

**Vergleich von Schmerzmarkern im endometriotischen Gewebe und
Charakterisierung des subjektiven Schmerzempfindens der
Patientinnen.**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Fruhmann Berger Lea Manina
aus Lustenau

Gießen 2022

**Vergleich von Schmerzmarkern im endometriotischen Gewebe und
Charakterisierung des subjektiven Schmerzempfindens der
Patientinnen.**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Fruhmann Berger Lea Manina
aus Lustenau

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Direktor: Prof. Dr. Ivo Meinhold-Heerlein

Gutachter: PD Dr. Lutz Konrad

Gutachter: Prof. Dr. Ralf Middendorff

Tag der Disputation: 30.05.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition Endometriose.....	1
1.2	Morphologie und Manifestation der Endometriose.....	2
1.3	Klassifikationssysteme der Endometriose.....	5
1.4	Epidemiologie und gesellschaftliche Relevanz.....	7
1.5	Beeinflussende Faktoren.....	8
1.5.1	Genetik.....	8
1.5.2	Risikofaktoren.....	9
1.6	Ätiologie.....	10
1.6.1	Implantationstheorie (retrograde Menstruation).....	10
1.6.2	Die Coelom-Metaplasietheorie bzw. die epithelial-mesenchymale Transition (EMT).....	11
1.6.3	Tissue Injury and Repair Konzept.....	11
1.6.4	Stammzellhypothese.....	12
1.6.5	Alternative Theorien zur Ätiologie.....	12
1.7	Klinisches Bild der Endometriose.....	14
1.8	Diagnostik der Endometriose.....	15
1.9	Endometriotische Therapie nach aktuellen Leitlinien.....	16
1.9.1	Medikamentöse Therapie der Endometriose.....	16
1.9.2	Operative Therapie der Endometriose.....	18
1.10	Schmerzpathogenese der Endometriose.....	20
1.10.1	Nozizeptiver bzw. Somatischer Schmerz.....	21
1.10.2	Neuropathischer Schmerz.....	21
1.10.3	Viszeraler Schmerz.....	22
1.10.4	Inflammatorischer Schmerz.....	22
1.10.5	Psychogener Schmerz.....	23
1.11	Analyse pro-inflammatorischen Mediatoren bei der Endometriose.....	24
1.12	Gender: generisches Femininum.....	26
2	Fragestellung und Problemstellung dieser Arbeit	27
3	Material und Methoden	28

3.1	Material.....	28
3.1.1	Gewebeproben von Patientinnen	28
3.1.2	Endozervikale Mucus- und Blutproben	31
3.1.3	Fragebogen zur Anamnese der EM-Patientinnen	32
3.1.4	Chemikalien und Puffer	34
3.1.5	Antikörper zur Immunhistochemie.....	35
3.1.6	ELISA-Kit.....	36
3.1.7	Geräte und Substanzen.....	37
3.1.8	Analytische Vorgehensweise.....	39
3.2	Methoden	40
3.2.1	Paraffinschnitte	40
3.2.2	Immunhistochemie	41
3.2.3	ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay)	46
3.3	Statistische Auswertung	49
4	Ergebnisse.....	50
4.1	Immunhistochemie:	50
4.1.1	Auswahl und Testung von Markern mit bekannter Schmerzmodulation	50
4.1.2	Qualitative und Quantitative Beurteilung von BR1.....	53
4.1.3	Qualitative und quantitative Beschreibung von BR2	63
4.2	ELISA:.....	74
4.2.1	Quantitative Analyse von Bradykinin.....	74
4.3	Analyse der Fragebögen zur Endometriose.....	83
5	Diskussion	85
5.1	Studienkohorte.....	85
5.2	Bradykinin-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2.....	87
5.3	Bradykinin	88
5.4	Interpretation des Bradykinin-Rezeptor Typ 1 in den Endometrien und den ektopen endometriotischen Entitäten.....	89
5.5	Interpretation des Bradykinin-Rezeptor Typ 2 in den Endometrien und den ektopen endometriotischen Entitäten.....	91
5.6	Bradykinin in Bezug auf Inflammation und Hyperalgesie	93
5.7	EM-Fragebögen und <i>PainDetect</i>	94

6	Zusammenfassung.....	97
7	Abstract.....	98
8	Abkürzungsverzeichnis	99
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	103
10	Literaturverzeichnis.....	108
11	Anhang	132
12	Publikationsverzeichnis und Förderungen	137
13	Ehrenwörtliche Erklärung	138
14	Danksagung.....	139

1 Einleitung

1.1 Definition Endometriose

Bei der Endometriose (Suffix aus dem altgr. *endon* für ‚innen‘, *mētra* für Gebärmutter und altgr. -osis für Erkrankungen) handelt es sich um eine gynäkologische Erkrankung. Sie ist gekennzeichnet durch das Vorkommen und die Ausbreitung von epithelalem und stromalem uterinem Gewebe außerhalb der Cavum Uteri. Häufig kommt es zusätzlich zu Adhäsionen und einer umliegenden Fibrosierung. Diese gutartigen Verwachsungen sind östrogenabhängig und durch ihren chronischen, inflammatorischen Verlauf charakterisiert (Hickey *et al.*, 2014; Vercellini *et al.*, 2014; Vigano *et al.*, 2018). Daher sind überwiegend Frauen im reproduktionsfähigen Alter mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen 25 bis 35 Jahren betroffen (Vercellini *et al.*, 2014). Der Entstehungsmechanismus mit der größten Akzeptanz stellt die retrograde Menstruation dar. Demzufolge wandern die abgelösten Zellen der Gebärmutterschleimhaut entlang der Tuben in die Bauchhöhle und nisten sich häufig dort ein (Sampson, 1927a). In seltenen Fällen siedeln sich die „endometriumartigen“ Zellen in extraabdominellen Organen, wie zum Beispiel der Lunge an (Mecha *et al.*, 2021). Die Adenomyose bildet eine Sonderform der Endometriose (EM). Dabei infiltrieren die endometrialen Drüsen das darunterliegende Myometrium (Racinet *et al.*, 1987). Obwohl die Endometriose eine gutartige Krankheit ist, evoziert sie ein invasives Wachstum mit einem stellenweisen organüberschreitenden Ausmaß (Anglesio *et al.*, 2017). Das ausgeprägte Beschwerdebild ist gekennzeichnet durch starke perimenstruelle Schmerzen und Blutungen, sowie durch Dysurie und Dyspareunie. Im schlimmsten Fall führt diese Erkrankung zur Infertilität (Sinaii *et al.*, 2008). In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2020 wurde postuliert, dass eine Relation zwischen der Erkrankung und dem psychischen Stress besteht und in Zukunft eine mental unterstützende Versorgung der Patientinnen erfolgen sollte (Brasil *et al.*, 2020). Bis heute ist die Operation mit histologischer Materialgewinnung die einzige Möglichkeit zur sicheren Diagnosestellung (Dunselman *et al.*, 2014). Es existieren noch keine Biomarker zum diagnostischen Screening für diese Krankheit (Greene *et al.*, 2016).

1.2 Morphologie und Manifestation der Endometriose

Das mikroskopische Bild der Endometriose basiert auf dem Vorhandensein von zytothemem endometrialem Stroma mit darin eingebetteten Drüsen und Blutgefäßen, sowie teilweise vorhandenen glatten Muskelzellen. Das ektopische „gebärmutterartige“ Gewebe ist histologisch kongruent zum epithelialen und stromalen Endometrium des Uterus und unterliegt meist ebenso hormonellen Einflüssen (Clement, 2007). Falls die peritonealen Läsionen makroskopisch sichtbar sind (etwa ab 10mm³), kann eine Unterteilung in weiße, blaue, rote, braune und schwarze Läsionen vorgenommen werden (Abb. 1.1). Die Farben verdeutlichen das Aktivitätsstadium der endometriotischen Läsionen (EM-Läsionen) (Tab. 1.1). Auch bei der ovariellen Endometriose werden die Zysten makroskopisch in aktive und inaktive Stadien unterteilt (Schindler, 2007). 1987 wurde erstmalig beschrieben, dass die verschiedenen Farben der EM-Herde in direktem Zusammenhang zu ihrem Alter stehen (Redwine, 1987).

Tabelle 1.1: Aktive und inaktive makroskopische Erscheinungsformen der peritonealen und ovariellen Endometriose (Schindler, 2007)

PERITONEALE EM		
Aktivitätsstadium	Aktiv	Inaktiv
	Rote Färbung	Blaue, schwarze, braune Färbung
	Gesteigerte Durchblutung	Weißer Verdickungen
	Kardinalsymptome der Entzündung	Geringe Gefäßanzahl
	Gefäßneubildungen	
OVARIELLE EM		
Aktivitätsstadium	Aktiv	Inaktiv
	Bläulich bis dunkelrot	Braun, schwarz
	Einblutung	Fibrotisch verändert
	Zystenwand dünn	Zystenwand dick
	Gute Vaskularisation	

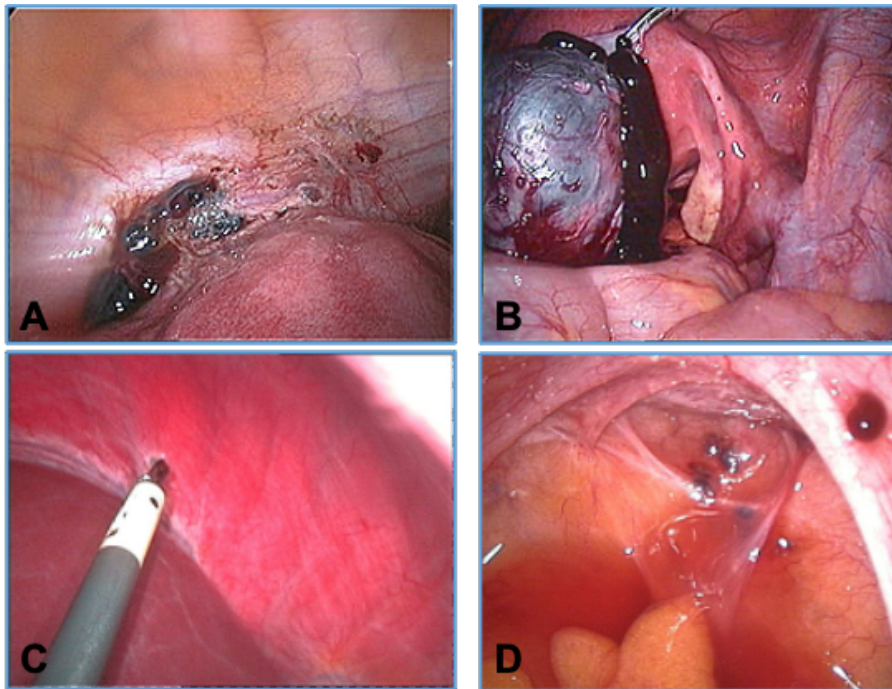


Abbildung 1.1: Fotografien von EM-Herden während einer laparoskopischen Operation. A: Darstellung von multiplen dunkelroten bis schwarzen EM-Herden, lokalisiert auf dem Bauchfell zwischen Uterus und Vesicae. B: Öffnung einer prallen, bläulich gefärbten endometriotischen Zyste, dadurch tritt koaguliertes Blut in die Bauchhöhle. C: Es sind weiße und rötliche EM-Herde am Zwerchfell zu erkennen, die mit Hitze destruiert werden. D: Darstellung von multiplen schwarzen EM-Herden im Douglasraum und eine dunkelrote Läsion auf dem rechten Ligamentum sacrouterinum (Quelle: <https://www.wikiwand.com/de/Endometriose>). EM, Endometriose.

In der deutschen Literatur erfolgt die Einteilung klassischerweise nach der anatomischen Lage der Läsionen in die folgenden 3 Kategorien:

- Endometriosis genitalis interna
- Endometriosis genitalis externa
- Endometriosis extragenitalis

Diese Form der Systematisierung hat sich klinisch durchgesetzt, da das Konzept der einheitlichen Krankheit bewahrt wird (Reichert *et al.*, 2017). Die **Endometriosis genitalis interna** bezeichnet das Auftreten von epithelialen und stromalen Zellen im Myometrium (=Adenomyose uteri). Teilweise werden die Implantate von zystischen Erweiterungen und Einblutungen begleitet. Die Produktion von Wachstumshormonen, insbesondere der tiefreichenden Läsionen, kann eine Hyperplasie des Myometriums mit einer Volumenzunahme der Gebärmutter induzieren. Die Adenomyose kann sich sowohl fokal als auch diffus über die ganze Gebärmutter ausbreiten (Rabe *et al.*, 2017). Bei der

Endometriosis genitalis externa breiten sich die Läsionen über den Bauchraum aus. Dabei werden die uterinen Oberflächen, die Adnexen, das Beckenperitoneum, das Ligamentum sacrouterinum sowie das Spatium rectovaginale und rectouterinae infiltriert (Mechsner, 2016a). Häufig bilden sich Zysten in den Ovarien (Endometriome), die sich auf Grund von zyklusabhängigen Einblutungen vergrößern. Diese werden in Abhängigkeit von der Farbe des koagulierten Blutes als Schokoladen- oder Teerzysten bezeichnet (Chapron, 2002). Die Manifestation der **Endometriosis extragenitalis** liegt außerhalb des weiblichen Genitales und befällt vor allem die Vagina, die Harnblase, den Harnleiter, das Zwerchfellperitoneum und Teile des Darms wie bspw. das Rektum und den Appendix. Eine Seltenheit stellt der Befall von Leber oder Lunge dar (Ulrich *et al.*, 2014). Die Häufigkeitsverteilung des Organbefalls bei der Endometriose ist in Tab. 1.2. dargestellt. Die wichtigsten Prädilektionsstellen sind das pelvine Peritoneum und die weiblichen Geschlechtsorgane (Halis *et al.*, 2010).

