

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

---

## **DISSERTATION**

Immunhistochemische Charakterisierung Endometriose-assoziiertes  
glatter Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen

---

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jessica Ricarda Gericke  
aus Potsdam

Datum der Promotion: 27.02.2015



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abstrakt .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Endometriose .....	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie der Endometriose .....	1
1.1.2 Einteilung und Klassifikation der Endometriose .....	2
1.1.3 Klinische Symptome der Endometriose .....	3
1.1.4 Pathomorphologie und Histologie der Endometriose .....	3
1.1.5 Diagnostik und Therapie der Endometriose .....	4
1.1.6 Ätiologie der Endometriose .....	5
1.2 Endometriose-assoziierte glatte Muskelzellen .....	8
1.2.1 Entwicklung und Differenzierung glatter Muskelzellen .....	8
1.2.2 Muskelzellmetaplasien in der Archimetra des Uterus.....	9
1.2.3 Muskelzellmarker zur Charakterisierung glatter Muskelzellen .....	11
1.2.4 Uterine Markermoleküle zur Charakterisierung glatter Muskelzellen .....	12
1.3 Stand der Forschung und Ableitung der Fragestellungen .....	13
<b>2 Materialien und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1 Beschreibung des Patientenkollektivs.....	19
2.2 Labormaterialien .....	21
2.2.1 Puffer .....	21
2.2.2 Geräte .....	21
2.2.3 Reagenzien, gebrauchsfertige Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	22
2.3 Materialgewinnung und Probenentnahme.....	24
2.4 Immunhistochemische Färbungen .....	25
2.4.1 Anfertigung von Gewebeschnitten .....	25
2.4.2 Entparaffinierung und Antigendemaskierung .....	25
2.4.3 Absättigung unspezifischer Bindungen .....	25
2.4.4 Verwendete Antikörper.....	25
2.4.5 Visualisierung der immunhistochemischen Färbung.....	27
2.4.6 Überprüfung der Spezifität der Färbung.....	27

2.5	Auswertung und Statistik.....	28
2.5.1	Mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	28
2.5.2	Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
3.1	Immunhistochemische Untersuchung des Muskelzellgehaltes in peritonealen Endometrioseläsionen.....	30
3.1.1	Vorkommen glatter Muskelzellen und Muskelzellgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen und gesunden peritonealen Gewebeproben.....	31
3.1.2	Lokalisation der glatten Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen ...	32
3.1.3	Untersuchungen des Muskelgehalts in peritonealen Endometrioseläsionen unterschiedlicher anatomischer Lokalisation.....	35
3.2	Expressionsanalyse der Muskelzellendifferenzierungsmarker in Endometriose-assoziiierter Muskulatur peritonealer Endometriose-läsionen.....	38
3.2.1	Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker in intrastromalen glatten Muskelzellen peritonealer Endometriose-läsionen .....	39
3.2.2	Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker in Stroma-assoziierten Muskelzellen peritonealer Endometriose-läsionen .....	41
3.2.3	Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker in der peripheren Muskulatur peritonealer Endometriose-läsionen .....	43
3.2.4	Möglicher Differenzierungsprozesses in Endometriose-assoziiierter glatter Muskulatur in peritonealen Endometriose-läsionen.....	45
3.3	Expressionsanalyse von sm-MHC, OTR und VPR in Endometriose-assoziiierter Muskulatur peritonealer Endometriose-läsionen.....	46
3.3.1	Expressionsanalyse von sm-MHC, OTR und VPR in intrastromalen Muskelzellen peritonealer Endometriose-läsionen .....	46
3.3.2	Expressionsanalyse von sm-MHC, OTR und VPR in Stroma-assoziierten Muskelzellen peritonealer Endometriose-läsionen .....	48
3.3.3	Expressionsanalyse von sm-MHC, OTR und VPR in den peripheren Muskelzellen peritonealer Endometriose-läsionen .....	50
3.3.4	Funktionalität Endometriose-assoziiierter glatter Muskulatur peritonealer Endometriose-läsionen.....	52
3.4	Muskelgehalt in peritonealen Endometriose-läsionen in Korrelation zum rASRM-Stadium der Erkrankung.....	54
3.5	Muskelgehalt in peritonealen Endometriose-läsionen in Korrelation zum hormonellen Zyklus der Patientinnen.....	55
3.6	Muskelgehalt in peritonealen Endometriose-läsionen in Korrelation zur hormonellen Therapie .....	56
3.7	Korrelation zwischen dem Muskelgehalt in peritonealen Endometriose-läsionen und dem Aktivitätsgrad des Endometrioseherdes .....	57

---

3.8	Korrelation zwischen dem Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen und dem Krankheitsverlauf der EM .....	58
3.9	Korrelation zwischen dem Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen und chronisch rezidivierenden Unterbauchschmerzen.....	59
3.10	Korrelation zwischen dem Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen und Dysmenorrhoe.....	61
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>62</b>
4.1	Vorkommen, Lokalisation und Gehalt glatter Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen.....	63
4.2	Muskelzelldifferenzierungs- und Muskelzellfunktionalitätsmarker in glatten Muskelzellen peritonealer Endometrioseläsionen .....	65
4.3	Genese der Endometriose-assoziierten glatten Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen.....	67
4.4	Bedeutung der EM-assoziierten glatten Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen.....	74
4.5	Ausblick.....	76
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>101</b>
9.1	Eidesstattliche Versicherung.....	101
9.2	Publikationsliste .....	102
9.3	Lebenslauf .....	103
9.4	Danksagung.....	104

---

**Abkürzungsverzeichnis**

AP	Alkalische Phosphatase
AM	Adenomyosis uteri
Cal	Caldesmon
COX-2	Cyclooxygenase-2
Des	Desmin
EM	Endometriose
FCS	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
IgG	Immunglobulin G
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
ISM	Intrastromale Muskelzellen
KG	Kontrollgruppe
LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin
MW	Mittelwert
NGF	Nerve Growth Factor
OT	Oxytocin
OTR	Oxytocinrezeptor
PGE2	Prostaglandin E2
PGF2 $\alpha$	Prostaglandin F2 $\alpha$
PM	Periphere Muskelzellen
rASRM	Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis
SAM	Stroma-assoziierte Muskelzellen
SF	Standardfehler
smActin	Alpha-Smooth Muscle Actin

sm-MHC	Smooth Muscle Myosin Heavy Chains
STAR	Steroidogen acute regulatory protein
TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Factor- $\beta$ 1
TIAR	"Tissue Injury and Repair"
VP	Vasopressin
VPR	V1a-Vasopressinrezeptor

---

## Abstrakt

### **Immunhistochemische Charakterisierung Endometriose-assoziiertes glatter Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen**

Einleitung: Endometriose ist eine gutartige, chronische, Östrogen-abhängige gynäkologische Erkrankung, von der viele Frauen im reproduktiven Alter betroffen sind. Die meisten Patientinnen leiden unter zyklusabhängigen Symptomen wie Dysmenorrhoe und Unterbauchschmerzen, wobei 50% von ihnen Langzeitbehandlungen wie z.B. wiederkehrende Operationen und/oder kontinuierliche Hormonbehandlungen benötigen. Die Entwicklung geeigneter Therapien wird solange nicht möglich sein, bis die Pathogenese der Endometriose, insbesondere die der Endometriose-assoziierten Schmerzentsstehung, vollständig geklärt ist. In diesem Zusammenhang stellen die glatten Muskelzellen in Endometrioseläsionen einen vielversprechenden Forschungsansatz dar. Glatte Muskelzellen treten häufig in Endometrioseläsionen auf und konnten bereits in peritonealen, ovarialen und tief-infiltrierenden Endometrioseherden nachgewiesen werden. Bis heute ist der Ursprung dieser Endometriose-assoziierten glatten Muskelzellen völlig ungeklärt. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass sie metaplastischen Ursprungs sind. Des Weiteren ist auch ihre biologische Funktionalität noch immer nicht vollständig bekannt. Aus diesem Grund wird der Differenzierungsgrad dieser Endometriose-assoziierten glatten Muskelzellen in der vorliegenden Studie näher untersucht.

Methoden: Es wurden Biopsien von peritonealen Endometrioseläsionen (n = 60) und gesunde Peritonealproben von Patientinnen ohne Endometriose (Kontrollgewebe, n = 10) gesammelt. Das Kontrollgewebe stammte aus Hysterektomien von Patientinnen ohne Endometriose oder Adenomyose. Im Rahmen der Studie wurden immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen Oxytocinrezeptoren (OTR), Vasopressinrezeptoren (VPR) und Smooth Muscle Myosin Heavy Chains (sm-MHC) durchgeführt. Zur Identifizierung glatter Muskelzellen und zur Untersuchung ihres Differenzierungsgrades kamen Antikörper gegen Smooth Muscle Actin (smActin), Desmin (Des) und Caldesmon (Cal) zur Anwendung.

Ergebnisse: Glatte Muskelzellen konnten in sämtlichen Endometrioseläsionen nachgewiesen werden. Der Muskelzellgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen



(38%) war signifikant höher als im Peritoneum von Frauen ohne Endometriose (6%;  $p < 0,001$ ). Die Endometriose-assoziierten glatten Muskelzellen zeigten verschiedene Differenzierungsgrade in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation zur Endometrioseläsion. Hierbei konnten intrastromale glatte Muskelzellen, Stroma-assoziierte glatte Muskelzellen und periphere Muskelzellen unterschieden werden. Im Vergleich zu intrastromalen und Stroma-assoziierten glatten Muskelzellen zeigten peripher gelegene Muskelzellen den höchsten Differenzierungsgrad ( $p < 0,001$ ). In Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsgrad wiesen die Muskelzellen den größten Gehalt des Muskelzellfunktionalitätsmarkers sm-MHC und der uterinen Markermoleküle OTR und VPR auf. OTR und VPR konnten nur in vollständig ausdifferenzierten glatten Muskelzellen nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung: Die vorliegende Studie gibt einen ersten Hinweis auf einen möglichen metaplastischen Ursprung der Endometriose-assoziierten glatten Muskelzellen. Der Nachweis von OTR und VPR legt die Hypothese nahe, dass Endometriose-assoziierte glatte Muskelzellen funktionell aktiv sein könnten und damit an der Entstehung von Endometriose-assoziierten Schmerzen beteiligt sind.

## Abstract

### **Immunohistochemical characterization of endometriosis-associated smooth muscle cells in human peritoneal Endometriotic lesions**

Introduction: Endometriosis is a benign, chronic, estrogen-dependent gynaecologic disease affecting millions of women of reproductive age. Most of the patients suffer from cycle-dependent symptoms, such as dysmenorrhoea and pelvic pain, whereby 50% of them require long-term treatment including recurring surgery and/or continuous hormonal treatment. Developing suitable healing options will not be feasible as long as the pathogenesis of endometriosis, especially the pathogenesis of pain generation, is not fully understood. In this perspective the smooth muscle cells in endometriotic lesions have become a promising research area. Smooth muscle cells are common components of endometriotic lesions and have been characterized previously in peritoneal, ovarian and deep infiltrating endometriotic lesions. To date, the origin of these endometriosis-associated smooth muscle cells is still unclear. However, there is some evidence that they are of metaplastic origin. Furthermore, their biological functionality is still not fully known. Therefore, this retrospective study aims for investigating the differentiation level among endometriosis-associated smooth muscle cells in peritoneal endometriotic lesions.

Methods: Biopsies from peritoneal endometriotic lesions (n = 60) and healthy peritoneum from patients without endometriosis (control tissue, n = 10) were obtained. The controls were hysterectomy specimens from patients without endometriosis or adenomyosis. An immunohistochemical examination of peritoneal specimens using antibodies against oxytocin receptor (OTR), vasopressin receptor (VPR) and smooth muscle myosin heavy chain (sm-MHC) was performed during this study. To identify smooth muscle cells and their level of differentiation, antibodies for smooth muscle actin (smActin), desmin (Des) and caldesmon (Cal) were used.

Results: Smooth muscle cells were detected in all endometriotic lesions. They were more abundant in the peritoneum of women with endometriosis (38%) compared with women without endometriosis (6%;  $p < 0,001$ ). Endometriosis-associated smooth muscle cells were differentiated based on their association with the endometriotic lesion. Intrastromal smooth muscle cells, stroma surrounding smooth muscle cells and peripheral smooth muscle cells could be distinguished. The peripheral smooth

muscle cells contained an increased number of differentiated cells compared with intrastromal and stroma surrounding smooth muscle cells ( $p < 0,001$ ). Depending on the level of differentiation, smooth muscle cells stained for sm-MHC, OTR and VPR. OTR and VPR were only detected in fully differentiated smooth muscle cells.

Conclusions: The present study provides first evidence for a possible metaplastic origin of endometriosis-associated smooth muscle cells. The identification of OTR and VPR leads to the hypothesis that endometriosis-associated smooth muscle cells might be functionally active and possibly involved in the generation of pain associated with endometriosis.

# 1 Einleitung

## 1.1 Endometriose

Im 19. Jahrhundert legte der Wiener Pathologe und Mitbegründer der Wiener Medizinischen Schule Carl Freiherr von Rokitansky vor der Gesellschaft der Ärzte den Bauchraum einer Frau frei, die jeden Monat extreme Menstruationsschmerzen hatte. Die Mediziner sahen Wucherungen der Gebärmutter Schleimhaut überall dort, wo sie nicht hingehörten - am Bauchfell, an der Blase und am Darm. Sie bezeichneten die Krankheit nach der Gebärmutter Schleimhaut, dem Endometrium, als Endometriose (EM) und ließen sie in die Liste der gynäkologischen Erkrankungen eintragen [1,2]. Diese Fallvorstellung von Carl Freiherr von Rokitansky ist eine der ersten bekannten Beschreibungen eines Krankheitsbildes, unter dessen Symptomen Frauen vermutlich schon seit Jahrhunderten leiden. Jedoch galten typische Symptome wie Dysmenorrhoe und Unterbauchbeschwerden lange als „normales Frauenleiden“ während der Menstruation, welche keiner weiteren Aufklärung bedurften. Seitdem das Krankheitsbild der EM erstmals beschrieben wurde, ist es Gegenstand intensiver Forschung. Dennoch ist die Pathogenese der EM, insbesondere der Pathomechanismus der EM-assoziierten Schmerzentstehung, bis heute nicht hinreichend geklärt. Das fehlende Verständnis der grundlegenden Pathomechanismen stellt ein erhebliches klinisches Problem dar. Die zur Verfügung stehenden Therapien sind rein symptomatisch und mit herkömmlichen therapeutischen Optionen kann oftmals keine ausreichende Analgesie erreicht werden. Die hohe Rezidivrate und die anhaltenden Beschwerden der Patientinnen spiegeln die Unzulänglichkeiten der derzeitigen Therapiekonzepte deutlich wider.

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie der Endometriose

Die EM ist als das Vorkommen von Endometrium-ähnlichem Gewebe außerhalb des Cavum uteri definiert [3-6]. Es handelt sich hierbei um eine gutartige, proliferative Erkrankung, die häufig mit einem chronischen Verlauf einhergeht. EM-Herde wachsen Östrogen-abhängig und treten insbesondere während der reproduktiven Lebensphase einer Frau auf [7]. Die EM zeichnet sich häufig durch ein infiltratives, organübergreifendes Wachstum aus, welches ausgedehnte Operationen erforderlich machen kann. Obwohl sie als benigne Erkrankung verstanden wird, teilt sie somit

einige Eigenschaften mit malignen Tumoren wie Invasivität und destruierendes Wachstum, Neoangiogenese sowie eine, auch nach operativer Sanierung, hohe Rezidivrate [8-10].

An EM leiden etwa 10 bis 15% aller Frauen im reproduktionsfähigen Alter [11]. Damit gehört sie zu den häufigsten gutartigen gynäkologischen Erkrankungen. Die genaue Prävalenz ist nicht bekannt, da dafür bei allen Frauen zur genauen Diagnostik eine Laparoskopie oder Laparotomie notwendig wäre [12,13]. Das typische Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der EM liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr [14]. Bei ca. 50% der EM-Patientinnen liegt ein anhaltender Therapiebedarf vor [15]. Die Rezidivraten liegen auch nach operativer und endokriner Therapie bei 50-80% und stellen damit ein großes Problem dar [16].

### **1.1.2 Einteilung und Klassifikation der Endometriose**

Entsprechend der Lokalisation wird die EM in drei verschiedene Formen eingeteilt:

- Endometriosis genitalis interna = Adenomyosis uteri (AM)
- Endometriosis genitalis externa
- Endometriosis extragenitalis.

Die Endometriosis genitalis interna zeichnet sich durch das Vorkommen von endometrialem Gewebe im Myometrium aus. Bei der Endometriosis genitalis externa sind hingegen die inneren weiblichen Geschlechtsorgane im kleinen Becken wie die Tuben, die Ovarien oder das Beckenperitoneum betroffen. Eine Endometriosis extragenitalis liegt vor, wenn beispielsweise der Darm, die Blase, die Scheide oder andere seltenere Lokalisationen wie die Lunge, das Gehirn oder Lymphknoten von EM-Läsionen befallen sind [17]. Die rectovaginale EM stellt hierbei eine Sonderform dar. Die am meisten verwendete Klassifikation zur klinischen und intraoperativen Klassifikation der Endometriosis genitalis externa ist die rASRM-Klassifikation der *American Society for Reproductive Medicine*. Dabei erfolgt eine intraoperative Beurteilung des Ausmaßes der Endometriosis genitalis externa mit Hilfe eines Punktesystems. Hiernach wird die Endometriosis genitalis externa in vier verschiedene Stadien eingeteilt, die anhand der Anzahl, der Oberflächenausdehnung in cm<sup>2</sup>, der Lokalisation der EM-Läsion im kleinen Becken (Ovar, Tube, Peritoneum) sowie der Infiltrationstiefe vorgenommen wird. Zudem gehen das Ausmaß von

netzartigen und dichten Adhäsionen sowie die Obliteration des Douglasraumes in die Bewertung ein. Der Befund wird mittels eines Punktesystems charakterisiert, wobei aus der ermittelten Punktzahl das Stadium der EM zugeordnet wird (I = gering, II = mäßig, III = schwer, IV = ausgedehnt). Diese Klassifikation geht nicht auf das Vorkommen weiterer EM-Manifestationsformen wie extragenitaler und tief-infiltrierender EM ein [18].

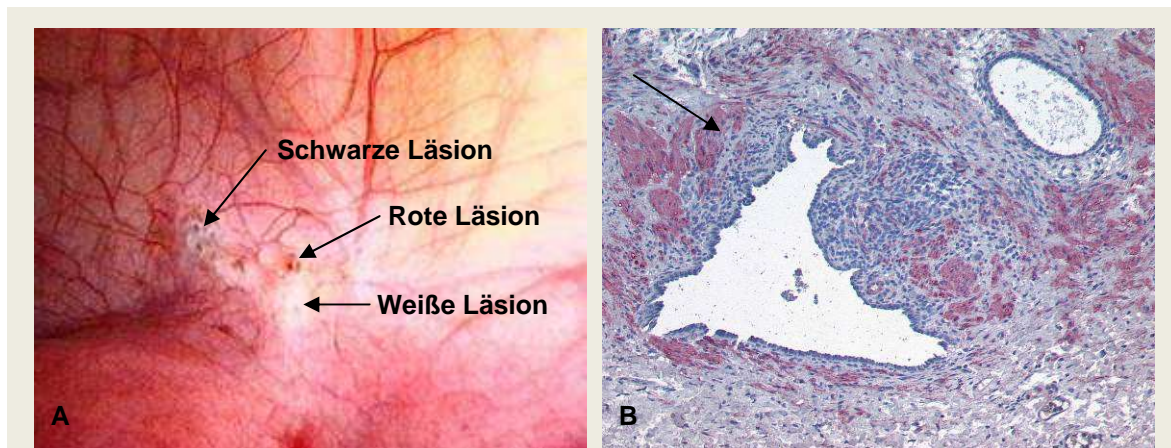
### **1.1.3 Klinische Symptome der Endometriose**

Die EM ist nicht nur im Hinblick auf ihre verschiedenen Ausbreitungsformen, sondern auch in Bezug auf das individuell unterschiedliche Beschwerdebild, ein sehr pleiomorphes Krankheitsbild [19]. Eine EM kann völlig asymptomatisch verlaufen und erst im Rahmen einer Infertilitätsabklärung diagnostiziert werden, aber auch starke Schmerzen hervorrufen. Die Beschwerden der Patientinnen variieren erheblich und korrelieren oftmals nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung [20]. Die klinischen Symptome der EM erscheinen zumeist mit der Menarche und verschwinden nach der Menopause wieder [7]. Im Vordergrund der Symptomatik stehen Schmerzen wie Dysmenorrhoe, chronisch rezidivierende zyklische und azyklische Unterbauchschmerzen, Dyspareunie und Dysurie oder Dyschezie. Ein weiteres schwerwichtiges Problem ist die EM-assoziierte Infertilität, von der bis zu 50% der an EM erkrankten Frauen betroffen sind [21]. Aufgrund der chronischen Schmerzen und der Infertilität ist die Lebensqualität der Patientinnen stark beeinträchtigt [22]. Nicht zu unterschätzen ist die seelische Belastung für die Frau in der Partnerschaft sowie im Alltags- und Arbeitsleben durch andauernde oder regelmäßig wiederkehrende Schmerzen bzw. einen unerfüllten Kinderwunsch. Damit hat die EM extreme menschliche, klinische und volkswirtschaftliche Relevanz [11].

### **1.1.4 Pathomorphologie und Histologie der Endometriose**

Bei der laparoskopischen Betrachtung können EM-Herde entsprechend ihrer Aktivität ein unterschiedliches morphologisches Erscheinungsbild aufweisen. Rote, braune und gelb-weiße Herde werden als aktiv angesehen und von weiß-narbigen, blauen oder schwarzen inaktiven Läsionen unterschieden [6]. Histologisch stützt sich die Diagnose einer EM auf den pathologischen Nachweis von Epithelzellen sowie Stromazellen und/oder Makrophagen [6]. Des Weiteren kommen häufig glatte

Muskelzellen in der unmittelbaren Umgebung von EM-Läsionen vor [3,23-25]. Abbildung 1.1 A zeigt das unterschiedliche makroskopische Erscheinungsbild einer peritonealen EM-Läsion [6]. In Abbildung 1.1 B ist eine peritoneale EM-Läsion mit den umgebenden glatten Muskelzellen in einer immunhistochemischen Färbung mit einem Antikörper gegen *Alpha-Smooth Muscle Actin* dargestellt [25].



**Abbildung 1.1:** Makroskopisches und mikroskopisches Erscheinungsbild einer peritonealen Endometriose. A: Peritonealendometriose (aus Ebert 2006). B: Endometriose-assoziierte glatte Muskelzellen in einer peritonealen EM-Läsion (Pfeil) (Vergrößerung 100-fach) (aus Mechsner et al. 2005).

### 1.1.5 Diagnostik und Therapie der Endometriose

Äußerst problematisch ist das lange Zeitintervall zwischen dem Auftreten erster Symptome bis zur Diagnosestellung, das im Mittel etwa sieben Jahre beträgt [26]. Die derzeit weltweit angewandte Standardmethode, um eine EM zu diagnostizieren, ist die Laparoskopie, bei der die Lokalisation und die Ausdehnung der EM-Läsionen erkannt werden können [14]. Im Rahmen der Laparoskopie werden für die histologische Diagnosesicherung Biopsien gewonnen und alle sichtbaren EM-Läsionen entfernt sowie Adhäsionen gelöst. Damit erfüllt die Laparoskopie nicht nur den Zweck der Diagnosestellung, sondern dient gleichzeitig als operative Therapie [6]. Jede Patientin sollte eine individuell gestaltete Therapie erhalten, bei der sowohl die jeweilige Schmerzsymptomatik als auch das Alter der Patientin und ein möglicherweise unerfüllter Kinderwunsch Berücksichtigung finden. Als Therapieoptionen stehen die operative und die medikamentöse Therapie der EM zur Verfügung. Goldstandard der operativen Therapie ist die Laparoskopie, deren Ziel neben der histologischen Diagnosesicherung die radikale Entfernung der EM-Läsionen ist. Dabei werden alle sichtbaren EM-Herde mittels Exzision, Koagulation

oder Laserbehandlung zerstört, Adhäsionen im Becken gelöst und die anatomischen Verhältnisse weitgehend wiederhergestellt [6,17]. Die medikamentöse Therapie der EM stellt keine Alternative zur operativen Behandlung dar, vielmehr bildet eine Kombination beider Verfahren in vielen Fällen die effektivste Therapiestrategie. Die Grundlage der hormonellen Therapie ist die Erkenntnis, dass EM-Läsionen für die Entstehung und ihren Fortbestand einen Östrogenstimulus benötigen und somit über einen Östrogenentzug eine „Austrocknung“ der östrogenabhängig wachsenden EM-Läsionen erreicht werden kann [6,27]. Dies führt zur Atrophie und bindegewebigen Vernarbung der Herde. Als medikamentöse Therapieoptionen stehen dafür u.a. Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga (GnRH-Analoga) und Gestagentherapien in Form von kombinierten oralen Kontrazeptiva oder Gestagenmonotherapien zur Verfügung [28,29]. Eine symptomatische Behandlung EM-assoziiierter Schmerzen wird bislang mit nicht-steroidalen Antiphlogistika vorgenommen. Bei unzureichender Analgesie können Koanalgetika wie trizyklische Antidepressiva und Antikonvulsiva ergänzend eingesetzt werden [27,30,31].

### 1.1.6 Ätiologie der Endometriose

Es gibt viele Erklärungsversuche zur Ursache der EM. Es sind verschiedene Theorien entwickelt worden, zu denen u.a. die Transplantationstheorie von J.A. Sampson, die Metaplasietheorie von R. Meyer, die Immuntheorie, die *Endometriotic Disease Theory* von Ph. Koninckx sowie das jüngst entwickelte „*Tissue Injury And Repair Concept*“ von G. Leyendecker und Kollegen gehören. Dennoch existiert bis heute kein befriedigendes Konzept zur Erklärung des Pathomechanismus der EM, welches die Ätiologie aller Formen dieser Erkrankung hinreichend erklären kann. Die EM scheint auf einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren wie genetischen und morphologischen Voraussetzungen, hormonellen und immunologischen Mechanismen, auto- und parakrinen Einflüssen sowie vermutlich noch einigen weiteren bislang unbekanntem Faktoren zu beruhen [6].

Die Transplantationstheorie von J.A. Sampson ist die derzeit am weitesten akzeptierte Theorie zur Erklärung der Ätiologie der EM. Laut dieser Theorie ist die Ursache der Erkrankung auf eine retrograde Menstruation zurückzuführen, bei der Gebärmutter-schleimhaut während der Menstruation durch die Tuben in die Peritonealhöhle verschleppt wird [32]. Das Vorkommen einer retrograden



Menstruation ist jedoch ein physiologisches Phänomen und betrifft etwa 90% aller Frauen [33-36]. Da aber nicht alle Frauen mit retrograder Menstruation auch eine EM entwickeln, kann dieses Phänomen die Pathogenese der EM allein nicht ausreichend erklären [37,38].

Die Metaplasie-Theorie von R. Meyer sieht den Ursprung der EM in undifferenzierten Zölomepithelzellen, die unter dem Einfluss verschiedener Stimuli wie hormonellen Einflüssen, Wachstumsfaktoren, Inflammationsreizen oder mechanischen Alterationen, eine metaplastische Umwandlung in Zellen mit endometriumartiger Differenzierung vollziehen [6,39]. Mit der Metaplasie-Theorie lässt sich auch die Existenz extraperitonealer EM-Herde erklären, die nicht durch retrograde Menstruation entstanden sein können, sondern möglicherweise aus einer Metaplasie von Überresten der Müller'schen Gänge ihren Ursprung nehmen [35,36].

Die Immuntheorie führt die Entstehung der EM auf eine unzureichende Abwehrreaktion zurück. Retrograd menstruierte Endometriumzellen werden durch die humorale und zelluläre Immunabwehr nicht erkannt, nicht abgebaut und nicht in ihrer Implantationskapazität gehemmt [6]. Eine niedrige natürliche Killerzell-Aktivität im Plasma und in der Peritonealflüssigkeit bei Frauen mit EM unterstützt die immunologische These der EM-Entstehung [12,40].

Die *Endometriotic Disease Theory* von Ph. Koninckx besagt, dass genetisch veränderte Endometriumzellen aggressivere biologische Eigenschaften, wie Invasivität, Proliferation, Migration und Angiogenese, erhalten und damit zur Manifestation der EM beitragen [6,41]. So erklärt sich aus seiner Sicht, warum einige Frauen an EM erkranken und andere nicht.

Die jüngst entwickelte Theorie zur Erklärung der Pathogenese der EM ist das „*Tissue Injury And Repair Concept*“ von G. Leyendecker und Kollegen. Es stellt eine Weiterentwicklung der Transplantationstheorie von J. Sampson dar. Diesem Konzept zufolge entwickelt sich der Uterus aus dem Zusammenspiel der Gewebe der Archimetra und der Neometra [29,42]. Bei EM-Patientinnen kommt es durch eine Hyperperistaltik des Uterus zu einer Mikrotraumatisierung der Basalis [24]. Daraufhin werden Reparaturmechanismen im Gewebe in Gang gesetzt, die als „*Tissue Injury and Repair*“ (TIAR) bezeichnet werden. Die Abbildung 1.2 zeigt eine schematische Darstellung der Mechanismen des TIAR [42].

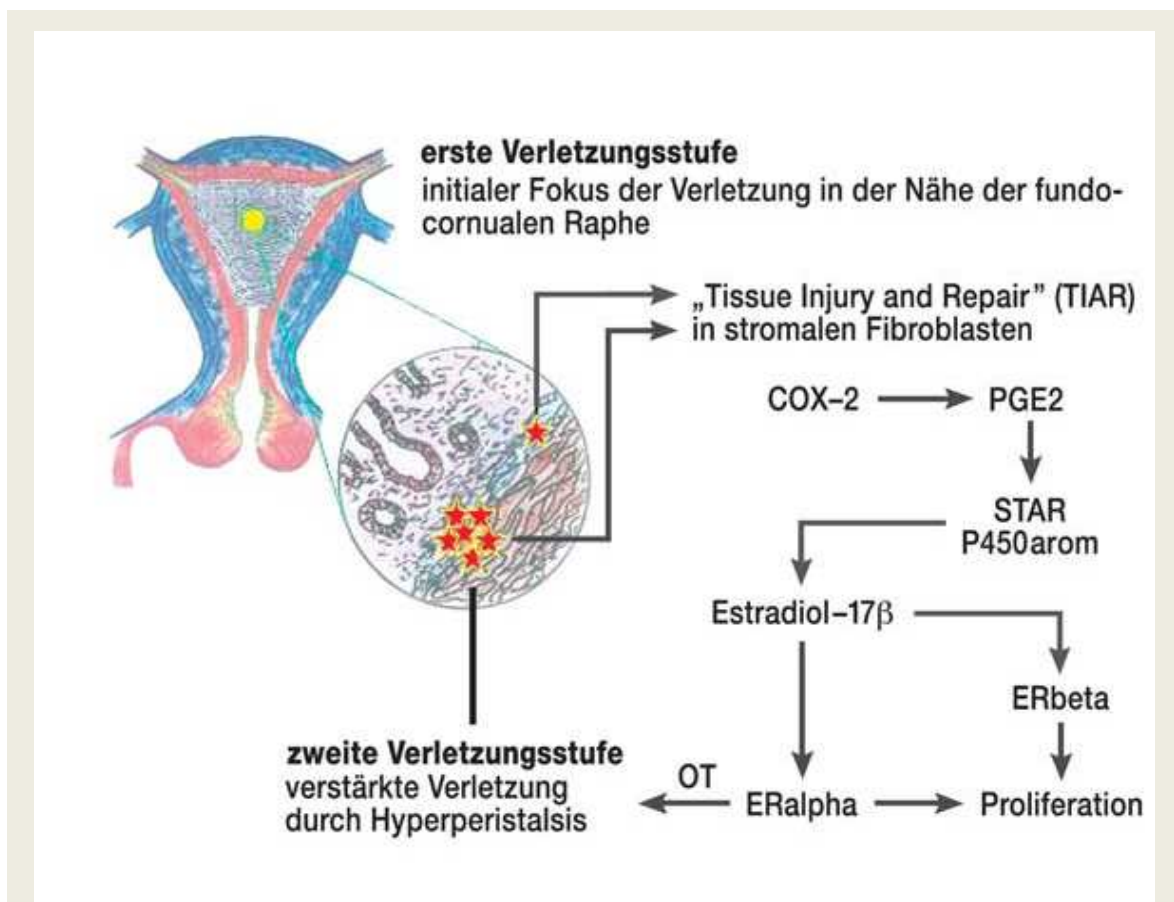


Abbildung 1.2: „Tissue Injury and Repair“ (aus Leyendecker et al. 2009).

In der ersten Verletzungsstufe kommt es durch eine uterine Hyperperistaltik zu Mikrotraumen im Bereich der fundocornualen Raphe des Uterus. Daraufhin setzen Reparaturvorgänge im Bereich der Basalis des Endometriums ein (TIAR). Bei der Gewebeschädigung kommt es zur Synthese von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), welches die Hochregulation der Cyclooxygenase-2 (COX-2) mit konsekutiver Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)-Biosynthese bewirkt. PGE<sub>2</sub> aktiviert das *steroidogen acute regulatory protein* (STAR) und die P450-Aromatase. Die uterine P450-Aromatase-Überexpression katalysiert die Umwandlung von Präkursor-Androgenen zu Östrogen. Der lokale Hyperöstrogenismus forciert die uterine Hyper- und Dysperistaltik und bedingt damit im Sinne eines Circulus vitiosus eine weitere Mikrotraumatisierung mit Desquamation und Dislokation von basalem Endometrium über die Tuben in den Bauchraum (Leyendecker et al. 2009; Halis et al. 2010).