Tabelle 1.2: Lokalisation der Endometriosis genitalis externa mit den jeweiligen Häufigkeitsangaben in Prozent (Hertlein *et al.*, 2012)

Lokalisation	Häufigkeiten in %
Lig. sacrouterinum	60
Ovar	52
Douglas-Raum	28
Lig. latum	16
Harnblase	15
Rektum	12
Mesosalpinx	10
Dünn-/Dickdarm	7
Tube	2-8
Appendix	2

Lig. = Ligamentum, %=Prozent

Eine weitere klinische/intraoperative Einteilung, die erstmals 1997 definiert wurde, beruht auf der Lokalisation und Eindringtiefe der Läsionen und wird in eine ovarielle, oberflächlich peritoneale und in eine tief infiltrierende Endometriose (TIE) klassifiziert (Abb. 1.2) (Nisolle und Donnez, 1997). Dies entspricht auch heute noch der gängigsten Klassifikation (Haas *et al.*, 2013a).

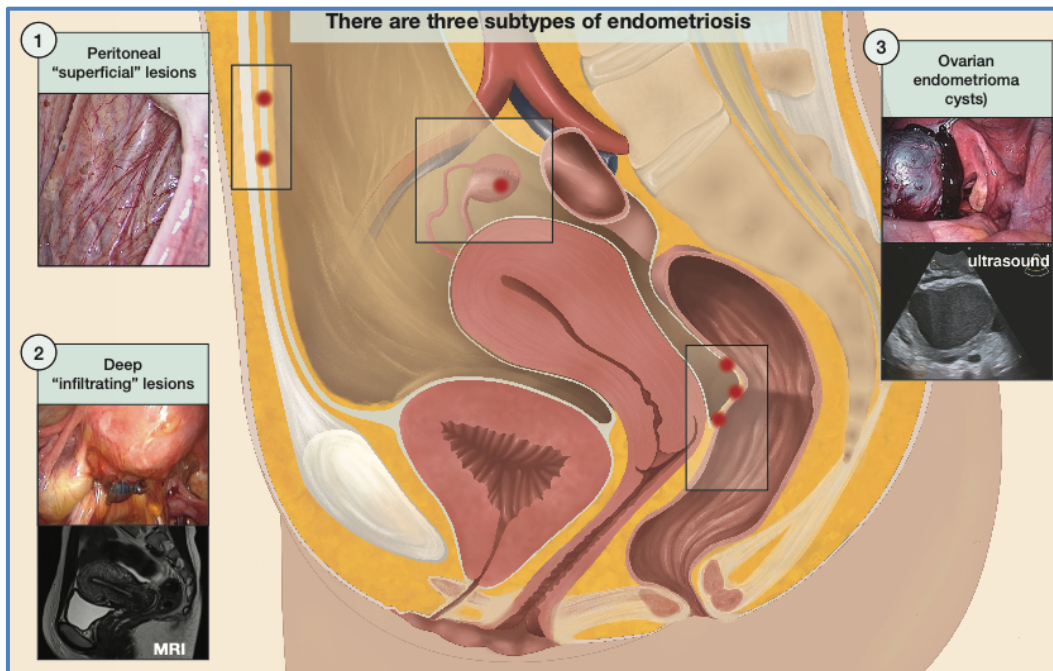


Abbildung 1.2: Lokalisation der EM-Herde in Abhängigkeit von der Eindringtiefe mit Differenzierung in die ovarielle, oberflächlich peritoneale und tief infiltrierende Endometriose (Horne und Saunders, 2019).

1.3 Klassifikationssysteme der Endometriose

Die *American Society for Reproductive Medicine* (sog. rASRM, früher in 1997 ASRM) definiert die erste und weltweit am meisten genutzte Einteilung, den rASRM-Score (Abb. 1.3). Somit bietet dieser den Vorteil einer internationalen Vergleichbarkeit in Bezug auf prospektive Studien. Ein wesentlicher Nachteil ist, dass der rASRM-Score eine geringe direkte Korrelation zu den beiden Leitsymptomen Schmerz und Infertilität sowie zur Rezidivrate aufweist. Außerdem fehlt die Beurteilung der tief infiltrierenden und infolgedessen auch der relevanten rektovaginalen Endometriose (Haas *et al.*, 2013a). In erster Linie findet eine Bewertung des makroskopischen Bildes der Endometriosis genitalis interna und externa statt (Ochs *et al.*, 1993). Auf Grund einer klaren Gliederung in Form eines Punktesystems ist der rASRM-Score einfach zu verstehen (Haas *et al.*, 2013a). Bei multiviszeralen und tief infiltrierenden Läsionen ist dieses Klassifikationssystem jedoch nicht ausreichend (Engel *et al.*, 2015).

Zur Vervollständigung wurde im Jahr 2005 von der Stiftung für Endometriose-Forschung der neue ENZIAN-Score entwickelt, um eine deskriptive und morphologische

Einleitung

Klassifikation für die TIE zu erhalten (Tuttlies *et al.*, 2005). Es wird insbesondere auf die retroperitoneale Form Bezug genommen. Die endometriotischen Läsionen werden in Anlehnung an das onkologische Staging in 4 Stadien unterteilt. Dabei werden die anatomischen Lokalisationen und die Größe der Läsionen erhoben, wodurch eine präzise Analyse der EM-Herde ermöglicht wird (Abb. 1.3). Auf Grund der Komplexität unterliegt der ENZIAN-Score einer geringen internationalen Akzeptanz und wird vor allem im deutschen Raum verwendet (Tuttlies *et al.*, 2005; Haas *et al.*, 2013a). Dennoch stellt der ENZIAN-Score eine wichtige Ergänzung zum rASRM dar. Zusätzlich wurde beschrieben, dass signifikante Korrelationen zwischen klinischen Symptomen und den vorliegenden Stadien zu erkennen sind (Haas *et al.*, 2013b).

rASRM-Score

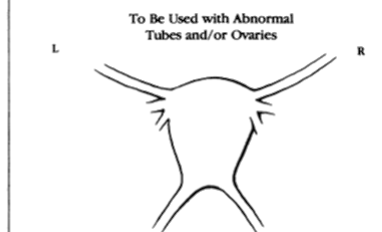
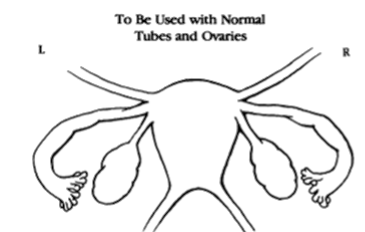
Patient's Name _____ Date _____
 Stage I (Minimal) - 1-5 Laparoscopy _____ Laparotomy _____ Photography _____
 Stage II (Mild) - 6-15 Recommended Treatment _____
 Stage III (Moderate) - 16-40
 Stage IV (Severe) - >40
 Total _____ Prognosis _____

PERITONEUM	ENDOMETRIOSIS	< 1cm	1-3cm	> 3cm
	Superficial	1	2	4
	Deep	2	4	6
OVARY	R Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
	L Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION		Partial 4	Complete 40	
OVARY	ADHESIONS	< 1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	> 2/3 Enclosure
	R Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	L Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	R Filmy	1	2	4
	Dense	4*	8*	16
	L Filmy	1	2	4
TUBE	Dense	4*	8*	16

*If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.
 Denote appearance of superficial implant types as red (R), red, red-pink, flame-like, vesicular blobs, clear vesicles, white (W), opacifications, peritoneal defects, yellow-brown, or black (B) black, hemosiderin deposits, blue]. Denote percent of total described as R____%, W____% and B____%. Total should equal 100%.

Additional Endometriosis: _____

 Associated Pathology: _____



a

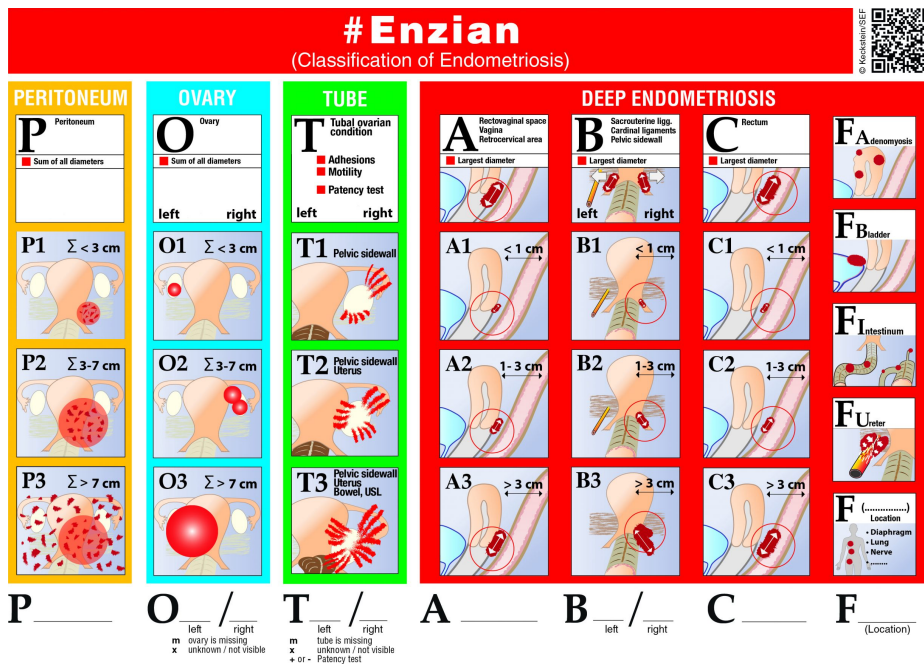


Abbildung 1.3: Die rASRM (Revised American Society for Reproductive Medicine Classification of Endometriosis, 1985) und ENZIAN Klassifikation der Endometriose (Quelle: <https://www.endometriose-sef.de/aktivitaeten/klassifikation-enzian/>).

1.4 Epidemiologie und gesellschaftliche Relevanz

Der historisch geprägte Begriff „The Forgotten Disease“ aus dem 17. Jahrhundert beschreibt sowohl die fehlende gesellschaftliche Verankerung als auch die geringe wissenschaftliche und klinische Anerkennung der Endometriose, die bis in das 21. Jahrhundert anhielt (Knapp, 1999). Bezogen auf die gebräuchlichsten Daten wurde die weltweite Prävalenz der an Endometriose erkrankten Frauen in gebärfähigem Alter vor einigen Jahren deutlich überschätzt (Gao *et al.*, 2006; Becker *et al.*, 2014) und wird aktuell nur mehr in einem Bereich zwischen 2-5% angenommen (Eisenberg *et al.*, 2018). Wenngleich die Endometriose häufig bei Frauen im reproduktiven Alter vorkommt, liegen Beweise für die Existenz der Erkrankung bei prämenarchalen und postmenopausalen Patientinnen vor (Popoutchi *et al.*, 2008; Ebert *et al.*, 2009). Zur sicheren Diagnosestellung ist eine Laparoskopie notwendig. Da diese häufig nicht stattfindet, ist eine präzise Erhebung der Prävalenz erschwert (Schweppe, 2003). Im Rahmen einer norwegischen Studie wurde gezeigt, dass nach erstmaligem Einsetzen der chronischen Unterbauchschmerzen bei Endometriose eine Verzögerung der Diagnosestellung von durchschnittlich 7 Jahren vorliegt (Husby *et al.*, 2003). Die

Patientinnen sind zum Zeitpunkt der Diagnosesicherung durchschnittlich 28 Jahre alt (Pritts und Taylor, 2003).

Auf Grund der relativ hohen Prävalenz und der ernstzunehmenden Klinik mit starken Schmerzen bis hin zur Infertilität wurde diese Krankheit bereits Ende des 20. Jahrhunderts als ein großes sozioökonomisches und gesundheitspolitisches Problem erkannt (Eskenazi und Warner, 1997). Eine kanadische Forschungsgruppe postulierte, dass die jährlichen Kosten im Rahmen der Hospitalisierung durch die Endometriose bei etwa 30 Millionen US-Dollar liegen und wollen somit die gesellschaftliche Belastung dieser Erkrankung unterstreichen (Chen *et al.*, 2020). In Frankreich wird einer Studie zufolge die Hospitalisierungsrate auf 0,9% geschätzt, jedoch mit Schwankungen in Abhängigkeit zur Region. Die Re-Hospitalisierungsrate innerhalb von 3 Jahren liegt in Frankreich bei rund 7% (von Theobald *et al.*, 2016). Ein weiteres wichtiges epidemiologisches Kriterium ist die Infertilität (Rogers *et al.*, 2009). Die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Schwangerschaft steht in direkter Korrelation zum Krankheitsstadium und nimmt mit fortschreitender Erkrankung ab. Es gibt multiple Gründe für die Ursachen der Infertilität, die insbesondere auf dem inflammatorischen Milieu der Bauchhöhle basieren. Dabei werden die Funktionen der Spermien und Oozyten gestört (Morcos *et al.*, 1985; Macer und Taylor, 2012). Die rezidivierenden, entzündlichen Reaktionen können zu Adhäsionen und Tubenmotilitätsstörungen führen, die ebenfalls eine Infertilität begünstigen (Manolopoulos *et al.*, 2005).

Es ist entscheidend, dass alle Fakten in Zusammenhang mit klinischen Angaben analysiert werden. Nur der Gesamtkontext ermöglicht eine sinnvolle Interpretation der epidemiologischen Daten.