Im Rahmen der Reparaturmechanismen kommt es durch eine Hochregulation der Aromatase zu einer vermehrten lokalen Östrogenproduktion. Der basale Hyperöstrogenismus führt zu einer erhöhten Transkription von Oxytocin-mRNA und bedingt damit im Sinne eines Circulus vitiosus eine uterine Hyperperistaltik mit konsekutiver Entwicklung von Mikroläsionen in der Epithel-Mesenchym-Muskel-Übergangszone, was eine Dislokation von Zellen der Zona basalis zur Folge hat [42]. Durch transtubales Verschleppen gelangen die endometrialen Gewebsfragmente in

die Bauchhöhle. Sie besitzen Stammzellcharakter, so dass sich EM-Läsionen mit Komponenten des primordialen Uterus (endometriales Epithel, Stroma und glatte Muskelzellen) ausbilden können [42]. Passend zu der Theorie von G. Leyendecker und Kollegen konnte nachgewiesen werden, dass bei Frauen mit EM die Desquamation basalen Endometriums verstärkt ist, so dass bei 80% von ihnen Basalisfragmente im Menstrualblut gefunden werden konnten [24,43]. Des Weiteren wurde in mehreren Studien eine uterine Hyper- bzw. Dysperistaltik bei Frauen mit EM gezeigt [44-47]. Die Östrogenspiegel im Menstrualblut bei EM-Patientinnen sind im Vergleich zu krankheitsfreien Frauen und zum peripheren Blut erhöht [42,48]. Ebenso ist die Expression von P450-Aromatase im eutopen und ektopen Endometrium von Frauen mit EM erhöht [42,49-51], womit das Konzept von G. Leyendecker unterstützt wird.

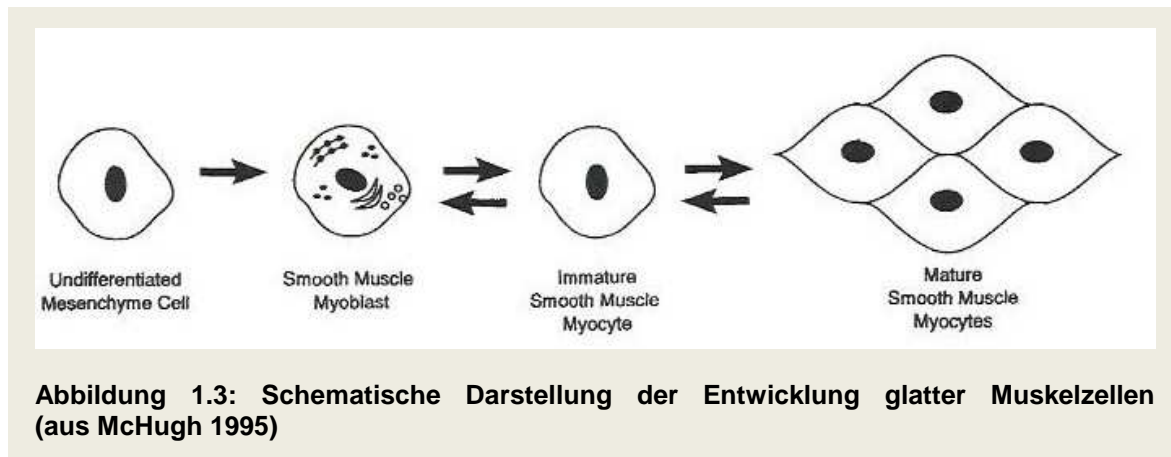
## **1.2 Endometriose-assoziierte glatte Muskelzellen**

Nicht nur im Hinblick auf die noch weitgehend unbekannt Pathogenese der EM-Läsionen, sondern auch hinsichtlich des Pathomechanismus der EM-assoziierten Schmerzentstehung, stellen die glatten Muskelzellen in EM-Läsionen einen interessanten neuen Forschungsaspekt dar. Obwohl sie in vielen EM-Manifestationsformen vorkommen [3,24,25,52-56], wurde ihnen lange Zeit wenig Beachtung geschenkt. Bis heute ist der Ursprung dieser EM-assoziierten glatten Muskelzellen noch völlig ungeklärt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass glatte Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen einen erheblichen Anteil der EM-Herde ausmachen können [25]. Des Weiteren gibt es erste Hinweise darauf, dass die glatten Muskelzellen in EM-Läsionen eine funktionelle Aktivität besitzen und damit möglicherweise am Pathomechanismus der EM-assoziierten Schmerzentstehung beteiligt sind [25].

### **1.2.1 Entwicklung und Differenzierung glatter Muskelzellen**

Die Entwicklung glatter Muskelzellen nimmt in undifferenzierten Mesenchymzellen ihren Ursprung. Hierbei handelt es sich um pluripotente embryonale Bindegewebszellen, die sich zu verschiedenen Bindegewebszellen differenzieren können. Es ist bekannt, dass *Transforming Growth Factor-β1* (TGF-β1) die Expression von *Alpha-Smooth Muscle Actin* in Fibroblasten stimuliert und damit

deren Differenzierung in Myofibroblasten bewirkt [57]. Myofibroblasten stellen eine Zwischenform zwischen Fibroblast und glatter Muskelzelle dar. Sie exprimieren bereits den Muskelzellmarker *Alpha-Smooth Muscle Actin* [58,59]. Im weiteren Entwicklungsprozess entstehen unreife glatte Muskelzellen, die sich letztlich zu Bündeln reifer glatter Muskelzellen organisieren. Abbildung 1.3 zeigt eine schematische Darstellung der Entwicklung glatter Muskelzellen [60].

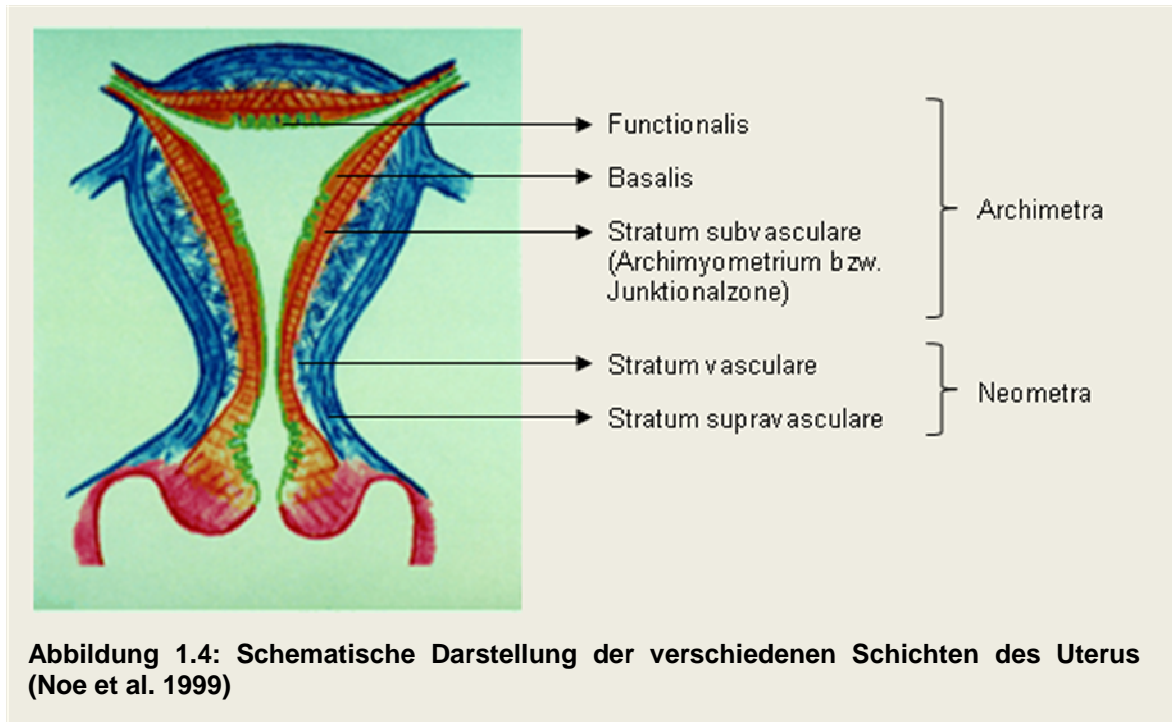


Im Rahmen der Differenzierung zu ausgereiften glatten Muskelzellen vollziehen die Zellen eine Transformation, die eine Expression von immer mehr Muskel-spezifischen Proteinen bzw. sogenannten Muskelzellmarkern nach sich zieht [61,62].

### 1.2.2 Muskelzellmetaplasien in der Archimetra des Uterus

Das Potenzial zur Entwicklung glatter Muskelfasern ist nicht nur während der Embryogenese, sondern auch im adulten Uterus ein spezifisches Potenzial des basalen Stromas [63-66]. Der primordiale Uterus bildet sich ontogenetisch durch Fusion der beiden Müller'schen Gänge, wobei die Muskelschicht des primordiales Uterus durch eine Metaplasie aus dem basalen Endometrium entsteht [43]. Im subendometrialen Myometrium des fetalen Uterus sind undifferenzierte Mesenchymzellen lokalisiert, aus denen eine Differenzierung in Myofibroblasten und weiter zu glatten Muskelzellen stattfindet [67,68]. Auch im adulten Uterus konnten in ultrastrukturellen Analysen in der endometrialen-myometrialen Übergangszone Muskelzellmetaplasien nachgewiesen werden [64,68]. Die Übergangszone zwischen dem endometrialen Stroma und dem subendometrialen Myometrium (Archimyometrium) wird auch als Junktionalzone bezeichnet und vom äußeren

Myometrium abgegrenzt [64,69-71]. Abbildung 1.4 zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Schichten des Uterus [65].



Im nicht-graviden Uterus finden die uterinen Kontraktionen überwiegend im subendometrialen Myometrium statt [47,72,73]. Interessanterweise kann in diesem Bereich unter dem Einfluss ovarieller Hormone eine Metaplasie von endometrialen Stromazellen zu glatten Muskelzellen stattfinden [64,74]. So sieht G. Leyendecker die Archimetra als adulte Repräsentanz des fetalen primordialen Uterus. Seiner Ansicht nach besitzt disloziertes basales Endometrium das Potenzial zur Reaktivierung embryonaler Wachstumsprozesse, die zur Bildung der kompletten Organstruktur eines ektopen primordialen Uterus führen kann [43].

Da EM-Läsionen möglicherweise ihren Ursprung aus uterinen Gewebsfragmenten mit Stammzellcharakter nehmen [43] und in Untersuchungen bereits Muskelzellmetaplasien in der Junktionalzone des Uterus beschrieben wurden [64,74], sollen in der vorliegenden Arbeit immunhistochemische Muskelzelldifferenzierungs- und Muskelzellfunktionalitätsanalysen in EM-assoziierten glatten Muskelzellen durchgeführt werden. Dazu wurden verschiedene Muskelzelldifferenzierungsmarker und uterine Markermoleküle ausgewählt, die im Folgenden näher beschrieben werden:

### 1.2.3 Muskelzellmarker zur Charakterisierung glatter Muskelzellen

Mit dem Verfahren der Immunhistochemie ist es heute möglich, glatte Muskelzellen zu identifizieren sowie ihren Differenzierungs- und Funktionalitätsgrad mit Hilfe von Muskelzellmarkern zu untersuchen und damit eine immunhistochemische Charakterisierung vorzunehmen. Als besonders geeignete Marker zur Identifizierung glatter Muskelzellen und zur Charakterisierung ihres Differenzierungs- und Funktionalitätsgrades haben sich u.a. Antikörper gegen *Alpha-Smooth Muscle Actin*, Desmin, Caldesmon und *Smooth Muscle Myosin Heavy Chains* etabliert.

Bei *Alpha-Smooth Muscle Actin* (smActin) handelt es sich um einen Muskelzellmarker, der sehr früh im Prozess der Muskelzelldifferenzierung exprimiert wird [60,61]. Es wird auch schon in der frühen Phase der Muskelzellentwicklung von Myofibroblasten exprimiert [58,59,75]. SmActin ist ein kontraktiles Mikrofilament in glatten Muskelzellen [76]. Es ist in sämtlichen glatten Muskelzellen vorhanden [77] und kann zu deren Identifizierung herangezogen werden. SmActin ist ein Marker sowohl für reife und als auch für unreife glatte Muskelzellen [58,78].

Desmin und Caldesmon hingegen sind Muskelzellmarker [79], die erst später im Laufe der Differenzierung glatter Muskelzellen nachweisbar werden [58,61]. Antikörper gegen Desmin und Caldesmon können somit als Muskelzelldifferenzierungsmarker betrachtet werden.

Bei Desmin (Des) handelt es sich um ein Typ 3-Intermediärfilament in glatten Muskelzellen und somit ein Element des Zytoskeletts. Während die glatten Muskelzellen in großen Gefäßwänden überwiegend Vimentin als Intermediärfilament enthalten, ist das Intermediärfilament in glatten Muskelzellen kleiner Gefäße sowie in den Wänden des Gastrointestinaltrakts und in uterinen glatten Muskelzellen vorwiegend Desmin [58]. Desmin ist ein sensitiver Marker für den Nachweis von differenzierten glatten Muskelzellen [58,80,81].

Caldesmon (Cal) ist ebenfalls ein sehr sensitiver und sehr spezifischer Muskelzelldifferenzierungsmarker. Es werden zwei Isoformen von Caldesmon unterschieden: H-Caldesmon und I-Caldesmon [82]. H-Caldesmon wird in differenzierten glatten Muskelzellen exprimiert [83], während I-Caldesmon in unreifen und auch in nicht-muskulären Geweben vorkommt [58]. Das in dieser Arbeit

verwendete H-Caldesmon wird erst spät im Differenzierungsprozess in glatten Muskelzellen nachweisbar [61] und ist ein sensitiver und spezifischer Marker für ausdifferenzierte glatte Muskelzellen [81,84,85]. Es wird nicht in Myofibroblasten exprimiert.

Bei *Smooth Muscle Myosin Heavy Chains* (sm-MHC) handelt es sich um einen Bestandteil des Myosins in glatten Muskelzellen, welches eine wichtige Komponente des kontraktiven Systems dieser Zellen darstellt. Das Myosin-Molekül liegt als Hexamer vor und besteht aus zwei schweren Ketten (MHC) und zwei Paaren leichter Ketten (MLC) [58,86]. Die Funktionalität einer glatten Muskelzelle korreliert mit ihrem Gehalt an *Smooth Muscle Myosin*-Isoformen [87]. Somit kann sm-MHC als Funktionalitätsmarker für glatte Muskelzellen angesehen werden. Es wurden bisher noch keine Myofibroblasten beschrieben, die sm-MHC exprimieren [57,77].

#### **1.2.4 Uterine Markermoleküle zur Charakterisierung glatter Muskelzellen**

Oxytocinrezeptoren und Vasopressinrezeptoren sind Markermoleküle für uterine glatte Muskelzellen. Beide Rezeptorsysteme werden im Myometrium des graviden und nicht-graviden Uterus exprimiert [88,89]. Oxytocin (OT) und Vasopressin (VP) sind potente Uterotonika und an der Koordination von uterinen Kontraktionsabläufen involviert, im nicht-graviden Uterus insbesondere im subendometrialen Myometrium [46,72,88,90].

Der Oxytocinrezeptor (OTR) gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und wird durch eine Inositoltriphosphat-Proteinkinase C-Kaskade aktiviert. OTR wird im Endometrium sowie im Myometrium des Uterus exprimiert [91-93]. Im Endometrium wird OTR zyklusabhängig in den Epithelzellen exprimiert [25,94]. Im Myometrium wird OTR zyklusunabhängig in allen Wandschichten exprimiert [56]. Im Myometrium schwangerer Frauen existiert eine hohe Expression von OTR, die bis zum Ende der Schwangerschaft steigt [95]. Das Peptidhormon OT vermittelt seine Effekte über den OTR [96]. Im graviden Uterus führt OT gegen Ende der Schwangerschaft sowie unter der Geburt zur Auslösung der Wehentätigkeit. Nach der Schwangerschaft führt es zur Kontraktion der myoepithelialen Zellen in der Brustdrüse und regt damit die Milchsekretion an [97,98]. Auch im nicht-graviden Uterus ist OT an der Regulation uteriner Kontraktionen beteiligt [46]. OT scheint

zudem für die Regulation der Synthese des Prostaglandins  $F2_{\alpha}$  ( $PGF2_{\alpha}$ ) von endometrialen Zellen zuständig zu sein [99-101].  $PGF2_{\alpha}$  ist zum einen uteroton wirksam, zum anderen ein bekannter Koaktivator von Nozizeptoren und dient somit als Schmerzmediator. Der OTR konnte auch bereits in den Epithelzellen peritonealer EM-Läsionen sowie in den umgebenden EM-assoziierten glatten Muskelzellen nachgewiesen werden [25]. Dies und die hypothetische OTR-vermittelte Induktion der  $PGF2_{\alpha}$ -Synthese in Epithelzellen von EM-Läsionen deuten auf eine Beteiligung des OTR-Systems an der Entwicklung von EM-assoziierten Symptomen wie Dysmenorrhoe und Unterbauchschmerzen hin.

Der V1a-Vasopressinrezeptor (VPR) gehört ebenfalls zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. VPR vermittelt die Wirkung des Peptidhormons VP am Uterus [96]. VPR wird ebenfalls in allen Wandschichten des Myometriums exprimiert [56]. Es stimuliert uterine Kontraktionen im graviden und nicht-graviden Uterus [88,102,103].

Studien haben gezeigt, dass OT und VP auch eine Rolle in der Pathogenese der Dysmenorrhoe zu spielen scheinen [103,104]. Dabei wird ein Ungleichgewicht zwischen den uteroton wirksamen OT, VP und Prostaglandinen und dem vasodilatativ wirkenden Prostacyclin diskutiert, wodurch die Muskelkontraktion gegenüber der Vasodilatation überwiegt und es zu einem ischämischen Schmerz kommt. Passend dazu konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die peripheren OT- und VP-Spiegel bei Frauen mit Dysmenorrhoe erhöht sind [96]. Atosiban®, ein OT- und VP-1a-Rezeptor-Antagonist, erwies sich interessanterweise bereits in der Behandlung der Dysmenorrhoe als effektiv [105,106].

### **1.3 Stand der Forschung und Ableitung der Fragestellungen**

#### **• *Vorkommen und Morphologie Endometriose-assoziiertes glatter Muskelzellen***

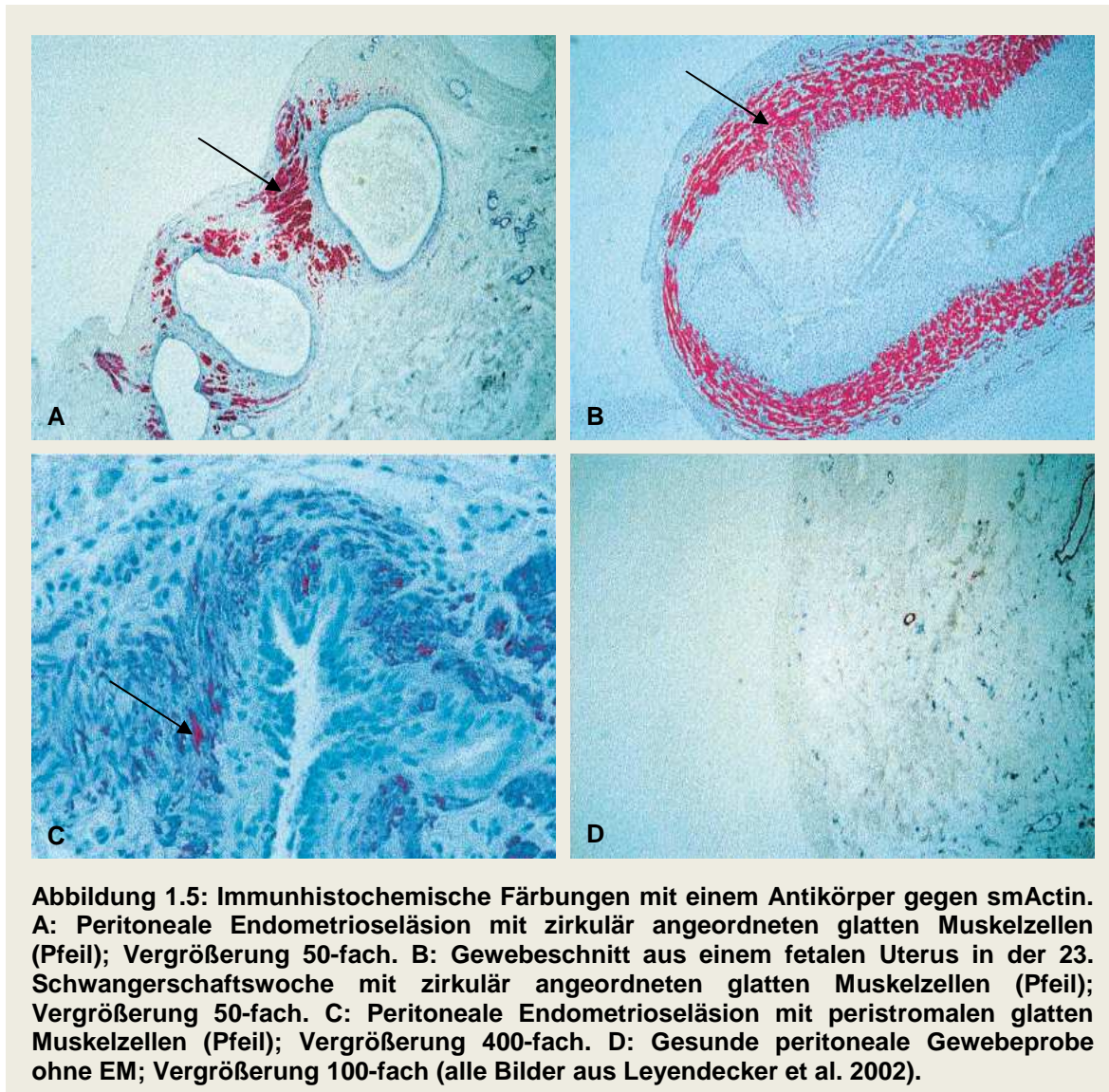
EM-assoziierte glatte Muskelzellen wurden lange Zeit nicht als Endometriosekomponenten definiert, da sich glatte Muskelzellen in der gängigen Hämatoxylin-Eosin-Färbung schlecht von dem angrenzenden fibroadipösen Bindegewebe differenzieren. Somit wurde den EM-assoziierten glatten Muskelzellen lange Zeit keine Beachtung geschenkt. Sie wurden jedoch schon vor vielen Jahren in histo-morphologischen Untersuchungen beschrieben. Bereits im Jahr 1942 schrieb



De Snoo in seinem Kapitel über die Müller'schen Gänge im Handbuch der vergleichenden Anatomie eine ausführliche Abhandlung über die EM-assoziierten glatten Muskelzellen [107]. Schon damals bemerkte er, dass sich die ektopen Gewebe bei der EM in der typischen Anordnung mit Drüsen und zytogenem Stroma innen und der zirkulären Anordnung der Muskelzellen außen herum entwickelten. Diese morphologische Ähnlichkeit veranlasste De Snoo bei ektopen endometrialen Läsionen von „Äquivalenten der Uterushöhle“ bzw. micro-primordialen Uteri zu sprechen [43]. De Snoo vermutete, dass sie in multipotenten, noch undifferenzierten Zellen der Müller'schen Gänge ihren Ursprung nehmen, die einerseits über die Fähigkeit verfügen, Muskel-, Drüsen- und zytogenes Gewebe zu bilden, andererseits aber auch die Potenz haben, diese Gewebe in regelmäßiger Weise anzuordnen [107]. Das Verfahren der Immunhistochemie ermöglicht es, die EM-assoziierten glatten Muskelzellen in vielen verschiedenen Formen der EM darzustellen. Immunhistochemisch lassen sich glatte Muskelzellen in peritonealen [3,24,25], ovariellen [25,52] und in tief infiltrierenden EM-Läsionen [54] darstellen. Auch in Adenomyosis uteri [56] und in extragenitalen Bauchdeckenendometriosen [53,55] wurden derartige glatte Muskelzellen nachgewiesen. Es zeigte sich, dass EM-assoziierte Muskelzellen einen erheblichen Teil der EM-Herde ausmachen können [25]. Zudem zeigten Mechsner et al. 2005 erstmals, dass die EM-assoziierten glatten Muskelzellen neben Östrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren auch OTR exprimieren [25]. Interessanterweise fanden sich OTR-positive glatte Muskelzellen nicht nur in unmittelbarer Umgebung der EM-Läsion, sondern auch vereinzelt zwischen den Stromazellen. Diese zwischen den Stromazellen liegenden OTR-positiven Zellen konnten mittels Anti-smActin als glatte Muskelzellen identifiziert werden, die in direktem Kontakt mit den Stromazellen liegen bzw. von diesen umgeben sind.

Auch Leyendecker und Kollegen führten immunhistochemische Untersuchungen an peritonealen EM-Läsionen mit einem Antikörper gegen smActin durch. Die Abbildung 1.5 zeigt die immunhistochemisch mit Anti-smActin gefärbten Gewebeschnitte [24]. Leyendecker und Kollegen beobachteten die morphologisch zirkuläre Anordnung der Komponenten (endometriales Epithel, Stroma und glatte Muskelzellen) der EM-Herde und verglichen die morphologische Anordnung der glatten Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen (Abbildung 1.5 A und C) mit denen eines fetalen

primordialen Uterus in der 23. Schwangerschaftswoche (Abbildung 1.5 B). Dabei bemerkten sie die beachtlichen morphologischen Gemeinsamkeiten der Gewebe. In einer mit Anti-smActin gefärbten gesunden Peritonealprobe (Abbildung 1.5 D) hingegen konnte ein Vorkommen glatter Muskelzellen nur in den darin liegenden Gefäßwänden gesehen werden.



Eine weitere immunhistochemische Charakterisierung der EM-assoziierten glatten Muskelzellen mit Muskelzelldifferenzierungsmarkern wie Desmin und Caldesmon sowie mit Muskelzellfunktionalitätsmarkern und uterinen Markermolekülen liegt bislang nicht vor. Eine Untersuchung mit solchen Markern könnte erste Hinweise auf einen möglichen Muskelzelldifferenzierungsprozess in EM-Läsionen und eine potenzielle funktionelle Aktivität dieser Muskelzellen liefern.

---

- ***Verschiedene Theorien zur Genese Endometriose-assoziiertes glatter Muskelzellen***

Die Genese der EM-assoziierten glatten Muskelzellen ist noch ungeklärt. Es werden bislang drei verschiedene Theorien diskutiert. Zum einen gibt es Hinweise darauf, dass die EM-assoziierten glatten Muskelzellen durch eine Muskelzellmetaplasie aus pluripotenten Vorläuferzellen bzw. endometrialen Stromazellen entstehen [3,24,25,108].

Zum anderen wird die Möglichkeit diskutiert, dass EM-assoziierte glatte Muskelzellen ihren Ursprung in einer Reaktivierung von Residuen der Zölomepithelzellen nehmen [3,25,107]. Grundlage dieser Hypothese ist die Metaplasietheorie, der die Vorstellung zugrunde liegt, dass sich EM-Läsionen aus persistierenden zölomhaltigen Epithelzellen differenzieren [109]. Diese Zölomepithelzellen werden auch als sogenanntes „sekundäres Müller`sches System“ bezeichnet [110]. Dabei handelt es sich um mesotheliale Zellen, welche die ovarielle Oberfläche und das pelvine Peritoneum bedecken [111]. Der metaplastischen Theorie zufolge haben die Zellen die Fähigkeit behalten, Strukturen der Müller`schen Gänge zu duplizieren [112]. Eine solche peritoneale Muskelzellmetaplasie aus Zölomepithelzellen wurde auch schon in der Pathogenese der Leiomyomatosis peritonealis disseminata beschrieben [3,113].

Eine weitere Hypothese zur Erklärung der Genese EM-assoziiertes glatter Muskelzellen ist ihre Entstehung aus einer metaplastischen Reaktion des umliegenden fibroadipösen Bindegewebes. Das Auftreten solcher metaplastischer Prozesse im Peritoneum wurde bereits im Rahmen von Langzeitanwendungen peritonealer Dialysen beschrieben, die oftmals über eine epithelial-mesenchymale Transformation zur Fibrose des Peritoneums führen können [114,115]. Allen drei Theorien ist eine Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten gemeinsam, welche sich letztlich über eine Expression von smActin zu glatten Muskelzellen ausdifferenzieren können [116].

Das Vorkommen eines solchen Muskelzelldifferenzierungsprozesses von EM-assoziierten Muskelzellen in EM-Läsionen ist noch nicht untersucht worden.

---

- ***Erklärungsansätze zum Pathomechanismus der Endometriose-assoziierten Schmerzentstehung***

Der Pathomechanismus der EM-assoziierten Schmerzentstehung ist noch weitestgehend ungeklärt. Die Schmerzsymptomatik der Patientinnen korreliert nicht mit dem Schweregrad bzw. dem Stadium der EM [117-119]. Es können zwar Rückschlüsse hinsichtlich der Art der Schmerzen auf die EM-Manifestationsform gezogen werden, aber die Symptome der einzelnen Formen überlappen sich auch, wodurch das Verständnis der Schmerzgenese erschwert wird. Es ist bekannt, dass peritoneale EM-Läsionen an der Pathogenese EM-assoziiierter Beschwerden wie Unterbauchschmerzen und Dysmenorrhoe beteiligt sind. Sie sind metabolisch aktiv und sezernieren eine Reihe von Schmerzmediatoren wie z.B. Prostaglandine, wodurch peritoneale Nozizeptoren aktiviert werden [120,121]. EM-assoziierte Schmerzen können zum einen durch Adhäsionen sowie Invasion und Destruktion benachbarter Strukturen verursacht werden. Zum anderen können die Schmerzen aber auch durch die mit der EM verbundene Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes entstehen [108]. Zudem konnten sensible Nervenfasern in enger topographischer Lokalisation zu peritonealen EM-Läsionen nachgewiesen werden [122,123]. Mit dieser Erkenntnis ist es wahrscheinlich geworden, dass neben der inflammatorischen, nociceptiven Schmerzkomponente auch ein neuropathischer Schmerzcharakter eine Rolle im Pathomechanismus der EM-assoziierten Schmerzentstehung spielen könnte. Interessanterweise traten sensible Nervenfasern insbesondere bei Patientinnen mit starken Schmerzen vermehrt auf, wobei die Schmerzsymptomatik nach operativer Sanierung der EM-Herde signifikant reduziert werden konnte [124].

Welche weiteren Komponenten eine Rolle in der Pathogenese EM-assoziiierter Schmerzen spielen, ist noch offen. Es gibt Hinweise darauf, dass auch die EM-assoziierten glatten Muskelzellen an diesem Pathomechanismus beteiligt sind [25].

Ausgehend von dem aktuellen Stand der Forschung hat die vorliegende Arbeit die folgenden Ziele und Fragestellungen:

- I. Immunhistochemische Untersuchung des Vorkommens glatter Muskelzellen sowie des Muskelzellgehalts in peritonealen EM-Läsionen.

- II.** Gibt es einen Unterschied zwischen dem Muskelzellgehalt in peritonealen EM-Herden und in gesunden Gewebeproben sowie zwischen EM-Läsionen unterschiedlicher peritonealer Lokalisation?
- III.** Immunhistochemische Charakterisierung der EM-assoziierten glatten Muskelzellen mit dem Muskelzellmarker smActin und den Muskelzelldifferenzierungsmarkern Desmin und Caldesmon.
- IV.** Immunhistochemische Charakterisierung der EM-assoziierten glatten Muskelzellen mit den uterinen Markermolekülen OTR und VPR sowie dem Muskelzellfunktionalitätsmarker sm-MHC.
- V.** Welche Rückschlüsse erlauben die gewonnenen Daten dieser Studie hinsichtlich der Genese der EM-assoziierten glatten Muskelzellen und einer möglichen Beteiligung dieser Muskelzellen an dem Pathomechanismus EM-assoziiierter Schmerzen?
- VI.** Korreliert der Muskelzellgehalt in peritonealen EM-Läsionen mit klinischen Aspekten wie dem rASRM-Stadium der Erkrankung, dem Aktivitätsgrad der EM-Läsion, der hormonellen Zyklusphase oder der Einnahme von Hormonen und beeinflusst der bisherige Krankheitsverlauf den Muskelzellgehalt in peritonealen EM-Läsionen?
- VII.** Korreliert der Muskelzellgehalt in peritonealen EM-Läsionen mit dem Auftreten von chronisch rezidivierenden Unterbauchschmerzen oder Dysmenorrhoe im untersuchten Patientinnenkollektiv?

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Um die topographische Beziehung zwischen EM-Läsionen und glatten Muskelzellen näher zu charakterisieren, wurden 60 peritoneale EM-Läsionen auf deren Lokalisation sowie Differenzierungs- und Funktionalitätsgrad immunhistochemisch untersucht. Des Weiteren wurden 10 gesunde Peritonealproben von Patientinnen ohne EM oder AM immunhistochemisch analysiert. Die untersuchten EM-Proben stammten von 60 Patientinnen im Alter von 19 bis 47 Jahren, die zur Diagnosesicherung der EM oder aufgrund von EM-assoziierten Beschwerden wie Unterbauchschmerzen, Dysmenorrhoe, Dysurie, Dyschezie, Dyspareunie und Infertilität laparoskopiert oder laparotomiert wurden. Die in dieser Studie untersuchten Gewebeproben wurden gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin gewonnen. Für die Studie liegt ein Ethikvotum vor. Die Patientinnen gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Die Patientinnen wurden zwischen Juni 2001 und Juli 2007 in der Klinik für Gynäkologie & Hochschulambulanz der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, operiert. Alle Frauen waren zum Zeitpunkt der Operation prämenopausal. Patientinnen mit zusätzlich malignen Tumoren wurden von der Probenentnahme ausgeschlossen. Die Patientinnen stellten sich in der Endometriosesprechstunde der gynäkologischen Hochschulambulanz des Campus Benjamin Franklin vor und füllten routinemäßig einen Fragebogen aus. Hieraus wurden die klinischen Daten der Patientinnen bezüglich Alter, Endometriosesymptomatik, letzter Menstruation und Therapie erhoben. Die jeweiligen Zyklusphasen wurden durch Korrelation des angegebenen Datums der letzten Menstruation und dem histologischen Befund des Endometriums ermittelt. Die Stadieneinteilung der EM wurde nach der Klassifikation der *American Society of Reproductive Medicine* (rASRM) vorgenommen. Demnach befanden sich 23 (38%) Patientinnen im rASRM-Stadium I, 19 (32%) im rASRM-Stadium II, 13 (22%) im rASRM-Stadium III und 5 (8%) Frauen waren im rASRM-Stadium IV. Innerhalb des Patientinnenkollektivs zeigten 97% der Frauen typische Endometriosebeschwerden, wobei 88% über Dysmenorrhoe und 87% über chronische Unterbauchschmerzen

klagten. Des Weiteren litten 62% der Frauen unter Dyspareunie, 25% hatten eine Dysurie und 27% der Frauen beklagten eine Dyschezie. 38 (63%) Frauen hatten einen regulären Menstruationszyklus und nahmen bis mindestens 2 Monate vor der Operation keine Hormonpräparate ein. 22 (37%) Patientinnen standen unter Hormontherapie. 35 (58%) Patientinnen durchliefen bereits eine oder mehrere Endometrioseoperationen, bei 22 (37%) Frauen handelte es sich um die Erstdiagnose der Erkrankung. Bei 3 Patientinnen ließ sich hierzu keine Aussage treffen. Tabelle 2.1 zeigt eine Übersicht der klinischen Daten der Endometriosepatientinnen dieser Studie.