1.5 Beeinflussende Faktoren

1.5.1 Genetik

Die Komplexität der Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung wird durch die Abwesenheit von diagnostischen Markern, die späte Diagnosesicherung, die schwierige Behandlung und die operativen Interventionen im Rahmen der Endometriose unterstrichen. Der genaue molekulargenetische Mechanismus ist bis heute nicht erforscht

(Joseph und Mahale, 2019). Es wird wiederholt eine familiäre Häufung der Erkrankung beschrieben. Das Risiko für Frauen eine Endometriose zu entwickeln erhöht sich um das 10fache, sobald Verwandte ersten Grades erkrankt sind (Kennedy, 2003; Matalliotakis *et al.*, 2008). Die Analyse von 1176 Schwesterpaaren, die an einer histologisch gesicherten Endometriose leiden, ergab eine erhöhte Kongruenz von Veränderungen auf dem Chromosom 10q26, wobei bislang kein Gen als ursächlich für die Erkrankung in Verbindung gebracht werden konnte (Treloar *et al.*, 2005). Neben genetischen Veränderungen wurden auch Aberrationen der Epigenetik entdeckt. Im Bereich der *Single Nucleotid Polymorphism* (SNP) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Patientinnen mit Endometriose und gesunden Frauen in bestimmten Genarealen erhoben werden (Matalliotakis *et al.*, 2017). In Bezug auf Autoimmunerkrankungen ist noch nicht klar, ob die Endometriose ein Risikofaktor oder eine Konsequenz darstellt. Auch die Information über einen möglichen gemeinsamen Pathomechanismus ist nicht geklärt. Weitere Forschungen sind notwendig und halten die Möglichkeit für immunmodulatorische Therapien offen (Shigesu *et al.*, 2019).

1.5.2 Risikofaktoren

Aufgrund der bislang noch unklaren Ätiologie der Endometriose stellt sich auch die Erhebung von signifikanten Risikofaktoren als deutlich erschwert dar und es gibt viele verschiedene Studien mit unterschiedlichen Aufzählungen. Der Mediziner Schindler (2007) deklarierte, dass sich die Menstruation und der Hormonhaushalt stark modifizierend auf das Krankheitsbild der Endometriose auswirken. Eine Hypermenorrhoe, Dysmenorrhoe, Menorrhagie, und eine Nullparität erhöhen die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung einer EM. Die Schwangerschaft hat wiederum meist eine protektive Wirkung (Schindler, 2007). In einer Fallkontrollstudie aus dem Jahr 2011 konnten einige der Risikofaktoren nachgebildet werden (Burghaus *et al.*, 2011). Einer Metaanalyse zu Folge konnte bewiesen werden, dass Patientinnen, die postoperativ eine Therapie mit Dienogest erhielten, einem signifikant geringerem Risiko für das Wiederauftreten der Endometriose unterlagen (Zakhari *et al.*, 2020). Umweltfaktoren und Lebensstil sind als mögliche beeinflussende Komponenten unzureichend erforscht. Es gibt viele kontroverse Arbeiten, wodurch ein kausaler Zusammenhang nicht sicher bestimmt werden kann (Rier *et al.*, 1993, Bruner-Tran *et al.*, 2008, Porpora *et al.*, 2006, Niskar *et al.*, 2009).

1.6 Ätiologie

Eine große Anzahl an Forschern und Wissenschaftlern versucht eine endgültige Erklärung für die Entstehung der Endometriose zu finden. Trotz der jahrzehntelangen Forschung konnte noch keine endgültige Erklärung für die Pathogenese der Endometriose erhoben werden. Im folgenden Kapitel werden die wichtigsten Theorien vorgestellt.

1.6.1 Implantationstheorie (retrograde Menstruation)

Die erste Theorie wurde im Jahr 1927 von John A. Sampson aus New York postuliert und wurde damals bei der Zusammenkunft der *American Gynaecological Society* vorgestellt. Sampson beobachtete, dass neben dem antegraden Bluten zusätzlich ein retrograder Menstruationsfluss existierte. Dabei gelangen während der Regelblutung endometriale vitale Zellen über die Tuben in die Bauchhöhle. Dort kam es dann zur Einnistung des endometrialen Gewebes und gegebenenfalls zur Entwicklung einer Endometriose. Eine zusätzliche Bekräftigung dieser Theorie wurde durch den direkten laparatomischen Nachweis dieses Blutflusses aus der Tube bei Patientinnen während bzw. kurz nach der Menses erzielt. Die anatomischen und praktischen Begebenheiten stützten dieses Erklärungsmodell (Sampson, 1927a). Einer Studie zufolge wurde bei etwa 90% der laparotomierten Frauen während des perimenstruellen Zeitraums Blut in der Bauchhöhle entdeckt. Lag jedoch keine Durchgängigkeit der Tuben vor, fiel dieser Prozentsatz auf 15 herab (Halme *et al.*, 1984). Zusätzlich wurde im Jahr 1995 der Nachweis erbracht, dass die retrograde Menstruation eine intrapelvine Implantation von vitalen Endometriumzellen herbeiführen kann (D’Hooghe *et al.*, 1995). Diese beiden und noch viele weitere Studien stützen die These von Sampson. Dennoch gibt es Forschungen, die Limitationen in dieser Theorie sehen. Dazu gehört die Tatsache, dass Endometriose auch bei Frauen in der Prämenarche und postmenopausal nachgewiesen wurde (Popoutchi *et al.*, 2008). Da dies jedoch eher selten vorkommt, ist Sampsons Theorie zum größten Teil erklärend.

1.6.2 Die Coelom-Metaplasietheorie bzw. die epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Diese Theorie wurde ursprünglich von R. Meyer im Jahr 1919 beschrieben und besagt, dass sich die endometriotischen Herde unter bestimmten Einflüssen metaplastisch aus dem embryonalen Coelom Epithel ableiten lassen (Meyer, 1919). Verschiedene Studien bekräftigen diese Theorie mit dem Hintergrund, dass bei Patientinnen mit Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrom (MRKH) und folglich funktionslosem Uterus eine Endometriose nachgewiesen werden konnte (Mok-Lin *et al.*, 2010; Troncon *et al.*, 2014). Im Hinblick auf das MRKH konnte gezeigt werden, dass bislang bei allen histologisch gesicherten Endometriosen zumindest ein Uterusrest vorlag und es wurden insbesondere über das MRT ermittelte Endometriosen bei MRKH herangezogen (Konrad *et al.*, 2019a). Dies unterstreicht weiterhin die Theorie von Sampson. Die aktuelle Studie der Forschungsgruppe Konrad *et al.* (2020) konnte mit mesenchymalen und epithelialen Markern nachweisen, dass der epitheliale Phenotyp in den endometriotischen Läsionen nicht verloren geht. Zusammenfassend wurden einige Anzeichen für eine EMT ermittelt, jedoch kann dies nicht als alleinige Ursache für die Entstehung der Endometriose deklariert werden (Konrad *et al.*, 2019b, Konrad *et al.*, 2020).

1.6.3 Tissue Injury and Repair Konzept

Das TIAR-Konzept bietet ergänzend zu Sampsons Transplantationstheorie eine Erklärung für die geringe Prävalenz der Endometriose, obwohl nahezu alle Frauen eine retrograde Menstruation aufweisen. Es wurde von Leyendecker *et al.* (1999) entwickelt. Dabei wird der Uterus aus embryologischer Sicht in zwei Bereiche unterteilt. Die Archimetra stellt die Grenze zur Cavitas uteri dar und besteht aus dem Endometrium und dem Stratum subvasculare. Sie unterliegt autarken Kontraktionsabläufen, deren Aktivität durch Sexualhormone modifiziert wird (Leyendecker *et al.*, 1999; Kunz und Leyendecker, 2002). Direkt an die Archimetra angeschlossen liegt die Neometra, die für Uteruskontraktionen im Rahmen der Wehentätigkeit zuständig ist und bei Frauen mit Endometriose eine gesteigerte Östrogenproduktion und Inflammation induziert (Bulun, 2009). Im oberen Bereich des Uterus findet eine unvollständige Fusion der archimyometrialen Muskelfasern statt. Dieser vulnerable Bereich wird als Prädilektionsstelle für uterine Auto-Traumatisierungen angesehen. Sie stellt zusammen

mit der restlichen endomyometrialen Grenzzone den Ursprungsherd für Mikroläsionen von Stromazellen, Fibroblasten und Myozyten dar (Kunz und Leyendecker, 2002). Grund für diese „erste Stufe der Verletzung“ sind östrogenabhängige, uterine Hyperperistaltiken in Kombination mit einem erhöhten intrauterinen Druck. Infolgedessen wird die Freisetzung von inflammatorischen Proteinen gefördert. Anschließende Reparaturmechanismen führen zur Aktivierung der Aromatase-Expression mit einer lokalen Erhöhung des Östrogenspiegels (Mechsner, 2016b), was wiederum in einer von der ovariellen Hormonachse entkoppelten Hyper- bzw. Dysperistaltik resultiert. Dies wird als „zweite Stufe der Verletzung“ definiert. Im Rahmen dieses *Circulus Vitiosus* mit verstärkter Desquamation gelangen abgelöste basale Fragmente des Endometriums retrograd in die Bauchhöhle und begünstigen die Entwicklung einer Endometriose (Leyendecker *et al.*, 2009).

1.6.4 Stammzellhypothese

Bislang erklärt noch keine Theorie die Entstehung der Endometriose ausreichend. Im Review von Maruyama und Yoshimura (2012) wird beschrieben, dass endometriale Vorläuferzellen (Stammzellen) möglicherweise die Entstehung von endometriotischen Implantaten begünstigen. Es wird davon ausgegangen, dass es zu einer neonatalen uterinen Blutung kommt. Dabei wandern Vorläuferzellen in die Bauchhöhle und überleben dort. Sobald dann die Östrogenstimulation in der Pubertät erfolgt, werden diese Zellen genährt und können das Krankheitsbild einer Endometriose hervorrufen (Gargett *et al.*, 2014).

1.6.5 Alternative Theorien zur Ätiologie

Neben den bereits beschriebenen Theorien gibt es weitere teilweise ergänzende Ideenmodelle für die Pathogenese. Die Theorie der lymphogenen oder hämatogenen Streuung besagt, dass Endometriumzellen nicht über die retrograde Menstruation, sondern über andere Transportwege in weit entfernte Körperregionen verteilt werden (Jerman und Hey-Cunningham, 2015). Bereits Sampson entdeckte 1927 endometriale Zellen in uterinen Venen von Frauen mit Endometriose (Sampson, 1927b). Bestärkt wurde dies im Rahmen einer experimentellen Studie an Kaninchen, wobei eine

intravenöse Injektion von Endometriumgewebe eine pulmonale Endometriose auslöste (Hobbs und Bortnick, 1940). Zusätzlich konnten bei Autopsien und resezierten Lymphknoten EM-Herde gefunden werden (Javert, 1952). Diese Theorie stellt eine Erklärung für die weit entfernte extraperitoneale Endometriose dar.

Hier ist es wichtig zu erwähnen, dass die Endometriose trotz ihres invasiven, destruierenden und metastasierenden Charakters eine benigne Erkrankung ist. Dennoch teilt sie sich insbesondere mit dem Ovarialkarzinom einige neoplastische Eigenschaften. Dazu zählen die Neoangiogenese, die erhöhte COX2 und VEGF Expression, Apoptosemechanismen und genomische Instabilitäten (Ulrich *et al.*, 2005a; Siufi *et al.*, 2014). Statistischen Daten zufolge haben Frauen mit Endometriose ein erhöhtes Risiko von etwa 1% für maligne Entartungen, vor allem für das Ovarialkarzinom und das Non-Hodgkin-Lymphom (Melin *et al.*, 2007).

Zuletzt bietet die Fehlfunktion der Immunabwehr ein plausibles Erklärungsmodell für die Entstehung der Endometriose. Dabei wird die Theorie von Sampson als Ausgangspunkt anerkannt und es wird nach aktivierenden Faktoren für die EM-Herde, die durch retrograde Menstruation entstanden sind, gesucht. Es werden lokale Veränderungen der humoralen und zellulären Immunantwort als unterhaltende Stimuli für die Läsionen angesehen. Eine erhöhte Makrophagen Anzahl, der Verlust von T-Zellen und natürlichen Killer-Zellen stellen mitunter eine Ursache für die unzureichende Entfernung von ektopen Endometriumzellen dar (Oral *et al.*, 1996; Ulukus und Arici, 2005). Zusätzlich führt die erhöhte Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus Immunzellen und endometrialen Zellen zu einem Wachstumsschub des ektopen Endometriums mit Proliferation und Angiogenese (Lebovic *et al.*, 2001). Es wird gezeigt, dass eine Veränderung der Expression von Komplementfaktoren mit einer gesteigerten Sekretion von C3 aus den endometrialen Läsionen abzulesen ist. Dies führt ebenfalls zu einer immunologischen Aktivierung (Isaacson *et al.*, 1989; Suryawanshi *et al.*, 2014). Die entscheidende, bislang unbeantwortet gebliebene Frage ist, ob diese immunologischen Veränderungen Grund für die Entstehung der EM sind oder eine Folge der Implantation der endometrialen Läsionen an ektopen Stellen sind.