**Tabelle 2.1: Übersicht der klinischen Daten der Endometriosepatientinnen.**

Peritoneale Endometrioseläsionen		(n = 60)
Alter (Mittelwert)		33
rASRM-Stadium	I	23
	II	19
	III	13
	IV	5
Zyklusphase	Proliferationsphase	16
	Sekretionsphase	16
	Menses	4
	Dysfunktionelle Blutungen	2
Hormoneinnahme	Keine	38
	Orale Kontrazeptiva	17
	GnRH-Analoga	5
Krankheitsverlauf	Erstdiagnose	22
	Rezidiv	35

## 2.2 Labormaterialien

### 2.2.1 Puffer

- 50 mM Tris Puffer pH 7,4-7,6 (5L)
  - 34,25 g Trizma<sup>®</sup> HCl
  - 4 g Trizma<sup>®</sup> Base
  - 43,9 g NaCl
  - Auffüllen auf 5 l mit Aqua destillata.

Die pH-Einstellung erfolgte mit HCl / NaOH.

- 10 mM Citratpuffer pH 6,0

Lösung A: 0,1 M Zitronensäure (21,01 g in 1000 ml Aqua destillata)

Lösung B: 0,1 M NaCitrat (29,41 g in 1000 ml Aqua destillata)

18 ml Lösung A und 82 ml Lösung B ad 1000 ml Aqua destillata.

### 2.2.2 Geräte

Geräte	Hersteller
Accu Jet (Pipettierhilfe)	Brand, Wertheim
Analysenwaage Navigator TM	Ohaus, Giessen
Axiovert 25 Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Bidestanlage GFL 2102	GFL, Burgwedel
Canon PowerShot G5	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Eiswürfelbereiter Scotsman Frimont AF 80	Scotsman Industries, Vernon Hills, Illinois, USA
Gefrierschrank Premium - 20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Heizschrank	Heraeus, Hanau
Kühlschrank 4 °C	Bosch, Gerlingen
Magnetrührer mit Heizplatte KMO 2 basic	Janke & Kunkel Labortechnik, Staufen
Magnetrührer MR 2002	Heidolph, Schwabach



Geräte	Hersteller
Mikrotom HM 400R	MICROM International GmbH, Walldorf
Mikrowellengerät NN-E205W	Panasonic, Kadoma, Osaka, Japan
Multi Gourmet (Dampfgarer)	Braun, Kronberg im Taunus
pH-Meter pH 300	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Pipetus (Pipettierhilfe)	Hirschmann Laborgeräte
Präzisionswaage 2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Spülmaschine	Gilowy GmbH & Co, Berlin
Stopuhr Model No. SKT338N	Roth, Meiningen
Tissue cool plate COP 20	Medite Medizintechnik, Burgdorf
Trockenschrank	Ehret, Emmendingen
Vortex (Genie 2)	Scientific Industries, Darmstadt

### 2.2.3 Reagenzien, gebrauchsfertige Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Reagenz, Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aceton	J.T. Baker, Deventer, Holland
Dako <sup>®</sup> Antibody Diluent with Background Reducing Components	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Dako <sup>®</sup> Biotin Blocking System	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Dako <sup>®</sup> LSAB + System, AP, Code No. K0689	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Dako <sup>®</sup> Pen	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Derma Clean, nichtsterile Einmal- Untersuchungshandschuhe	Ansell, München

Reagenz, Verbrauchsmaterial	Hersteller
Eppendorf T.I.P.S., verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Ethanol (70%)	Merck, Darmstadt
Ethanol (80%)	Merck, Darmstadt
Ethanol (90%)	Merck, Darmstadt
Ethanol (96%) reinst	Merck, Darmstadt
Falcon Serologische Pipetten 10 ml, 25 ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ USA
Falcon Tubes 25 und 50 ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ USA
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Fuchsin Substrate-Chromogen-System	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Plastipur <sup>®</sup> sterile Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Mayers Hämaunlösung	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl) min 99,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Objektträger SuperFrost <sup>®</sup> Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Neenah, WI, USA
Pasteur Pipetten	Brand GmbH + Co, Wertheim
Reaktionsgefäße	Brand GmbH + Co, Wertheim
Salzsäure	Merck, Darmstadt

Reagenz, Verbrauchsmaterial	Hersteller
Streptavidin-AP conjugate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Trizma <sup>®</sup> Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma <sup>®</sup> Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

### 2.3 Materialgewinnung und Probenentnahme

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden peritoneale EM-Läsionen (n = 60) und Gewebeproben aus dem Peritoneum gesunder Frauen (n = 10) entnommen, in 4%iger Formalinlösung für 12 Stunden fixiert und im Institut für Pathologie der Charité-Campus Benjamin Franklin in Paraffin eingebettet. Von den 60 peritonealen EM-Proben waren 16 (27%) Läsionen im Blasenperitoneum lokalisiert, 14 (23%) Herde befanden sich am Ligamentum sacrouterinum, 11 (18%) Proben wurden dem Douglasperitoneum entnommen, 10 (17%) Proben stammten aus der Fossa ovarica und 4 (7%) Läsionen lagen im Bereich des Beckenwandperitoneums. 5 (8%) Gewebeproben wurden an anderen Stellen des Peritoneums entnommen. 38 (63%) Gewebeproben konnten als typische schwarze bzw. weißlich vernarbte EM-Läsionen eingeordnet werden, 3 (5%) Gewebeproben erschienen als rote, aktive EM-Herde und 19 (32%) EM-Läsionen wurden hinsichtlich ihres morphologischen Erscheinungsbildes nicht näher klassifiziert. Die gesunden Peritonealproben stammten aus Hysterektomien von unterschiedlichen Lokalisationen des Peritoneums. Die tiefste Ebene aller Peritonealbiopsien war das subperitoneale Fettgewebe.

## **2.4 Immunhistochemische Färbungen**

### **2.4.1 Anfertigung von Gewebeschnitten**

Von den Paraffinblöcken wurden mit dem Mikrotom (HM 400R Microm GmbH, Walldorf) 1 µm dicke Serienschnitte angefertigt, auf „Super Frost Plus“ – Objektträger (Menzel-Gläser) aufgebracht und der Reihenfolge nach durchnummeriert. Diese Schnitte wurden über Nacht bei 37°C getrocknet und konnten mehrere Wochen bei 4°C im Kühlschrank gelagert oder sofort für die immunhistochemische Färbung verwendet werden.

### **2.4.2 Entparaffinierung und Antigendemaskierung**

Nachdem die Schnitte über Nacht bei 37°C vollständig getrocknet waren, wurden sie vor der Weiterverarbeitung zur optimalen Anhaftung am Objektträger für mindestens zwei bis maximal 16 Stunden bei 60°C inkubiert. Zur Entfernung des Paraffins wurden die Objektträger anschließend nachfolgender Prozedur unterzogen: Eintauchen der Schnitte für 5 Minuten in Xylol, anschließend nochmals 5 Minuten in neuem Xylol, dann 10 Minuten in 100% Aceton und abschließend 10 Minuten in Aceton/Tris-Puffer (1:1). Danach folgte ein Verweilen der Schnitte für 10 Minuten in Tris-Puffer zur Rehydrierung. Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Schnitte in Küvetten gestellt und zur Antigendemaskierung bei 95°C in einem Dampfgargerät erwärmt. Dies erfolgte bei einem pH-Wert von 6 in 10 mM Citratpuffer. Anschließend kühlten die Schnitte 20 Minuten in der jeweiligen Lösung auf Eis ab, bevor dann mit der immunhistochemischen Färbung fortgefahren werden konnte.

### **2.4.3 Absättigung unspezifischer Bindungen**

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte mit fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurde lediglich überschüssiges FCS vom Objektträger abgeklopft.

### **2.4.4 Verwendete Antikörper**

Die Immunhistochemie erfolgte nach der Avidin-Biotin-Methode. Nach Absättigung unspezifischer Bindungen wurde der jeweilige Primärantikörper aufgetragen und für

eine Stunde bei Raumtemperatur im geschlossenen Färbekasten inkubiert, um ein Austrocknen der Gewebeschnitte zu vermeiden. Alle verwendeten Antikörper wurden direkt vor dem Auftragen mit Antibody Diluent with Background Reducing Components (DakoCytomation) verdünnt und die Lösung mit einem Vortexgerät gut durchmischt. Der optimale Verdünnungsgrad wurde vorab in Färbereihen mit verschiedenen Verdünnungen ermittelt. Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

**Tabelle 2.2: Verwendete Primärantikörper.**

Primärantikörper	gerichtet gegen Spezies	Hersteller	Verdünnung
Monoclonal Mouse Smooth Muscle Actin (Clone 1A4)	Mensch	DakoCytomation	1:50
Monoclonal Mouse Desmin (Clone D33)	Mensch	DakoCytomation	1:50
Monoclonal Mouse Caldesmon-h-CD	Mensch	DakoCytomation	1:50
Monoclonal Mouse Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (Clone SMMS-1)	Mensch	DakoCytomation	1:50
Polyclonal Goat Oxytocin Receptor (C-20)	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	1:50
Polyclonal Goat Vasopressin (AVP) Receptor V1a (C-20)	Mensch	Santa Cruz Biotechnology	1:100

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte gründlich mit Tris Puffer gespült und der jeweilige Sekundärantikörper aufgetragen. Die verwendeten Sekundärantikörper sind in Tabelle 2.3 angegeben. Für den Nachweis von OTR und VPR wurden die Gewebeschnitte mit einem biotinylierten Rabbit-anti-Goat Immunglobulin (IgG) (DakoCytomation) in einer Verdünnung von 1:400 für ebenfalls 40 Minuten inkubiert und anschließend mit Tris Puffer gespült. Im nachfolgenden Schritt kam Streptavidin-Alkalische Phosphatase (AP)-Conjugate

(Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:400 zum Einsatz, das wiederum 40 Minuten einwirkte. Auch hier wurde nach Ablauf der Einwirkzeit eine gründliche Spülung mit Tris Puffer vorgenommen. Zum Nachweis von smActin, Des, Cal und sm-MHC kam die sogenannte Labeled-Streptavidin-Biotin (LSAB)-Methode zum Einsatz. Hierbei wurden die Schnitte nach Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper jeweils 15 Minuten mit einem biotinylierten Brückenantikörper (Biotinylated Link Universal, DakoCytomation) und einem mit alkalischer Phosphatase markierten Streptavidin (Streptavidin-AP, DakoCytomation) inkubiert. Nach beiden Schritten wurden die Gewebeschnitte jeweils gründlich mit Tris Puffer gespült.

**Tabelle 2.3: Verwendete Sekundärantikörper.**

Sekundärantikörper	gerichtet gegen Spezies	Hersteller	Verdünnung
Biotin-SP-konjugiertes IgG	Rabbit-anti-Goat	DakoCytomation	1:400
LSAB + System-AP	Anti-Rabbit, anti-Mouse, anti-Goat	DakoCytomation	

#### 2.4.5 Visualisierung der immunhistochemischen Färbung

Im folgenden Schritt wurden die gebundenen Antikörper mit dem Fuchsin Substrate-Chromogen System (DakoCytomation) visualisiert. Die Einwirkzeit des aktivierten Fuchsin betrug 15 Minuten. Abschließend wurde die Färbereaktion mit Aqua destillata gestoppt. Im Anschluss an eine 25 Sekunden dauernde Gegenfärbung mit Mayers Hämalanlösung (Merck Darmstadt) wurden die Schnitte unter laufendem Wasser gespült und im letzten Schritt mit erwärmter Glyceringelantine (Kaisers Glyceringelantine, Merck Darmstadt) und Deckgläsern (Menzel-Gläser) eingedeckelt.

#### 2.4.6 Überprüfung der Spezifität der Färbung

Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse infolge unspezifischer Antikörperbindung wurden Negativkontrollen bei jedem Färbegang durchgeführt. Dazu wurde der Primärantikörper durch Tris Puffer ersetzt. Des Weiteren wurden in allen Färbegängen Positivkontrollen mitgeführt. Als Gewebekontrollen für den Nachweis

der Muskelzellmarker smActin, Desmin, Caldesmon und sm-MHC dienten Gewebeschnitte eines Uterus myomatosus, welche keine pathologischen Hinweise für eine EM oder AM aufwiesen. Zum Nachweis von OTR und VPR dienten Gewebeschnitte eines schwangeren Uterus als Positivkontrolle.

## **2.5 Auswertung und Statistik**

### **2.5.1 Mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen**

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mikroskopisch mit einem Carl Zeiss Axiovert 25 Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen) in verschiedenen Vergrößerungen beurteilt (25x bis 400x). Dabei wurden die Gewebeschnitte in mehreren Durchgängen zu verschiedenen Zeitpunkten mindestens zweimal begutachtet und bewertet. Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurden nur Schnitte berücksichtigt, die sowohl endometriale Drüsen- als auch Stromazellen enthielten (60 Proben), also den gängigen pathologischen Kriterien einer EM entsprachen. Aus jedem der 60 Gewebepreparate wurde eine EM-Läsion mit der EM-assoziierten Muskulatur zur mikroskopischen Begutachtung herangezogen. Bei der mikroskopischen Auswertung wurden innerhalb der EM-assoziierten Muskulatur drei verschiedene Areale unterschieden: die intrastromalen Muskelzellen, die Stroma-assoziierten Muskelzellen sowie die periphere Muskulatur. Diese drei Bereiche wurden jeweils getrennt beurteilt und hinsichtlich des prozentualen Gehaltes angefärbter Muskelzellen sowie anhand der Intensität der Färbereaktion bewertet.

Für die mikroskopische Auswertung der Serienschnitte wurde eine EM-Läsion mit ihrer Umgebung abskizziert und in den verschiedenen Färbungen zur semiquantitativen Auswertung herangezogen. Die Färbung wurde entsprechend dem prozentualen Anteil angefärbter glatter Muskelzellen in folgender Prozentskala bewertet: 0%, 1-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%. Diese Skala wurde anschließend in ein Punktesystem überführt, bei dem 0% keinem Punkt entspricht, 1-10% = 1 Punkt, 10-20% = 2 Punkte, 20-30% = 3 Punkte, 30-40% = 4 Punkte, 40-50% = 5 Punkte, 50-60% = 6 Punkte, 60-70% = 7 Punkte, 70-80% = 8 Punkte, 80-90% = 9 Punkte und 90-100% = 10 Punkte.

Des Weiteren wurde die Intensität der Färbereaktion mit einem Score mit 0 für keine, 1 für schwache, 2 für mäßige und 3 für starke Anfärbung bewertet. Da die Intensität

der Färbung in den einzelnen Färbedurchgängen jeweils unterschiedlich ausfiel, wurde die Bewertung immer innerhalb eines Durchgangs im Verhältnis zur Färbung der Positivkontrolle durchgeführt.

### **2.5.2 Statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen**

Die im Rahmen der mikroskopischen Auswertung gewonnenen Daten wurden mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 4 für Windows (GraphPad Software, 2003, San Diego, CA, USA) statistisch analysiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte (MW) mit Standardfehler (SF) angegeben. Zur Signifikanzprüfung kamen verschiedene statistische Testverfahren zur Anwendung. Es wurden folgende Signifikanzgrenzen festgelegt:  $p < 0,001$  = hoch signifikant,  $p < 0,01$  = sehr signifikant,  $p < 0,05$  = signifikant,  $p > 0,05$  = nicht signifikant.

Als nichtparametrischer Test für zwei unabhängige Variablen kam der Mann-Whitney Test zur Anwendung. Zum Vergleich mehrerer unabhängiger Variablen wurde der Kruskal-Wallis Test mit anschließendem *Post Hoc* Test nach Dunn (*Dunn`s Multiple Comparison Test*) durchgeführt. Waren mehrere Gruppen zu vergleichen, wurden die Daten nach Überprüfung auf Normalverteilung der zweifaktoriellen Varianzanalyse (Two-way ANOVA) mit einem Signifikanzniveau von 95% unterzogen. Anschließend erfolgte mittels des *Post Hoc* Tests nach Bonferroni (*Bonferroni Multiple Comparison Test*) ein paarweiser Datenvergleich.

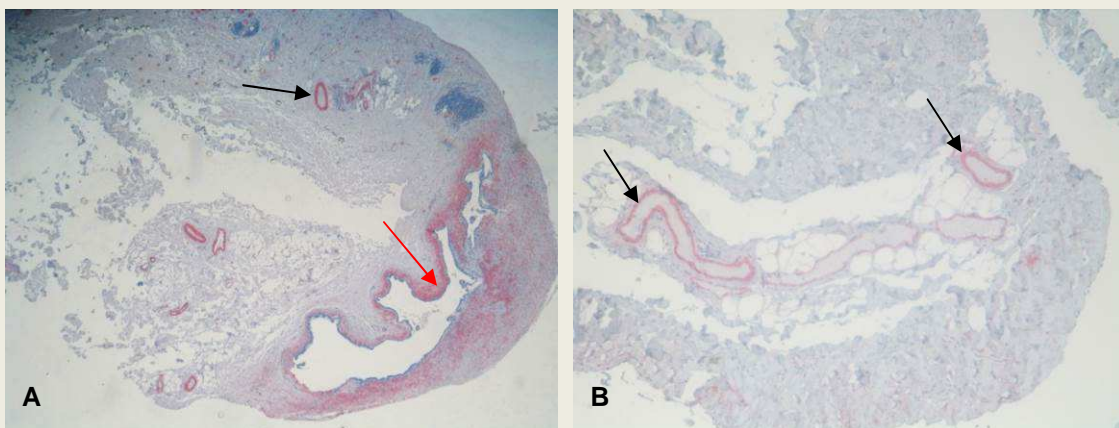


### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Immunhistochemische Untersuchung des Muskelzellgehaltes in peritonealen Endometrioseläsionen

Im ersten Schritt dieser Arbeit sollten das Vorkommen und der Muskelzellgehalt in peritonealen EM-Läsionen untersucht werden. Dazu wurden peritoneale EM-Läsionen (n = 60) und gesunde Peritonealproben von Frauen ohne EM (Kontrollgruppe; n = 10) immunhistochemisch mittels eines Antikörpers gegen smActin gefärbt und hinsichtlich des Vorkommens glatter Muskelzellen und des Gehaltes an glatter Muskulatur mikroskopisch beurteilt. Hierbei wurde der Muskelzellgehalt in der gesamten Gewebeprobe ermittelt. Glatte Muskelzellen in Gefäßwänden wurden nicht mit in die Betrachtung einbezogen.

Abbildung 3.1 A zeigt exemplarisch einen peritonealen EM-Herd aus dem Bereich des Blasenperitoneums mit der umgebenden smActin-positiven EM-assoziierten glatten Muskulatur (roter Pfeil). Ebenfalls smActin-positiv zeigen sich vereinzelte glatte Muskelzellen in Gefäßwänden (schwarzer Pfeil). In Abbildung 3.1 B ist ein Gewebeschnitt aus der Kontrollgruppe (KG) dargestellt. Die darin enthaltenen glatten Muskelzellen sind ausschließlich Gefäßwänden zuzuordnen (schwarze Pfeile). Es lassen sich jedoch keine glatten Muskelzellen in dem Peritonealgewebe darstellen.



**Abbildung 3.1:** Immunhistochemische Untersuchungen von glatten Muskelzellen in peritonealen Gewebeproben. A: EM: Peritoneale Endometrioseläsion mit smActin-positiven Endometriose-assoziierten glatten Muskelzellen (roter Pfeil) sowie glatten Muskelzellen in Gefäßwänden (schwarzer Pfeil) (Vergrößerung 25-fach). B: Gesundes Peritoneum mit smActin-positiven glatten Muskelzellen in Gefäßwänden (schwarze Pfeile) (Vergrößerung 25-fach).

### 3.1.1 Vorkommen glatter Muskelzellen und Muskelzellgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen und gesunden peritonealen Gewebeproben

In der mikroskopischen Auswertung der Gewebeschnitte zeigte sich, dass in allen (100%) EM-Gewebeproben glatte Muskelzellen nachgewiesen werden konnten. In der Kontrollgruppe fanden sich hingegen in nur 30% der Präparate glatte Muskelzellen. Bei der statistischen Analyse der Daten erwies sich die Anzahl Muskel-positiver Gewebeproben unter den EM-Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe im Mann-Whitney Test als statistisch hoch signifikant ( $p < 0,001$ ; Abbildung 3.2). Die peritonealen EM-Läsionen enthielten somit signifikant häufiger glatte Muskelzellen, als das anatomisch vergleichbare gesunde Peritonealgewebe.

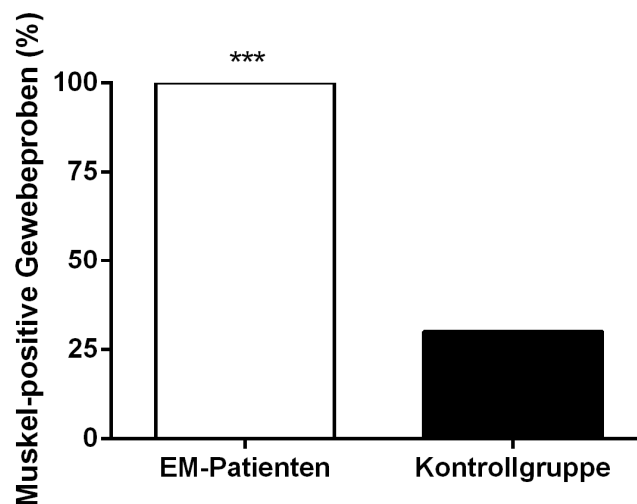
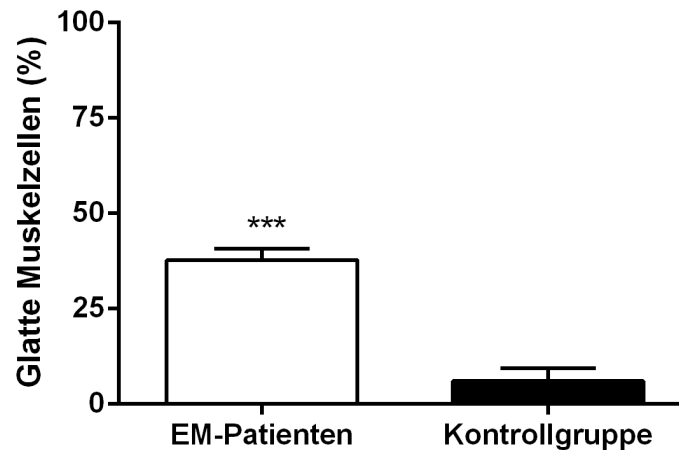


Abbildung 3.2: Muskel-positive Gewebeproben bei Endometriosepatientinnen. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils Muskel-positiver Gewebeproben bei Endometriosepatientinnen sowie in der Kontrollgruppe. EM:  $n = 60$ , KG:  $n = 10$ ; Mann-Whitney Test \*\*\*  $p < 0,001$ .

Im nächsten Schritt wurde der prozentuale Anteil glatter Muskelzellen in den EM-Proben und in den gesunden peritonealen Gewebeproben untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die peritonealen Gewebeproben der EM-Patientinnen nicht nur signifikant häufiger glatte Muskelzellen enthalten, sondern auch eine signifikant höhere Anzahl davon. In den Gewebeproben der EM-Patientinnen fanden sich durchschnittlich  $38 \pm 2,29\%$  glatte Muskelzellen, während das peritoneale Gewebe gesunder Frauen durchschnittlich nur  $6 \pm 0,87\%$  glatte Muskulatur enthielt.

Im Mann-Whitney Test erwies sich der Unterschied des Muskelzellgehaltes zwischen peritonealem EM-Gewebe und gesundem Kontrollgewebe als statistisch hoch signifikant ( $p < 0,001$ ; Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: Glatte Muskelzellgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes glatter Muskelzellen bei EM-Patientinnen sowie in der Kontrollgruppe. EM:  $n = 60$ , KG:  $n = 10$ ; Mann-Whitney Test \*\*\*  $p < 0,001$ .

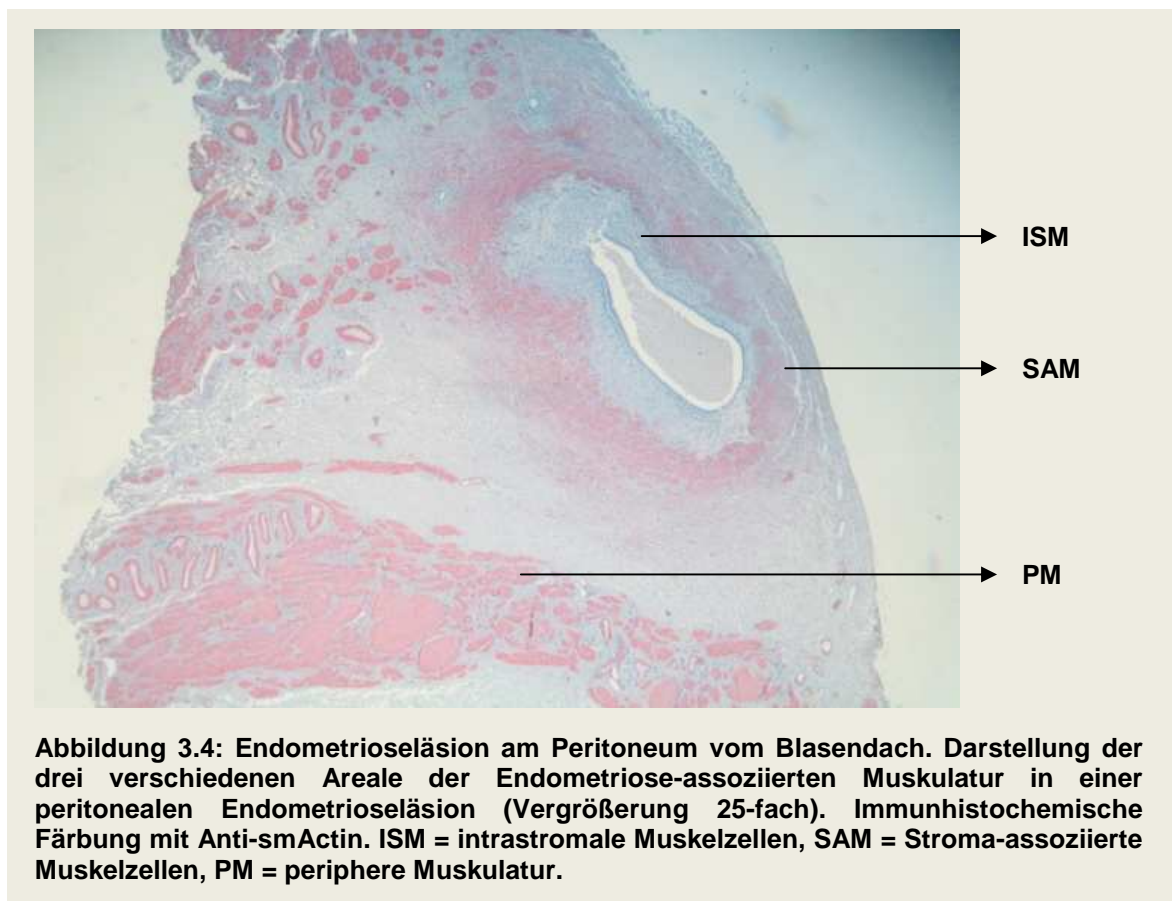
### 3.1.2 Lokalisation der glatten Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen

In allen untersuchten EM-Läsionen der 60 peritonealen EM-Herde waren glatte Muskelzellen mit Hilfe des Muskelzellmarkers smActin nachweisbar und dies mit einem durchschnittlichen Muskelzellgehalt von 38% sogar in beachtlicher Menge. Daher stellte sich nun im nächsten Schritt die Frage, in welchen Bereichen der EM-Herde die glatten Muskelzellen lokalisiert sind.

Bei der mikroskopischen Betrachtung der Lokalisation der glatten Muskelzellen in den peritonealen EM-Läsionen fiel auf, dass die Muskelzellen sehr häufig zirkulär um den EM-Herd angeordnet sind und sich die Muskulatur in Abhängigkeit von der morphologischen Beziehung zur EM-Läsion in verschiedene Areale untergliedern lässt. So wurde im nächsten Schritt dieser immunhistochemischen Analyse der Muskelgehalt in drei verschiedenen Arealen der Gewebeproben analysiert, die hinsichtlich ihrer Beziehung zur EM-Läsion wie folgt definiert wurden:

- intrastromale Muskelzellen (ISM), die zwischen den Stromazellen lokalisiert sind
- Stroma-assoziierte Muskulatur (SAM), die unmittelbar an das Stroma angrenzt und die EM-Läsion zirkulär umgibt
- Muskulatur in der Peripherie (PM), die mindestens 10 mm von der EM-Läsion entfernt lokalisiert ist.

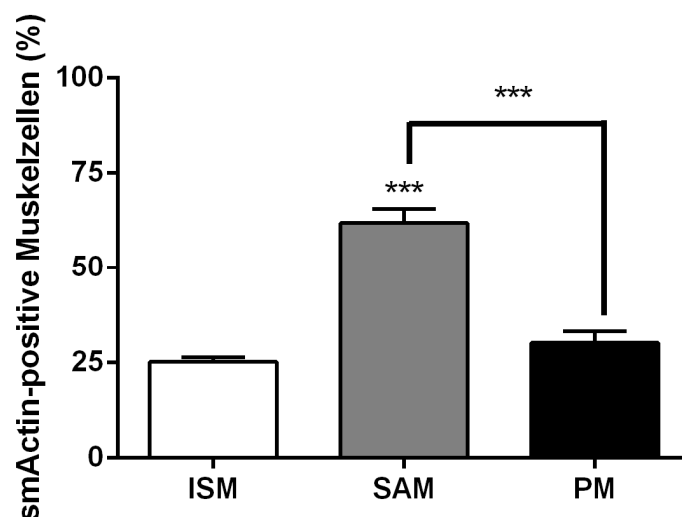
Interessanterweise konnten die definierten drei verschiedenen Areale der EM-assoziierten glatten Muskulatur in allen untersuchten peritonealen EM-Läsionen identifiziert und morphologisch abgegrenzt werden. Abbildung 3.4 zeigt einen immunhistochemisch mit Anti-smActin gefärbten Gewebeschnitt einer EM-Läsion vom Peritoneum am Blasendach. Darin sind exemplarisch die drei verschiedenen definierten Areale der EM-assoziierten glatten Muskulatur aufgezeigt.



Mit der Erkenntnis des Vorkommens verschiedener Areale EM-assoziiierter glatter Muskulatur in peritonealen EM-Läsionen, wurde nun der Muskelgehalt in diesen Bereichen mikroskopisch ausgewertet. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich

in dem Stroma-assoziierten Areal der EM-Läsionen mit durchschnittlich  $65 \pm 2,65\%$  die meisten glatten Muskelzellen befanden, während in der Peripherie der Gewebeschnitte durchschnittlich  $31 \pm 2,31\%$  glatte Muskelzellen nachgewiesen werden konnten. Den geringsten Anteil glatter Muskelzellen enthielt das intrastromale Areal. Hier lagen nur  $25 \pm 0,89\%$  EM-assoziierte glatte Muskelzellen.

Zur statistischen Analyse der Daten wurden der Kruskal-Wallis Test und im Anschluss der *Post Hoc* Test nach Dunn durchgeführt. Darin zeigte sich, dass sich in dem Stroma-assoziierten Areal der peritonealen EM-Läsionen signifikant mehr glatte Muskelzellen befinden, als intrastromal und in der Peripherie der EM-Läsionen ( $p < 0,001$ ; Abbildung 3.5). Damit macht das Stroma-assoziierte Muskelareal, welches die EM-Läsion unmittelbar angrenzend zirkulär umgibt, den signifikant größten Anteil der EM-assoziierten glatten Muskulatur aus.

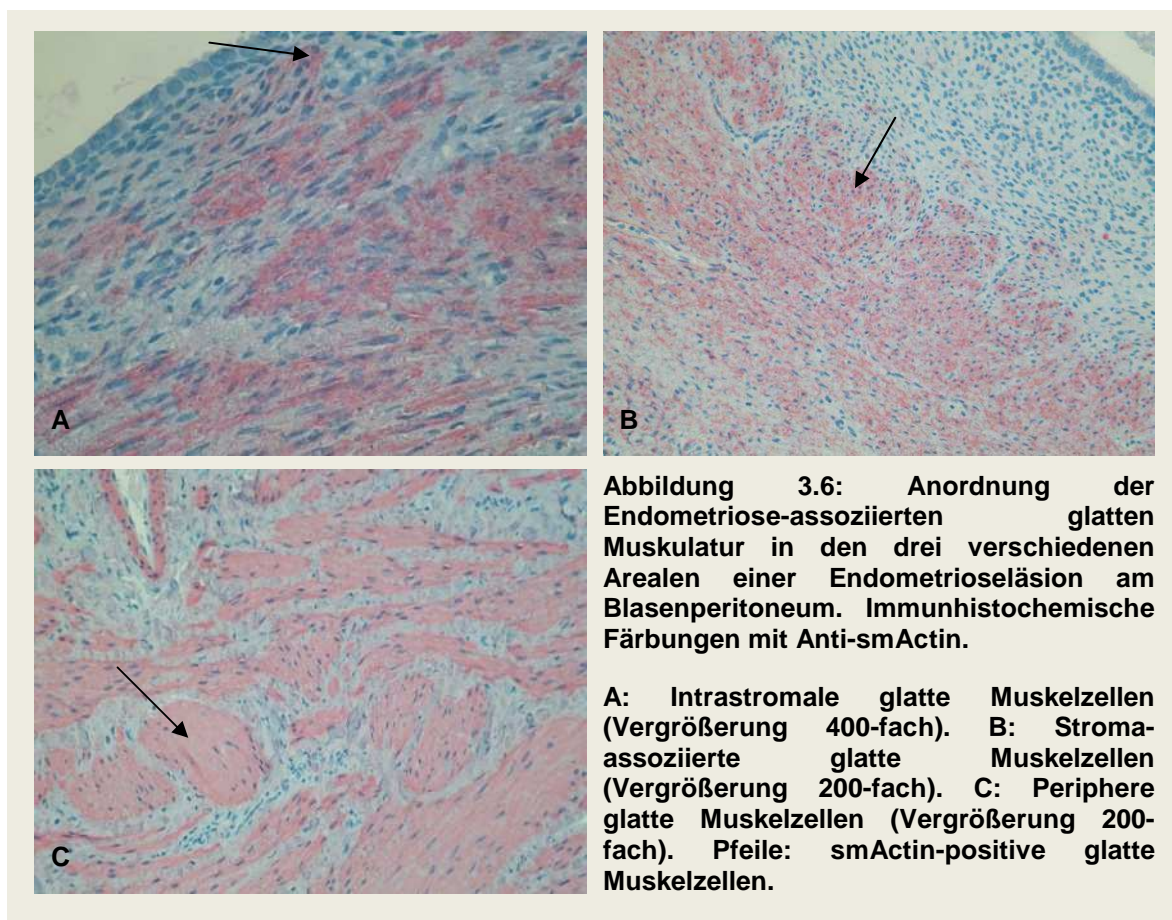


**Abbildung 3.5:** Verteilung der glatten Muskulatur in den Endometriose-Gewebeproben. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes EM-assoziiierter Muskulatur in den drei verschiedenen Arealen: ISM, SAM und PM.  $n = 60$ ; Kruskal-Wallis Test \*\*\*  $p < 0,001$ .