1.7 Klinisches Bild der Endometriose

Das Beschwerdebild der Endometriose präsentiert sich häufig sehr variabel. Im Vordergrund stehen die starken zyklischen, aber auch azyklischen Schmerzen, die Infertilität sowie die häufige Chronifizierung der Beschwerden (Tab. 1.4; Schindler, 2007). Das Leitsymptom der Endometriose ist die Dysmenorrhoe und wird oftmals von Menorrhagien und Hypermenorrhoeen begleitet (Schindler, 2007). Einer multizentrischen Studie zufolge haben Frauen mit Endometriose in 73 % der Fälle entweder Unterbauchschmerzen, Regelschmerzen oder eine Menorrhagie (Ballard *et al.*, 2008). Weitere typische Symptome sind Dyspareunien und selten wird von Dyschezien und Abdominalbeschwerden berichtet (Schindler, 2007). Diese Symptome treten vor allem bei einem Befall des Rectum, des Septum rectovaginale oder dem Lig. sacrouterinum auf. Jedoch leiden auch Frauen mit peritonealer EM an diesen Beschwerden (Siedentopf, 2009; Halis *et al.*, 2010). Befinden sich die Läsionen im Bereich der Harnblase kann es zur Hämaturie und Dysurie kommen und in seltenen Fällen führt eine Endometriose im Ureter zu einer meist stummen Hydronephrose (Soriano *et al.*, 2011). Meistens liegen die Beschwerden kombiniert vor (Schindler, 2007). Einer Studie zufolge haben 50% der Frauen mit einer TIE einmalig im Leben tiefsitzende Schmerzen beim Geschlechtsverkehr, was auf eine Beeinflussung der Symptome auf die Läsionslokalisation hindeutet (Ferrero *et al.*, 2005). Es können keine Korrelationen zwischen der Schmerzintensität bzw. der Symptomatik und dem Ausmaß der Endometriose erhoben werden (Berkley, 2005). Die Forschungsgruppe von Fraser *et al.* konnte (2008) erstmalig eine weitere Erklärung für die Schmerzentwicklung bei dieser Erkrankung erheben. Sie berichten im Bereich der endometriotischen Läsionen über eine Proliferation von sensiblen Nervenfasern, die an der Schmerzentstehung beteiligt sein könnten (Fraser *et al.*, 2008).

Tabelle 1.3: Leitsymptome der Endometriose (Schindler, 2007)

Schmerzbeschreibung	Häufigkeit in %
Dysmenorrhoe	60 – 88
Menorrhagie	25 – 57
Hypermenorrhoe	16 – 75
Chronische unterbauchschmerzen	38 – 84
Dyspareunie	25 – 76
Abdominalbeschwerden	16 – 63
Dysurie	8 – 14
Hämaturie	6 – 8

1.8 Diagnostik der Endometriose

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es für Patientinnen mit Endometriose kein etabliertes Screening-Verfahren. Die Diagnostik beginnt stets mit einer ausführlichen Anamnese, die eine systematische Abfrage der Leitsymptome beinhaltet (Mechsner, 2016a). Es ist von zentraler Bedeutung eine vertrauensvolle Arzt-Patienten Beziehung aufzubauen, umso den Patientinnen in dieser psychosozialen Belastungssituation beizustehen. Darauf basierend können auch psychosomatische Faktoren mit behandelt werden, um einer Chronifizierung entgegen zu steuern (Siedentopf, 2015). Anschließend erfolgt die klinisch gynäkologische Untersuchung. Diese beinhaltet die rektovaginale Inspektion bzw. Palpation sowie eine bimanuelle Tastuntersuchung mit dem Augenmerk auf Druckdolenzen und Verhärtungen. Der transvaginale Ultraschall stellt eine obligate bildgebende Untersuchungsmethode dar und dient zur Beurteilung der inneren Geschlechtsorgane. Diese Untersuchung hilft bei der Erkennung von Endometriomen und einem möglichen tiefen Rektumbefall. Besteht der Verdacht auf einen Rektumbefall, wird eine Kolorektoskopie durchgeführt (Hudelist *et al.*, 2011). Bei einer Infiltration der ableitenden Harnwege ist eine Sonographie der Nieren unabdingbar und eine Zytoskopie kann in Betracht gezogen werden. Ein weiteres bildgebendes Verfahren ist das MRT, welches als Zusatzuntersuchung gewertet und nur bei dem Verdacht auf eine TIE angewandt wird (Ulrich *et al.*, 2005b). Im Vergleich zu den anderen Untersuchungen bietet das MRT die höchste Sensitivität (Bazot *et al.*, 2009). Der Goldstandard in der Diagnosestellung der Endometriose ist die minimalinvasive Laparoskopie mit

anschließender histologischer Beurteilung (Garry, 2004). Dieser Eingriff ist essentiell für eine sichere Diagnose (Walter *et al.*, 2001). Abgesehen von den bereits erwähnten Methoden ist ein Nachweis der Endometriose durch einen laborchemischen Marker noch nicht ausreichend gelungen. CA-125 wurde wiederholt bei Patientinnen untersucht und ist teilweise bei schwerer Endometriose erhöht. Dennoch erfüllt CA-125 nicht die Kriterien für einen spezifischen Marker und hat noch keine Wertigkeit als (differential)diagnostisches Mittel (Mol *et al.*, 1998), weshalb von einem klinischen Gebrauch abgeraten wird (Lenhard *et al.*, 2011).

1.9 Endometriotische Therapie nach aktuellen Leitlinien

Die Endometriose ist eine komplexe Erkrankung und die klinischen Beschwerden, die anatomische Lage der Läsionen und die morphologischen Begebenheiten variieren stark. Infolgedessen ist eine Standardisierung der Therapie kaum möglich. Die Patientinnen werden individuell nach Alter, Schmerzen und ihren reproduktiven Erwartungen behandelt (Schweppe, 2004). Es ist wichtig zu klären, ob die Therapie auf Grund von Endometriose-assoziierten Schmerzen oder einer vorliegenden Infertilität eingeleitet werden soll. Aktuell existieren endokrinologische, medikamentöse und operative Behandlungsmöglichkeiten mit ergänzenden schmerztherapeutischen und komplementären Maßnahmen. Jedoch gibt es bis heute auf Grund der unklaren Ätiologie keine kausale und kurative Therapie (Deutsche, Österreichische, Schweizerische und Tschechische Gesellschaften für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., 2013).

1.9.1 Medikamentöse Therapie der Endometriose

Die medikamentöse Therapie beinhaltet die endokrinologische Behandlung mit Gestagenen, Östrogen/Gestagen Kombinationspräparaten (= oralen Kontrazeptionspräparate) und GnRH-Agonisten (Deutsche, Österreichische, Schweizerische und Tschechische Gesellschaften für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., 2013). Ziel der medikamentösen Therapie ist eine langfristige und konstante Reduktion des Östrogenspiegels, resultierend in einer Amenorrhoe und Suppression der hypophysären-ovariellen Hormonachse. Folglich wird eine Stagnation des Wachstums oder im besten Fall eine Rückbildung der endometrialen Läsionen erzielt. Die

Hormonpräparate ermöglichen zudem eine Schmerzreduktion, wobei bestimmten Studien zufolge GnRH-Analoga am effektivsten bei Dysmenorrhoe und Dyspareunie wirken (Juhász-Böss *et al.*, 2014). Ansonsten unterscheiden sich die Präparate lediglich im Hinblick auf die Nebenwirkungen und Kosten. In etwa 75% der Fälle profitieren die Patientinnen von einer niedrig dosierten Gestagengabe (Vercellini *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 2010). Bei einer Langzeiteinnahme mit GnRH-Agonisten wird ein Östrogenmangel initiiert, wodurch das Risiko einer Osteoporose steigt. Um dies zu verhindern, kann initial eine „Add-Back-therapie“ mit Gestagenen als präventive Maßnahme eingesetzt werden (Ulrich *et al.*, 2014). Zur Schmerzlinderung kommen nicht-steroidale-Antiphlogistika (NSAR) und Antirheumatika zum Einsatz. Als additive Schmerztherapeutika können Opiate und Antidepressiva angewandt werden. Die Schmerztherapie wirkt rein symptomatisch und erzielt keine Wirkungen auf die Größe der EM-Läsionen (Brucker, 2003).

Solang keine fassbaren Organbefunde vorliegen und die Patientinnen über zyklische bzw. azyklische Endometriose-assoziierte Schmerzen klagen, werden die oralen Gestagenhaltigen Kontrazeptiva und/oder NSAR als „First-Line“ Therapie angesehen. Bei fehlender Besserung oder unerfülltem Kinderwunsch werden „Second-Line“ Therapeutika wie GnRH-Analoga erwogen (Moore *et al.*, 2000). In einem Review von 2020 wurde postuliert, dass die Therapie mit Dienogest ein effektives additives aber auch alternatives Mittel neben der operativen Therapie darstellt (Murji *et al.*, 2020). Die Unterbauchschmerzen wurden bei Frauen mit Endometriose signifikant reduziert und postoperativ wurde ein signifikanter Rückgang des Wiederauftretens von Endometriose-assoziierten Beschwerden ermittelt (Römer, 2018; Zakhari *et al.*, 2020).

Sterilität ist ein schwerwiegendes Symptom und es werden sowohl operative als auch reproduktionsmedizinische Maßnahmen zur Erfüllung des Kinderwunsches angewandt. Rein medikamentöse Behandlungen sind ohne Nutzen (Kennedy *et al.*, 2005). Eine Stimulation der intrauterinen Insemination soll Forschungen zu Folge die Fertilität der Frauen steigern (Brucker, 2003). Unter der Voraussetzung, dass sich die Tuben und das Spermogramm unauffällig präsentieren, erzielt bereits die operative Resektion eine Erhöhung der Fruchtbarkeit. In einer randomisierten Studie erhielten Frauen mit Endometriose (rASRM III/IV) nach einer operativen Sanierung eine ultralange Therapie

mit GnRH-Agonisten. Dabei wurde eine signifikant erhöhte Schwangerschaftsrate beobachtet (Rickes *et al.*, 2002; Ulrich *et al.*, 2014).

1.9.2 Operative Therapie der Endometriose

Die Laparoskopie als therapeutisches Mittel wird in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung eingesetzt und ein präoperativer adäquater Konsens mit den Patientinnen ist verpflichtend. Sie bietet den Vorteil einer gewebeschonenden minimalinvasiven Operation (Keckstein und Tuttlies, 1997; Kennedy *et al.*, 2005). Postoperativ wurden eine signifikante Schmerzreduktion und eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität in den nächsten 5 Jahren beobachtet. Für den Fall, dass die Patientinnen im Verlauf erneut über Schmerzen klagen, sind diese nicht immer mit dem Rezidiv von Implantaten assoziiert (Abbott *et al.*, 2003). Angenommen, die Laparoskopie ist nicht umsetzbar, wird eine Laparotomie durchgeführt. Die erfahrenen Operateure arbeiten mit optimierten Instrumenten und ermöglichen so die komplexe Resektion von EM-Herden bis zu Grad IV. Intraoperativ kommen destruierende Wärme, Laser und Ultraschall zum Einsatz, die eine Erhöhung der Sicherheit gewährleisten (Keckstein und Tuttlies, 1997). Ziel der Operation ist die vollständige und organerhaltende Entfernung aller endometriotischen Implantate. Zugleich können mögliche Sekundärschäden des inneren Genitals, wie Adhäsionen und Narbengewebe korrigiert und saniert werden (Schweppe, 2004). Darüber hinaus besteht die Option zur laparoskopischen uterinen Nervenablation (LUNA). Dieses Verfahren destruiert Nervenplexi und parasymphatische Nervenganglien im Ligamentum sacrouterinum, wodurch eine Inhibition der Schmerzübertragung aus dem Uterus und anderen pelvischen Organen ausgelöst wird (Daniels, 2009). Es existiert eine große Meinungsdiversität in Bezug auf den *Benefit* dieser Methode (Latthe *et al.*, 2005). Problematisch sind die potenziellen Komplikationen, wie bspw. der Uterusprolaps und die Denervierung im Bereich des kleinen Beckens mit Inkontinenzentwicklung (El-Din Shawki, 2011). Manchen Studien zu Folge führt die Kopplung dieser Methode an eine therapeutische Operation nach 6 Monaten zu einer signifikanten Erleichterung des Schmerzes bei Frauen mit milder bis moderater Endometriose (Jacobson *et al.*, 2001). Andere wiederum beschreiben die Beweislage als desolat und sprechen sich gegen eine Empfehlung dieser Methode aus (Proctor *et al.*, 2005). Das *National Institute for Health and Clinical Excellence* (NICE) suggeriert, dass dieses Verfahren auf Grund der geringen Evidenz nicht angewandt werden sollte (National Institute for Health and Clinical

Excellence, 2007). Diese kontroverse Lage treibt Studien voran. Die laparoskopisch durchgeführte präsakrale Neurolyse stellt ebenfalls eine Möglichkeit zur Schmerzlinderung bei milder bis moderater EM dar. Es fehlen jedoch noch Daten um die Effizienz und Sicherheit dieser Methode zu analysieren (Soysal *et al.*, 2003).

In dem 7-jährigen Follow-up der Forschungsgruppe Shakiba *et al.* (2008) wurde nachgewiesen, dass bei einer Laparoskopie mit Entfernung der Läsionen nach 2 Jahren 79% der Frauen keine weiteren Operationen mehr benötigten. Nach 7 Jahren lag der Prozentsatz nur mehr bei 45%. Bei Hysterektomien wurden nach 2 Jahren 96% und nach 7 Jahren 77% der Frauen nicht mehr operiert (Shakiba *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit des Uterus in der Pathogenese der Endometriose. Bisher machen viele Arbeiten die unvollständige Entfernung der Läsionen für die ausbleibende Remission mit Wiedereintreten der Beschwerden verantwortlich. Limitierend ist, dass die meisten Studien sich im Hinblick auf den Schmerz mit Läsionen beschäftigen, obwohl diese in geringem Zusammenhang mit dem Schmerz bzw. dem Ausmaß der Erkrankung stehen. Es wäre in Zukunft sehr bedeutsam, sich auf die verschiedenen Schmerzsymptome zu fokussieren (Stratton und Berkley, 2011). Darüber hinaus besteht bei Erhalt der Ovarien ein sechsfach erhöhtes Risiko für erneute EM-assoziierte Schmerzen und ein achtfach erhöhtes Risiko für erneute Operationen (Rizk *et al.*, 2014). In einem Review von 2015 konnte deklariert werden, dass postoperativ die konstante Einnahme einer hormonellen Therapie das Wiederauftreten von Symptomen signifikant reduziert (Koga *et al.*, 2015). Im folgenden Abschnitt wird in Bezug auf die Lokalisation der Endometriose die Leitliniengerechte (S2k-Leitlinie) Therapie erörtert. Die verschiedenen Behandlungsstrategien in Abhängigkeit zur Lokalisation der EM wurden aus den SK2-Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der Endometriose abgeleitet (Deutsche, Österreichische, Schweizerische und Tschechische Gesellschaften für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., 2013). Zu erwähnen ist, dass bei allen Formen einer Schmerzmedikation das WHO-Schema befolgt werden sollte.

Nach den Leitlinien wird Patientinnen mit einer ovariellen Endometriose keine medikamentöse Therapie empfohlen. Die effektivste Methode stellt die operative Resektion dar, die eine Entfernung des Zystenbalges impliziert. Studien besagen, dass die ovarerhaltende Extraktion positive Auswirkung auf die Schmerzreduktion, die Rezidivrate und die Fertilität hat. Eine vorangegangene GnRH-Analoga Therapie wird

nicht empfohlen. Jedoch bewirkt die postoperative Behandlung unter der Voraussetzung einer vollständigen Resektion eine Verringerung der Rezidivrate (Deutsche, Österreichische, Schweizerische und Tschechische Gesellschaften für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., 2013).

Bei Patientinnen mit einer peritonealen EM werden nach Leitlinie sowohl medikamentöse als auch operative Verfahren angewandt. Grundlagen für eine medikamentöse Behandlung sind die Verträglichkeit, kein Kinderwunsch und eine erfolgte histologische Sicherung. Die Zielsetzung sollte immer die Schmerzreduktion involvieren. Sind diese Voraussetzungen nicht erfüllt, ist die Operation indiziert, mit Destination auf eine Schmerzreduktion und die Zunahme der Spontanschwangerschaften.

Der Leitlinie zufolge sollte die symptomatische TIE *in sano* reseziert werden, wenngleich dies auf Grund einer Fertilität erhaltenden Operation oft nicht möglich ist. Verschiedenste Operationstechniken wie Laparotomien, vaginale Resektionen, Laparoskopien etc. ermöglichen die komplexe Entfernung der oft organüberschreitenden Implantate. Je nach Organbefall werden interdisziplinäre Strategien geplant. Es sollten sowohl Allgemeinchirurgen bei Befall des Darmes als auch Urologen bei Befall der ableitenden Harnwege mit einbezogen werden. Auch hier indiziert der Kinderwunsch eine Operation mit Erhalt des Uterus und den Adnexen. Bei einer asymptomatischen TIE ist eine Nierenultraschalluntersuchung zum Ausschluss einer stummen Hydronephrose obligat. Es ist wichtig, dass Patientinnen an spezialisierten Kliniken mit erfahrenen Operateuren behandelt werden. Sowohl die prä- als auch die postoperative Therapie mit GnRH-Analoga ist in ihrem Nutzen nicht belegt. Hormonelle Therapeutika kommen vor allem bei Frauen, die sich gegen eine Operation aussprechen und bei postoperativen Beschwerden zum Einsatz (Deutsche, Österreichische, Schweizerische und Tschechische Gesellschaften für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., 2013).

1.10 Schmerzpathogenese der Endometriose

Es gibt verschiedene Definitionen für Schmerz, abhängig von der Literatur (Cohen et al., 2018). Die *International Association of Pain* (IASP) etablierte 1979 eine sachbezogene Definition, die eine internationale Akzeptanz erlangte. Sie wurde von Klinikern, Forschern und von großen Organisationen wie der WHO (World Health Organisation)

anerkannt. Die IASP bezeichnet Schmerz wie folgt: „*An unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage*“ (Raja *et al.*, 2020). Aufgrund der vielen Forschungen und der daraus resultierenden Wissenserweiterung im Hinblick auf den Schmerz, erfolgte eine Reevaluation der Definition im Jahr 2018. Hierfür wurde ein Expertenkomitee aus 14 Personen herangezogen, welche eine Abwandlung der Definition vornahmen: “*An unpleasant sensory and emotional experience associated with, or resembling that associated with, actual or potential tissue damage.* “ (Raja *et al.*, 2020) .

Der Schmerz nimmt einen zentralen Stellenwert des Krankheitsbildes der EM ein und ist ein Kernaspekt der Wissenschaft. Ziel vieler Forschungen ist es, mögliche Einflussfaktoren in der multimodalen Schmerzentstehung bei Frauen mit Endometriose zu erheben. Der genaue Pathomechanismus der zu chronischen Schmerzen bei Frauen mit Endometriose führt, ist nicht geklärt (Ballard *et al.*, 2008). Um das subjektive Schmerzempfinden der Patientinnen messen zu können, werden Visuelle (VAS) oder numerische Analogskalen (NAS) verwendet (von Null gleich kein Schmerz bis 10 gleich stärkster Schmerz). Dabei werden einer Studie zu Folge die wissenschaftlichen Gütekriterien wie Validität, Reliabilität und Objektivität erfüllt (Schomacher, 2008) und eine Vergleichbarkeit geschaffen. Schmerzen werden in Abhängigkeit von ihrer Dauer in akute (<6 Wochen) und chronische (>6 Wochen) Schmerzen klassifiziert (Yam *et al.*, 2018). Eine weitere Unterteilung wird anhand verschiedener Schmerzformen vorgenommen (Abbildung 1.5).

1.10.1 Nozizeptiver bzw. Somatischer Schmerz

Bei dieser Schmerzform reagieren die Nozizeptoren der Nervenendigungen auf schädliche Stimuli und es kommt so zur Aktivierung. Die resultierende Schmerzeinleitung erfolgt bei intakten Nervenstrukturen und wird durch toxische Reize, wie Knochenbrüche, Verbrennungen, Schnittverletzungen etc. induziert. Dieser somatische Schmerz äußert sich als spitz/scharf und ist oft gut lokalisierbar (Yam *et al.*, 2018).

1.10.2 Neuropathischer Schmerz

Hierbei handelt es sich um einen meist polymodalen Schmerz, dessen Herkunft im

Körperinneren liegt. Fundamental für diese Form des Schmerzes ist die direkte Schädigung von somatischen afferenten Nervenfasern, die sowohl peripher als auch zentral stattfinden kann. In Frage kommen mechanische, toxische und entzündliche Noxen, die eine Destruktion der Neurone induzieren (Arning und Baron, 2008). Typische Symptome des neuropathischen Schmerzes sind Dysästhesien, Kribbelparästhesien, Allodynien und spontane sowie evozierte Schmerzen. Sie können oftmals nicht genau lokalisiert werden. Ein Screening-Verfahren dieser Schmerzform mit Lokalisation am Rücken ist der *PainDetect* (Freynhagen *et al.*, 2006).

1.10.3 Viszeraler Schmerz

Diese Schmerzform ist nicht so gut erforscht wie der somatische Schmerz, da dieser von vielen Faktoren beeinflusst wird, wie beispielsweise dem Sexualdimorphismus, den genetischen Merkmalen, von Stress oder genetischen Prädispositionen (Sengupta, 2009). Es handelt sich um einen diffusen Schmerz. Dieser kommt durch die Aktivierung von spinalen afferenten Bahnen, welche die viszerale Organe innervieren und im Rückenmark auf ein zweites afferentes Neuron verschaltet werden, zustande. Hierfür wird ein ausreichender mechanischer oder chemischer Reiz benötigt (Jänig, 2014). Als weiterer Mechanismus wird neben der Hyperreagibilität von den im Rückenmark befindlichen afferenten Bahnen eine Fehlregulation der modulierenden absteigenden Bahnen angenommen (Sengupta, 2009).

1.10.4 Inflammatorischer Schmerz

Die Inflammation stellt eine Reaktion des Körpers auf schädliche Stimuli dar. So können nekrotische Zellen beseitigt werden und die Wiederherstellung des physiologischen Milieus ist gewährleistet. Im Rahmen der Entzündung treffen zunächst neutrophile Granulozyten ein, die von chemischen Mediatoren (z.B. Prostaglandine, Bradykinin, ATP, NGF, Serotonin etc.) gefolgt werden. Zugleich findet ein Anstieg der Protonenkonzentration statt, wodurch ein saures Milieu aufkommt und die Aktivierung von Azid-sensitiven Ionenkanälen wie TRPV1 und ACID-Kanälen eingeleitet werden. Diese Faktoren führen zur Hyperalgesie (Huang *et al.*, 2006; Su, 2014). Die Kardinalsymptome der Inflammation wurden erstmalig im 1. Jahrhundert n. Chr. von Aulus Cornelius Celsus beschrieben und beinhalten den Schmerz, die Rötung, Schwellung, Überwärmung und die Funktionseinschränkung (Böcker, 2013). Die

Inflammation stellt eine lebensnotwendige Reaktion des Körpers auf gefährliche Mikroorganismen oder Gewebeschädigungen dar und schützt uns so vor Infektionen. Kommt es jedoch zu einer überschießenden, unkontrollierten Inflammation, kann dies zur Gewebeschädigung führen (Xiao, 2017).

1.10.5 Psychogener Schmerz

Bis heute ist die Ursache für den psychogenen Schmerz nicht geklärt und es gibt keine klare Definition. Von dieser Schmerzform spricht man, wenn Menschen betroffen sind, die starken psychischen Belastungen ausgesetzt sind und keine organisch evaluierbare Destruktion von Gewebe zu erkennen ist (Danilov *et al.*, 2018).

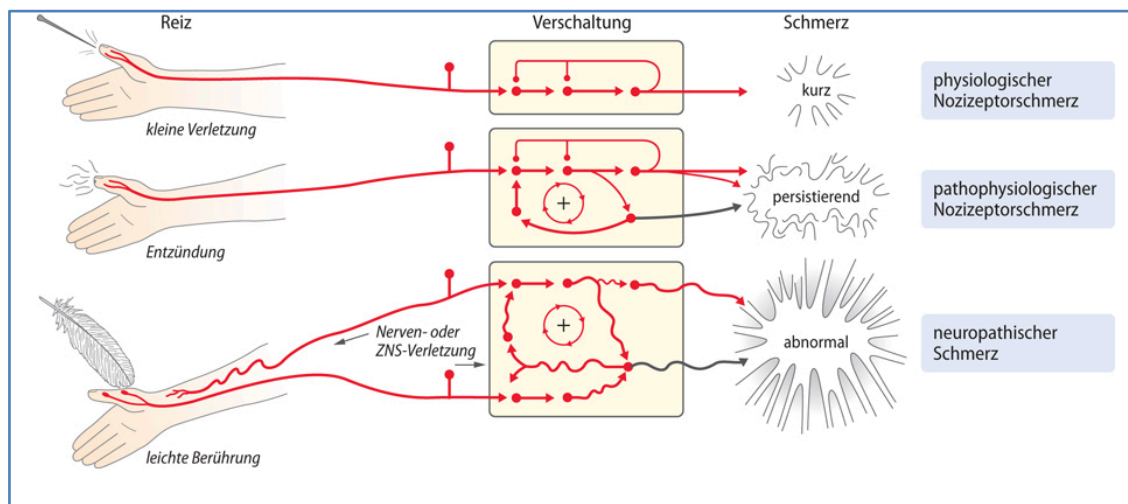


Abbildung 1.4: visuelle Darstellung verschiedener Schmerzformen basierend auf den unterschiedlichen pathogenetischen Vorgängen (Schaible, 2019).

In Bezug auf die Endometriose wird angenommen, dass der chronische Unterbauchschmerz und weitere „Schmerzsymptome“ der EM durch multiple Faktoren induziert werden. Die Fehlregulationen des nozizeptiven Systems, des neuropathischen Systems mit Sensibilisierungen von im Rückenmark liegenden autonomen Nervenfasern und inflammatorische Prozesse werden als relevante Mechanismen angesehen (Howard, 2009; Siedentopf, 2013). Jedoch wurden bisher nur geringe Fortschritte in Bezug auf den exakten Entstehungsmechanismus erzielt. Daraus ableitend fehlen effektive therapeutische Strategien zur Bekämpfung der Beschwerden (Rogers *et al.*, 2017). Hinzu kommt der Fakt, dass die Ausbreitung der Krankheit nach rASRM in keiner Korrelation zum Ausmaß des Schmerzes steht (Gruppo Italiano per lo Studio dell’Endometriosi,

2001). Bisher konnten nur Zusammenhänge in Bezug auf die Schmerzlokalisierung in Abhängigkeit vom Ort der EM-Herde postuliert werden (Leng *et al.*, 2007). Eine Forschungsgruppe erzielte 2014 eine wichtige Erkenntnis. Es konnte eine positive Korrelation zwischen dem Zytokin Gehalt in der peritonealen Flüssigkeit und der neuronalen zentralen Hyperreagibilität im zentralen Nervensystem auf Schmerzreize erhoben werden (Neziri *et al.*, 2014). Ergänzend wurde in mehreren Studien gezeigt, dass bei Patientinnen während der Menses ein erhöhter Metabolismus in bestimmten zerebralen Arealen vorliegt (Tu *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2011). Außerdem konnten abnorme Volumina der grauen Substanz und signifikant reduzierte Cortison-Spiegel bei Frauen mit chronischer Dysmenorrhoe erhoben werden (Tu *et al.*, 2010; Vincent *et al.*, 2011). Als Reaktion auf diese Untersuchungen wurde die Dysmenorrhoe als Merkmal in die *International Association for the Study of Pain* (IASP) aufgenommen. Dennoch fehlt die Präsenz des Schmerzparameters in den geläufigen Klassifikationssystemen der Endometriose (Rogers *et al.*, 2017).