Bei der mikroskopischen Auswertung der Gewebeschnitte fiel auch auf, dass intrastromal liegende oder an das Stroma angrenzende EM-assoziierte glatte Muskelzellen diffus angeordnet waren, während peripher gelegene Muskelzellen oftmals zu Muskelbündeln angeordnet waren.

Abbildung 3.6 zeigt Ausschnitte aus den verschiedenen Arealen der EM-assoziierten glatten Muskulatur einer peritonealen EM-Läsion in immunhistochemischer Färbung

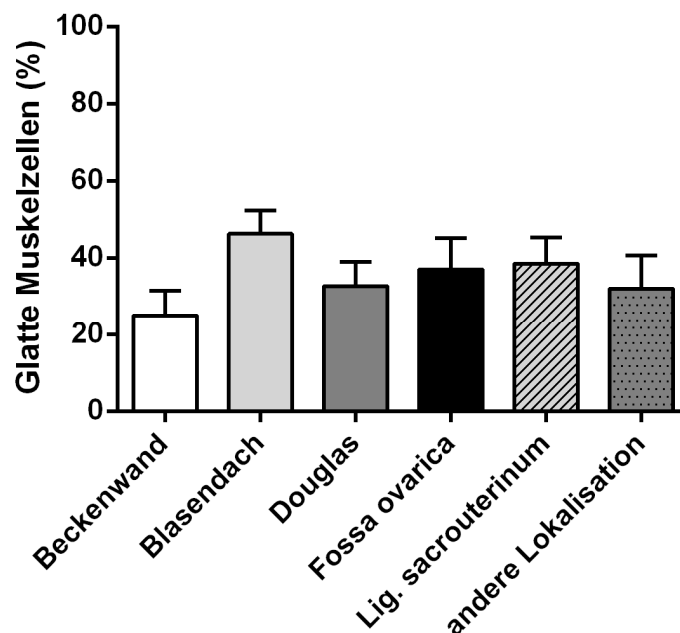
mit einem Antikörper gegen smActin. Auf den Abbildungen sind intrastromale Muskelzellen (Abbildung 3.6 A), Stroma-assoziierte Muskulatur (Abbildung 3.6 B) und ein Ausschnitt aus der peripheren Muskulatur (Abbildung 3.6 C) einer peritonealen EM-Läsion dargestellt. Es wird die ungeordnete Struktur der EM-assoziierten glatten Muskelzellen intrastromal und auch im Stroma-assoziierten Areal deutlich. Im Gegensatz dazu sind die peripheren Muskelzellen im gleichen Gewebepreparat zu kleinen Muskelbündeln organisiert.



### 3.1.3 Untersuchungen des Muskelgehalts in peritonealen Endometriose-Läsionen unterschiedlicher anatomischer Lokalisation

Die immunhistochemische Färbung glatter Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen ermöglichte es, erste Aussagen über den Muskelzellgehalt in den Gewebeproben zu treffen. Es sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob zwischen dem prozentualen Muskelgehalt in peritonealen EM-Läsionen und der unterschiedlichen anatomischen Lokalisation der Gewebeproben ein Unterschied besteht. Für den

prozentualen Muskelgehalt, bezogen auf die gesamte Gewebeprobe, ergaben sich dabei folgende Durchschnittswerte: Lokalisation Beckenwand: 25% glatte Muskulatur, Blasendach: 46%, Douglas: 33%, Fossa ovarica: 37%, Ligamentum sacrouterinum: 39% und andere Lokalisation: 32% glatte Muskelzellen. Im Kruskal-Wallis Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied im prozentualen Muskelgehalt zwischen EM-Läsionen unterschiedlicher peritonealer Lokalisation ( $p > 0,05$ ; Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7:** Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen bezüglich der anatomischen Lokalisation der Gewebeprobe. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes EM-assoziiierter Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation der Peritonealprobe. Beckenwand:  $n = 4$ , Blasendach:  $n = 16$ , Douglas:  $n = 11$ , Fossa ovarica:  $n = 10$ , Lig. sacrouterinum:  $n = 14$ , andere Lokalisation:  $n = 5$ .

Des Weiteren wurde auch untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen der EM-assoziierten Muskulatur und der anatomischen Lokalisation der Gewebeprobe besteht. Auch hier ergab die Analyse der Daten im Kruskal-Wallis Test keine statistische Signifikanz ( $p > 0,05$ ; Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1: Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit von der Lokalisation der Gewebeprobe; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler;  $p > 0,05$ .**

	ISM	SAM	PM
Beckenwandperitoneum	25 $\pm$ 0,87 (n = 4)	72 $\pm$ 1,79 (n = 4)	15 $\pm$ 0,87 (n = 4)
Blasenperitoneum	25 $\pm$ 0,84 (n = 16)	73 $\pm$ 1,93 (n = 16)	38 $\pm$ 2,65 (n = 16)
Douglas	24 $\pm$ 1,21 (n = 11)	61 $\pm$ 3,23 (n = 11)	21 $\pm$ 1,78 (n = 11)
Fossa ovarica	20 $\pm$ 1,25 (n = 10)	50 $\pm$ 2,68 (n = 10)	35 $\pm$ 2,16 (n = 10)
Lig. sacrouterinum	27 $\pm$ 0,61 (n = 14)	65 $\pm$ 2,72 (n = 14)	32 $\pm$ 2,21 (n = 14)
Peritoneum (sonstige)	28 $\pm$ 0,45 (n = 5)	70 $\pm$ 1,67 (n = 5)	28 $\pm$ 1,94 (n = 5)



### **3.2 Expressionsanalyse der Muskelzellendifferenzierungsmarker in Endometriose-assoziiierter Muskulatur peritonealer Endometriose-läsionen**

Im ersten Teil dieser Studie konnte ein Vorkommen von EM-assoziierten glatten Muskelzellen mit Hilfe eines Antikörpers gegen smActin in allen peritonealen EM-Läsionen nachgewiesen werden und dies mit einem durchschnittlichen Muskelzellgehalt von 38% sogar in beachtlichen Menge. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich in dem Stroma-assoziierten Areal der EM-Läsionen mit durchschnittlich 65% die meisten smActin-positiven Zellen befanden. Diese zeigten zumeist eine zirkuläre Anordnung um die EM-Läsion, die mikroskopisch stark an das Bild eines primordialen Uterus erinnerte. Es stellte sich somit im nächsten Teil dieser Arbeit die Frage, was das für Muskelzellen sind und ob es Hinweise auf deren Ursprung gibt. Dazu sollten diese smActin-positiven Zellen immunhistochemisch charakterisiert werden, insbesondere im Hinblick auf deren Differenzierungsgrad. Es wurde die Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon in EM-assoziiierter (n = 60) und Nicht-EM-assoziiierter Muskulatur (n = 10) peritonealer Gewebeproben in smActin-positiver glatter Muskulatur untersucht. Diese immunhistochemische Charakterisierung sollte erste Hinweise auf einen möglichen Differenzierungsprozess in EM-assoziierten glatten Muskelzellen liefern.

Die EM-assoziierte Muskulatur peritonealer EM-Läsionen zeigte in 68% der smActin-positiven Zellen eine Expression des Muskelzellendifferenzierungsmarkers Desmin und in 70% eine Expression von Caldesmon. In der Nicht-EM-assoziierten Muskulatur (Kontrollgruppe) konnte mikroskopisch kein Unterschied zwischen smActin- und Desmin- bzw. Caldesmon-positiven Muskelzellen festgestellt werden. Alle smActin-positiven Muskelzellen exprimierten auch die Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon.

Die Analyse zeigte eine statistisch hohe Signifikanz im Two-way Anova Test ( $p < 0,0001$ ). In den EM-assoziierten Muskelzellen exprimierten signifikant weniger smActin-positive Muskelzellen die Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon, als im gesunden Kontrollgewebe. Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

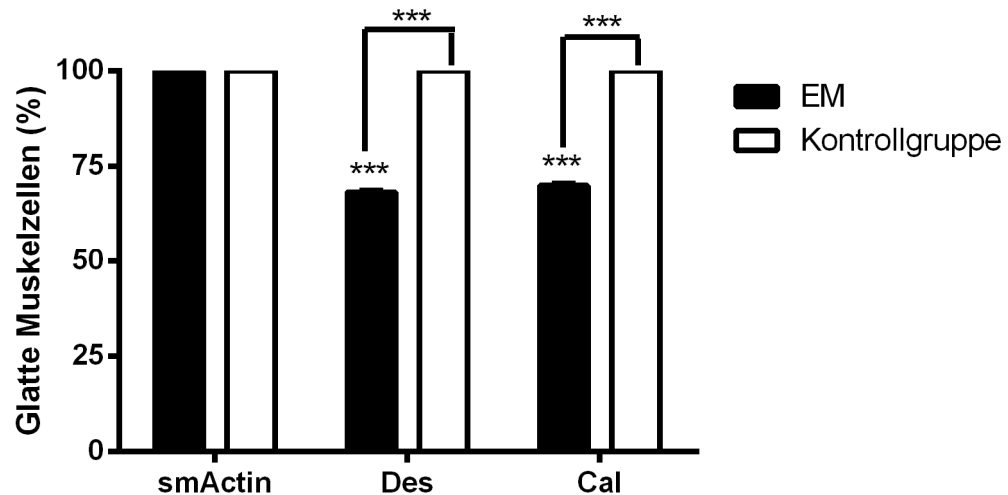


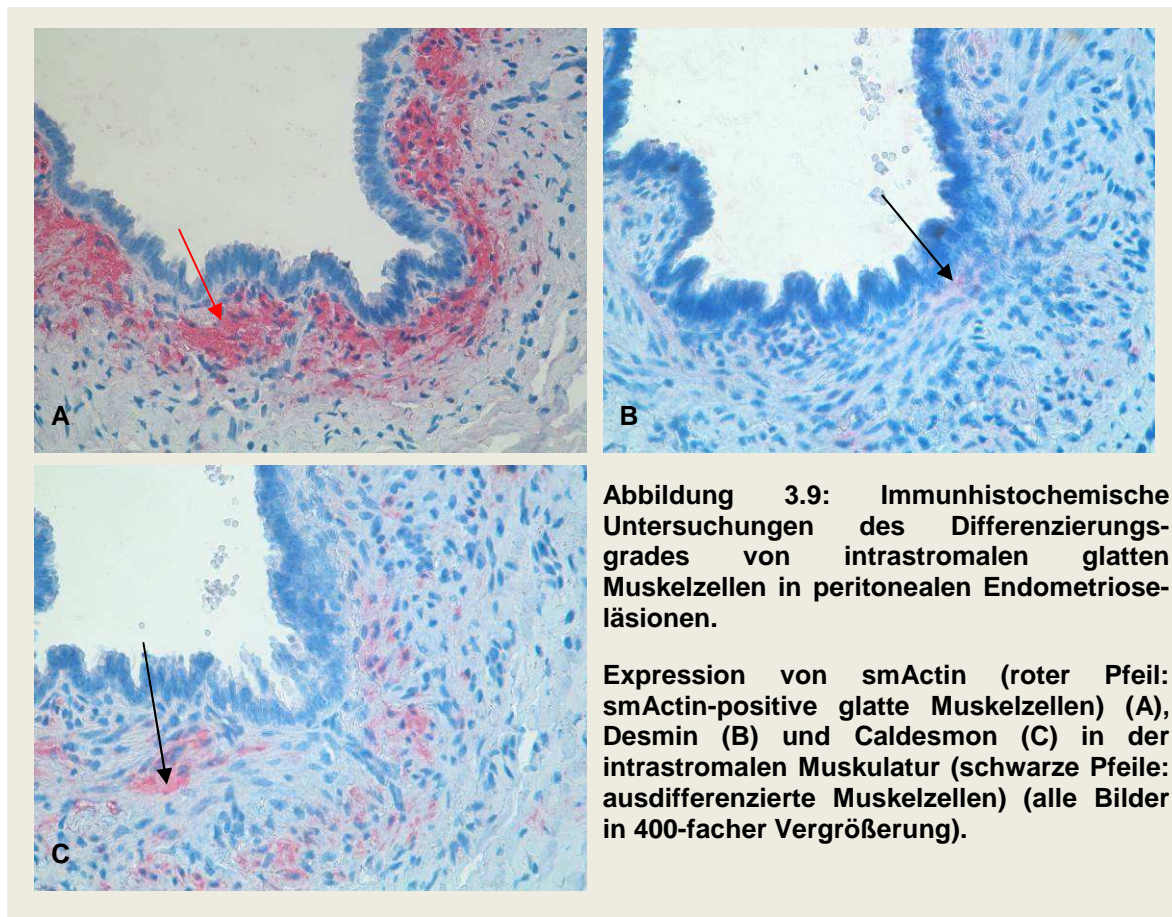
Abbildung 3.8: Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon in smActin-positiver Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen und gesunden Peritonealproben. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes ausdifferenzierter glatter Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen und gesunden Peritonealproben. smActin = *Smooth Muscle Actin*, Des = Desmin, Cal = Caldesmon; EM: n = 60, Kontrollgruppe: n = 10; Two-way Anova \*\*\* p < 0,0001.

### 3.2.1 Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker in intrastromalen glatten Muskelzellen peritonealer Endometrioseläsionen

Von den smActin-positiven Zellen in peritonealen EM-Läsionen exprimierten signifikant weniger Muskelzellen die Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon. Dies ist scheinbar auf einen Muskelzellendifferenzierungsprozess in der EM-assoziierten glatten Muskulatur zurückzuführen, der im nächsten Schritt weiter immunhistochemisch untersucht werden sollte.

Von weiterem Interesse war die Klärung der Frage, inwieweit die glatten Muskelzellen in den verschiedenen Arealen der EM-assoziierten Muskulatur ausdifferenziert sind. Damit sollte eine Aussage darüber getroffen werden, wo ein möglicher Differenzierungsprozess seinen Ursprung nehmen könnte.

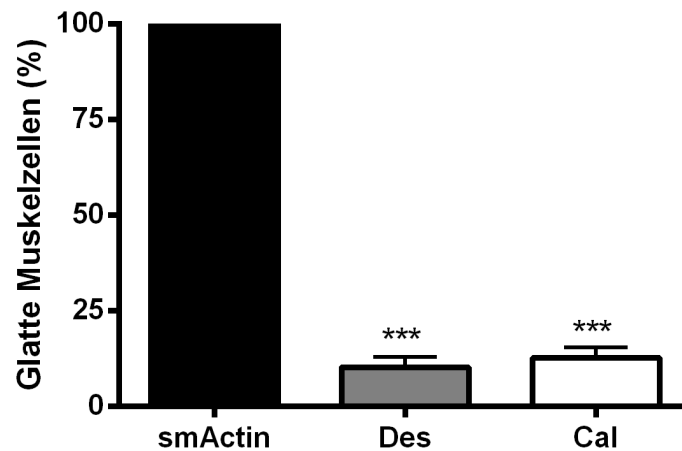
In Abbildung 3.9 sind Ausschnitte aus der intrastromalen glatten Muskulatur einer peritonealen EM-Läsion dargestellt. Abbildung 3.9 A zeigt die smActin-positiven intrastromalen Muskelzellen. Die Abbildung 3.9 B und C verdeutlichen im gleichen Gewebeareal die Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon (Pfeile: glatte Muskelzellen).



Hinsichtlich der Intensität der immunhistochemischen Färbereaktion ist erkennbar, dass die intrastromalen Muskelzellen in den peritonealen EM-Läsionen neben einer starken Expression des Muskelzellmarkers smActin eine deutlich schwächere Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon zeigen. Desmin und Caldesmon hingegen werden in dem Areal annähernd in gleicher Intensität exprimiert.

In der mikroskopischen Auswertung konnte beobachtet werden, dass von den smActin-positiven Muskelzellen in dem intrastromalen Areal der EM-assoziierten glatten Muskulatur nur 12% der Muskelzellen Desmin-positiv und 14% Caldesmon-positiv sind. Die statistische Analyse der Daten im Kruskal-Wallis Test zeigte eine hohe statistische Signifikanz zwischen den smActin-positiven glatten Muskelzellen und den davon Desmin- bzw. Caldesmon- exprimierenden glatten Muskelzellen ( $p < 0,0001$ ). Die Muskelzellendifferenzierungsmarker werden in dem intrastromalen Areal annähernd gleich exprimiert. Somit sind von den intrastromal gelegenen smActin-

positiven Muskelzellen nur 12-14% ausdifferenzierte reife Muskelzellen. Die dazugehörigen statistischen Daten sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

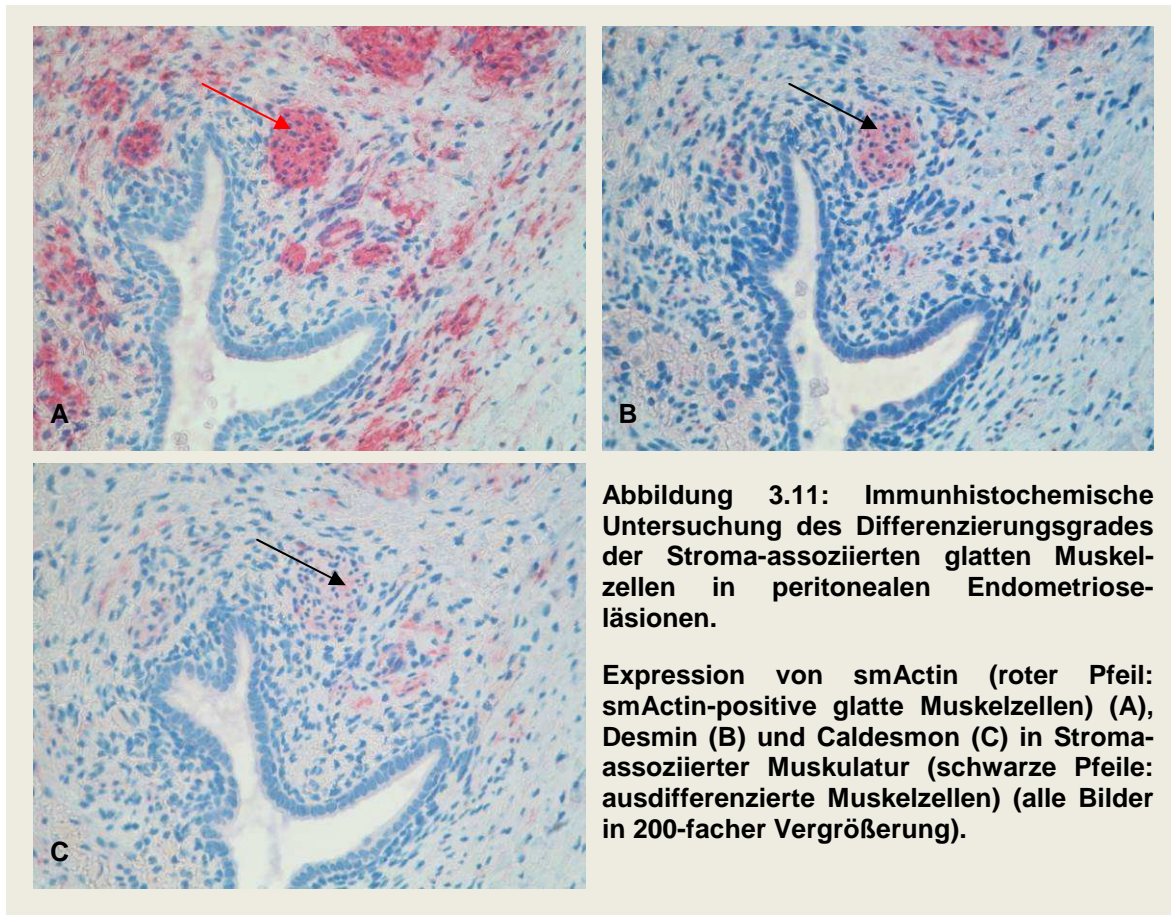


**Abbildung 3.10:** Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon in smActin-positiven intrastromalen glatten Muskelzellen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes ausdifferenzierter glatter Muskulatur in intrastromalen EM-assoziierten glatten Muskelzellen. smActin = *Smooth Muscle Actin*, Des = Desmin, Cal = Caldesmon; n = 60; Kruskal-Wallis Test \*\*\* p < 0,0001.

### 3.2.2 Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker in Stroma-assoziierten Muskelzellen peritonealer Endometrioseläsionen

Bei der Expressionsanalyse der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon in smActin-positiver Stroma-assoziiierter Muskulatur zeigte sich, dass die Differenzierungsmarker auch hier geringer exprimiert werden, als der Muskelzellmarker smActin.

Abbildung 3.11 beinhaltet Serienschnitte einer peritonealen Endometrioseläsion mit den darin vorkommenden Stroma-assoziierten glatten Muskelzellen (Abbildung 3.11 A-C) in immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen smActin (Abbildung 3.11 A), Desmin (Abbildung 3.11 B) und Caldesmon (Abbildung 3.11 C). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon weniger exprimiert werden, als der Muskelzellmarker smActin, aber stärker als im intrastromalen Areal. Hinsichtlich der Intensität der immunhistochemischen Färbungen zeigten die Stroma-assoziierten Muskelzellen neben einer starken Expression des Muskelzellmarkers smActin nur eine mittelstarke Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon.



Bei der mikroskopischen Analyse der Stroma-assoziierten glatten Muskelzellen zeigte sich, dass von den smActin-positiven Muskelzellen in diesem Areal nur 37% der Muskelzellen Desmin-positiv und 44% Caldesmon-positiv waren. Die Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon wurden in den Stroma-assoziierten glatten Muskelzellen geringer exprimiert, als der Muskelzellmarker smActin.

Die statistische Analyse der Daten verdeutlichte im Kruskal-Wallis Test, dass der Expressionsunterschied zwischen den smActin-positiven Muskelzellen und den davon Desmin- bzw. Caldesmon- exprimierenden Muskelzellen statistisch hoch signifikant ist ( $p < 0,0001$ ). In Abbildung 3.12 sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung dargestellt.

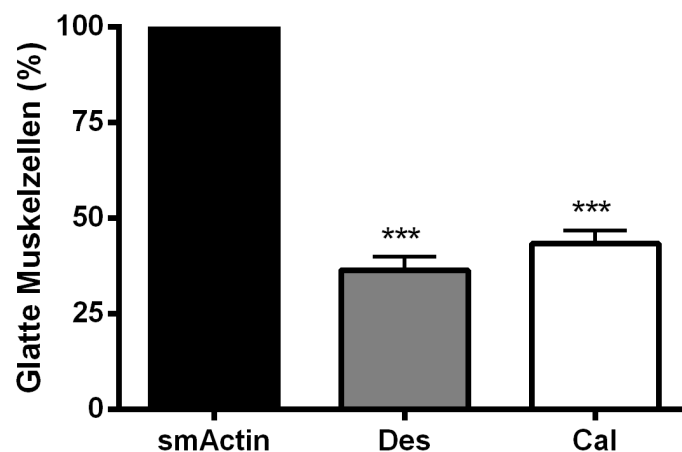


Abbildung 3.12: Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon in smActin-positiver Stroma-assoziiierter Muskulatur peritonealer Endometrioselesionen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes ausdifferenzierter glatter Muskulatur in Stroma-assoziierten Muskelzellen. smActin = *Smooth Muscle Actin*, Des = Desmin, Cal = Caldesmon; n = 60; Kruskal-Wallis Test \*\*\* p < 0,0001.

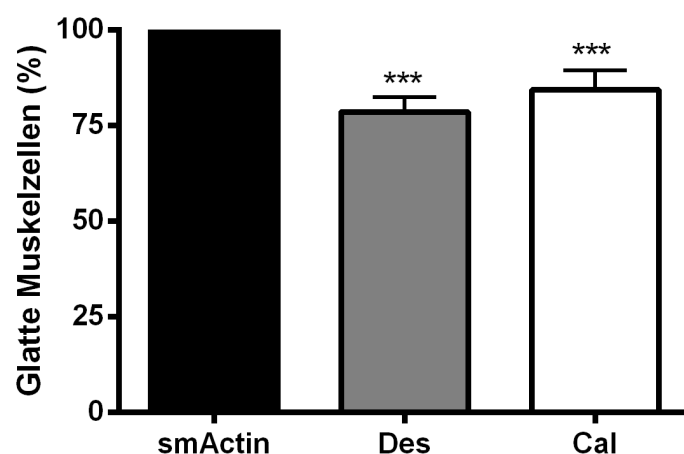
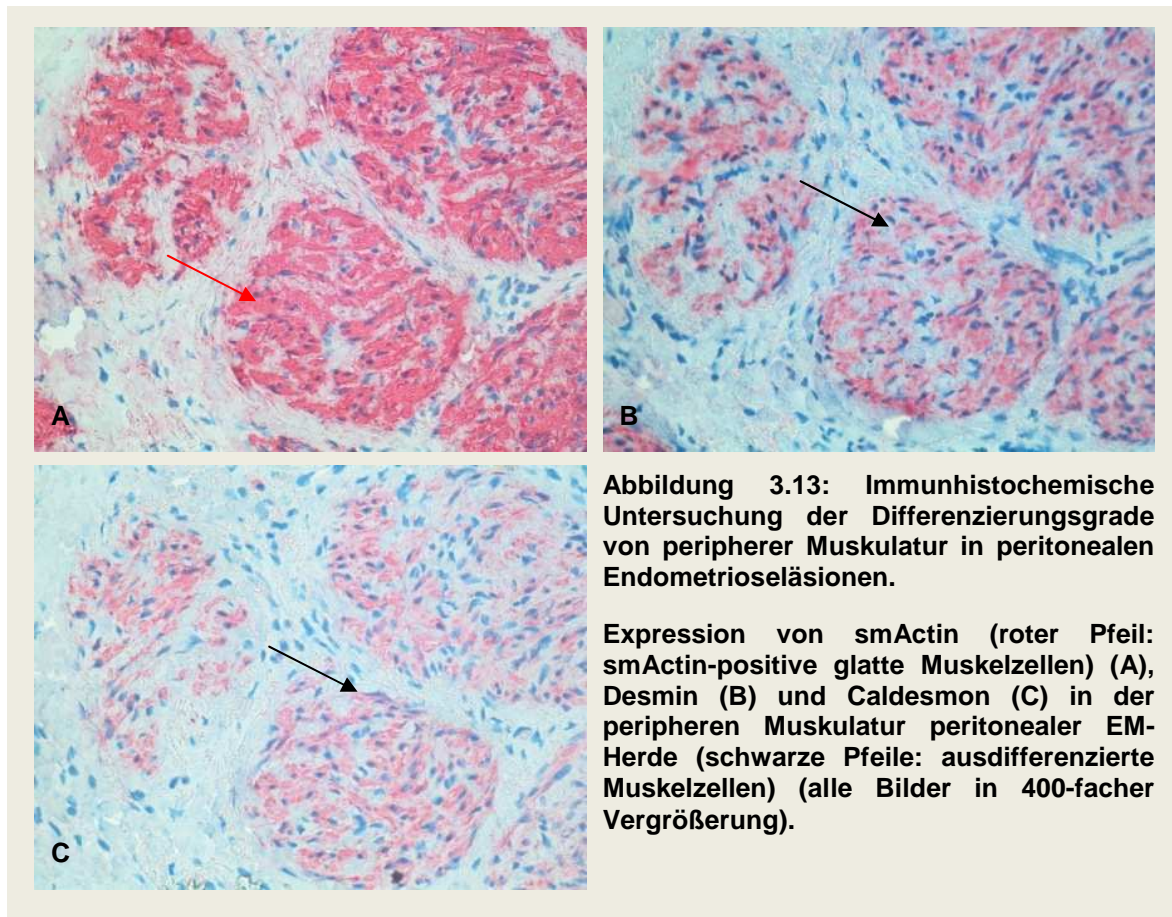
### 3.2.3 Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker in der peripheren Muskulatur peritonealer Endometrioselesionen

Bei der Expressionsanalyse der Muskeldifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon in smActin-positiver peripherer Muskulatur in peritonealen Endometrioselesionen zeigte sich eine Expression von Desmin in 77% der glatten Muskelzellen. 80% der peripher gelegenen smActin-positiven Muskelzellen exprimierten den Muskelzellendifferenzierungsmarker Caldesmon. Hinsichtlich des Expressionsmusters von Desmin und Caldesmon wurde deutlich, dass die Muskelzellendifferenzierungsmarker auch in diesem Areal geringer und schwächer exprimiert werden, als der Muskelzellmarker smActin. Während die peripheren Muskelzellen eine starke Expression von smActin aufwiesen, konnte bei den Färbungen mit Antikörpern gegen Desmin und Caldesmon auch hier nur eine mittelstarke Immunreaktion nachgewiesen werden. In Abbildung 3.13 ist ein Areal aus der peripheren Muskulatur einer peritonealen EM-Läsion in immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen smActin (Abbildung 3.13 A), Desmin (Abbildung 3.13 B) und Caldesmon (Abbildung 3.13 C) dargestellt.

Die Daten wurden im Anschluss statistisch mittels des Kruskal-Wallis Tests analysiert. Vergleicht man die smActin-positiven Muskelzellen in diesem Areal mit



dem Anteil davon Desmin- und Caldesmon- exprimierender Muskelzellen, so stellt man fest, dass auch dieser Vergleich statistisch hoch signifikant ist ( $p < 0,0001$ ). Abbildung 3.14 zeigt die dazugehörigen Daten.



**Abbildung 3.14: Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon in smActin-positiver peripherer Muskulatur peritonealer Endometrioseläsionen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes ausdifferenzierter glatter Muskulatur in peripherer EM-assoziiierter Muskulatur. smActin = *Smooth Muscle Actin*, Des = Desmin, Cal = Caldesmon;  $n = 60$ ; Kruskal-Wallis Test \*\*\*  $p < 0,0001$ .**

### 3.2.4 Möglicher Differenzierungsprozesses in Endometriose-assoziiertes glatter Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen

Um das Vorkommen eines eventuellen Differenzierungsprozesses in EM-assoziiertes Muskulatur festzustellen, wurde die Expression der Muskelzell-differenzierungsmarker in der intrastromalen, Stroma-assoziiertes und peripheren Muskulatur miteinander verglichen. Zur statistischen Analyse der Daten wurde der Two-way Anova Test mit anschließendem *Post Hoc* Test nach Bonferroni durchgeführt. Bei der statistischen Analyse der Daten zeigte sich im *Bonferroni Multiple Comparison Test*, dass die Zunahme der Expression von Desmin und Caldesmon innerhalb der drei verschiedenen Arealen EM-assoziiertes Muskulatur statistisch hoch signifikant ist ( $p < 0,0001$ ). Es gibt somit eine signifikante Zunahme der Expression der Muskeldifferenzierungsmarker in der EM-assoziiertes glatten Muskulatur, ausgehend von den intrastromalen Muskelzellen über die Stroma-assoziiertes Muskulatur bis hin zur Peripherie, wo der größte Anteil ausdifferenzierter glatter Muskelzellen lokalisiert ist. Abbildung 3.15 zeigt die dazugehörigen Daten.

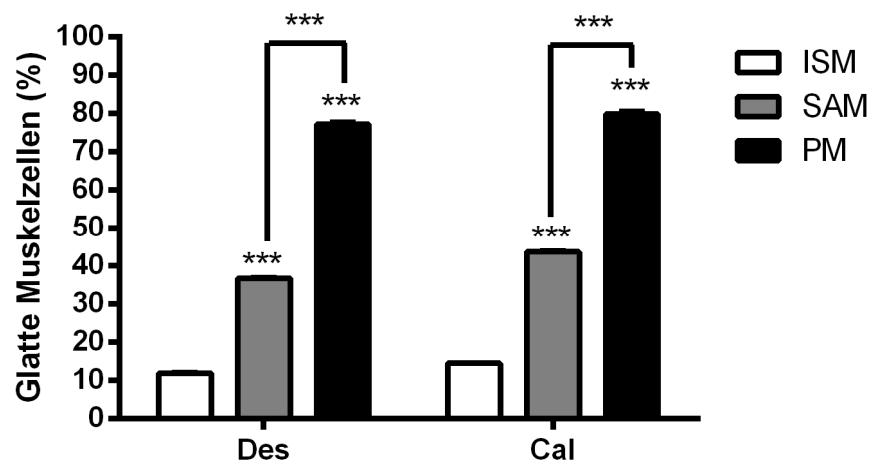


Abbildung 3.15: Zunahme der Expression der Muskelzell-differenzierungsmarker in den verschiedenen Arealen der Endometriose-assoziiertes Muskulatur. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes der prozentualen Zunahme der Expression ausdifferenzierter glatter Muskelzellen in den verschiedenen Arealen der Endometriose-assoziiertes Muskulatur.  $n = 60$ ; Two-way Anova \*\*\*  $p < 0,0001$ .