Die endometriotischen Läsionen synthetisieren Schmerzmediatoren, die eine nachgewiesene Wirkung auf die Schmerzgenese erzielen. Faktoren wie Prostaglandine, Thromboxane, Histamine, Kinine, Substanz P und Interleukine werden verstärkt sezerniert und aktivieren die Nozizeptoren der Nervenendigungen (Drake *et al.*, 1981; Yoshino *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2020). Zusätzlich wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen bewiesen, dass in tief infiltrierenden und in peritonealen Läsionen ein Kontakt zu sensorischen Nervenfasern besteht (Anaf *et al.*, 2002; Mechsner *et al.*, 2007). Zudem ist im Bereich der tief infiltrierenden Läsionen eine signifikant höhere Zahl an Mastzellen lokalisiert (Anaf *et al.*, 2006).

1.11 Analyse pro-inflammatorischen Mediatoren bei der Endometriose

Im Rahmen der EM kommt es zu immunologischen Veränderungen der peritonealen Flüssigkeit. Dabei liegt eine Funktionsmodifikation der immun-bezogenen Zellen vor und die Zahl der Makrophagen steigt an (Agić *et al.*, 2006). Diese aktivierten Zellen in Kombination mit den epithelialen Zellen der EM-Herde induzieren die Sekretion von Zytokinen. Es besteht die Vermutung, dass so eine vorteilhafte Mikroumgebung entsteht, wodurch die Einnistung der Läsionen sowie die Progression der Krankheit mit zunehmender Schmerzsymptomatik begünstigt wird (Pizzo *et al.*, 2002). Die

Veränderung von pro-inflammatorischen Proteinen wird als Anhaltspunkt für die Erforschung eines diagnostischen Markers und für die Erhebung von Korrelationen in Bezug auf den Schmerz ermittelt. Am häufigsten wurden Biomarker in Blutseren und dem Endometrium untersucht. Bisher wurde jedoch noch kein brauchbarer und valider Marker ermittelt (O *et al.*, 2018). Es wurden neben inflammatorischen Proteinen wie TNF α , Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-8, Monocyte chemoattractant protein-1 zusätzlich Hormone (Polaktin, Leptin, luteinisierendes Hormon, Oxytocin), Angiogenese Faktoren (VEGF), Autoantikörper und neuronale Marker (PGP9.5) im Endometrium untersucht. Dies spiegelt nur einen Bruchteil der bereits erforschten Biomarker wider (Fassbender *et al.*, 2015). Das Ziel in dieser Arbeit war es, die bereits untersuchten Marker, um andere relevante pro-inflammatorische Proteine zu erweitern und so die Schmerzgenese besser zu verstehen. Somit kann vielleicht in Zukunft ein Schmerztarget zur therapeutischen Behandlung ermittelt werden.

Die humanen B1 und B2 Rezeptoren sind membranständige, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die im Kallikrein-Kinin-System beteiligt sind (Marceau und Regoli, 2004). Bei der Bindung von Kinin-Peptiden oder pro-inflammatorischen Liganden an den Rezeptor werden verschiedene intrazelluläre Signalwege beeinflusst. Es wurde beispielsweise nachgewiesen, dass Bradykinin über den BR2 Rezeptor die Freisetzung von TNF α in Gang setzt und eine Hyperalgesie einleitet (Ferreira *et al.*, 1993). BR2 wird im myometrialen als auch im endometrialen Gewebe des Uterus exprimiert und unterliegt vor allem im Myometrium zyklischen Schwankungen. In der präovulativen Phase ist die Rezeptordichte im Myometrium signifikant am höchsten. Dem zu Folge haben die weiblichen Geschlechtshormone einen Einfluss auf die Dichte von BR2 im uterinen Gewebe (Murone *et al.*, 1999). Einer Studie zu Folge konnte die Antagonisierung des Rezeptors über die Gabe von HOE103 nach einer Gewebsverletzung eine Schmerzlinderung erzielen. Dies führt zur Annahme, dass BR2 eine wichtige Rolle in der Entstehung von inflammatorischen Schmerzen spielt und das Kallikrein-Kinin-Systems in die komplexe Schmerzpathogenese bei Frauen mit Endometriose eingreift (George *et al.*, 2014). Der BR1 wird in gesundem Gewebe auf einer sehr niedrigen Stufe exprimiert. Erst durch inflammatorische Prozesse mit Sezernierung von Zytokinen wird BR1 verstärkt exprimiert (Qadri und Bader, 2018). Einer Studie zufolge führt die Injektion von Interleukin-1 β in die Hinterläufe einer Ratte zur mechanischen Hyperalgesie unter Beteiligung von BR1. Auch Interleukin-2 und Interleukin-8 induzieren zusammen mit

den beiden Rezeptoren BR1 und BR2 eine mechanische Hyperalgesie (Davis und Perkins, 1994).

Bradykinin wurde erstmals im Jahr 1949 durch einen reinen Zufall während Untersuchungen zur Histaminfreisetzung entdeckt. Es ist ein Oligopeptid und wird aus verschiedenen Vorläufer-Peptiden aus dem Blutplasma freigesetzt. Die Freisetzung von Bradykinin ist temperatur- und konzentrationsabhängig. Es konnte gezeigt werden, dass eine exogene Injektion von Bradykinin die Kardinalsymptome der Entzündung hervorruft. Die Rötung, Schwellung und Überwärmung entsteht über die Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung, während der Schmerz durch die Reizung von afferenten Nervenfasern hervorgerufen wird (Marceau und Regoli, 2004). Bradykinin spielt eine wichtige Rolle bei der vasodilatativen Hypotension in Folge der Hemmung des *Angiotensin Converting Enzyme* (Gainer *et al.*, 1998). Zusätzlich hat dieses Hormon Einfluss auf inflammatorische und schmerzassoziierte Prozesse (Naidoo und Bhoola, 1997). Es konnte belegt werden, dass Bradykinin eine Freisetzung von IL-1 und TNF α aus Makrophagen hervorruft (Tiffany und Burch, 1989).

1.12 Gender: generisches Femininum

In dieser Studie werden aus biologischer Sicht nur Frauen untersucht. Um eine Vereinfachung des Lesens zu erzielen, wurde in dieser Arbeit das generische Femininum verwendet.

2 Fragestellung und Problemstellung dieser Arbeit

Die Erfassung der Schmerzen und Schmerzparameter bei der Endometriose ist bisher nur unzureichend gelungen. In letzter Zeit wurden besonders die inflammatorischen Begleiterscheinungen der Erkrankung als Verursacher der Schmerzen favorisiert. In dieser Doktorarbeit wurden mit Hilfe eines Fragebogens die typischen Lokalisationen des Schmerzes im Rahmen einer Endometriose (z.B. Dysmenorrhoe, Dysurie, chron. Unterbauchschmerz etc.) als auch die neuropathischen Schmerzen mittels *PainDetect* erfasst. Zur Einstufung der Schmerzintensität wurde der NAS-Score herangezogen. Von den Patientinnen wurden in der Regel endozervikale Proben gesammelt. Diese konnten dann mit Hilfe von ELISAs auf mögliche Schmerz-assoziierte Proteine (z.B. PGEs, Zytokine, Gewebshormone etc.) und deren Korrelationen zum Schmerzbild und zur Pilleneinnahme untersucht werden. Zusätzlich wurden regelmäßig Gewebeproben aus der gynäkologischen Abteilung des Uniklinikum Gießens zur Verfügung gestellt, um die oben genannten Proteine auf ihre Lokalisationen im Endometrium und den endometriotischen Läsionen zu analysieren. Ziel dieses Projekts ist die Klassifizierung der Regelschmerzen und die Entwicklung einer verbesserten Schmerzdiagnostik mit spezifischen Markern. Zunächst wurde nach Proteinen gesucht, die durch vorliegende pro-inflammatorische Charakteristika eine mögliche Rolle in der Schmerzentstehung bei Endometriose spielen könnten. Dabei wurde der Fokus auf zwei Rezeptoren gelegt, den BR1 und BR2. Grund dafür war deren ihre beeinflussende Rolle in der Einleitung von Hyperalgesien und die verstärkte Rezeptorhäufigkeit beider Rezeptoren in entzündlichem Gewebe (Siedentopf, 2015). Es wurde nachgewiesen, dass Bradykinin über die Bindung an BR2 die Freisetzung von verschiedensten Zytokinen in Gang setzt (Ferreira *et al.*, 1993). Der BR1 wird in gesundem Gewebe auf einer sehr niedrigen Stufe exprimiert und erst im Rahmen von inflammatorischen Prozessen durch Zytokine verstärkt synthetisiert und an der Zelloberfläche exprimiert (Qadri und Bader, 2018). Somit erfolgte die immunhistochemische Analyse dieser beiden Proteine in den endometriotischen Läsionen und in uterinen Gewebeschnitten an einer ausgewählten Kohorte von Patientinnen. Im Anschluss wurde Bradykinin, als inflammatorischer Mediator und wichtigster Ligand von BR2 in endozervikalen Proben untersucht. Ziel dieser Untersuchung war es, Konzentrationsveränderungen oder Schwankungen zu erkennen und mit den Schmerzmodalitäten der Endometriose-Fragebögen zu vergleichen und mögliche Korrelationen zu erheben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Seit der 2009 eingeholten Zustimmung der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität wird eine Datenbank mit Gewebe- und Endozervikalschleimproben von Patientinnen mit Endometriose sowie einer Kontrollgruppe gesammelt und untersucht. Dies wird ermöglicht durch die enge Zusammenarbeit zwischen dem Labor und dem Fachbereich der Gynäkologie des Universitätsklinikums Gießens. Die Patientinnen willigten unter ärztlicher Aufsicht durch die Unterzeichnung eines Aufklärungsbogens für die Probenentnahme ein und waren nach ausführlicher Aufklärung mit der Teilnahme am Forschungsvorhaben einverstanden.

3.1.1 Gewebeproben von Patientinnen

Alle für diese Arbeit verwendeten Gewebeproben wurden in der Fachabteilung der Gynäkologie und Geburtshilfe des UKGM Gießens durch die operative Laparoskopie bei Patientinnen mit dem Verdacht auf Endometriose gewonnen. Bei Vorliegen einer TIE wurden die Patientinnen präoperativ neben den klinischen Untersuchungen einer MRT-Untersuchung als bildgebendes Verfahren auf Grund der hohen Sensitivität von 90% für die Diagnose einer TIE unterzogen. Die Sensitivität variiert in Abhängigkeit zur Lokalisation der TIE und ist am größten bei der Endometriose im Bereich der Vagina und des Ligamentum sacrouterinum (Bazot *et al.*, 2004, 2009). Die intraoperative Zuordnung einer TIE erfolgte mit Hilfe der ENZIAN-Klassifikation (Haas *et al.*, 2011). Nach der Laparoskopie wurde der Großteil des Gewebes an das Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Gießens (Direktor: Prof. Dr. S. Gattenlöhner) weitergeleitet. Dort erfolgten eine detaillierte makroskopische Beschreibung, eine histologische Beurteilung und die Ermittlung von möglichen malignen Prozessen der Gewebepreparate. Teilweise wurde zur Bestätigung einer Endometriose eine Testung mit CD10 durchgeführt. Mittels der Analysen durch die Pathologen konnten die Proben für diese Arbeit selektiv zugeordnet werden. Der Rest des Gewebes wurde an die Arbeitsgruppe von PD. Dr. L. Konrad zu Forschungszwecken weitergeleitet.

Für diese Arbeit wurden in Bouin-Lösung fixierte Gewebeschnitte verwendet. In Formaldehyd fixierte Präparate wurden nicht miteingeschlossen, da diese sich unter dem Einsatz mit primären und sekundären Antikörpern in der immunhistochemischen Färbung oft anders verhalten. Insgesamt besteht die zu untersuchende Kohorte für diese Arbeit aus 122 Gewebeproben und es erfolgt eine Unterteilung in die folgenden 6 Gruppen: Endometrien von Frauen ohne Endometriose, Endometrien von Frauen mit Endometriose sowie der hierzu gehörenden Untergruppe der Frauen mit Endometriose und Adenomyose, der ovariellen Endometriose, peritonealen Endometriose und tief infiltrierenden Endometriose (Tab. 3.1). Zusätzlich wird eine Aufteilung der endometrialen Proben nach der vorliegenden Zyklusphase in eine Proliferations-, Sekretions- oder Ruhephase vorgenommen. Diese Informationen wurden zunächst durch die Bestimmung des Zyklustages mittels Endometriose-Fragebogens erhoben und im Anschluss durch die mikroskopische Beurteilung der Drüsenmorphologie bestätigt.

Die Kohorte zur immunhistochemischen Untersuchung von BR2 weicht von der BR1 Kohorte durch ein fehlendes Präparat in der Gruppe der peritonealen sowie ein fehlendes Präparat in der Gruppe der tief infiltrierenden Endometriose ab (Tab. 3.2).

Tabelle 3.1: Überblick der Kohorte zur immunhistochemischen Analyse von BR1 und BR2

	Endometrium: ohne Endometriose	Endometrium: mit Endometriose	Endometrium: Endometriose, Adenomyose	Ovar	PE	TIE
Patientinnen	n=18	n=36	n=13	n=22	n=18 (17)	n=28 (27)
Alter: Median	43	40	44	33	35	32
Range	28-54	23-53	28-53	25-45	26-40	25-46
Zyklusph. s	8	16	5			
Zyklusph. p	10	16	4			
Zyklusph. r	0	4	4			
Lokalisation Präparate						
Blase					3	0
Lig. sacrouterinum					0	4
Fossa ovarica					3	0
Douglasraum					4 (3)	1 (0)
Peritoneum (Ligamentum infundibulum pelvium)					2	1
Rectum					0	9
Rectosigmoid					0	3
Septum rectovaginale					2	3
Paraureteral					1	1
Colon sigmoideum					1	1
Darm					0	2
Mesovarium					0	1
Lig. latum uteri					1	0
Vagina					0	2
Narbengewebe					1	0

n=18 (17) bedeutet 18 Proben bei BR1 und 17 Proben bei BR2;
TIE=tief infiltrierende Endometriose; Lig. = Ligamentum; s=sekretorisch, p=proliferativ, r=ruhend; AM=Adenomyose;
Zyklusph.=Zyklusphase

Tabelle 3.2: Kohorte der mit BR1 und BR2 zu analysierenden Gewebeschnitte

	BR1	BR2
<i>Uterine Gewebeschnitte</i>	54	54
- <i>Mit Endometriose</i>	36	36
<i>davon AM</i>	13	13
- <i>Ohne Endometriose</i>	18	18
<i>Ovarielle Endometriose</i>	22	22
<i>Peritoneale Endometriose</i>	18	17
<i>Tief inf. Endometriose</i>	28	27

AM=Adenomyose, inf. =infiltrierend

3.1.2 Endozervikale Mucus- und Blutproben

Die in dieser Arbeit verwendeten endozervikalen Mucusproben wurden im Rahmen der gynäkologischen Untersuchungen gesammelt. Ein Wattestäbchen wurde durch den Gynäkologen in die Zervix eingeführt und dort für drei Minuten belassen. Im Anschluss wurde dieses Stäbchen in ein mit PBS und Proteaseinhibitoren gefülltes Röhrchen gelegt. Im Labor wurden die Proben für 10 Minuten bei 10.000 rpm (*rounds per minute*) bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend in Eppendorfgläser aliquotiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20° C mit anschließender Aufnahme in eine Datenbank. Für diese Studie wurde eine Kohorte bestehend aus 102 Mucusproben von verschiedenen Patientinnen analysiert (Tab. 3.3). Unterteilt wurde die Kohorte zunächst in 2 Gruppen, die jeweils aus 51 Probandinnen bestand: Patientinnen mit Pille, Patientinnen ohne Pille. Weitere zu analysierenden Kriterien waren die Dysmenorrhoe, Dyschezie, Dyspareunie, Dysurie (über den NAS-Score), die neuropathischen Schmerzen, der aktuelle Schmerz und das Vorliegen von Endometriose. Die Erhebung dieser Daten erfolgte mit Hilfe eines Fragebogens. Zusätzlich wurde im Rahmen des ELISAs eine Vorbehandlung der Mucusproben mit PIC und PSMF durchgeführt, um eine Hemmung der Proteasen herbeizuführen.

Tabelle 3.3: Überblick der Kohorten zur quantitativen Analyse der Bradykinin-Konzentration mittels Sandwich-ELISA

	Patientinnen mit Pille	Patientinnen ohne Pille	Alle Patientinnen
Endometriose ja	28	28	56
Endometriose nein	23	23	46
Dysmenorrhoe ja	12	42	54
Dysmenorrhoe nein	39	9	48
GESAMT	51	51	102
Alter Median	31	32	30
(Range)	(18 – 49)	(21 – 44)	(18 – 49)

Dysmenorrhoe=Schmerzen während Menses

3.1.3 Fragebogen zur Anamnese der EM-Patientinnen

Seit 2012 erhielten die Probandinnen einen von PD. Dr. L. Konrad modifizierten und erweiterten Endometriose-Fragebogen (siehe Anhang). Dieser erfragt Auskünfte über relevante Vorerkrankungen, Operationen und Leitsymptome der Endometriose wie perimenstruelle Schmerzen, Dyspareunie, Dysurie, Infertilität etc. Die Kohorte des Endometriose-Fragebogens umfasst 102 Probandinnen. Dabei beinhaltet die Gruppe der „Patientinnen mit Pilleneinnahme“ und der „Patientinnen ohne Pilleneinnahme“ jeweils 51 Fragebögen. Die untersuchten Kriterien sind in der Tabelle 3.4 aufgelistet. Grund für die geringere Zahl von nur 98 analysierten Fragebögen in der Gruppe Patientinnen mit/ohne Dyspareunie ist der fehlende Geschlechtsverkehr einiger Frauen. Auf Grund von nicht vorhandenen Angaben liegt die Zahl der Fragebögen in der Gruppe der Patientinnen mit/ohne spezifische Schmerzarten bei 92.

Zusätzlich wird der Einsatz des neuropathischen Schmerzfragebogens für Rückenschmerzen *PainDetect* seit 2016 gepflegt. Entwickelt wurde dieser vom Deutschen Forschungsverbund Neuropathischer Schmerzen (DFNS) in Zusammenarbeit mit dem Unternehmen Pfizer Pharma GmbH. Dieser beinhaltet Fragen zu verschiedenen Schmerzarten, -lokalisationen, -intervallen und -häufigkeiten, die mit unterschiedlichen Punktezahlen versehen sind. Am Ende werden alle Punkte zusammengezählt und ein Gesamt-Score berechnet. Liegt dieser zwischen 0-12 Punkten ist kein neuropathischer Schmerz vorhanden. Zwischen 13 und 18 Punkten ist das Ergebnis unklar und erst ab 19 bis insgesamt 39 Punkte ist das Vorliegen von neuropathischen Schmerzkomponenten

wahrscheinlich (Freynhagen *et al.*, 2006). Da nur die Patientinnen mit Schmerzen diesen Fragebogen ausgefüllt haben, ist die Kohorte etwas kleiner. Für die statistische Analyse besteht diese aus 92 Patientinnen (Tab. 3.4). Bei der Gruppe „Patientinnen mit Pille“ liegen von 45 Probandinnen und bei der Gruppe „Patientinnen ohne Pille“ von 47 Probandinnen Angaben zu den verschiedenen Schmerzarten vor. Diese geben Auskunft über die Wahrscheinlichkeit eines vorliegenden neuropathischen Schmerzes.

Die Daten der Fragebögen werden seither gesammelt und regelmäßig analysiert. Für diese Studie werden insbesondere die Schmerzlokalisationen und die Schmerzarten in Zusammenschau mit der Pille untersucht.

Tabelle 3.4: Kohorte der Patientinnen mit Schmerzfragebogen und *PainDetect*

	Anzahl Probandinnen mit Pille (n)	Anzahl Probandinnen ohne Pille (n)	Gesamt (n)
Endometriose-Fragebogen			
Dysmenorrhoe	12	42	102
Keine Dysmenorrhoe	39	9	
Dyspareunie	27	25	98
Keine Dyspareunie	21	25	
Dyschezie	7	23	102
Keine Dyschezie	44	28	
Dysurie	8	38	102
Keine Dysurie	43	13	
CUB	12	23	102
Kein CUB	39	28	
<i>PainDetect</i>			
Spezif. Schmerzarten	17	40	92
Keine spezif. Schmerzarten	28	7	

CUB=chronische Unterbauchschmerzen, Dysmenorrhoe=Regelschmerzen, spez.=spezifisch, Dyspareunie=Schmerzen während Geschlechtsverkehr, Dyschezie=Schmerzen während Defäkation, Dysurie=Schmerzen während dem Wasser lassen; n= Anzahl der Probandinnen

3.1.4 Chemikalien und Puffer

Bouin-Stammlösung:

Die Stammlösung wird dunkel gelagert und besteht aus 500 mL Pikrinsäure mit 167 mL 37%igem Formaldehyd.

Bouin-Gebrauchslösung:

Für die Gebrauchslösung, welche erst kurz vor Verwendung hergestellt werden sollte, werden 30 mL Stammlösung mit 1,5 mL Essigsäure (100%) gemischt und dunkel gelagert.

Citrat-Puffer:

Stammlösung A (Zitronensäure 0,1 M):

Es werden 21,01 g Zitronensäure mit 1000 mL destilliertem Wasser vermennt.

Stammlösung B (Natriumcitrat 0,1 M):

Es werden 29,41 g Natriumcitrat in 1000 mL destilliertem Wasser vermennt. Dann werden 270 mL destilliertes Wasser mit 25 mL der Stammlösung B aufgefüllt. Anschließend wird unter pH Messung über Elektroden die Stammlösung A hinzugefügt, bis der pH-Wert bei 6,0 liegt.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

In einem Liter destilliertem Wasser werden 4 PBS Tabletten aufgelöst.

Rinderserumalbumin (BSA):

Das BSA-Stampulver wird bei 4° C im Kühlschrank gelagert. Zur Herstellung der Gebrauchslösung wird 1 g BSA in 70 mL destilliertem Wasser aufgelöst. Anschließend werden 22 µL Triton (X 100) dazu pipettiert.

Methanol/Wasserstoffperoxid-Lösung:

5 mL H₂O₂ werden mit 45 mL Methanol gemischt.

DAB-Lösung (Wasserstoffperoxid- Chromogen-3,3' Diaminobenzidin aus dem EnVision+™ System der Firma Dako):

1 ml Substrat Puffer wird mit einem Tropfen Chromogen zu einer Gebrauchslösung vermischt. Dies wird für jeden Versuch frisch angesetzt.

3.1.5 Antikörper zur Immunhistochemie

3.1.5.1 Primärantikörper

In PubMed und im Proteinatlas wurde gezielt nach Proteinen gesucht, welche eine wichtige Rolle in der Verarbeitung von Schmerz spielen, als Schmerzrezeptoren fungieren oder in der komplexen Signalkaskade der Schmerzentstehung mitbeteiligt sind. Immunhistochemisch zeigten 8 getestete Antikörper eine diffuse Färbung mit schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis zwischen Myometrium, Endometrium und endometrialem Stroma. Diese wurden im Rahmen der Vollständigkeit mit aufgelistet (Tab. 3.5). Zwei der getesteten Antikörper, BR1 und BR2 zeigten eine stetige Färbung des uterinen Drüsengewebes und der endometriotischen Läsionen mit einem sehr guten Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Nachdem eine Optimierung der Färbezeit und des Verdünnungsverhältnisses der beiden Antikörper erfolgte, konnte die Kohorte von insgesamt 122 Gewebeschnitten in Serie getestet werden (Tab. 3.6).

Tabelle 3.5: Liste aller getesteten Primärantikörper, welche nicht als Serienuntersuchung an menschlichem Gewebe verwendet wurden

Primär-AK	Sekundär-AK	Firma Verdünnung	Lokalisation
Bradykinin AK	Kaninchen	Biorbyt 1/100	Uterine Drüsen, Gefäße, glatte MZ
CGRP	Maus	Sigma-Aldrich 1/100	Keine Färbung
P2X3	Kaninchen	Abcam 1/400	Uterine Drüsen, Gefäße, glatte MZ
LPAR1	Kaninchen	Abcam 1/100	Uterine Drüsen, Gefäße, glatte MZ
LPAR2	Kaninchen	Sigma-Aldrich 1/50	Uterine Drüsen, Stroma
LPAR3	Kaninchen	Novus biological 1/40	vereinzelt Zellen von Uterinen Drüsen

MZ= glatte Muskelzellen, CGRP= Calcitonin Gene-related Peptide, P2X3= P2X Purinrezeptor Typ 3, LPAR1= Lysophosphatidsäure-Rezeptor Typ 1, LPAR2= Lysophosphatidsäure-Rezeptor Typ 2, LPAR3 = Lysophosphatidsäure-Rezeptor Typ 3

Tabelle 3.6: Immunhistochemische Analyse der Kohorte mit den beiden Primärantikörpern BR1 und BR2

Primär-AK	Spezies	Firma	Verdünnung	Färbezeit	Klonalität	Lokalisation
BDKRB1 (BR1)	Kaninchen	Biorbyt	1/300	50 Sekunden	polyklonal	Apikale und basale Drüsen, glatte MZ, Gefäßendothel
BDKRB2 (BR2)	Kaninchen	Biorbyt	1/300	50 Sekunden	polyklonal	Apikale und basale Drüsen, glatte MZ, Gefäßendothel

MZ= Muskelzellen, BDKRB1=BR1=Bradykinin-Rezeptor Typ 1, BDKRB2=BR2= Bradykinin-Rezeptor Typ 2

3.1.5.2 Sekundärantikörper für das DAKO Envision System

Es wurden Sekundärantikörper der Firma DAKO eingesetzt. Das sogenannte EnVision+ System - HRP labelled Polymer von DAKO diente zum Nachweis der Rezeptorexpression in den verschiedenen Gewebetypen (Tab. 3.7).