### **3.3 Expressionsanalyse von sm-MHC, OTR und VPR in Endometriose-assoziiierter Muskulatur peritonealer Endometrioseläsionen**

Mit der Erkenntnis des Vorkommens glatter Muskelzellen in peritonealen EM-Herden, die verschiedene Differenzierungsgrade aufweisen, geht es im letzten Teil dieser Studie um die Frage einer möglichen funktionellen Aktivität dieser EM-assoziierten glatten Muskelzellen. Hierzu wurden 60 peritoneale EM-Läsionen immunhistochemisch mit dem Muskelzellfunktionalitätsmarker sm-MHC sowie den uterinen Markermolekülen OTR und VPR gefärbt und mikroskopisch beurteilt.

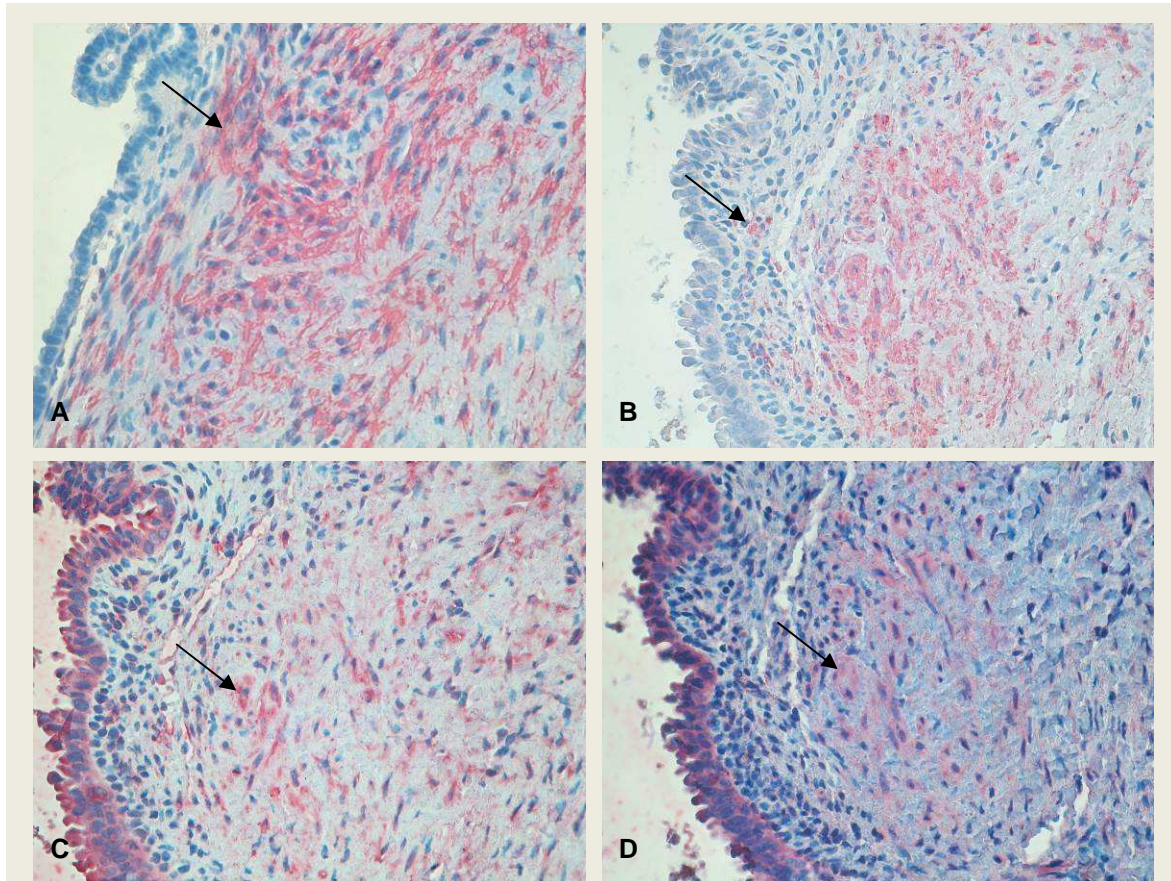
Auch hierbei wurde die EM-assoziierte Muskulatur einer EM-Läsion des Gewebeschnittes zur Beurteilung herangezogen und der Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen der EM-assoziierten Muskulatur begutachtet und bewertet. Die Expression von sm-MHC, OTR und VPR wurde als prozentualer Anteil der smActin-positiven Muskulatur (100%) ermittelt.

#### **3.3.1 Expressionsanalyse von sm-MHC, OTR und VPR in intrastromalen Muskelzellen peritonealer Endometrioseläsionen**

In den smActin-positiven intrastromalen Muskelzellen wurde die Expression des Muskelzellfunktionalitätsmarkers sm-MHC sowie von OTR und VPR untersucht. Dabei zeigten die intrastromalen Muskelzellen peritonealer Endometrioseläsionen in 47% der smActin-positiven Zellen eine Expression des Muskelzellfunktionalitätsmarkers sm-MHC. In 40% der smActin-positiven Muskelzellen wurde OTR exprimiert. Der VPR konnte in nur 8% der intrastromalen smActin-positiven Muskelzellen nachgewiesen werden.

Abbildung 3.16 A-D zeigt einen Ausschnitt aus einer peritonealen EM-Läsion mit den intrastromalen EM-assoziierten Muskelzellen in immunhistochemischer Färbung mit Antikörpern gegen smActin (Abbildung 3.16 A), sm-MHC (Abbildung 3.16 B), OTR (Abbildung 3.16 C) und VPR (Abbildung 3.16 D). Es wird deutlich, dass nicht alle smActin-positiven intrastromalen glatten Muskelzellen den Muskelzellfunktionalitätsmarker sm-MHC bzw. die uterinen Markermoleküle OTR und VPR exprimieren. Ebenso zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der immunhistochemischen Färbereaktion. Während der Muskelzellmarker smActin in den intrastromalen Muskelzellen stark exprimiert wurde, konnte nur eine mittelstarke

Expression von sm-MHC und OTR beobachtet werden. VPR wurde in den intrastromal gelegenen EM-assoziierten Muskelzellen nur mit schwacher Intensität exprimiert.



**Abbildung 3.16: Immunhistochemische Untersuchungen der Funktionalität von intrastromalen glatten Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen. Expression von smActin (A), sm-MHC (B), OTR (C) und VPR (D) in intrastromalen glatten Muskelzellen peritonealer Endometrioseläsionen (alle Bilder in 400x Vergrößerung); Pfeile: glatte Muskelzellen.**

Zur statistischen Analyse der Daten wurden der Kruskal-Wallis Test und anschließend der *Multiple Comparison* Test nach Dunn angewendet. Hier zeigte sich, dass von den 100% smActin-positiven intrastromalen Muskelzellen signifikant weniger glatte Muskelzellen den Muskelzellfunktionalitätsmarker sm-MHC sowie OTR und VPR exprimieren ( $p < 0,001$ ). Die dazugehörigen Daten sind in Abbildung 3.17 dargestellt.

Auch der Vergleich zwischen den sm-MHC-positiven Muskelzellen und der VPR-exprimierenden Muskulatur erwies sich im *Post Hoc* Test nach Dunn als statistisch hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Vergleicht man den Anteil der OTR-exprimierenden

Muskelzellen mit den VPR-exprimierenden Muskelzellen, so stellt man fest, dass auch dieser Unterschied statistisch signifikant ist ( $p < 0,01$ ; Abbildung 3.17). Lediglich der Vergleich zwischen den sm-MHC-positiven Muskelzellen und den OTR-exprimierenden glatten Muskelzellen erwies sich in der statistischen Analyse als nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; Abbildung 3.17).

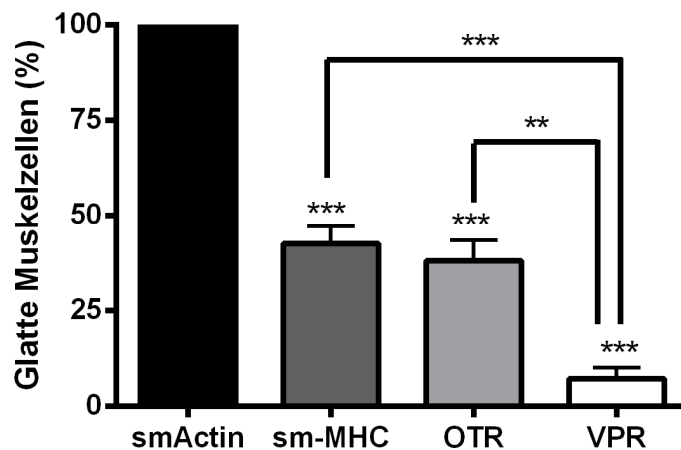


Abbildung 3.17: Expression von sm-MHC, OTR und VPR in smActin-positiven intrastromalen glatten Muskelzellen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes funktioneller glatter Muskulatur in intrastromalen Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen. smActin= *Smooth Muscle Actin*, sm-MHC = *Smooth Muscle Myosin Heavy Chains*, OTR = *Oxytocinrezeptor*, VPR = *Vasopressinrezeptor*; n = 60; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

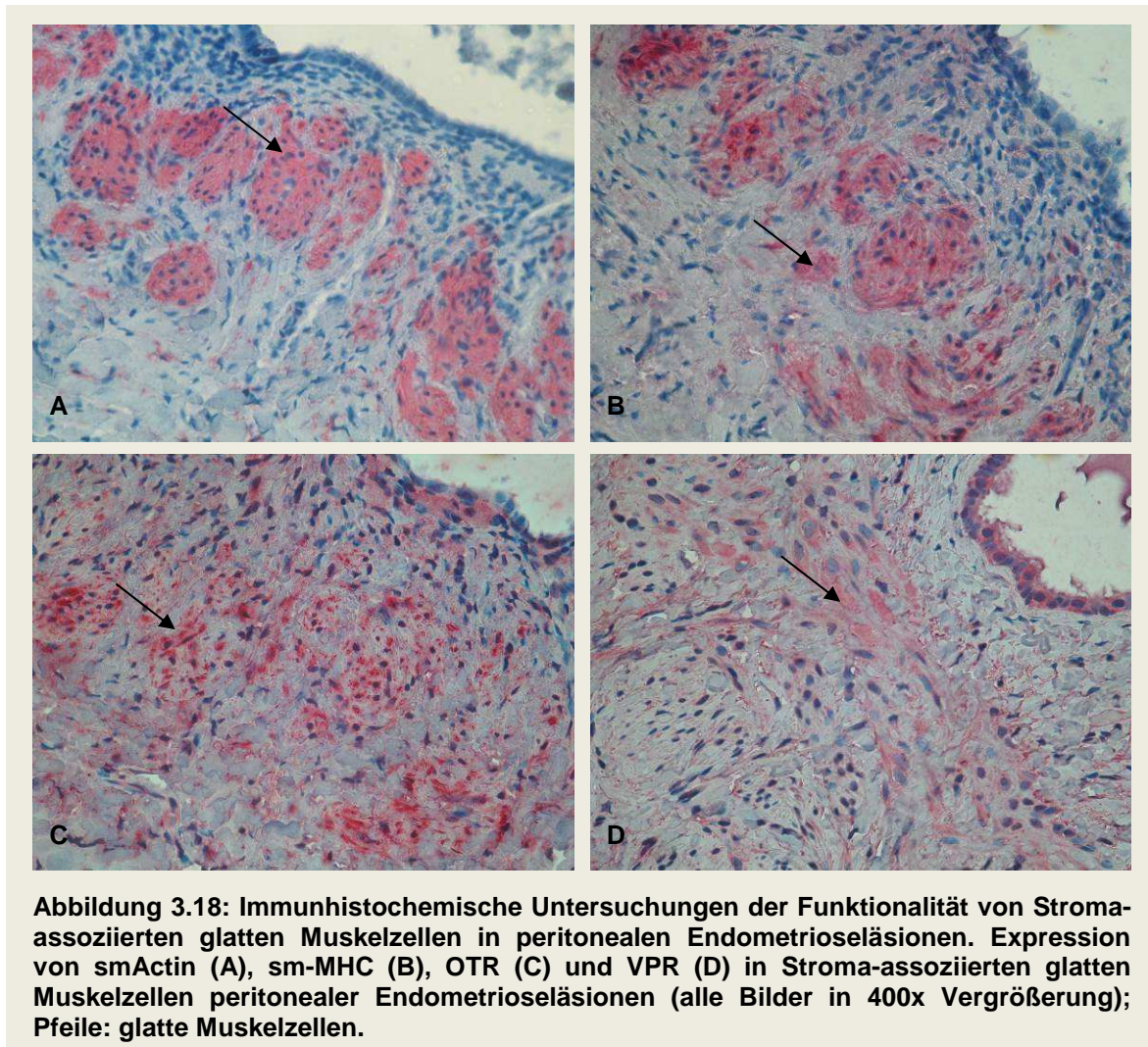
### 3.3.2 Expressionsanalyse von sm-MHC, OTR und VPR in Stroma-assoziierten Muskelzellen peritonealer Endometrioseläsionen

Bei der Untersuchung der Expression von sm-MHC, OTR und VPR in Stroma-assoziierten Muskelzellen peritonealer EM-Läsionen konnte festgestellt werden, dass von den smActin-positiven Muskelzellen 62% der Muskelzellen den Muskelzellfunktionalitätsmarker sm-MHC exprimieren. Des Weiteren waren 40% der Muskelzellen OTR-positiv und 28% der Muskelzellen exprimierten VPR.

Abbildung 3.18 A-D zeigt die Stroma-assoziierten glatten Muskelzellen einer peritonealen EM-Läsion in immunhistochemischer Färbung mit Antikörpern gegen smActin (Abbildung 3.18 A), sm-MHC (Abbildung 3.18 B), OTR (Abbildung 3.18 C) und VPR (Abbildung 3.18 D). Der Muskelzellfunktionalitätsmarker sm-MHC sowie die



uterinen Markermoleküle OTR und VPR werden auch in den Stroma-assoziierten glatten Muskelzellen nicht von allen smActin-positiven Zellen exprimiert.



Die Stroma-assoziierten glatten Muskelzellen zeigten eine starke Expression des Muskelzellmarkers smActin sowie des Muskelzellfunktionalitätsmarkers sm-MHC. OTR und VPR wurden mit mittelstarker Intensität exprimiert.

Bei der statistischen Analyse dieser Daten im Kruskal-Wallis Test und im *Post Hoc* Test nach Dunn wurde deutlich, dass der Unterschied zwischen den smActin-positiven Muskelzellen und den davon sm-MHC-, OTR- bzw. VPR-exprimierenden Muskelzellen im Stroma-assoziierten Areal statistisch hoch signifikant ist ( $p < 0,001$ ; Abbildung 3.19).

Der Vergleich zwischen den sm-MHC-positiven glatten Muskelzellen und der VPR-exprimierenden Muskulatur erwies sich im *Post Hoc* Test nach Dunn als statistisch hoch signifikant ( $p < 0,001$ ; Abbildung 3.19).

Vergleicht man den Anteil sm-MHC-positiver Muskelzellen mit den OTR-exprimierenden glatten Muskelzellen, so stellt man fest, dass dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ist ( $p > 0,05$ ; Abbildung 3.19). Auch der Vergleich zwischen den OTR-exprimierenden Muskelzellen und den VPR-exprimierenden glatten Muskelzellen im Stroma-assoziierten Areal EM-assoziiierter glatte Muskelzellen erwies sich in der statistischen Analyse als nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; Abbildung 3.19).

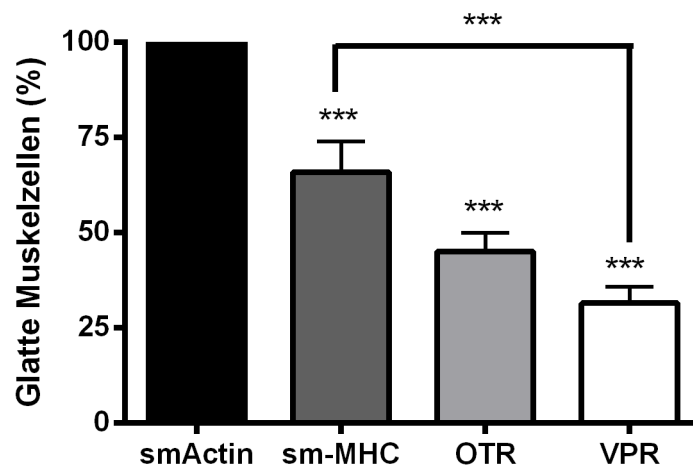


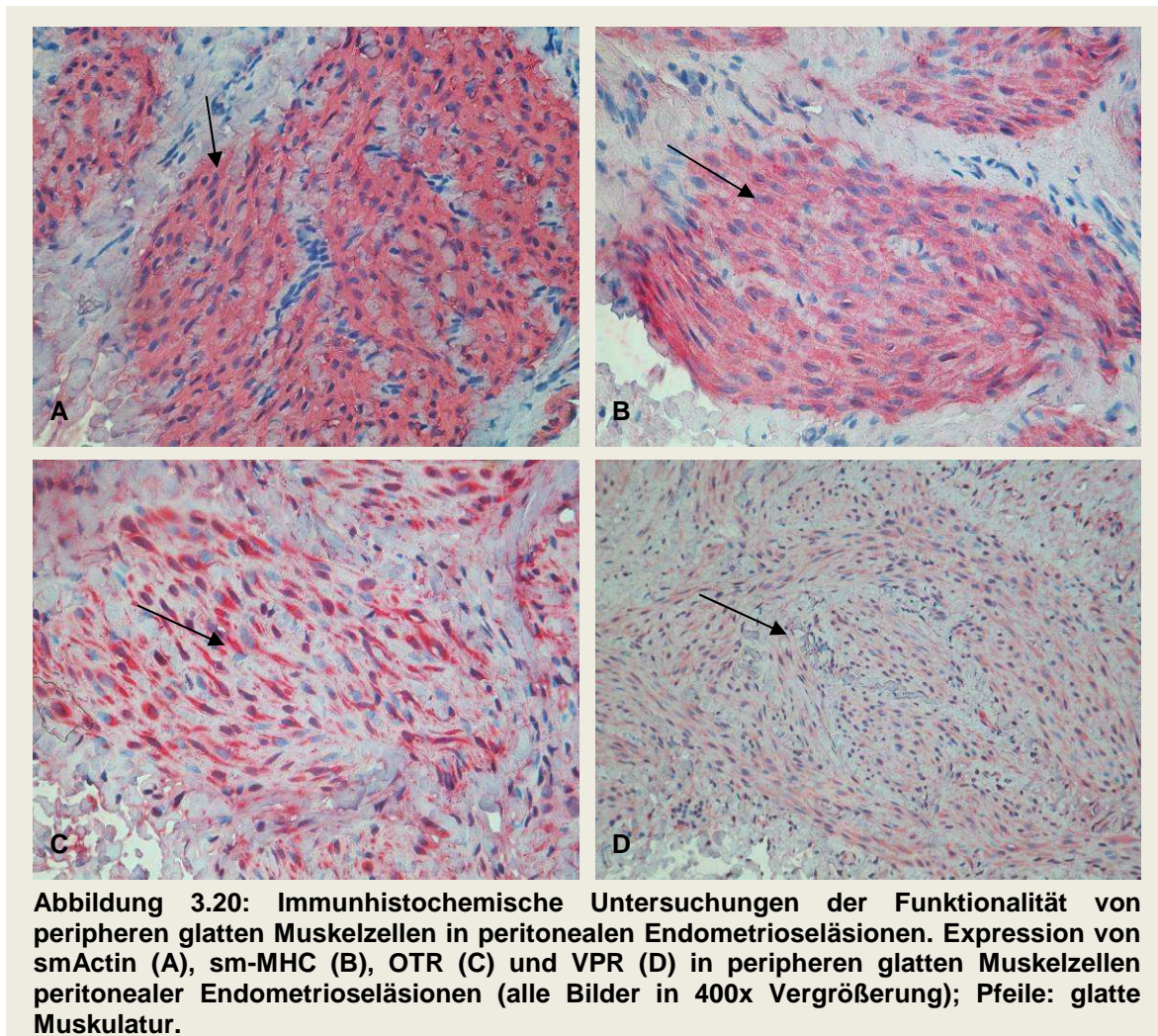
Abbildung 3.19: Expression von sm-MHC, OTR und VPR in smActin-positiver Stroma-assoziiierter Muskulatur peritonealer Endometrioseeläsionen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes funktionell aktiver glatter Muskulatur in Stroma-assoziierten Muskelzellen in peritonealen Endometrioseeläsionen. smActin = *Smooth Muscle Actin*, sm-MHC = *Smooth Muscle Myosin Heavy Chains*, OTR = *Oxytocinrezeptor*, VPR = *Vasopressinrezeptor*;  $n = 60$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.3.3 Expressionsanalyse von sm-MHC, OTR und VPR in den peripheren Muskelzellen peritonealer Endometrioseeläsionen

Die Expression des Muskelzellfunktionalitätsmarkers sm-MHC sowie der uterinen Markermoleküle OTR und VPR wurde auch in der peripheren Muskulatur peritonealer EM-Läsionen untersucht. Von den peripheren smActin-positiven Muskelzellen waren in diesem Areal 88% der glatten Muskelzellen sm-MHC-positiv, 83% der



Muskelzellen exprimierten OTR und in 62% der Muskelzellen konnte VPR nachgewiesen werden. Abbildung 3.20 A-D zeigt exemplarisch Serienschnitte aus der peripheren Muskulatur einer peritonealen EM-Läsion in immunhistochemischer Färbung mit Antikörpern gegen smActin (Abbildung 3.20 A), sm-MHC (Abbildung 3.20 B), OTR (Abbildung 3.20 C) und VPR (Abbildung 3.20 D).



Die peripheren EM-assoziierten glatten Muskelzellen zeigten eine starke Expression des Muskelzellfunktionalitätsmarkers sm-MHC und eine mittelstarke Intensität der Expression der uterinen Markermoleküle OTR und VPR.

Die Daten wurden mittels des Kruskal-Wallis Tests statistisch analysiert (Abbildung 3.21). Vergleicht man den Anteil sm-MHC-exprimierender Muskelzellen mit den smActin-positiven Zellen, so ist der Unterschied des prozentualen Muskelgehaltes in diesem Areal statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ). Zwischen den smActin-positiven peripheren Muskelzellen und dem Anteil davon OTR- bzw. VPR-exprimierenden

Muskelzellen ergab sich in der statistischen Analyse ebenfalls eine hohe statistische Signifikanz ( $p < 0,001$ ).

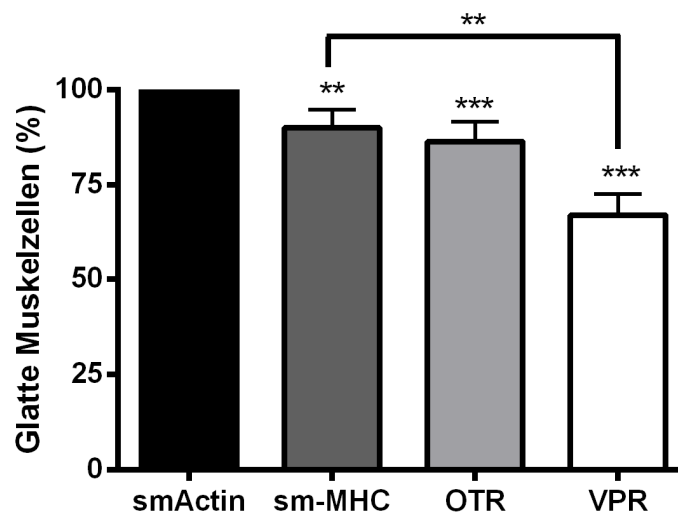


Abbildung 3.21: Expression von sm-MHC, OTR und VPR in smActin-positiver peripherer Muskulatur peritonealer Endometrioseläsionen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes funktioneller glatter Muskulatur in den peripheren Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen. smActin = *Smooth Muscle Actin*, sm-MHC = *Smooth Muscle Myosin Heavy Chains*, OTR = Oxytocinrezeptor, VPR = Vasopressinrezeptor;  $n = 60$ ; \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ .

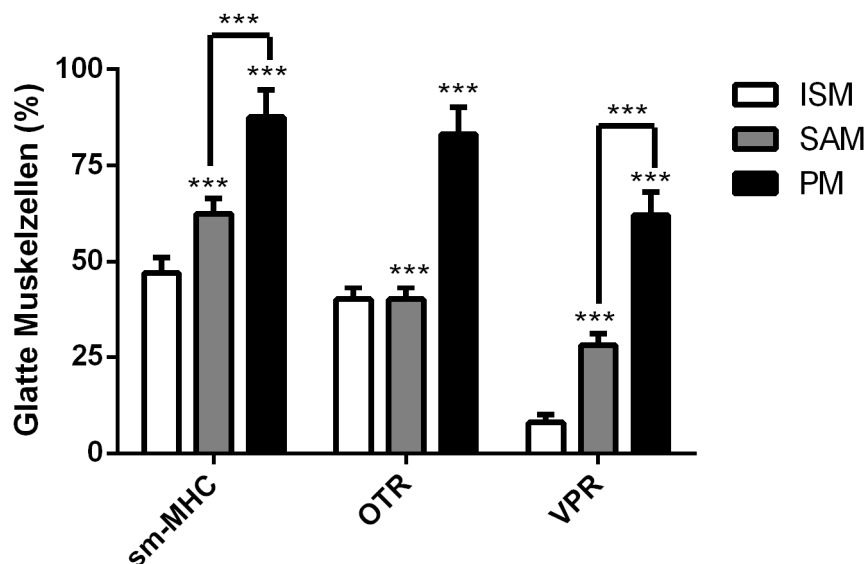
Vergleicht man in diesem Areal den Anteil sm-MHC-positiver Muskelzellen mit den OTR-exprimierenden glatten Muskelzellen, so lässt sich auch hier feststellen, dass dieser Unterschied nicht signifikant ist ( $p > 0,05$ ; Abbildung 3.21). Auch der Vergleich zwischen den OTR-exprimierenden Muskelzellen und den VPR-exprimierenden glatten Muskelzellen in der Peripherie EM-assoziierter glatter Muskelzellen erwies sich in der statistischen Analyse als nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; Abbildung 3.21). Der Vergleich sm-MHC-positiver Muskelzellen mit den VPR-exprimierenden glatten Muskelzellen erwies sich jedoch als statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ; Abbildung 3.21).

### 3.3.4 Funktionalität Endometriose-assoziierter glatter Muskulatur peritonealer Endometrioseläsionen

In der EM-assozierten glatten Muskulatur peritonealer EM-Läsionen zeigten sich in den verschiedenen Arealen signifikante Unterschiede in der Expression des Muskelzellfunktionalitätsmarkers sm-MHC sowie der uterinen Markermoleküle OTR und VPR. Demzufolge sollten die Daten hinsichtlich der Fragestellung analysiert

werden, ob die Zunahme der Expression der Marker in den drei Arealen EM-assoziierter Muskulatur statistisch signifikant ist, um hier von einer eventuellen funktionalen Entwicklung ausgehen zu können. In Abbildung 3.22 ist der prozentuale Anteil sm-MHC-, OTR- und VPR-exprimierender Muskelzellen in den drei Muskelarealen dargestellt. Zur statistischen Analyse der Daten wurde eine Two-way Anova mit anschließenden *Bonferroni Post Hoc* Test durchgeführt. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

Hinsichtlich der Expression des Muskelzellfunktionalitätsmarkers sm-MHC zeigte sich eine signifikante Zunahme innerhalb der drei verschiedenen Muskelareale in der EM-assozierten glatten Muskulatur ( $p < 0.001$ ; Abbildung 3.22). Der Vergleich der Expression von OTR zwischen der intrastromalen und der Stroma-assoziierten Region erwies sich als statistisch nicht signifikant ( $p > 0.05$ ). Es konnte jedoch eine signifikante Zunahme der OTR-Expression zwischen dem Stroma-assoziierten und dem peripheren Muskelareal gezeigt werden ( $p < 0.001$ ; Abbildung 3.22). Die Expression von VPR nahm ebenfalls zwischen den drei verschiedenen Regionen EM-assoziierter Muskulatur signifikant zu ( $p < 0.001$ ; Abbildung 3.22).



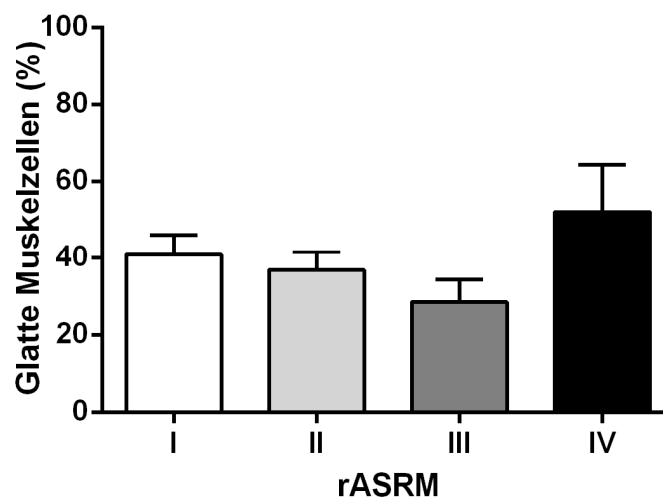
**Abbildung 3.22:** Expression von sm-MHC, OTR und VPR in den drei verschiedenen Arealen EM-assoziierter glatter Muskulatur. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes der prozentualen Expression des Muskelzellfunktionalitätsmarkers sm-MHC und der uterinen Markermoleküle OTR und VPR in den verschiedenen Arealen der Endometriose-assoziierten Muskulatur. sm-MHC = *Smooth Muscle Myosin Heavy Chains*, OTR = *Oxytocinrezeptor*, VPR = *Vasopressinrezeptor*;  $n = 60$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .



### 3.4 Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen in Korrelation zum rASRM-Stadium der Erkrankung

Die Angabe des rASRM-Stadiums der EM lag bei allen Patientinnen vor. Der prozentuale Gehalt EM-assoziiierter Muskulatur im gesamten Gewebeschnitt betrug im rASRM-Stadium I durchschnittlich 41%, im Stadium II waren es 37% und im Stadium III kamen durchschnittlich 29% glatte Muskelzellen in den Gewebeproben vor. Im Stadium IV enthielten die Gewebeproben mit 52% die höchste Anzahl an glatten Muskelzellen.

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde der Kruskal-Wallis Test durchgeführt, in dem sich kein statistischer Zusammenhang zwischen dem rASRM-Stadium und dem Muskelgehalt in den Gewebeproben zeigen lies ( $p > 0,05$ ; Abbildung 3.23).



**Abbildung 3.23:** Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit vom rASRM-Stadium der Erkrankung. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes Endometriose-assoziiierter Muskulatur (EAM) in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit der rASRM-Stadien. I: n = 23, II: n = 19, III: n = 13, IV: n = 5.

Auch in den unterschiedlichen Arealen der EM-assoziierten glatten Muskulatur wurde der Muskelzellgehalt in Abhängigkeit vom rASRM-Stadium statistisch untersucht. In Tabelle 3.2 ist der prozentuale Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen der EM-assoziierten Muskelzellen als MW  $\pm$  SF in Zusammenhang mit dem rASRM-Stadium dargestellt. Auch hier zeigte sich in der statistischen Analyse der Daten kein signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallis Test:  $p > 0,05$ ).

**Tabelle 3.2: Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit vom rASRM-Stadium; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler;  $p > 0,05$ .**

rASRM	I	II	III	IV
ISM	26 $\pm$ 0,66 (n = 23)	26 $\pm$ 0,84 (n = 19)	23 $\pm$ 1,18 (n = 13)	24 $\pm$ 1,34 (n = 5)
SAM	69 $\pm$ 2,31 (n = 23)	68 $\pm$ 2,19 (n = 19)	59 $\pm$ 3,34 (n = 13)	50 $\pm$ 2,68 (n = 5)
PM	34 $\pm$ 2,32 (n = 23)	26 $\pm$ 2,08 (n = 19)	25 $\pm$ 1,98 (n = 13)	48 $\pm$ 2,48 (n = 5)

### 3.5 Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen in Korrelation zum hormonellen Zyklus der Patientinnen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der hormonellen Zyklusphase und dem prozentualen Muskelgehalt in peritonealen EM-Läsionen zu untersuchen, wurden die Daten auch hinsichtlich dieser Fragestellung statistisch analysiert. Bei zwei Patientinnen lag keine Angabe über die Zyklusphase vor, so dass ihre Daten nicht mit in die Analyse einbezogen wurden. Ebenso wurden die Daten der vier Patientinnen in der Zyklusphase der Menses und die Daten der Patientinnen mit dysfunktionellen Blutungen aus der statistischen Betrachtung ausgeschlossen. In der statistischen Analyse der Daten zeigte sich kein signifikanter Unterschied im prozentualen Muskelgehalt zwischen der Proliferationsphase (n = 16) und der Sekretionsphase (n = 16) in den verschiedenen Arealen der EM-assoziierten Muskulatur ( $p > 0.05$ ). Die dazugehörigen Daten sind in Tabelle 3.3 als MW  $\pm$  SF aufgeführt.

**Tabelle 3.3: Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit von der hormonellen Zyklusphase; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler;  $p > 0,05$ .**

	ISM	SAM	PM
Proliferationsphase	24 $\pm$ 0,81 (n = 16)	74 $\pm$ 2,37 (n = 16)	34 $\pm$ 2,12 (n = 16)
Sekretionsphase	26 $\pm$ 0,99 (n = 16)	62 $\pm$ 3,13 (n = 16)	30 $\pm$ 2,65 (n = 16)

### 3.6 Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen in Korrelation zur hormonellen Therapie

Bei der Untersuchung einer Korrelation zwischen dem Muskelgehalt in peritonealen EM-Läsionen und der Einnahme von Hormonen zeigte sich keine statistische Signifikanz ( $p > 0,05$ ; Abbildung 3.24). Bei EM-Patientinnen, die unter einer Hormontherapie standen ( $n = 22$ ), befand sich durchschnittlich 35% EM-assoziierte glatte Muskulatur in der gesamten Gewebeprobe. Bei Patientinnen ohne Hormoneinnahme ( $n = 38$ ) waren es durchschnittlich 39%.

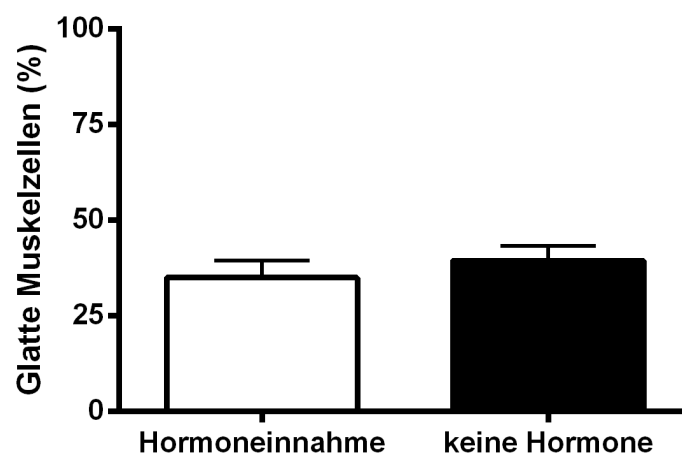


Abbildung 3.24: Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit einer Hormoneinnahme. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes Endometriose-assoziiierter Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit von einer Hormoneinnahme. Hormoneinnahme:  $n = 22$ , keine Hormone:  $n = 38$ .

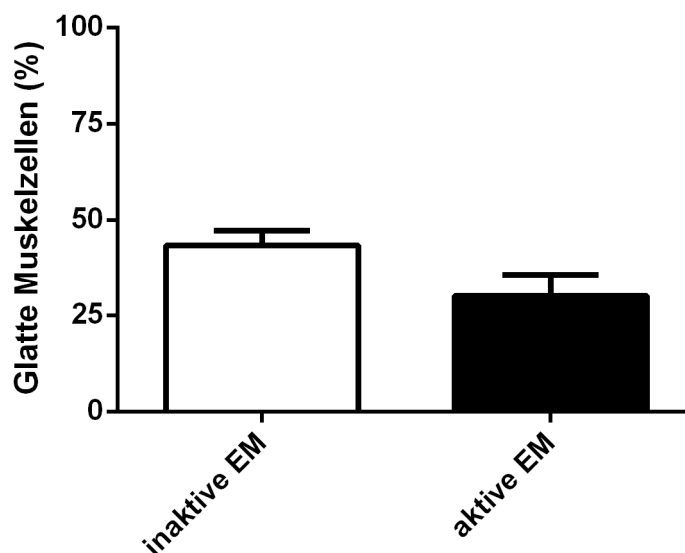
Auch die statistische Analyse einer Korrelation zwischen dem Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen der EM-assoziierten Muskulatur und einer Hormoneinnahme zeigte im Mann-Whitney Test keine Signifikanz ( $p > 0,05$ ; Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit von einer Hormoneinnahme; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler.

	ISM	SAM	PM
Hormoneinnahme	25 $\pm$ 0,94 (n = 22)	62 $\pm$ 2,17 (n = 22)	28 $\pm$ 2,06 (n = 22)
Keine Hormoneinnahme	26 $\pm$ 0,86 (n = 38)	66 $\pm$ 2,85 (n = 38)	32 $\pm$ 2,39 (n = 38)

### 3.7 Korrelation zwischen dem Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen und dem Aktivitätsgrad des Endometrioseherdes

Die Angabe des Aktivitätsgrades der EM-Läsion konnte bei 41 Patientinnen aus dem Operationsbericht entnommen werden. Die Daten der 19 Frauen mit nicht klassifizierten EM-Proben wurden nicht in die statistische Analyse einbezogen. 38 EM-Läsionen waren schwarz oder weißlich vernarbt und somit inaktiv. Drei EM-Herde konnten aufgrund ihres morphologisch roten Erscheinungsbildes als aktiv eingestuft werden. Die statistische Analyse der Daten im Mann-Whitney Test zeigte, dass es keinen signifikanten Unterschied im Muskelzellgehalt zwischen aktiven und inaktiven peritonealen EM-Läsionen gibt ( $p > 0,05$ ; Abbildung 3.25).



**Abbildung 3.25:** Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit vom Aktivitätsgrad des Endometrioseherdes. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes Endometriose-assoziiierter Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit vom Aktivitätsgrad des Endometrioseherdes. Inaktive EM:  $n = 38$ , aktive EM:  $n = 3$ .

Auch der Muskelgehalt in den drei verschiedenen Arealen der EM-assoziierten Muskulatur zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen aktiven und inaktiven EM-Läsionen ( $p > 0,05$ ). Die dazugehörigen Daten sind in Tabelle 3.5 als MW  $\pm$  SF angegeben.

**Tabelle 3.5: Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit vom Aktivitätsgrad der Endometrioseläsion; Mittelwerte (%) ± Standardfehler.**

	ISM	SAM	PM
Aktive EM	20 ± 1,00 (n = 3)	73 ± 1,53 (n = 3)	17 ± 1,15 (n = 3)
Inaktive EM	25 ± 0,92 (n = 38)	67 ± 2,70 (n = 38)	36 ± 2,33 (n = 38)

### **3.8 Korrelation zwischen dem Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen und dem Krankheitsverlauf der EM**

Um eine mögliche Korrelation zwischen dem Muskelzellgehalt in peritonealen EM-Läsionen und dem Krankheitsverlauf der EM festzustellen, wurde der prozentuale Muskelzellgehalt in Abhängigkeit von einer Erstdiagnose der Erkrankung oder eingetretenen Rezidiven untersucht. Bei drei Patientinnen lag keine Angabe über den Krankheitsverlauf vor, weshalb deren Daten nicht mit in die statistische Analyse einbezogen wurden. Die EM-Läsionen von Patientinnen mit Erstdiagnose (n = 22) enthielten durchschnittlich 47% glatte Muskelzellen in der Peripherie des Gewebeschnittes, während sich in den Gewebeproben von Patientinnen mit Rezidiv (n = 35) durchschnittlich nur 34% Muskulatur in diesem Areal befand. Die statistische Auswertung zeigte im Mann-Whitney Test, dass Patientinnen, bei denen die Gewebeproben aus einer diagnostischen Laparoskopie bzw. Laparotomie mit Erstdiagnose der EM stammten, signifikant mehr Muskulatur im Bereich der Peripherie enthielten, als EM-Läsionen von Patientinnen mit einer oder mehreren Voroperationen ( $p < 0,05$ ). Die dazugehörigen Daten sind in Abbildung 3.26 dargestellt.

Die statistische Analyse des Muskelzellgehaltes im intrastromalen Gewebeareal und im Stroma-assoziierten Areal der EM-assoziierten Muskulatur zeigte in Hinblick auf den Krankheitsverlauf der EM keinen statistisch signifikanten Unterschied im Mann-Whitney Test ( $p > 0,05$ ). In Tabelle 3.6 sind die dazugehörigen Daten als MW ± SF angegeben.

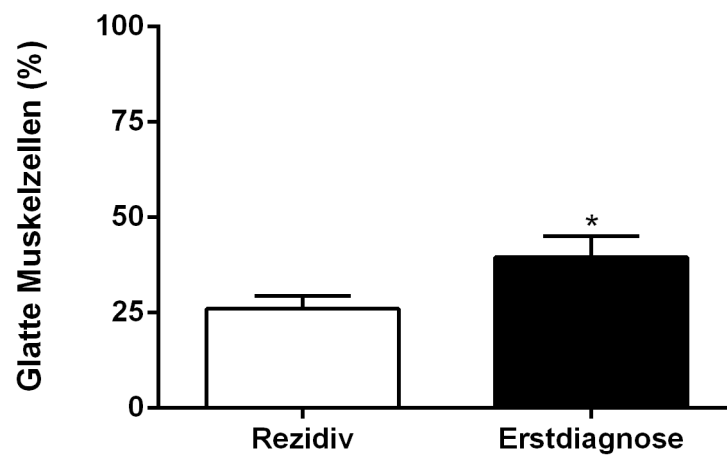


Abbildung 3.26: Prozentualer Anteil Endometriose-assoziiertes glatter Muskelzellen in der Peripherie bei Patientinnen mit Rezidiv und Erstdiagnose der Endometriose. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes Endometriose-assoziiertes Muskulatur in der Peripherie von peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf der Endometriose. Rezidiv: n = 35, Erstdiagnose: n = 22; Mann-Whitney Test \* p < 0,05.

Tabelle 3.6: Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiertes Muskulatur in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf der Endometriose; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler.

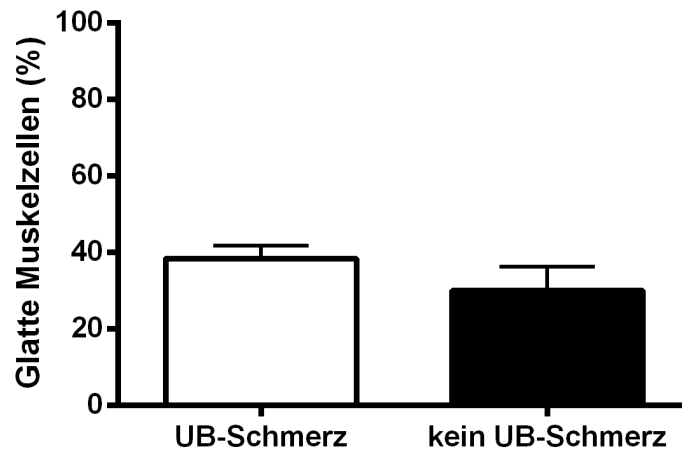
	ISM	SAM	PM
Rezidiv	25 $\pm$ 0,95 (n = 35)	65 $\pm$ 2,58 (n = 35)	34 $\pm$ 1,96 (n = 35)
Erstdiagnose	25 $\pm$ 0,86 (n = 22)	67 $\pm$ 2,66 (n = 22)	47 $\pm$ 2,64 (n = 22)*

\*p < 0,05 (siehe Abb. 3.26)

### 3.9 Korrelation zwischen dem Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen und chronisch rezidivierenden Unterbauchschmerzen

Die Angabe über das Vorliegen von Unterbauchschmerzen lag bei 52 der 60 EM-Patientinnen vor. 5 Patientinnen beklagten gemäß Akteneinsicht keine Unterbauchschmerzen. Bei drei Patientinnen lag keine Angabe über das Vorhandensein von Unterbauchschmerzen vor, weshalb deren Daten nicht in den Test einbezogen wurden. Die statistische Analyse einer Korrelation zwischen dem

Muskelgehalt in peritonealen EM-Läsionen und dem Auftreten von chronisch rezidivierenden Unterbauchschmerzen zeigte im Mann-Whitney Test keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0,05$ ). Abbildung 3.27 stellt die dazugehörigen Daten graphisch dar.



**Abbildung 3.27:** Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit vom Auftreten chronisch rezidivierender Unterbauchschmerzen bei Endometriose-Patientinnen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes Endometriose-assoziiierter Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit vom Auftreten chronisch rezidivierender Unterbauchschmerzen. UB-Schmerz = Unterbauchschmerz ( $n = 52$ ), kein UB-Schmerz = kein Unterbauchschmerz ( $n = 5$ ).

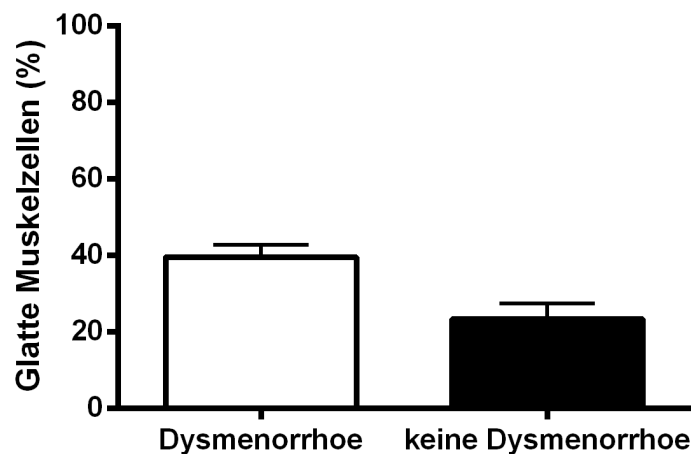
Auch die statistische Analyse der Daten in den verschiedenen Arealen der EM-assoziierten Muskulatur ergab keine statistische Signifikanz im Mann-Whitney Test hinsichtlich einer Korrelation zwischen dem Vorkommen glatter Muskelzellen und dem Auftreten chronisch rezidivierender Unterbauchschmerzen ( $p > 0,05$ ). Die dazugehörigen Daten sind in Tabelle 3.7 als MW  $\pm$  SF wiedergegeben.

**Tabelle 3.7:** Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit vom Auftreten chronisch rezidivierender Unterbauchschmerzen; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler.

	ISM	SAM	PM
UB-Schmerz	25 $\pm$ 0,94 ( $n = 52$ )	65 $\pm$ 2,67 ( $n = 52$ )	31 $\pm$ 2,40 ( $n = 52$ )
Kein UB-Schmerz	26 $\pm$ 0,55 ( $n = 5$ )	60 $\pm$ 3,08 ( $n = 5$ )	24 $\pm$ 1,34 ( $n = 5$ )

### 3.10 Korrelation zwischen dem Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen und Dysmenorrhoe

Eine Dysmenorrhoe lag bei 53 der 60 EM-Patientinnen vor. Bei 6 Patientinnen konnte aus den Unterlagen entnommen werden, dass sie an keiner Dysmenorrhoe litten. Bei einer Patientin fehlte die Angabe über das Vorliegen einer Dysmenorrhoe, weshalb ihre Daten nicht mit in den Test einbezogen wurden. Die Analyse zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied im Muskelgehalt der EM-Läsion zwischen Patientinnen mit und ohne Dysmenorrhoe, weder bezogen auf den Muskelzellgehalt in der gesamten Gewebeprobe (Mann-Whitney Test:  $p > 0,05$ ; Abbildung 3.28) noch hinsichtlich des Muskelzellgehaltes in den verschiedenen Arealen der EM-assoziierten Muskulatur (Mann-Whitney Test:  $p > 0,05$ ; Tabelle 3.8).



**Abbildung 3.28:** Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit von dem Auftreten einer Dysmenorrhoe bei Endometriose-Patientinnen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes Endometriose-assoziiierter Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit von dem Auftreten einer Dysmenorrhoe. Dysmenorrhoe:  $n = 53$ , keine Dysmenorrhoe:  $n = 6$ .

**Tabelle 3.8:** Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit von dem Auftreten einer Dysmenorrhoe; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler.

	ISM	SAM	PM
Dysmenorrhoe	25 $\pm$ 0,93 ( $n = 53$ )	66 $\pm$ 2,69 ( $n = 53$ )	32 $\pm$ 2,37 ( $n = 53$ )
Keine Dysmenorrhoe	28 $\pm$ 0,41 ( $n = 6$ )	48 $\pm$ 1,72 ( $n = 6$ )	18 $\pm$ 1,33 ( $n = 6$ )



## 4 Diskussion

Die EM ist eine häufige Erkrankung von Frauen im reproduktionsfähigen Alter, die mit einer ausgeprägten, vielseitigen Beschwerdesymptomatik einhergehen kann. Zwei Leitsymptome bei EM-Patientinnen sind EM-assoziierte Unterbauchschmerzen und Dysmenorrhoe, wobei das Beschwerdebild interessanterweise nicht mit dem Schweregrad der EM korreliert [20]. Einen neuen Forschungsaspekt stellen in diesem Zusammenhang die EM-assoziierten glatten Muskelzellen dar. Bedingt durch ihre schlechte Visualisierbarkeit in der klassischen Hämatoxylin-Eosin-Färbung konnten die EM-assoziierten glatten Muskelzellen lange Zeit nicht gut vom angrenzenden fibroadipösen Bindegewebe im Peritoneum unterschieden werden. Somit wurden sie auch nicht als Komponente der EM-Läsionen betrachtet. Das Verfahren der Immunhistochemie ermöglicht es heute, die EM-assoziierten glatten Muskelzellen in allen Formen der EM darzustellen. So konnten glatte Muskelzellen bereits in peritonealen [3,24,25], ovariellen [25,52] und in tief infiltrierenden EM-Läsionen [54] identifiziert werden. Auch in Adenomyosis uteri [56] und sogar in extragenitalen Bauchdeckenendometriosen [53,55] wurden derartige EM-assoziierte glatte Muskelzellen nachgewiesen. Neuere Studien zeigten zudem, dass glatte Muskelzellen einen erheblichen Anteil der EM-Läsionen ausmachen können und mit der Expression von OTR sogar Charakteristika der Uterusmuskulatur aufweisen [25].

Viele Forschungsgruppen beschäftigen sich seither mit dem Vorkommen und der Genese EM-assoziiierter glatter Muskelzellen [3,24,25,52-56] und entfachten eine Diskussion über den Ursprung und die Bedeutung dieser Muskelzellen. Dennoch sind sowohl die Genese als auch die Frage nach einer möglichen Funktionalität der EM-assoziierten Muskelzellen bislang nicht geklärt.

Die vorliegende Studie liefert erste Hinweise für einen möglichen metaplastischen Ursprung der EM-assoziierten glatten Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen. Wesentliche Anhaltspunkte hierbei sind das Vorliegen unterschiedlicher Muskelzellendifferenzierungsgrade in EM-assoziierten Muskelzellen und die Expression von Muskelzellfunktionalitätsmarkern und uterinen Markermolekülen, insbesondere in ausdifferenzierten, peripher lokalisierten glatten Muskelzellen.

#### **4.1 Vorkommen, Lokalisation und Gehalt glatter Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen**

Im ersten Schritt dieser Studie wurden das Vorkommen und die Lokalisation EM-assoziiertes glatter Muskelzellen sowie der Muskelgehalt in peritonealen EM-Läsionen untersucht und mit dem Vorkommen glatter Muskelzellen in EM-freien Peritonealproben verglichen. Dabei konnte ein Vorkommen von EM-assoziierten glatten Muskelzellen in allen untersuchten peritonealen EM-Läsionen (100%) nachgewiesen werden. In den EM-freien Peritonealproben hingegen fand sich in nur drei Gewebeschnitten (30%) glatte Muskulatur. Es kamen somit signifikant mehr Muskel-positive Gewebeproben in der Endometriosegruppe vor, als in der EM-freien Kontrollgruppe.

Bei der mikroskopischen Betrachtung der EM-assoziierten glatten Muskelzellen fiel auf, dass sich drei verschiedene Areale abgrenzen lassen: die intrastromalen Muskelzellen, die Stroma-assoziierten glatten Muskelzellen sowie die glatte Muskulatur in der Peripherie der EM-Läsionen. Die Stroma-assoziierten glatten Muskelzellen zeigten eine zirkuläre Anordnung um die peritonealen EM-Läsionen, die sehr stark an die Beschreibungen von De Snoo [107] sowie Leyendecker und Kollegen [24] erinnerte. Auch diese Kollegen beobachteten bereits die bemerkenswerte zirkuläre Anordnung der glatten Muskelzellen und verglichen deren Ähnlichkeit mit den morphologischen Eigenschaften eines primordialen Uterus. Interessanterweise konnten in dem zirkulär angeordneten Stroma-assoziierten Areal mit durchschnittlich 65% die meisten glatten Muskelzellen in den peritonealen EM-Läsionen gefunden werden, während sich intrastromal (25%) und in der Peripherie (31%) der Gewebeschnitte deutlich weniger Muskulatur nachweisen ließ. Weiterhin fiel auf, dass sich intrastromal lokalisierte glatte Muskelzellen diffus zwischen den Stromazellen befanden und keinerlei morphologische Anordnung zeigten, während peripher lokalisierte Muskelzellen oftmals bereits zu kleinen Muskelbündeln organisiert waren.

Vergleicht man den Gehalt glatter Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen mit dem Muskelgehalt in EM-freien Peritonealproben, so lässt sich auch hier ein signifikanter Unterschied feststellen. In den peritonealen EM-Läsionen konnten mit durchschnittlich 38% signifikant mehr glatte Muskelzellen identifiziert werden, als in

den gesunden Peritonealproben, die im Durchschnitt nur 6% glatte Muskelzellen enthielten. EM-assoziierte glatte Muskelzellen kamen in den peritonealen EM-Läsionen in großer Zahl vor, unabhängig von der anatomischen Lokalisation der peritonealen Gewebeproben und dem Aktivitätsgrad der EM-Läsionen. Auch das rASRM-Stadium der Erkrankung hatte keinen Einfluss auf den Muskelzellgehalt in den Gewebeproben. Obwohl EM-Läsionen im rASRM-Stadium IV tendenziell die meisten glatten Muskelzellen enthielten, konnte diesbezüglich keine statistische Signifikanz festgestellt werden. Ebenso hatten die hormonelle Zyklusphase und die Einnahme von Hormonen keinen Einfluss auf den Gehalt an glatten Muskelzellen in den EM-Läsionen. Zudem war es nicht möglich eine Korrelation zwischen dem Auftreten chronisch rezidivierender Unterbauchschmerzen oder einer Dysmenorrhoe und dem Muskelgehalt in peritonealen EM-Läsionen aufzuzeigen. Lediglich der Krankheitsverlauf scheint mit dem Gehalt glatter Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen zu korrelieren. So war der Muskelzellgehalt im Falle einer Erstdiagnose der EM in der Peripherie der Gewebeschnitte signifikant höher, als im Falle eines Rezidivs der Erkrankung. Möglicherweise ist dies ein Hinweis darauf, dass die EM-assoziierten glatten Muskelzellen im Prozess der Pathogenese peritonealer EM-Läsionen erst später auftreten und ausdifferenziert werden. Wenn man davon ausgeht, dass die Diagnosestellung der EM bei den meisten Patientinnen im Mittel erst nach 7 Jahren erfolgt [26], könnte hier ein langer Differenzierungsprozess stattgefunden haben, der zu einem signifikant höheren Anteil ausdifferenzierter EM-assoziiertes Muskelzellen geführt hat. Dies legt die Hypothese nahe, dass der Anteil EM-assoziiertes glatter Muskelzellen in EM-Läsionen möglicherweise mit dem Alter des EM-Herdes korrelieren könnte.

Die Daten der vorliegenden Studie zu Vorkommen und Gehalt glatter Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen belegen deutlich ein EM-assoziiertes Auftreten glatter Muskelzellen im Peritoneum von Frauen mit EM. Das Peritoneum von EM-Patientinnen enthält signifikant häufiger und signifikant mehr glatte Muskelzellen, als dasjenige EM-freier Frauen.

Anaf und Kollegen führten eine der ersten Studien mit einem monoklonalen Antikörper gegen smActin an pelvinen EM-Läsionen durch. In Übereinstimmung mit den Daten der vorliegenden Studie konnten auch sie zeigen, dass in allen von ihnen

untersuchten EM-Läsionen smActin-positive Zellen vorkamen und EM-Herde signifikant mehr glatte Muskelzellen aufwiesen, als vergleichbares gesundes Kontrollgewebe. Sie stellten zudem fest, dass EM-Läsionen unabhängig von ihrer Lokalisation beachtliche Mengen an glatten Muskelzellen enthielten [3].

Ein EM-unabhängiges gehäuftes Vorkommen glatter Muskelzellen im weiblichen Peritoneum, wie in einer Studie von Fredericks und Kollegen zum Vorkommen glatter Muskelzellen im weiblichen Beckenperitoneum beschrieben, konnte in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden [125]. Allerdings wurden in der Studie von Fredericks und Kollegen 70 Gewebeproben von 31 Frauen untersucht, die wegen des klinischen Verdachts auf EM operiert wurden. Das entnommene Gewebe enthielt neben EM-Läsionen auch andere Arten von „Müllerianosis“, chronische Entzündungen sowie makroskopisch unauffälliges Gewebe. Sie konnten in 52 Biopsien glatte Muskelzellen im subcoelomen Mesenchym finden. Fredericks und Kollegen interpretierten dieses Ergebnis als ein häufiges Vorkommen glatter Muskelzellen im weiblichen Becken, so dass diese als normale Komponente der Mikroanatomie des Gewebes der untersuchten Frauen angesehen wurden [125]. Dabei unterschieden sie jedoch nicht zwischen Frauen mit und ohne EM und führten diesbezüglich auch keine vergleichende Quantifizierung des Vorkommens glatter Muskelzellen in den Gewebeproben durch.

Die aktuellen Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen deutlich, dass glatte Muskelzellen im gesunden Peritoneum signifikant seltener und in geringerer Anzahl auftreten, als in Assoziation mit einer EM und weisen somit auf ein EM-assoziiertes Vorkommen glatter Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen hin. Zudem liefert die vorliegende Studie weitere interessante Hinweise auf die Genese und die Bedeutung der EM-assoziierten glatten Muskelzellen.

#### **4.2 Muskelzellendifferenzierungs- und Muskelzellfunktionalitätsmarker in glatten Muskelzellen peritonealer Endometrioseläsionen**

Mittels der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon wurde der Differenzierungsgrad der glatten Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass glatte Muskelzellen in unmittelbarer Umgebung von EM-Läsionen (ISM/SAM) die Muskelzellendifferenzierungsmarker

deutlich weniger und geringer exprimieren, als glatte Muskulatur in der Peripherie der Gewebeschnitte (PM). Dies lässt vermuten, dass es sich bei den intrastromalen und den Stroma-assoziierten Muskelzellen eher um unreife, noch weniger ausdifferenzierte Muskelzellen handelte, während die peripher gelegenen, oftmals schon zu Muskelbündeln organisierten Muskelzellen, eine vollständige Differenzierung aufwiesen. Diese Ergebnisse stellen einen ersten Hinweis auf einen Muskelzellendifferenzierungsprozess in der EM-assoziierten glatten Muskulatur dar. Interessanterweise konnten in den glatten Muskelzellen EM-freier Peritonealproben derartige Hinweise auf einen Muskelzellendifferenzierungsprozess nicht beobachtet werden. Hier exprimierten die smActin-positiven Muskelzellen auch in ähnlich hohem Anteil die Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon, so dass sich mikroskopisch kein Expressionsunterschied feststellen ließ. Demzufolge scheint es sich hierbei allein um ausdifferenzierte glatte Muskelzellen zu handeln.

Der Nachweis ausdifferenzierter glatter Muskelzellen in der Peripherie peritonealer EM-Läsionen legte im nächsten Schritt dieser Arbeit die Fragestellung nahe, ob diese Muskelzellen auch funktionell aktiv sein könnten. Aus diesem Grund wurden zur weiteren Charakterisierung der EM-assoziierten glatten Muskelzellen immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen den Muskelzellfunktionalitätsmarker sm-MHC sowie die uterinen Markermoleküle OTR und VPR angefertigt. Auch hier zeigten sich interessante Expressionsunterschiede innerhalb der verschiedenen Areale der EM-assoziierten glatten Muskulatur in peritonealen EM-Läsionen. So konnte beobachtet werden, dass die uterinen Markermoleküle OTR und VPR sowie sm-MHC signifikant häufiger in den reifen, ausdifferenzierten glatten Muskelzellen in der Peripherie der EM-Läsionen exprimiert wurden, als in den unreifen Muskelzellen in unmittelbarer Umgebung des EM-Herdes.

Diese Beobachtungen sind Hinweise auf einen Muskelzellendifferenzierungsprozess in EM-assoziierten glatten Muskelzellen mit dem Vorliegen unterschiedlicher Differenzierungsgrade der glatten Muskelzellen und der Expression uteriner Markermoleküle v.a. in ausdifferenzierten glatten Muskelzellen. In unmittelbarer Umgebung der peritonealen EM-Läsion fanden sich unreife Muskelzellen, während weiter peripher ausdifferenzierte glatte Muskelzellen lokalisiert waren. Mit

zunehmendem Differenzierungsgrad exprimierten die EM-assoziierten glatten Muskelzellen uterine Markermoleküle wie OTR und VPR und den Muskelzellfunktionalitätsmarker sm-MHC.

Es ist nun die Frage zu klären, wo dieser Muskelzelldifferenzierungsprozess seinen Ursprung nimmt.

#### **4.3 Genese der Endometriose-assoziierten glatten Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen**

Das EM-assoziierte Vorkommen glatter Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen lässt die Frage nach deren Genese aufkommen. Diesbezüglich können verschiedene Hypothesen diskutiert werden: Sind die EM-assoziierten glatten Muskelzellen durch metaplastische Prozesse aus den endometrialen Stromazellen entsprungen, durch eine Reaktivierung aus persistierenden Zölomepithelzellen hervorgegangen oder entstanden sie in einer metaplastischen Reaktion des umliegenden Gewebes aus peritonealen Fibroblasten?

Gemeinsam ist allen drei Hypothesen eine Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die über eine Expression von smActin zu einer Differenzierung zu glatten Muskelzellen führt [57]. Bislang ist es völlig ungeklärt, wo dieser Muskelzelldifferenzierungsprozess seinen Ursprung nimmt. Ebenso ist unbekannt, welcher Mechanismus den Prozess induziert.

Die Beobachtungen der vorliegenden Studie geben histomorphologisch den Hinweis, dass die glatten Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen durch metaplastische Vorgänge aus endometrialen Stromazellen hervorgehen könnten. Die enge morphologische Lokalisation unreifer, undifferenzierter glatter Muskelzellen zwischen den Stromazellen und direkt zirkulär an das Stroma angrenzend, liefert einen ersten Hinweis darauf, dass möglicherweise eine metaplastische Umwandlung von Stromazellen zu glatten Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen erfolgt. Es scheint ein Muskelzelldifferenzierungsprozess stattzufinden, der rein morphologisch betrachtet von endometrialen Stromazellen ausgehen könnte. Auch die Expression von OTR und VPR, Markern für uterine glatte Muskelzellen [94,126], lässt die Vermutung aufkommen, dass diese Muskelzellen durch eine Metaplasie aus uterinen

Stromazellen entstanden sind. Diese interessante Hypothese wirft die Diskussion auf, wo EM-assoziierte glatte Muskelzellen ihren Ursprung nehmen.

Es ist bereits lange bekannt, dass das Potential, glatte Muskelfasern metaplastisch zu entwickeln, nicht nur in der Embryogenese, sondern auch im adulten Uterus ein spezifisches Potential des basalen Stromas ist [63,64,66,127]. Es wurde nachgewiesen, dass im subendometrialen Myometrium des fetalen Uterus undifferenzierte Mesenchymzellen lokalisiert sind, aus denen eine Differenzierung in Myofibroblasten und weiter zu glatten Muskelzellen stattfindet [67,68]. In weiteren Untersuchungen wurden derartige Beobachtungen auch im adulten Uterus gemacht. In der subendometrialen-myometrialen Übergangszone des Uterus wurden elektronenmikroskopisch Myofibroblasten identifiziert, die in der Sekretionsphase des Menstruationszyklus mehr Charakteristika glatter Muskelzellen aufweisen, als in der Proliferationsphase des Menstruationszyklus [74]. Dies ist ein Beweis dafür, dass auch im adulten Uterus physiologischerweise Muskelzellmetaplasien auftreten und unter dem Einfluss ovarieller Hormone in der Junktionalzone eine Metaplasie von endometrialen Stromazellen zu Myozyten stattfindet [64,74].

Mit dieser Erkenntnis ist es durchaus denkbar, dass Zellen der Basalschicht des Endometriums mit Stammzellcharakter durch pathologische Kontraktionen aus dem Uterus herauskatapultiert werden. Diese Stammzellfragmente könnten dann in der Lage sein, losgelöst aus ihrem Gewebsverband in der Basalis, sich am Peritoneum festzusetzen und das embryonale paramesonephrische Organogeneseprogramm zu reaktivieren [25,66,107]. So sehen Leyendecker und Kollegen die Archimetra als adulte Repräsentanz des fetalen primordialen Uterus. Ihrer Ansicht nach stellt letztlich jeder Endometrioseherd den Versuch dar, einen neuen primordialen Uterus zu bilden [42]. Neuere Forschungsergebnisse zur Identifizierung von endometrialen Stammzellmarkern in der Basalschicht humanen Endometriums und in Endometriosegewebe unterstützen diese Hypothese [128]. So konnten kürzlich Stammzellmarker im endometrialen Stroma nachgewiesen werden, die eine Stammzellbeteiligung an der Ätiologie der EM und der Genese der EM-assoziierten glatten Muskelzellen immer wahrscheinlicher machen. Auch das Vorkommen von Stammzellen im Menstruationsblut unterstützt das Konzept einer Verschleppung von

endometrialen Stammzellen durch retrograde Menstruation, welche die Manifestation von stammzellbasierten EM-Läsionen ermöglichen [129].

Des Weiteren wurde in einer Studie der Forschungsgruppe von Kim und Kollegen gezeigt, dass Progesteron *in vitro* die Expression und Freisetzung von Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in endometrialen Epithelzellen zu induzieren scheint und zur Dezidualisierung von endometrialen Stromazellen mit der Expression von smActin führt [130]. So werden möglicherweise auch im Stroma peritonealer EM-Läsionen Muskelzellmetaplasien durch derartige Mechanismen beeinflusst. Die Rolle von TGF- $\beta$ 1 könnte in diesem Zusammenhang einen weiteren vielversprechenden Forschungsansatz in peritonealen EM-Läsionen darstellen.

Trotz dieser vielversprechenden Indizien zur Genese der EM-assoziierten glatten Muskelzellen ist es bislang völlig ungeklärt, ob die glatten Muskelzellen in EM-Läsionen aus endometrialen Stromazellen entstehen oder sich durch eine Reaktivierung aus persistierenden Zölomepithelzellen entwickeln [131]. Es gibt einige Argumente, die beide Hypothese unterstützen:

Bereits 1942 diskutierte De Snoo den Ursprung EM-assoziiierter glatter Muskelzellen als eine Reaktivierung von Residuen der paramesonephritischen Gänge, so wie die embryologische Entwicklung von Uterus und Tuben aus undifferenzierten bzw. multipotenten Zellen. Diese embryonalen Zellen verweilen seiner Ansicht nach zwischen den ausdifferenzierten Zellen, erhalten zu einem späteren Zeitpunkt einen Anstoß zu einer erneuten Entwicklung und beginnen dann sich zu differenzieren [107]. Auch in primären umbilicalen EM-Läsionen wurde das Vorkommen von differenzierten und undifferenzierten EM-assoziierten glatten Muskelzellen beobachtet [55]. Dabei fanden sich läsionsnah überwiegend unreife Muskelzellen, während die ausdifferenzierten Muskelzellen weiter peripher lokalisiert lagen. Der Nachweis glatter Muskelzellen ist hierbei besonders eindrucksvoll, da die Muskelzellen an dieser Stelle eindeutig ortsfremd sind und nur durch eine Muskelzellmetaplasie entstanden sein können, gemäß der Hypothese der Endometrioseentstehung durch metaplastische Vorgänge aus persistierenden Zölomepithelzellen [109]. So ist es insbesondere in diesem Fall naheliegend, dass sich die Epithelzellen, Stromazellen und glatten Muskelzellen durch eine Metaplasie aus persistierenden zölomhaltigen Epithelzellen entwickelten. Diese



Zölomepithelzellen treten physiologischerweise während der Embryonalphase im Nabel auf und bilden sich nach Schließung der physiologischen Omphalozele in der 12. Schwangerschaftswoche wieder zurück. Residuen infolge eines persistierenden Nabelbruches nach der Geburt stellen möglicherweise einen ursächlichen Faktor für die Persistenz solcher multipotenten Zölomepithelzellen dar. Diese könnten sich dann bei Persistenz den Apoptosemechanismen entziehen, sich in der reproduktiven Phase reaktivieren und durch Metaplasie zur Ausbildung von EM-Läsionen aus diesen reaktivierten pluripotenten Zellen führen [55,109]. Der kürzlich gelungene Nachweis von disloziertem primitivem endometrialem Gewebe in menschlichen Foeten während der Organogenese unterstützt diese Hypothese der Endometrioseentstehung [131]. So konnte in einer Studie von Signorile und Kollegen in 4 von 36 Foeten ein Vorkommen von disloziertem primitivem endometrialem Gewebe außerhalb der Gebärmutterhöhle an typischen EM-Manifestationsorten gezeigt werden.

Des Weiteren wurde das Vorkommen EM-assoziiierter glatter Muskelzellen auch in primären und sekundären Bauchdeckenendometriosen beschrieben [53]. Kazakov und Kollegen untersuchten 71 Fälle primärer Nabelendometriosen und sekundärer Narbenendometriosen, die bedingt durch ein Verschleppen von endometrialen Zellen während einer Operation, z.B. im Rahmen einer Sectio caesarea, entstanden [53]. Sie konnten in 31% der Fälle eine Muskelzellmetaplasie nachweisen. Die glatten Muskelzellen waren in Übereinstimmung mit der aktuellen Studie auch in diesen Fällen zwischen den Stromazellen lokalisiert, was morphologisch gesehen den Ursprung dieser Muskelzellen in einer Muskelzellmetaplasie aus endometrialen Stromazellen und nicht aus dem umliegenden Gewebe heraus, nahe legt [53,55]. Das nachgewiesene physiologische Auftreten von Muskelzellmetaplasien in der Junktionalzone des Uterus unterstützt diese Hypothese [64,68].

Im Gegensatz zur Hypothese der Muskelzellmetaplasie aus endometrialen Stromazellen bzw. der Entstehung der EM-assoziierten glatten Muskelzellen aus persistierenden Zölomepithelzellen, wurde die Entwicklung dieser Muskelzellen in einigen EM-Manifestationsformen als eine Reaktion des umliegenden fibroadipösen Bindegewebes diskutiert:

So konnten einige Forschungsgruppen glatte Muskelzellen in ovariellen Endometriosezysten identifizieren [25,52]. Fukunaga und Kollegen wiesen in einer großen Serie von ovariellen Endometriosezysten in 18% der Fälle eine Muskelzellmetaplasie nach. Diese glatten Muskelzellen waren vereinzelt im Stroma der Endometriosezysten lokalisiert, zumeist aber zirkulär um die Endometriosezysten angeordnet, jedoch ohne eine Mischung von Stromazellen und glatten Muskelzellen [52]. So diskutierten Fukunaga und Kollegen das Vorkommen der Muskelzellen im Stroma der Endometriosezysten als eine Muskelzellmetaplasie aus endometrialen Stromazellen und in der Randzone als eine metaplastische Umgebungsreaktion der ovariellen Stromazellen. In Übereinstimmung damit konnten auch Mechsner und Kollegen Muskelzellmetaplasien in ovariellen Endometriosezysten nachweisen, wobei sogar in 87% der Fälle glatte Muskelzellen identifiziert wurden [25]. Auch ihnen fiel die Lokalisation glatter Muskelzellen zum einen zwischen den endometrialen Stromazellen, zum anderen zirkulär angeordnet in der Peripherie der Endometriosezysten auf und sie diskutierten ebenfalls hinsichtlich der morphologischen Lokalisation der glatten Muskelzellen unterschiedliche pathomorphologische Ursprungsmechanismen der Muskelzellmetaplasien [25]. Wie sich in einer weiteren Studie von Doss und Kollegen zeigte, ist die Beobachtung glatter Muskelzellen im Ovar kein ausschließlich EM-assoziiertes Phänomen. Auch in anderen gutartigen Tumoren wurde das Vorkommen von glatten Muskelzellen in der Umgebung der Läsionen gezeigt. Doss und Kollegen erklärten die Entwicklung der glatten Muskelzellen deshalb eher als eine fibrotische Umgebungsreaktion der ovariellen Stromazellen auf den jeweiligen pathomorphologischen Prozess und nicht als ein ausschließlich EM-assoziiertes Phänomen [132].

In weiteren EM-Manifestationsformen wurde das Vorkommen EM-assoziiierter glatter Muskelzellen beschrieben: So wurden in tief infiltrierender EM ebenfalls glatte Muskelzellen identifiziert [3,133,134]. Auch diese Kollegen diskutierten über den Ursprung der EM-assoziierten glatten Muskelzellen ohne eine Klärung der Frage nach deren Genese herbeiführen zu können. Itoga und Kollegen beschrieben die Muskelzellmetaplasie in rektovaginalen EM-Läsionen und wurden dabei darauf aufmerksam, dass der Grad der Muskelzellmetaplasie mit dem Schweregrad der Fibrose im Gewebe korrelierte [134]. Die Differenzierung glatter Muskelzellen in tief infiltrierender EM untersuchten Van Kaam und Kollegen mit Muskelzellmarkern wie

Vimentin, Desmin, smActin und sm-MHC. Auch sie zeigten in Übereinstimmung mit den Daten der vorliegenden Studie, dass verschiedene Differenzierungs- und Reifungsgrade der glatten Muskelzellen in EM-assoziiertem fibromuskulärem Bindegewebe vorliegen. Dabei zeigte sich eine hohe Expression von smActin und Vimentin sowie eine geringere Expression von Desmin und sm-MHC [54]. Des Weiteren demonstrierten sie erstmals eine TGF- $\beta$ 1-Expression in den Epithelzellen der EM-Läsionen und diskutierten einen Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Induktion einer Muskelzellmetaplasie im EM-assoziierten fibromuskulären Bindegewebe. In einem Mausmodell induzierten Van Kaam und Kollegen durch subkutane Injektion sowie intraperitoneale Transplantation von humanem Endometrium ektipe EM-Läsionen. Auch hier konnten sie eine Muskelzellmetaplasie beobachten. Mit Hilfe eines spezifischen humanen anti-Vimentin-Antikörpers konnte zwischen murinem und humanem Gewebe unterschieden werden. Es stellte sich ein deutlicher smActin-positiver Ring um die epithelialen und stromalen Zellen herum dar, der aber aufgrund der murinen Vimentinexpression im Serienschnitt als eindeutig Maus-abstammend interpretiert wurde. Somit deuteten Van Kaam und Kollegen diesen Muskelzellring als eine Umgebungsreaktion des angrenzenden murinen Bindegewebes. Sie verglichen diesen Prozess mit einem passageren Myofibroblastenvorkommen, wie es im Rahmen der Wundheilung auftreten kann, und interpretierten ihn nicht als Muskelzellmetaplasie aus dem implantierten Endometriumgewebe selbst [54].

Von einigen Kollegen wurde das Vorkommen EM-assoziiierter glatter Muskelzellen bereits als eine Umgebungsreaktion diskutiert. Auch in peritonealen EM-Läsionen ist ein derartiger Ursprung der Muskelzellmetaplasie möglich. Die Transformation peritonealer Mesothelzellen in Myofibroblasten ist ein bekanntes Phänomen und wurde auch schon bei Frauen ohne EM beschrieben, insbesondere bei Patienten mit peritonealer Fibrose. Mehrere Autoren berichten insbesondere bei Patienten nach Langzeitanwendung einer peritonealen Dialyse von einer epithelial-mesenchymalen Transformation von Mesothelzellen in Myofibroblasten, die zur Fibrose des Peritoneums führt [114,115,135,136]. Dabei wird TGF- $\beta$ 1 als ein wesentlicher Induktor diskutiert. Vermutlich induziert TGF- $\beta$ 1 die Expression von smActin in den Myofibroblasten [57]. So konnten Yang und Kollegen eine Transdifferenzierung kultivierter humaner Mesothelzellen in Myofibroblasten *in vivo* unter Zugabe von

---

TGF- $\beta$ 1 herbeiführen [114]. In einer weiteren Studie wurde die Mesothelzell-Transformation durch eine Antagonisierung der TGF- $\beta$ 1-Stimulation verhindert [136].

Khare und Kollegen untersuchten die Myofibroblastenproliferation und Veränderungen der Kollagenablagerungen in ovarialen Endometriosezysten und in infiltrierender Beckenwandendometriose. Sie beobachteten, dass in ovarialer EM die endometrialen Epithel- und Stromazellen auf der Innenseite der Schokoladenzysten angeordnet und nicht mit dem ovariellen kollagenen Bindegewebe vermischt waren, während bei der infiltrierenden Beckenwandendometriose die endometrialen Epithel- und Stromazellen mit dem Bindegewebe der Beckenwand vermischt waren. So schlussfolgerten sie einen unterschiedlichen Ursprung der Läsionen mit einer metastatischen Herkunft ovarialer Endometriosezysten und einem metaplastischen Prozess in der Pathogenese der infiltrierenden Beckenwandendometriose [23].

Insgesamt belegen die vorgestellten Daten sowie die aktuellen Ergebnisse der eigenen Studie eindeutig eine EM-assoziierte Muskelzellmetaplasie. Eine Klärung der Ursprungszellen, aus denen diese glatten Muskelzellen hervorgehen, bleibt jedoch weiterhin offen. Möglicherweise können EM-assoziierte glatte Muskelzellen sowohl aus endometrialen Stromazellen ihren Ursprung nehmen, als auch infolge einer Umgebungsreaktion des umliegenden Gewebes entstehen. Auch die Herkunft der EM-assoziierten Muskelzellen aus einer Reaktivierung von persistierenden Zölomepithelzellen ist bei einigen EM-Manifestationsformen eine durchaus vielversprechende Hypothese. Möglicherweise scheinen die Vorgänge je nach EM-Manifestationsform unterschiedlich zu sein.

In der aktuellen Studie scheinen die endometrialen Stromazellen morphologisch gesehen den Ausgangspunkt für die metaplastischen Prozesse in peritonealen EM-Läsionen darzustellen, da sich an das Stroma angrenzend der höchste Anteil an unreifen glatten Muskelzellen befindet und die Muskelzellen zur Peripherie hin weiter ausdifferenzieren. Weitere Untersuchungen sind letztendlich erforderlich, um die Herkunft der EM-assoziierten glatten Muskelzellen eindeutig zu klären.

#### 4.4 Bedeutung der EM-assoziierten glatten Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen

Ein weiterer Forschungsaspekt in dieser Studie war die Frage nach einer möglichen Funktionalität der EM-assoziierten glatten Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen. Der Nachweis von EM-assoziierten glatten Muskelzellen in unmittelbarer Umgebung von EM-Läsionen lässt die Vermutung aufkommen, dass neben der inflammatorischen und der nozizeptiven Schmerzkomponente auch die glatten Muskelzellen an dem Pathomechanismus der EM-assoziierten Schmerzen beteiligt sein könnten.

Vor kurzem wurde bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die EM-assoziierten glatten Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen OTR, ER sowie PR exprimieren und somit Charakteristika der Uterusmuskulatur aufweisen [25]. In der vorliegenden Studie wurde nun gezeigt, dass die EM-assoziierten glatten Muskelzellen neben OTR auch VPR sowie sm-MHC, ein Markermolekül für den kontraktilem Apparat glatter Muskelzellen, exprimieren. Mit fortschreitendem Differenzierungsgrad der glatten Muskelzellen wurde eine vermehrte Expression von sm-MHC, OTR und VPR nachgewiesen. Des Weiteren konnte ein hoher Muskelzellgehalt in peritonealen EM-Läsionen beobachtet werden, unabhängig vom Aktivitätsgrad des EM-Herdes und dem rASRM-Stadium der EM. Der Muskelzellgehalt in gesundem Peritonealgewebe erwies sich als gering, während in peritonealen EM-Läsionen signifikant mehr glatte Muskelzellen lokalisiert waren. Diese Ergebnisse erklären möglicherweise das Stadien-unabhängige Auftreten EM-assoziiertes Symptome [118,137], welches sich mit dem Stadien-unabhängigen Vorkommen von EM-assoziierten Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen in Zusammenhang bringen lässt. So scheint es durchaus möglich zu sein, dass die EM-assoziierten glatten Muskelzellen im Pathomechanismus der EM-assoziierten Schmerzentstehung eine Rolle spielen. Wären sie funktionell aktiv, könnten sie durch irreguläre Kontraktionen zur Irritation der peritonealen Nozizeptoren führen und so zur Schmerzempfindung beitragen [25,108]. Des Weiteren führen die übermäßigen Kontraktionen möglicherweise zu einer lokalen Gewebsverletzung im Peritoneum, ähnlich dem von Leyendecker und Kollegen beschriebenen Konzept des „*Tissue Injury and Repair*“ [42]. Dies wiederum könnte eine Aktivierung von

Reparaturmechanismen auslösen, die mit einer Überexpression der P450-Aromatase sowie einer konsekutiven lokalen Östrogensynthese verbunden sind, welche die peritoneale Hyper- und Dysperistaltik weiter forciert. Die OT-abhängigen uterinen Kontraktionen in der Junktionalzone des nicht-schwangeren Uterus wurden von Kunz und Kollegen bereits beschrieben [46]. Andere Forschungsgruppen konnten Hinweise darauf finden, dass OT die Freisetzung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  aus endometrialen Zellen zu fördern scheint [99-101].  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ist nicht nur uteroton wirksam, sondern dient auch als Schmerzmediator, indem es benachbarte Nozizeptoren koaktiviert. Diese Zusammenhänge deuten auf eine Beteiligung des OTR-Systems an der Entwicklung von EM-assoziierten Symptomen hin. Die Expression von OTR in EM-assoziierten Muskelzellen und die hypothetische OTR-vermittelte Induktion der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese in Epithelzellen machen es sehr wahrscheinlich, dass OT auch einen ähnlichen Effekt in den Epithelzellen der Endometrioseherde und in den angrenzenden EM-assoziierten glatten Muskelzellen peritonealer EM-Läsionen vermittelt. Interessanterweise wurde in der vorliegenden Studie mit VPR noch ein weiterer uterotoner Marker in den glatten Muskelzellen peritonealer EM-Läsionen nachgewiesen, der auch eine Beteiligung des VPR-Systems am Pathomechanismus der EM-assoziierten Schmerzentstehung nahelegt.

In Übereinstimmung mit Odagiri und Kollegen liefern die vorliegenden Daten einen ersten Hinweis für eine mögliche funktionelle Kontraktionsaktivität EM-assoziiierter glatter Muskelzellen in peritonealen EM-Läsionen [108]. Damit ist es nun durchaus denkbar geworden, dass neben den anderen vermuteten Mechanismen der EM-assoziierten Schmerzentstehung, wie der Freisetzung von Schmerzmediatoren oder *Nerve Growth Factor* (NGF) und Prostaglandinen, welche von den EM-Läsionen freigesetzt werden [120,121,138] sowie der engen topographischen Beziehung zu Nervenfasern [138,139], auch die EM-assoziierten glatten Muskelzellen eine weitere mögliche Komponente im Pathomechanismus der EM-assoziierten Schmerzentstehung darstellen.

## 4.5 Ausblick

Dies ist die erste Studie, die metaplastische Vorgänge in EM-assoziierten glatten Muskelzellen peritonealer EM-Läsionen beschreibt. Es wurde das Vorkommen verschiedener Muskelzellendifferenzierungsgrade gezeigt, wobei morphologisch gesehen die endometrialen Stromazellen den Ausgangspunkt für die metaplastischen Prozesse in peritonealen EM-Läsionen darzustellen scheinen. Des Weiteren konnte immunhistochemisch die Fähigkeit der EM-assoziierten glatten Muskelzellen nachgewiesen werden, aus biologischer Sicht funktionelle Kontraktionsaktivität auszuüben und damit an dem Pathomechanismus der EM-assoziierten Schmerzentstehung beteiligt sein zu können.

Es sind weitere *in vitro* oder *in vivo* Studien erforderlich, um die Muskelzellmetaplasie vollständig darzustellen sowie die hypothetische Kontraktionsaktivität der EM-assoziierten glatten Muskelzellen funktionell darzulegen. Dazu könnten Patch Clamp-Messungen an exziierten peritonealen EM-Läsionen durchgeführt werden. Die EM-Läsionen würden in *Patch Clamps* installiert werden, um mögliche Kontraktionsaktivitäten der glatten Muskelzellen in den EM-Läsionen zu ermitteln. Mittels Zugabe von Kontraktionsmitteln wie OT und VP und deren Inhibitoren könnten mögliche Einflüsse auf das Kontraktionsverhalten der Muskelzellen ermittelt werden. Sollten die EM-assoziierten glatten Muskelzellen ein funktionell nachweisbares Kontraktionsvermögen besitzen und damit an der EM-assoziierten Schmerzentstehung beteiligt sein, so wäre die Unterbindung der kontraktiven Aktivität dieser Muskelzellen möglicherweise ein neuer effektiver Therapieansatz in der Behandlung EM-assoziiierter Schmerzen. So stünden gezielte medikamentöse Inhibitoren wie zum Beispiel der OT- und VP-1a-Rezeptor-Antagonist Atosiban® zur Behandlung EM-assoziiierter Schmerzen zur Verfügung [105,140,141].

Einen weiteren zukünftigen Forschungsaspekt stellt der Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Muskelzellmetaplasie in EM-Läsionen dar. Bislang gibt es keine *in vitro* Daten, die eine Beteiligung von TGF- $\beta$ 1 an einer epithelial-mesenchymalen Transformation im Sinne einer Muskelzellmetaplasie untersuchen. Mittels immunhistochemischer Methoden sollte ein Expressionsnachweis von TGF- $\beta$ 1 und seiner Rezeptoren in den verschiedenen EM-Manifestationsformen erfolgen. Einen ersten interessanten Hinweis auf eine Beteiligung von TGF- $\beta$ 1 an der Entwicklung von EM-Läsionen

beinhaltet eine Studie von Hull und Kollegen. Dabei wurde in einem Mausmodell gezeigt, dass ein Fehlen von TGF- $\beta$ 1 die Entstehung von EM-Herden supprimiert. In TGF- $\beta$ 1-Null mutierte Mäuse und TGF- $\beta$ 1-positive Mäuse wurde humanes Endometriumgewebe transplantiert und anschließend die Morphologie der EM-Läsionen immunhistochemisch untersucht. Es zeigte sich, dass unter fehlendem Einfluss von TGF- $\beta$ 1 deutlich kleinere EM-Läsionen entstanden sind. Das Drüsenepithel war wesentlich reduziert und auch die Infiltration von Makrophagen und Myofibroblasten erwies sich als deutlich geringer [142]. Dies sind vielversprechende Ergebnisse, die auch einen Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Genese der EM-assoziierten glatten Muskelzellen vermuten lassen.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Studie verdeutlichen, dass die EM-assoziierten glatten Muskelzellen einen wesentlichen Bestandteil der peritonealen EM-Läsionen ausmachen, nicht nur morphologisch, sondern auch hinsichtlich ihrer möglichen Funktionalität und Beteiligung an der EM-assoziierten Schmerzpathogenese.



## 5 Zusammenfassung

Endometriose-assoziierte Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen stellen einen vielversprechenden Forschungsansatz dar. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass Endometriose-assoziierte Muskelzellen durch metaplastische Vorgänge aus endometrialen Stromazellen hervorgehen, funktionelle Aktivität besitzen und somit an der Pathogenese Endometriose-assoziiierter Beschwerden wie Unterbauchschmerzen und Dysmenorrhoe beteiligt sind. In allen Formen der Endometriose wurden bereits glatte Muskelzellen nachgewiesen und es konnte gezeigt werden, dass diese einen erheblichen Anteil der Endometrioseläsionen ausmachen können. Ebenso ist es bislang ungeklärt, ob die Endometriose-assoziierten glatten Muskelzellen funktionell aktiv sind und durch eine mögliche Kontraktionsaktivität an dem Pathomechanismus der Endometriose-assoziierten Schmerzentstehung beteiligt sind. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, das Vorkommen und den Gehalt glatter Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen immunhistochemisch zu untersuchen, um Hinweise auf den Ursprung dieser Muskelzellen zu erhalten und Anhaltspunkte auf eine mögliche biologische Funktionalität der Muskelzellen darzulegen. Dazu wurden in einer retrospektiven Studie peritoneale EM-Läsionen (n = 60) sowie gesundes Peritonealgewebe (n = 10) immunhistochemisch untersucht. Die glatten Muskelzellen wurden mit Hilfe des etablierten Muskelzellmarkers smActin dargestellt und mittels der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon sowie des Muskelzellfunktionalitätsmarkers sm-MHC und der uterinen Markermoleküle OTR und VPR immunhistochemisch charakterisiert.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf einen metaplastischen Prozess in Endometriose-assoziierten glatten Muskelzellen mit verschiedenen Muskelzellendifferenzierungsgraden hin, der rein morphologisch gesehen seinen Ursprung in den endometrialen Stromazellen zu nehmen scheint. Die enge morphologische Lokalisation unreifer, undifferenzierter glatter Muskelzellen zwischen den Stromazellen und direkt zirkulär an das Stroma angrenzend, liefert einen ersten Hinweis darauf, dass eine metaplastische Umwandlung von Stromazellen zu glatten Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen erfolgt. Zudem scheinen die Endometriose-assoziierten glatten Muskelzellen über die Fähigkeit zur kontraktile

Aktivität zu verfügen. Insbesondere peripher lokalisierte ausdifferenzierte glatte Muskelzellen exprimieren OTR und VPR sowie sm-MHC, ein Markermolekül für den kontraktile Apparat glatter Muskelzellen. Mit diesen Erkenntnissen ist es durchaus möglich, dass Endometriose-assoziierte glatte Muskelzellen durch kontraktile Aktivität peritoneale Nozizeptoren irritieren können und somit zur Endometriose-assoziierten Schmerzempfindung beitragen. Die Expression von OTR und VPR liefert zudem einen neuen vielversprechenden Therapieansatz in der Behandlung Endometriose-assoziiierter Schmerzen. Das Stadien-unabhängige Vorkommen einer hohen Anzahl funktionell aktiver, glatter Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen könnte eine erste Erklärung für das Stadien-unabhängige Auftreten der erheblichen Schmerzsymptomatik bei vielen Endometriosepatientinnen sein.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Rokitansky, C. (1860). "Über Uterusdrüsen-Neubildung in Uterus und Ovarialcarcinom." ZKK Gesellschaft der Ärzte zu Wien 37: 577-584.
2. Stehrer, S. (2007). "Endometriose: immer mehr Frauen leiden daran." Medizin populär 10. (Aufgerufen unter: <http://www.medizinpopulaer.at/archiv/seelesein/details/article/endometriose-immer-mehr-frauen-leiden-daran.html>) am 27.02.2011)
3. Anaf, V., P. Simon, I. Fayt and J. Noel (2000). "Smooth muscles are frequent components of endometriotic lesions." Hum Reprod 15(4): 767-71.
4. Becker, C. M., J. Bartley, S. Mechsner and A. D. Ebert (2004). "[Angiogenesis and endometriose]." Zentralbl Gynakol 126(4): 252-8.
5. Giudice, L. C. and L. C. Kao (2004). "Endometriosis." Lancet 364(9447): 1789-99.
6. Ebert, A. D. (2006). Endometriose Update 2006. Berlin, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.
7. Bulun, S. E. (2009). "Endometriosis." N Engl J Med 360(3): 268-79.
8. Swiersz, L. M. (2002). "Role of endometriosis in cancer and tumor development." Ann N Y Acad Sci 955: 281-92; discussion 293-5, 396-406.
9. Van Gorp, T., F. Amant, P. Neven, I. Vergote and P. Moerman (2004). "Endometriosis and the development of malignant tumours of the pelvis. A review of literature." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 18(2): 349-71.
10. Guo, S. W. (2009). "Recurrence of endometriosis and its control." Hum Reprod Update 15(4): 441-61.
11. Gao, X., J. Outley, M. Botteman, J. Spalding, J. A. Simon and C. L. Pashos (2006). "Economic burden of endometriosis." Fertil Steril 86(6): 1561-72.
12. Schindler, A. E. (2007). "Epidemiologie, Pathogenese und Diagnostik der Endometriose." J Fertil Reprod 17(4): 22-27.
13. Catenacci, M., S. Sastry and T. Falcone (2009). "Laparoscopic surgery for endometriosis." Clin Obstet Gynecol 52(3): 351-61.

14. Keckstein, J. (2009). Endometriose: Die verkannte Frauenkrankheit. Würzburg, Diametric Verlag.
15. Kuohung, W., G. L. Jones, A. F. Vitonis, D. W. Cramer, S. H. Kennedy, D. Thomas and M. D. Hornstein (2002). "Characteristics of patients with endometriosis in the United States and the United Kingdom." *Fertil Steril* 78(4): 767-72.
16. Schweppe, K.-W. (2002). "Therapie der Endometriose unter Berücksichtigung der Aktivitätsgrade." *Der Gynäkologe* 35(3): 255-261.
17. Renner, SP., P. Oppelt, H. Binder, MW. Beckmann (2006). "Endometriose." *Geburtsh Frauenheilk* 66: R61-R88.
18. ASRM (1997). "Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996." *Fertil Steril* 67(5): 817-21.
19. Leyendecker, G. (2000). "Redefining endometriosis: endometriosis is an entity with extreme pleiomorphism." *Hum Reprod* 15(1): 4-7.
20. Jacobson, T. Z., J. M. Duffy, D. Barlow, P. R. Koninckx and R. Garry (2009). "Laparoscopic surgery for pelvic pain associated with endometriosis." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD001300.
21. Witz, C. A. and W. N. Burns (2002). "Endometriosis and infertility: is there a cause and effect relationship?" *Gynecol Obstet Invest* 53 Suppl 1: 2-11.
22. Sepulcri Rde, P. and V. F. do Amaral (2009). "Depressive symptoms, anxiety, and quality of life in women with pelvic endometriosis." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 142(1): 53-6.
23. Khare, V. K., D. C. Martin and M. Eltorkey (1996). "A comparative study of ovarian and pelvic wall-infiltrating endometriosis." *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 3(2): 235-9.
24. Leyendecker, G., M. Herberitz, G. Kunz and G. Mall (2002). "Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium." *Hum Reprod* 17(10): 2725-36.
25. Mechsner, S., J. Bartley, C. Loddenkemper, D. S. Salomon, A. Starzinski-Powitz and A. D. Ebert (2005). "Oxytocin receptor expression in smooth muscle

- cells of peritoneal endometriotic lesions and ovarian endometriotic cysts." *Fertil Steril* 83 Suppl 1: 1220-31.
26. Arruda, M. S., C. A. Petta, M. S. Abrao and C. L. Benetti-Pinto (2003). "Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women." *Hum Reprod* 18(4): 756-9.
  27. Olive, D. L. and E. A. Pritts (2001). "Treatment of endometriosis." *N Engl J Med* 345(4): 266-75.
  28. Valle, R. F. and J. J. Sciarra (2003). "Endometriosis: treatment strategies." *Ann N Y Acad Sci* 997: 229-39.
  29. Halis, G., S. Mechsner and A. D. Ebert (2010) "The diagnosis and treatment of deep infiltrating endometriosis." *Dtsch Arztebl Int* 107(25): 446-55; quiz 456.
  30. Schweppe, K.-W. (2005) Endometriose: Aktueller Stand von Diagnose und Therapie." *Frauenarzt* 46: 371-81.
  31. Halis G., Kopf A., Mechsner S., Bartley J., Thode J., Ebert A. D. (2006). "Schmerztherapeutische Optionen bei Endometriose". *Deutsches Ärzteblatt* 2006. 103(17): 1146-53.
  32. Sampson, J. A. (1927). "Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity." *Am. J. Obstet. Gynecol. J.* 14: 422-469.
  33. Halme, J., M. G. Hammond, J. F. Hulka, S. G. Raj and L. M. Talbert (1984). "Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis." *Obstet Gynecol* 64(2): 151-4.
  34. Liu, D. T. and A. Hitchcock (1986). "Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology." *Br J Obstet Gynaecol* 93(8): 859-62.
  35. Donnez, J., A. Van Langendonck, F. Casanas-Roux, J. P. Van Gossum, C. Pirard, P. Jadoul, J. Squifflet and M. Smets (2002). "Current thinking on the pathogenesis of endometriosis." *Gynecol Obstet Invest* 54 Suppl 1: 52-8; discussion 59-62.

36. Sasson, I. E. and H. S. Taylor (2008). "Stem cells and the pathogenesis of endometriosis." *Ann N Y Acad Sci* 1127: 106-15.
37. Leyendecker, G., G. Kunz, M. Noe, M. Herbertz and G. Mall (1998). "Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra." *Hum Reprod Update* 4(5): 752-62.
38. Valle, R. F. (2002). "Endometriosis: current concepts and therapy." *Int J Gynaecol Obstet* 78(2): 107-19.
39. Meyer, R. (1919). "Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa." *Zbl Gynäkol* 43: 745-750.
40. Vinatier, D., P. Dufour and D. Oosterlynck (1996). "Immunological aspects of endometriosis." *Hum Reprod Update* 2(5): 371-84.
41. Koninckx, P. R., S. H. Kennedy and D. H. Barlow (1998). "Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid." *Hum Reprod Update* 4(5): 741-51.
42. Leyendecker, G., L. Wildt and G. Mall (2009). "The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair." *Arch Gynecol Obstet* 280(4): 529-38.
43. Leyendecker, G. and G. Kunz (2005). "[Endometriosis and adenomyosis]." *Zentralbl Gynakol* 127(5): 288-94.
44. Salamanca, A. and E. Beltran (1995). "Subendometrial contractility in menstrual phase visualized by transvaginal sonography in patients with endometriosis." *Fertil Steril* 64(1): 193-5.
45. Leyendecker, G., G. Kunz, L. Wildt, D. Beil and H. Deininger (1996). "Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility." *Hum Reprod* 11(7): 1542-51.
46. Kunz, G., M. Noe, M. Herbertz and G. Leyendecker (1998). "Uterine peristalsis during the follicular phase of the menstrual cycle: effects of oestrogen, antioestrogen and oxytocin." *Hum Reprod Update* 4(5): 647-54.

47. Bulletti, C., D. De Ziegler, V. Polli, E. Del Ferro, S. Palini and C. Flamigni (2002). "Characteristics of uterine contractility during menses in women with mild to moderate endometriosis." *Fertil Steril* 77(6): 1156-61.
48. Takahashi, K., H. Nagata and M. Kitao (1989). "Clinical usefulness of determination of estradiol level in the menstrual blood for patients with endometriosis." *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 41(11): 1849-50.
49. Noble, L. S., E. R. Simpson, A. Johns and S. E. Bulun (1996). "Aromatase expression in endometriosis." *J Clin Endocrinol Metab* 81(1): 174-9.
50. Kitawaki, J., T. Noguchi, T. Amatsu, K. Maeda, K. Tsukamoto, T. Yamamoto, S. Fushiki, Y. Osawa and H. Honjo (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.
51. Hudelist, G., K. Czerwenka, J. Keckstein, C. Haas, A. Fink-Retter, D. Gschwantler-Kaulich, E. Kubista and C. F. Singer (2007). "Expression of aromatase and estrogen sulfotransferase in eutopic and ectopic endometrium: evidence for unbalanced estradiol production in endometriosis." *Reprod Sci* 14(8): 798-805.
52. Fukunaga, M. (2000). "Smooth muscle metaplasia in ovarian endometriosis." *Histopathology* 36(4): 348-52.
53. Kazakov, D. V., O. Ondic, M. Zamecnik, K. V. Shelekhova, P. Mukensnabl, O. Hes, V. Dvorak and M. Michal (2007). "Morphological variations of scar-related and spontaneous endometriosis of the skin and superficial soft tissue: a study of 71 cases with emphasis on atypical features and types of mullerian differentiations." *J Am Acad Dermatol* 57(1): 134-46.
54. van Kaam, K. J., J. P. Schouten, A. W. Nap, G. A. Dunselman and P. G. Groothuis (2008). "Fibromuscular differentiation in deeply infiltrating endometriosis is a reaction of resident fibroblasts to the presence of ectopic endometrium." *Hum Reprod* 23(12): 2692-700.
55. Mechsner, S., J. Bartley, M. Infanger, C. Loddenkemper, J. Herbel and A. D. Ebert (2009). "Clinical management and immunohistochemical analysis of umbilical endometriosis." *Arch Gynecol Obstet* 280(2): 235-42.

56. Mechsner, S., B. Grum, C. Gericke, C. Loddenkemper, J. W. Dudenhausen and A. D. Ebert (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.
57. Desmouliere, A., A. Geinoz, F. Gabbiani and G. Gabbiani (1993). "Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts." *J Cell Biol* 122(1): 103-11.
58. Owens, G. K. (1995). "Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells." *Physiol Rev* 75(3): 487-517.
59. Hinz, B., G. Celetta, J. J. Tomasek, G. Gabbiani and C. Chaponnier (2001). "Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity." *Mol Biol Cell* 12(9): 2730-41.
60. McHugh, K. M. (1995). "Molecular analysis of smooth muscle development in the mouse." *Dev Dyn* 204(3): 278-90.
61. Kohnen, G., S. Campbell, M. D. Jeffers and I. T. Cameron (2000). "Spatially regulated differentiation of endometrial vascular smooth muscle cells." *Hum Reprod* 15(2): 284-92.
62. Sanders, K. M. (2008). "Regulation of smooth muscle excitation and contraction." *Neurogastroenterol Motil* 20 Suppl 1: 39-53.
63. Bird, C. C. and R. A. Willis (1965). "The production of smooth muscle by the endometrial stroma of the adult human uterus." *J Pathol Bacteriol* 90(1): 75-81.
64. Fujii, S., I. Konishi and T. Mori (1989). "Smooth muscle differentiation at endometrio-myometrial junction. An ultrastructural study." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 414(2): 105-12.
65. Noe, M., G. Kunz, M. Herbertz, G. Mall and G. Leyendecker (1999). "The cyclic pattern of the immunocytochemical expression of oestrogen and progesterone receptors in human myometrial and endometrial layers: characterization of the endometrial-subendometrial unit." *Hum Reprod* 14(1): 190-7.



66. Leyendecker G., H. M., Kunz G. (2002). "Neue Aspekte zur Pathogenese von Endometriose und Adenomyose." *Frauenarzt* 43(3): 297-307.
67. Scully, R. E. (1981). "Smooth-muscle differentiation in genital tract disorders." *Arch Pathol Lab Med* 105(10): 505-7.
68. Konishi, I., S. Fujii, H. Okamura and T. Mori (1984). "Development of smooth muscle in the human fetal uterus: an ultrastructural study." *J Anat* 139 (Pt 2): 239-52.
69. Daels, J. (1974). "Uterine contractility patterns of the outer and inner zones of the myometrium." *Obstet Gynecol* 44(3): 315-26.
70. Brosens, J. J., F. G. Barker and N. M. de Souza (1998). "Myometrial zonal differentiation and uterine junctional zone hyperplasia in the non-pregnant uterus." *Hum Reprod Update* 4(5): 496-502.
71. Lesny, P. and S. R. Killick (2004). "The junctional zone of the uterus and its contractions." *Bjog* 111(11): 1182-9.
72. de Vries, K., E. A. Lyons, G. Ballard, C. S. Levi and D. J. Lindsay (1990). "Contractions of the inner third of the myometrium." *Am J Obstet Gynecol* 162(3): 679-82.
73. Brosens, J. J., N. M. de Souza and F. G. Barker (1995). "Uterine junctional zone: function and disease." *Lancet* 346(8974): 558-60.
74. Fusi, L., B. Cloke and J. J. Brosens (2006). "The uterine junctional zone." *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 20(4): 479-91.
75. Gabbiani, G. (2003). "The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases." *J Pathol* 200(4): 500-3.
76. Oliver, C., M. J. Montes, J. A. Galindo, C. Ruiz and E. G. Olivares (1999). "Human decidual stromal cells express alpha-smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts." *Hum Reprod* 14(6): 1599-605.
77. Gabbiani, G. (1996). *Biologische Eigenschaften von Myofibroblasten.* *Hartmann Wundforum* 1: 17-19.

78. Su, P. H., T. C. Wang, Z. R. Wong, B. M. Huang and H. Y. Yang "The expression of nestin delineates skeletal muscle differentiation in the developing rat esophagus." *J Anat* 218(3): 311-23.
79. Liang, J., L. Wu, H. Xiao, N. Li, H. Wang, C. Cheng, R. Bai, Y. Zhao and H. Zheng (2010). "Use of myocardin in the classification of mesenchymal tumors of the uterus." *Int J Gynecol Pathol* 29(1): 55-62.
80. Miettinen, M. (1988). "Antibody specific to muscle actins in the diagnosis and classification of soft tissue tumors." *Am J Pathol* 130(1): 205-15.
81. Hasegawa, T., F. Hasegawa, T. Hirose, T. Sano and Y. Matsuno (2003). "Expression of smooth muscle markers in so called malignant fibrous histiocytomas." *J Clin Pathol* 56(9): 666-71.
82. Frid, M. G., B. V. Shekhonin, V. E. Koteliansky and M. A. Glukhova (1992). "Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin." *Dev Biol* 153(2): 185-93.
83. Nucci, M. R., J. T. O'Connell, P. C. Huettnner, A. Cviko, D. Sun and B. J. Quade (2001). "h-Caldesmon expression effectively distinguishes endometrial stromal tumors from uterine smooth muscle tumors." *Am J Surg Pathol* 25(4): 455-63.
84. Rush, D. S., J. Tan, R. N. Baergen and R. A. Soslow (2001). "h-Caldesmon, a novel smooth muscle-specific antibody, distinguishes between cellular leiomyoma and endometrial stromal sarcoma." *Am J Surg Pathol* 25(2): 253-8.
85. Loddenkemper, C., S. Mechsner, H. D. Foss, F. E. Dallenbach, I. Anagnostopoulos, A. D. Ebert and H. Stein (2003). "Use of oxytocin receptor expression in distinguishing between uterine smooth muscle tumors and endometrial stromal sarcoma." *Am J Surg Pathol* 27(11): 1458-62.
86. Nagai, R., D. M. Larson and M. Periasamy (1988). "Characterization of a mammalian smooth muscle myosin heavy chain cDNA clone and its expression in various smooth muscle types." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(4): 1047-51.
87. Babu, G. J., D. M. Warshaw and M. Periasamy (2000). "Smooth muscle myosin heavy chain isoforms and their role in muscle physiology." *Microsc Res Tech* 50(6): 532-40.

88. Maggi, M., A. Magini, A. Fiscella, S. Giannini, G. Fantoni, F. Toffoletti, G. Massi and M. Serio (1992). "Sex steroid modulation of neurohypophysial hormone receptors in human nonpregnant myometrium." *J Clin Endocrinol Metab* 74(2): 385-92.
89. Lee, K. H., F. S. Khan-Dawood and M. Y. Dawood (1998). "Oxytocin receptor and its messenger ribonucleic acid in human leiomyoma and myometrium." *Am J Obstet Gynecol* 179(3 Pt 1): 620-7.
90. Lyons, E. A., P. J. Taylor, X. H. Zheng, G. Ballard, C. S. Levi and J. V. Kredentser (1991). "Characterization of subendometrial myometrial contractions throughout the menstrual cycle in normal fertile women." *Fertil Steril* 55(4): 771-4.
91. Takemura, M., S. Nomura, T. Kimura, T. Inoue, H. Onoue, C. Azuma, F. Saji, Y. Kitamura and O. Tanizawa (1993). "Expression and localization of oxytocin receptor gene in human uterine endometrium in relation to the menstrual cycle." *Endocrinology* 132(4): 1830-5.
92. Kimura, T., M. Takemura, S. Nomura, T. Nobunaga, Y. Kubota, T. Inoue, K. Hashimoto, I. Kumazawa, Y. Ito, K. Ohashi, M. Koyama, C. Azuma, Y. Kitamura and F. Saji (1996). "Expression of oxytocin receptor in human pregnant myometrium." *Endocrinology* 137(2): 780-5.
93. Zingg, H. H. (1996). "Vasopressin and oxytocin receptors." *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 10(1): 75-96.
94. Fuchs, A. R., O. Behrens, H. Maschek, E. Kupsch and A. Einspanier (1998). "Oxytocin and vasopressin receptors in human and uterine myomas during menstrual cycle and early pregnancy." *Hum Reprod Update* 4(5): 594-604.
95. Kimura, T. (1998). "Regulation of the human oxytocin receptor in the uterus: a molecular approach." *Hum Reprod Update* 4(5): 615-24.
96. Liedman, R., S. R. Hansson, D. Howe, S. Igdbashian, R. J. Russell and M. Akerlund (2008). "Endometrial expression of vasopressin, oxytocin and their receptors in patients with primary dysmenorrhoea and healthy volunteers at ovulation." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 137(2): 189-92.

97. Tahara, A., J. Tsukada, Y. Tomura, K. Wada, T. Kusayama, N. Ishii, T. Yatsu, W. Uchida and A. Tanaka (2000). "Pharmacologic characterization of the oxytocin receptor in human uterine smooth muscle cells." *Br J Pharmacol* 129(1): 131-9.
98. Gimpl, G. and F. Fahrenholz (2001). "The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation." *Physiol Rev* 81(2): 629-83.
99. Wilson, T., G. C. Liggins and D. J. Whittaker (1988). "Oxytocin stimulates the release of arachidonic acid and prostaglandin F2 alpha from human decidual cells." *Prostaglandins* 35(5): 771-80.
100. Burns, P. D., J. O. Mendes, Jr., R. S. Yemm, C. M. Clay, S. E. Nelson, S. H. Hayes and W. J. Silvia (2001). "Cellular mechanisms by which oxytocin mediates ovine endometrial prostaglandin F2alpha synthesis: role of G(i) proteins and mitogen-activated protein kinases." *Biol Reprod* 65(4): 1150-5.
101. Ivell, R., T. Kimura, D. Muller, K. Augustin, N. Abend, R. Bathgate, R. Telgmann, M. Balvers, G. Tillmann and A. R. Fuchs (2001). "The structure and regulation of the oxytocin receptor." *Exp Physiol* 86(2): 289-96.
102. Bossmar, T., M. Akerlund, J. Szamatowicz, T. Laudanski, G. Fantoni and M. Maggi (1995). "Receptor-mediated uterine effects of vasopressin and oxytocin in nonpregnant women." *Br J Obstet Gynaecol* 102(11): 907-12.
103. Akerlund, M. (2002). "Involvement of oxytocin and vasopressin in the pathophysiology of preterm labor and primary dysmenorrhea." *Prog Brain Res* 139: 359-65.
104. Akerlund, M. (1994). "Vascularization of human endometrium. Uterine blood flow in healthy condition and in primary dysmenorrhoea." *Ann N Y Acad Sci* 734: 47-56.
105. Akerlund, M. (1987). "Can primary dysmenorrhea be alleviated by a vasopressin antagonist? Results of a pilot study." *Acta Obstet Gynecol Scand* 66(5): 459-61.
106. Akerlund, M. (2004). "Vasopressin and oxytocin in normal reproduction and in the pathophysiology of preterm labour and primary dysmenorrhoea.

- Development of receptor antagonists for therapeutic use in these conditions." Roczn Akad Med Białymst 49: 18-21.
107. De Snoo, K. Das Problem der Menschwerdung im Lichte der vergleichenden Geburtshilfe. Jena, Germany: Gustav Fischer Verlag; 1942: 231-6.
108. Odagiri, K., R. Konno, H. Fujiwara, S. Netsu, C. Yang and M. Suzuki (2009). "Smooth muscle metaplasia and innervation in interstitium of endometriotic lesions related to pain." Fertil Steril 92(5): 1525-31.
109. Meyer, R. (1930). Die Pathologie der Bindegewebsgeschwülste und der Mischgeschwülste. In Veit J, Stoeckel W (Hrsg.) Handbuch der Gynäkologie, 1. Aufl. JF Bergmann, München.
110. Lauchlan, S. C. (1972). "The secondary Mullerian system." Obstet Gynecol Surv 27(3): 133-46.
111. Choudhrie, L., N. N. Mahajan, M. V. Solomon, A. Thomas, A. J. Kale and K. Mahajan (2007). "Ovarian ligament adenomyoma: a case report." Acta Chir Belg 107(1): 84-5.
112. Kim, M. J. and S. H. Seok (2007). "Uterus-like mass with features of an extrauterine adenomyoma: a case report and literature review." The Korean Journal of Pathology 41: 347-51.
113. Kuo, T., S. N. London and T. V. Dinh (1980). "Endometriosis occurring in leiomyomatosis peritonealis disseminata: ultrastructural study and histogenetic consideration." Am J Surg Pathol 4(2): 197-204.
114. Yang, A. H., J. Y. Chen and J. K. Lin (2003). "Myofibroblastic conversion of mesothelial cells." Kidney Int 63(4): 1530-9.
115. Witkowicz, J. (2008). "Mesothelial cell transplantation." Pol Arch Med Wewn 118(5): 307-13.
116. Saed, G. M. and M. P. Diamond (2004). "Differential expression of alpha smooth muscle cell actin in human fibroblasts isolated from intraperitoneal adhesions and normal peritoneal tissues." Fertil Steril 82 Suppl 3: 1188-92.
117. Muzii, L., R. Marana, L. Brunetti, G. Orlando, B. Michelotto and P. Benedetti Panici (2000). "Atypical endometriosis revisited: clinical and biochemical

- evaluation of the different forms of superficial implants." *Fertil Steril* 74(4): 739-42.
118. Vercellini, P., L. Trespidi, O. De Giorgi, I. Cortesi, F. Parazzini and P. G. Crosignani (1996). "Endometriosis and pelvic pain: relation to disease stage and localization." *Fertil Steril* 65(2): 299-304.
119. Whiteside, J. L. and T. Falcone (2003). "Endometriosis-related pelvic pain: what is the evidence?" *Clin Obstet Gynecol* 46(4): 824-30.
120. Vernon, M. W., J. S. Beard, K. Graves and E. A. Wilson (1986). "Classification of endometriotic implants by morphologic appearance and capacity to synthesize prostaglandin F." *Fertil Steril* 46(5): 801-6.
121. Muzii, L., R. Marana, L. Brunetti, M. E. Romanini, V. V. Vavala, S. Mancuso and M. Vacca (1996). "Production of Prostaglandin F<sub>2</sub>alpha by the Different Forms of Endometriosis." *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 3(4, Supplement): S33.
122. Tokushige, N., R. Markham, P. Russell and I. S. Fraser (2006). "Nerve fibres in peritoneal endometriosis." *Hum Reprod* 21(11): 3001-7.
123. Mechsner, S., J. Schwarz, J. Thode, C. Loddenkemper, D. S. Salomon and A. D. Ebert (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.
124. Kaiser, A., A. Kopf, C. Gericke, J. Bartley and S. Mechsner (2009). "The influence of peritoneal endometriotic lesions on the generation of endometriosis-related pain and pain reduction after surgical excision." *Arch Gynecol Obstet* 280(3): 369-73.
125. Fredericks, S., P. Russell, M. Cooper and N. Varol (2005). "Smooth muscle in the female pelvic peritoneum: a clinicopathological analysis of 31 women." *Pathology* 37(1): 14-21.
126. Fuchs, A. R., F. Fuchs and M. S. Soloff (1985). "Oxytocin receptors in nonpregnant human uterus." *J Clin Endocrinol Metab* 60(1): 37-41.

127. Maruyama, T., H. Masuda, M. Ono, T. Kajitani and Y. Yoshimura "Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology." *Reproduction* 140(1): 11-22.
128. Gotte, M., M. Wolf, A. Staebler, O. Buchweitz, L. Kiesel and A. N. Schuring "Aberrant expression of the pluripotency marker SOX-2 in endometriosis." *Fertil Steril Epub* 2010; 95(1): 338-41.
129. Patel, A. N., E. Park, M. Kuzman, F. Benetti, F. J. Silva and J. G. Allickson (2008). "Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation." *Cell Transplant* 17(3): 303-11.
130. Kim, M. R., D. W. Park, J. H. Lee, D. S. Choi, K. J. Hwang, H. S. Ryu and C. K. Min (2005). "Progesterone-dependent release of transforming growth factor-beta1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signalling in stromal cells." *Mol Hum Reprod* 11(11): 801-8.
131. Signorile, P. G., F. Baldi, R. Bussani, M. D'Armiento, M. De Falco and A. Baldi (2009). "Ectopic endometrium in human foetuses is a common event and sustains the theory of mullerianosis in the pathogenesis of endometriosis, a disease that predisposes to cancer." *J Exp Clin Cancer Res* 28: 49.
132. Doss, B. J., S. M. Wanek, S. M. Jacques, F. Qureshi, N. C. Ramirez and W. D. Lawrence (1999). "Ovarian smooth muscle metaplasia: an uncommon and possibly underrecognized entity." *Int J Gynecol Pathol* 18(1): 58-62.
133. Nisolle, M. and J. Donnez (1997). "Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities." *Fertil Steril* 68(4): 585-96.
134. Itoga, T., T. Matsumoto, H. Takeuchi, S. Yamasaki, N. Sasahara, T. Hoshi and K. Kinoshita (2003). "Fibrosis and smooth muscle metaplasia in rectovaginal endometriosis." *Pathol\_Int* 53(6): 371-5.
135. Yanez-Mo, M., E. Lara-Pezzi, R. Selgas, M. Ramirez-Huesca, C. Dominguez-Jimenez, J. A. Jimenez-Heffernan, A. Aguilera, J. A. Sanchez-Tomero, M. A. Bajo, V. Alvarez, M. A. Castro, G. del Peso, A. Cirujeda, C. Gamallo, F. Sanchez-Madrid and M. Lopez-Cabrera (2003). "Peritoneal dialysis and

- epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells." *N Engl J Med* 348(5): 403-13.
136. De Vriese, A. S., R. G. Tilton, S. Mortier and N. H. Lameire (2006). "Myofibroblast transdifferentiation of mesothelial cells is mediated by RAGE and contributes to peritoneal fibrosis in uraemia." *Nephrol Dial Transplant* 21(9): 2549-55.
137. Fedele, L., F. Parazzini, S. Bianchi, L. Arcaini and G. B. Candiani (1990). "Stage and localization of pelvic endometriosis and pain." *Fertil Steril* 53(1): 155-8.
138. Anaf, V., P. Simon, I. El Nakadi, I. Fayt, T. Simonart, F. Buxant and J. C. Noel (2002). "Hyperalgesia, nerve infiltration and nerve growth factor expression in deep adenomyotic nodules, peritoneal and ovarian endometriosis." *Hum Reprod* 17(7): 1895-900.
139. Mechsner, S., A. Kaiser, A. Kopf, C. Gericke, A. Ebert and J. Bartley (2009). "A pilot study to evaluate the clinical relevance of endometriosis-associated nerve fibers in peritoneal endometriotic lesions." *Fertil Steril* 92(6): 1856-61.
140. Goodwin, T. M., G. Valenzuela, H. Silver, R. Hayashi, G. W. Creasy and R. Lane (1996). "Treatment of preterm labor with the oxytocin antagonist atosiban." *Am J Perinatol* 13(3): 143-6.
141. Bossmar, T. (1998). "Treatment of preterm labor with the oxytocin and vasopressin antagonist Atosiban." *J Perinat Med* 26(6): 458-65.
142. Hull, M. L., M. Z. Johan, W. L. Hodge, S. A. Robertson and W. V. Ingman "Host-derived TGFB1 deficiency suppresses lesion development in a mouse model of endometriosis." *Am J Pathol* 180(3): 880-7.



## 7 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1.1:** Makroskopisches und mikroskopisches Erscheinungsbild einer peritonealen Endometrioseläsion. A: Peritonealendometriose (aus Ebert 2006). B: Endometriose-assoziierte glatte Muskelzellen in einer peritonealen EM-Läsion (Pfeil) (Vergrößerung 100-fach) (aus Mechsner et al. 2005).

**Abbildung 1.2:** „Tissue Injury and Repair“ (aus Leyendecker et al. 2009).

**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der Entwicklung glatter Muskelzellen (aus McHugh 1995)

**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung der verschiedenen Schichten des Uterus (Noe et al. 1999)

**Abbildung 1.5:** Immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen smActin. A: Peritoneale Endometrioseläsion mit zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen (Pfeil); Vergrößerung 50-fach. B: Gewebeschnitt aus einem fetalen Uterus in der 23. Schwangerschaftswoche mit zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen (Pfeil); Vergrößerung 50-fach. C: Peritoneale Endometrioseläsion mit peristromalen glatten Muskelzellen (Pfeil); Vergrößerung 400-fach. D: Gesunde peritoneale Gewebeprobe ohne EM; Vergrößerung 100-fach (alle Bilder aus Leyendecker et al. 2002).

**Abbildung 3.1:** Immunhistochemische Untersuchungen von glatten Muskelzellen in peritonealen Gewebeproben. A: EM: Peritoneale Endometrioseläsion mit smActin-positiven Endometriose-assoziierten glatten Muskelzellen (roter Pfeil) sowie glatten Muskelzellen in Gefäßwänden (schwarzer Pfeil) (Vergrößerung 25-fach). B: Gesundes Peritoneum mit smActin-positiven glatten Muskelzellen in Gefäßwänden (schwarze Pfeile) (Vergrößerung 25-fach).

**Abbildung 3.2:** Muskel-positive Gewebeproben bei Endometriosepatientinnen. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils Muskel-positiver Gewebeproben bei Endometriosepatientinnen sowie in der Kontrollgruppe. EM: n = 60, KG: n = 10; Mann-Whitney Test \*\*\* p < 0,001.

**Abbildung 3.3:** Glatter Muskelzellgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen

Gehaltes glatter Muskelzellen bei EM-Patientinnen sowie in der Kontrollgruppe. EM: n = 60, KG: n = 10; Mann-Whitney Test \*\*\* p < 0,001.

**Abbildung 3.4:** Endometrioseläsion am Peritoneum vom Blasendach. Darstellung der drei verschiedenen Areale der Endometriose-assoziierten Muskulatur in einer peritonealen Endometrioseläsion (Vergrößerung 25-fach). Immunhistochemische Färbung mit Anti-smActin. ISM = intrastromale Muskelzellen, SAM = Stroma-assoziierte Muskelzellen, PM = periphere Muskulatur.

**Abbildung 3.5:** Verteilung der glatten Muskulatur in den Endometriose-Gewebeproben. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes EM-assoziiierter Muskulatur in den drei verschiedenen Arealen: ISM, SAM und PM. n = 60; Kruskal-Wallis Test \*\*\* p < 0,001.

**Abbildung 3.6:** Anordnung der Endometriose-assoziierten glatten Muskulatur in den drei verschiedenen Arealen einer Endometrioseläsion am Blasenperitoneum. Immunhistochemische Färbungen mit Anti-smActin. A: Intrastromale glatte Muskelzellen (Vergrößerung 400-fach). B: Stroma-assoziierte glatte Muskelzellen (Vergrößerung 200-fach). C: Periphere glatte Muskelzellen (Vergrößerung 200-fach). Pfeile: smActin-positive glatte Muskelzellen.

**Abbildung 3.7:** Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen bezüglich der anatomischen Lokalisation der Gewebeprobe. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes EM-assoziiierter Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation der Peritonealprobe. Beckenwand: n = 4, Blasendach: n = 16, Douglas: n = 11, Fossa ovarica: n = 10, Lig. sacrouterinum: n = 14, andere Lokalisation: n = 5.

**Abbildung 3.8:** Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon in smActin-positiver Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen und gesunden Peritonealproben. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes ausdifferenzierter glatter Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen und gesunden Peritonealproben. smActin = *Smooth Muscle Actin*, Des = Desmin, Cal = Caldesmon; EM: n = 60, Kontrollgruppe: n = 10; Two-way Anova \*\*\* p < 0,0001.

**Abbildung 3.9:** Immunhistochemische Untersuchungen des Differenzierungsgrades von intrastromalen glatten Muskelzellen in peritonealen Endometriose-läsionen. Expression von smActin (roter Pfeil: smActin-positive glatte Muskelzellen) (A), Desmin (B) und Caldesmon (C) in der intrastromalen Muskulatur (schwarze Pfeile: ausdifferenzierte Muskelzellen) (alle Bilder in 400-facher Vergrößerung).

**Abbildung 3.10:** Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon in smActin-positiven intrastromalen glatten Muskelzellen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes ausdifferenzierter glatter Muskulatur in intrastromalen EM-assoziierten glatten Muskelzellen. smActin = *Smooth Muscle Actin*, Des = Desmin, Cal = Caldesmon; n = 60; Kruskal-Wallis Test \*\*\*  $p < 0,0001$ .

**Abbildung 3.11:** Immunhistochemische Untersuchung des Differenzierungsgrades der Stroma-assoziierten glatten Muskelzellen in peritonealen Endometriose-läsionen. Expression von smActin (roter Pfeil: smActin-positive glatte Muskelzellen) (A), Desmin (B) und Caldesmon (C) in Stroma-assoziiierter Muskulatur (schwarze Pfeile: ausdifferenzierte Muskelzellen) (alle Bilder in 200-facher Vergrößerung).

**Abbildung 3.12:** Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon in smActin-positiver Stroma-assoziiierter Muskulatur peritonealer Endometriose-läsionen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes ausdifferenzierter glatter Muskulatur in Stroma-assoziierten Muskelzellen. smActin = *Smooth Muscle Actin*, Des = Desmin, Cal = Caldesmon; n = 60; Kruskal-Wallis Test \*\*\*  $p < 0,0001$ .

**Abbildung 3.13:** Immunhistochemische Untersuchung der Differenzierungsgrade von peripherer Muskulatur in peritonealen Endometriose-läsionen. Expression von smActin (roter Pfeil: smActin-positive glatte Muskelzellen) (A), Desmin (B) und Caldesmon (C) in der peripheren Muskulatur peritonealer EM-Herde (schwarze Pfeile: ausdifferenzierte Muskelzellen) (alle Bilder in 400-facher Vergrößerung); Pfeile: glatte Muskulatur.

**Abbildung 3.14:** Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker Desmin und Caldesmon in smActin-positiver peripherer Muskulatur peritonealer Endometriose-läsionen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes

des prozentualen Gehaltes ausdifferenzierter glatter Muskulatur in peripherer EM-assoziierter Muskulatur. smActin = *Smooth Muscle Actin*, Des = Desmin, Cal = Caldesmon; n = 60; Kruskal-Wallis Test \*\*\*  $p < 0,0001$ .

**Abbildung 3.15:** Zunahme der Expression der Muskelzellendifferenzierungsmarker in den verschiedenen Arealen der Endometriose-assozierten Muskulatur. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes der prozentualen Zunahme der Expression ausdifferenzierter glatter Muskelzellen in den verschiedenen Arealen der Endometriose-assozierten Muskulatur. n = 60; Two-way Anova \*\*\*  $p < 0,0001$ .

**Abbildung 3.16:** Immunhistochemische Untersuchungen der Funktionalität von intrastromalen glatten Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen. Expression von smActin (A), sm-MHC (B), OTR (C) und VPR (D) in intrastromalen glatten Muskelzellen peritonealer Endometrioseläsionen (alle Bilder in 400x Vergrößerung); Pfeile: glatte Muskelzellen.

**Abbildung 3.17:** Expression von sm-MHC, OTR und VPR in smActin-positiven intrastromalen glatten Muskelzellen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes funktioneller glatter Muskulatur in intrastromalen Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen. smActin = *Smooth Muscle Actin*, sm-MHC = *Smooth Muscle Myosin Heavy Chains*, OTR = Oxytocinrezeptor, VPR = Vasopressinrezeptor; n = 60; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Abbildung 3.18:** Immunhistochemische Untersuchungen der Funktionalität von Stroma-assozierten glatten Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen. Expression von smActin (A), sm-MHC (B), OTR (C) und VPR (D) in Stroma-assozierten glatten Muskelzellen peritonealer Endometrioseläsionen (alle Bilder in 400x Vergrößerung); Pfeile: glatte Muskelzellen.

**Abbildung 3.19:** Expression von sm-MHC, OTR und VPR in smActin-positiver Stroma-assoziierter Muskulatur peritonealer Endometrioseläsionen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes funktionell aktiver glatter Muskulatur in Stroma-assozierten Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen. smActin = *Smooth Muscle Actin*, sm-MHC = *Smooth Muscle Myosin Heavy Chains*, OTR = Oxytocinrezeptor, VPR = Vasopressinrezeptor; n = 60; \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Abbildung 3.20:** Immunhistochemische Untersuchungen der Funktionalität von peripheren glatten Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen. Expression von smActin (A), sm-MHC (B), OTR (C) und VPR (D) in peripheren glatten Muskelzellen peritonealer Endometrioseläsionen (alle Bilder in 400x Vergrößerung); Pfeile: glatte Muskulatur.

**Abbildung 3.21:** Expression von sm-MHC, OTR und VPR in smActin-positiver peripherer Muskulatur peritonealer Endometrioseläsionen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes funktioneller glatter Muskulatur in den peripheren Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen. smActin = *Smooth Muscle Actin*, sm-MHC = *Smooth Muscle Myosin Heavy Chains*, OTR = Oxytocinrezeptor, VPR = Vasopressinrezeptor; n = 60; \*\* p < 0,01 \*\*\* p < 0,001.

**Abbildung 3.22:** Expression von sm-MHC, OTR und VPR in den drei verschiedenen Arealen EM-assoziiierter glatter Muskulatur. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes der prozentualen Expression des Muskelzellfunktionalitätsmarkers sm-MHC und der uterinen Markermoleküle OTR und VPR in den verschiedenen Arealen der Endometriose-assoziierten Muskulatur. sm-MHC = *Smooth Muscle Myosin Heavy Chains*, OTR = Oxytocinrezeptor, VPR = Vasopressinrezeptor; n = 60; \*\*\* p < 0,0001.

**Abbildung 3.23:** Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit vom rASRM-Stadium der Erkrankung. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes Endometriose-assoziiierter Muskulatur (EAM) in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit der rASRM-Stadien. I: n = 23, II: n = 19, III: n = 13, IV: n = 5.

**Abbildung 3.24:** Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit einer Hormoneinnahme. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes Endometriose-assoziiierter Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit von einer Hormoneinnahme. Hormoneinnahme: n = 22, keine Hormone: n = 38.

**Abbildung 3.25:** Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit vom Aktivitätsgrad des Endometrioseherdes. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$

Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes Endometriose-assoziiierter Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit vom Aktivitätsgrad des Endometrioseherdes. Inaktive EM: n = 38, aktive EM: n = 3.

**Abbildung 3.26:** Prozentualer Anteil Endometriose-assoziiierter glatter Muskelzellen in der Peripherie bei Patientinnen mit Rezidiv und Erstdiagnose der Endometriose. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes Endometriose-assoziiierter Muskulatur in der Peripherie von peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf der Endometriose. Rezidiv: n = 35, Erstdiagnose: n = 22; Mann-Whitney Test \* p < 0,05.

**Abbildung 3.27:** Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit vom Auftreten chronisch rezidivierender Unterbauchschmerzen bei Endometriose-Patientinnen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes Endometriose-assoziiierter Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit vom Auftreten chronisch rezidivierender Unterbauchschmerzen. UB-Schmerz = Unterbauchschmerz (n = 52), kein UB-Schmerz = kein Unterbauchschmerz (n = 5).

**Abbildung 3.28:** Muskelgehalt in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit von dem Auftreten einer Dysmenorrhoe bei Endometriose-Patientinnen. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes des prozentualen Gehaltes Endometriose-assoziiierter Muskulatur in peritonealen Endometrioseläsionen in Abhängigkeit von dem Auftreten einer Dysmenorrhoe. Dysmenorrhoe: n = 53, keine Dysmenorrhoe: n = 6.

## 8 Tabellenverzeichnis

**Tabelle 2.1:** Übersicht der klinischen Daten der Endometriosepatientinnen.

**Tabelle 2.2:** Verwendete Primärantikörper.

**Tabelle 2.3:** Verwendete Sekundärantikörper.

**Tabelle 3.1:** Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit von der Lokalisation der Gewebeprobe; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler;  $p > 0,05$ .

**Tabelle 3.2:** Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit vom rASRM-Stadium; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler;  $p > 0,05$ .

**Tabelle 3.3:** Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit von der hormonellen Zyklusphase; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler;  $p > 0,05$ .

**Tabelle 3.4:** Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit von einer Hormoneinnahme; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler.

**Tabelle 3.5:** Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit vom Aktivitätsgrad der Endometrioseläsion; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler.

**Tabelle 3.6:** Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf der Endometriose; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler.

**Tabelle 3.7:** Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit vom Auftreten chronisch rezidivierender Unterbauchschmerzen; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler.

**Tabelle 3.8:** Muskelgehalt in den verschiedenen Arealen Endometriose-assoziiierter Muskulatur in Abhängigkeit von dem Auftreten einer Dysmenorrhoe; Mittelwerte (%)  $\pm$  Standardfehler.

---

## 9 Anhang

### 9.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jessica Gericke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Immunhistochemische Charakterisierung Endometriose-assoziiierter glatter Muskelzellen in peritonealen Endometrioseläsionen“ selbständig 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.icjme.org](http://www.icjme.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 der Publikation zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin 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 der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§ 156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum:

Unterschrift:



---

## 9.2 Publikationsliste

Barcena de Arellano, M. L., **J. Gericke**, U. Reichelt, A. F. Okuducu, A. D. Ebert, V. Chiantera, A. Schneider and S. Mechsner "Immunohistochemical characterization of endometriosis-associated smooth muscle cells in human peritoneal endometriotic lesions." Hum Reprod 26(10): 2721-30.

### **Anteilerklärung an der erfolgten Publikation:**

Jessica Gericke hatte folgenden Anteil an der Publikation "Immunohistochemical characterization of endometriosis-associated smooth muscle cells in human peritoneal endometriotic lesions." Hum Reprod 26(10): 2721-30:

- Auswahl der Gewebeproben, Anfertigung der Gewebeschnitte und der immunhistochemischen Färbungen
- mikroskopische Auswertung der Präparate und Analyse der Daten
- Mitarbeit bei Interpretation und Diskussion der gewonnenen Daten und der Erstellung der Publikation

Datum:

Unterschrift:

### **9.3 Lebenslauf**

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

## 9.4 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Doktorarbeit unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bei Frau PD Dr. med. Sylvia Mechsner bedanke ich mich für die Bereitstellung meines interessanten Promotionsthemas, ihr in mich gesetztes Vertrauen und die hervorragende fachliche Unterstützung. Sie hat mich mit großem Engagement durch den gesamten Entstehungsprozess dieser Arbeit begleitet und immer die Zeit gefunden, mich mit sinnvollen Ratschlägen zu unterstützen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Maria-Luisa Barcena de Arellano für die vielen helfenden Hinweise und guten Anregungen bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse und so manche Korrektur meiner Arbeit bedanken.

Frau Carola Rüster gilt mein Dank für ihre Assistenz bei der Laborarbeit und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Dr. med. Wolfram Riedlinger und Dr. med. Uta Reichelt aus dem Institut der Pathologie, Charité-CBF, danke ich für die gute Kooperation und die Hilfestellung bei der Auswahl der Gewebeproben und der Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Kollegin Miriam Weichbrodt für die praktische Einarbeitung in die Laborarbeit und die Einführung in die Immunhistochemie bedanken. Meinen Kolleginnen Susanne Keichel und Julia Arnold sowie dem gesamten Team des Endometriosezentrums, Charite-CBF, danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den interessanten fachlichen als auch zwischenmenschlichen Austausch.

Mein wärmster Dank gilt meiner Familie, die mich durch die Höhen und Tiefen meines Studiums und meiner Promotion begleitet haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich danke meinen Eltern für den zweifellosen Glauben an mich, ihre bedingungslose Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung und ihre unübertroffene Fähigkeit der Motivation auch in schwierigen Zeiten. Meinem Freund Stefan Löw danke ich für die unermüdliche Hilfe bei der Bewältigung

unzähliger Konflikte mit dem Textverarbeitungsprogramm und der Ausarbeitung einer in Form und Rechtschreibung korrekten Ausgabe dieser Arbeit.