Tabelle 3.7: Liste der Sekundärantikörper

Sekundär-AK	Firma	Verdünnung	Färbezeit	Klonalität
Anti-Kaninchen	Biorbyt	vorgefertigt	En-Vision System HRP	IgG
Anti-Maus	Sigma Aldrich	vorgefertigt	En-Vision System HRP	IgG

3.1.6 ELISA-Kit

Zur quantitativen Messung des Bradykinins im Mucus *in vivo* wurde der kompetitive Bradykinin ELISA Kit (Enzym-linked Immunosorbent Assay) der Firma Abcam verwendet (ab136936). Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (s.S. 45).

3.1.7 Geräte und Substanzen

Tabelle 3.8: Auflistung aller Chemikalien und Verbrauchsmaterial im Rahmen dieser Studie

Material	Firma
Ethanol	Otto Fischar GmbH
NeoClear	Merck Millipore, Darmstadt
Hämatoxylin	Waldeck/ Morphisto
Xylol	Roth
Pikrinsäure	Fluka (80456)
Methanol	Sigma-Aldrich, USA
Triton	Merk
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe
BSA	Roth, Karlsruhe
PBS-Tabletten	GIBCO Life technologies
DAB-Substratpuffer	EnVision+™ System der Firma DAKO
DAB Chromogen	EnVision+™ System der Firma DAKO
Eukitt	Sigma Aldrich, USA
Antibody Diluent	DAKO
ASMA Antibody	DAKO
Rabbit Antibody	DAKO
Mouse Antibody	DAKO
DAKO-Pen (Grün)	DAKO
Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe
Glasküvetten	Roth, Karlsruhe
Färbekammer	Roth, Karlsruhe
Behälter, Gestelle	Roth, Karlsruhe
Pipetten (Research Plus), Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Finntips Flex 1200	ThermoScientific, Waltham, USA
Deckgläser (20x26, 22x22)	R. Langenbrick, Emmendingen
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrick, Emmendingen
Multipipette Finnpiette	ThermoScientific, Waltham, USA

Aqua dest. Anlage: Elix 3	Merck Millipore, Darmstadt
Mucus-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Transferpipette-8, 30-300	Brand, Wertheim
PIC (=Protease Inhibitor Cocktail)	Sigma-Aldrich, USA
PMSF Protease Inhibitor	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

PSMF= Protease Inhibitor, PIC= Protease Inhibitor Cocktail, ASMA= Antikörper gegen glatte Muskelzellen, DAB= Wasserstoffperoxid- Chromogen-3,3' Diaminobenzidin, PBS= „Phosphate buffered saline“, BSA= „Bovine Serum Albumin“, dest.= destilliert

Tabelle 3.9: Auflistung aller Geräte und Computerprogramme im Rahmen dieser Studie

Gerät/Programm	Firma
Waage 1219 MP	Sartorius, Göttingen
Mikroskop: Dialux 20	Leica, Wetzlar
Mischer/Hitzer: RH digital KT/ C ⁰	IKA, Staufen im Breisgau
Paraffin-Einbettungsautomat TP1050	Leica, Wetzlar
Eis Maschine Flake line	Wessamat, Kaiserlautern
Vortexer	Heidolph, Schwabach
Gourmetgarer (MultiGourmet PlusFS20R)	Braun, Kronberg im Taunus
Inkubator Kendro UT12	Heraeus, Hanau
Inkubator Hera Therm	ThermoScientific, Waltham, USA
Fotomikroskop DM2000 LED	Leica, Wetzlar
Rotationsmikrotom	Leica, Wetzlar
Kamera MC 170 HD	Leica, Wetzlar
Leica Application Suite LAS Version 4.9.0.	Leica, Wetzlar
pH-Meter CG 841 „SevenEasy“	Schott, Mainz
Lichtmikroskop Leitz Laborlux S	Leica, Wetzlar
Magnetrührer	Roth, Karlsruhe
Mikroskop Laborlux S	Leitz, Wetzlar
Mini-Zentrifuge: Sprout	Heathrow Scientific, Vemon Hills, USA
Schüttler: VIBRAX-VXR	IKA, Staufen im Breisgau
Timer	TFA Dostmann, Wertheim

Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotanta/RPC	Hettich, Tuttlingen
Tecan infinite M200 ELISA plate reader	TECAN, Crailsheim
Softwareprogramme	Adobe Photoshop CS2, Graph Pad PRISM 9 & 8, Microsoft Word, Microsoft PowerPoint, Microsoft Excel

3.1.8 Analytische Vorgehensweise

Zur Lokalisation der getesteten Antikörper in den Gewebeschnitten wurde eine lichtmikroskopische Beurteilung herangezogen. Es wurden die Färbungsintensitäten und Proteinlokalisationen von ektopen und eutopen, endometriotischen Epithelzellen in Zusammenschau mit dem umliegenden zytogenen Stroma analysiert. Zusätzlich erfolgte die Beurteilung der glatten Muskelzellen und der Gefäße des Myometriums bzw. des umliegenden Gewebes. Alle eutopen, uterinen Drüsen und ektopen Endometrioseherde wurden anschließend mit dem Fotomikroskop FSX100 dokumentiert. Die Drüsen wurden gezählt und erhielten je nach Farbintensität einen H-Score. Im Anschluss konnte der durchschnittliche H-Score für jeden Gewebeschnitt erhoben und in die Statistik aufgenommen werden.

3.2 Methoden

3.2.1 Paraffinschnitte

Das Gewebe zur Herstellung der Paraffinschnitte wurde noch im Operationssaal in Bouin'sche Lösung gelegt und für 48 Stunden auf einem Rollmischer unter dauerhaftem Schwenken fixiert. Danach erhielten diese mindestens 3 Tage eine Reinigung mit 70%igem Alkohol. Das Gewebe wurde in einem Paraffinautomaten der Firma Leica eingebettet (Tab. 3.10) und im Anschluss erfolgte die Lagerung der Schnitte für mindestens 24 Stunden im Kühlschrank bei 4° C.

Tabelle 3.10.: Protokoll für Paraffinschnitte mit dem Einbettungsgerät Leica TP1050

Arbeitsvorgang	Material	Dauer	Häufigkeit	Temperatur
1. Entwässerung	80% Ethanol	2 Stunden	1x	RT
	96% Ethanol	2 Stunden	1x	RT
	100% Ethanol	3 Stunden	3x	RT
2. Klären	Xylol	1 Stunde	1x	RT
	Xylol	45 Minuten	2x	RT
3. Einbettung	Paraffin	40 Minuten	3x	59° C

RT=Raumtemperatur

Aus den Paraffinblöcken wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms 5 µm dicke Schnitte abgelöst. Diese gelangten direkt im Anschluss in ein warmes Wasserbad (45° C) und wurden unter Mitwirkung der Adhäsionskraft auf die Objektträger „Super Frost Plus“ gezogen. Über Nacht wurden die Objektträger zur Lagerung für 24 Stunden in einen auf 37° C vorgewärmten Inkubator gegeben. Im Anschluss konnten sie bis zur Analyse in Aufbewahrungskisten einsortiert und in die Datenbank aufgenommen werden. Zusätzlich erstellte man Serienschnitte von Proben, die zur Analyse von eutopen, endometriotischen Epithelzellen beziehungsweise endometriotischen Läsionen in Frage kamen. Im Anschluss erfolgte die Färbung dieser Präparate mit HE und gegebenenfalls mit Mucin 1 zum Nachweis von endometrialen Epithelzellen (Gronbach, 2015).

3.2.2 Immunhistochemie

3.2.2.1 Grundlage der Methode

Die immunhistochemische Methode (IHC) dient zur Detektion von Proteinepitopen in unterschiedlichen Gewebetypen. Sie basiert auf der Eigenschaft von Antikörpern (AK) selektiv und hochaffin an Epitopstrukturen zu binden. Man unterscheidet mono- bzw. polyklonale Primärantikörper von Sekundärantikörpern. Monoklonale Antikörper binden nur an ein spezifisches Epitop, während polyklonale AK an mehrere Epitope eines Antigens binden können. Zweit genanntes ermöglicht in der Regel wegen unspezifischen Bindungen ein intensiveres Farbsignal, jedoch besteht die Gefahr für eine verstärkte Hintergrundfärbung.

Damit eine erfolgreiche und aussagekräftige immunhistochemische Färbung stattfinden kann, durchlaufen die Gewebeschnitte komplexe Abläufe von chemischen Reaktionen, die stets identisch ablaufen. Das Fixieren des Gewebes in Bouin'sche Lösung führt zu einer Veränderung der Epitopstruktur und mindert die Antigenerkennung. Im Rahmen einer milden Proteolyse wird dies zum größten Teil wieder reversibel gemacht (=Epitop-Demaskierung). Ermöglicht wird die Demaskierung durch das Sieden im Citratpuffer, was auch als *Heat Induced Epitope Retrieval* (=HIER) bezeichnet wird. Danach sind die Epitope der Zelloberfläche nahezu vollständig freigelegt und zugänglich für den Primärantikörper. Im nächsten Schritt erfolgt die gezielte Hemmung der endogenen Peroxidase-Aktivität der Zellen, die zu einer Reduktion unspezifischer Proteinreaktionen führt. Dazu werden die Proben mit einem Gemisch bestehend aus Methanol und H_2O_2 behandelt, wodurch lediglich die ergänzte Peroxidase zu einer Farbreaktion führt. Potenzielle intermolekulare Kräfte, die ebenfalls zu unspezifischen Antikörperbindungen und zu ungewollten Hintergrundfärbungen führen können, werden in der Behandlung mit einem BSA-Puffer blockiert.

Im Anschluss an die oben genannten Vorbehandlungen der histologischen Präparate wird die indirekte IHC-Methode angewandt. Im ersten Schritt dieser zweistufigen IHC-Methode erfolgt die Detektion des Epitops im Gewebe mit Hilfe des Primärantikörpers, der sich spezifisch an das dazugehörige Epitop bindet. Es bildet sich ein „Antigen-Primärantikörper-Komplex“. Im nächsten Schritt wird ein Sekundärantikörper verwendet, der an ein PEG-Gerüst mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist und

sich an den Primär-AK heftet (Abb. 3.1). Das Hinzufügen von Wasserstoffperoxid - Chromogen-3,3' Diaminobenzidin (DAB) führt zu einer Reaktion mit dem HRP-Enzym, wodurch die visuelle Markierung des Antigens (Epitops) ausgelöst wird. Die hohe Zahl an gekoppelten Peroxidasen ermöglicht die Verstärkung der braunen Farbreaktion. Diese auf einer Polymerkette basierende Methode zeigt eine höhere Sensitivität als andere IHC-Verfahren, wie die auf LSAB oder Biotin basierten Methoden. Dies kann durch die bessere Qualität der Signal- und Hintergrundverhältnisse bei den Polymerketten basierenden Methoden begründet werden. Im letzten Schritt führt die Gegenfärbung mit Hämatoxylin zu einer Blaufärbung und dient zur Kontrastierung. So wird ein guter Überblick des Präparates gewährleistet.

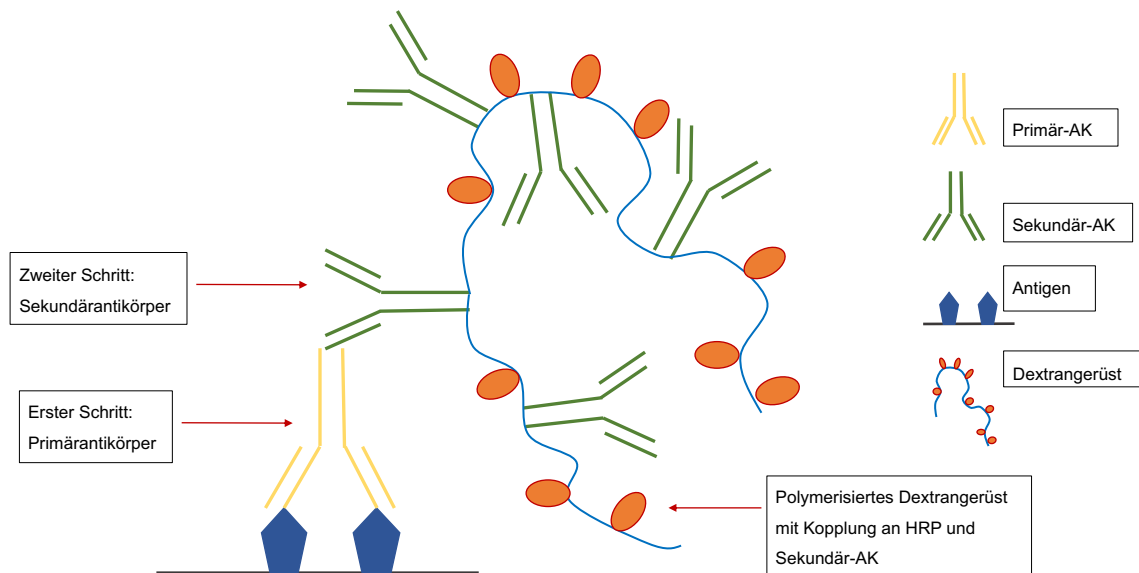


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der polymerbasierten und zweistufigen IHC-Methode.

3.2.2.2 Protokoll der immunhistochemischen Methode

In dieser Arbeit werden die immunhistochemischen Nachweise nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt. Wichtig ist die Mitbeurteilung einer Negativkontrolle bei jedem Durchgang (Abb. 3.2). Dabei weicht lediglich ein Arbeitsschritt vom Standardprotokoll ab. Es wird kein Primärantikörper auf die Gewebeschnitte gegeben und so bleibt die Bindungsreaktion zwischen Sekundärantikörper und Antigen aus. Folglich kommt es zu keiner Braunfärbung und der Ausschluss von falsch-positiven Reaktionen ist gewährleistet.

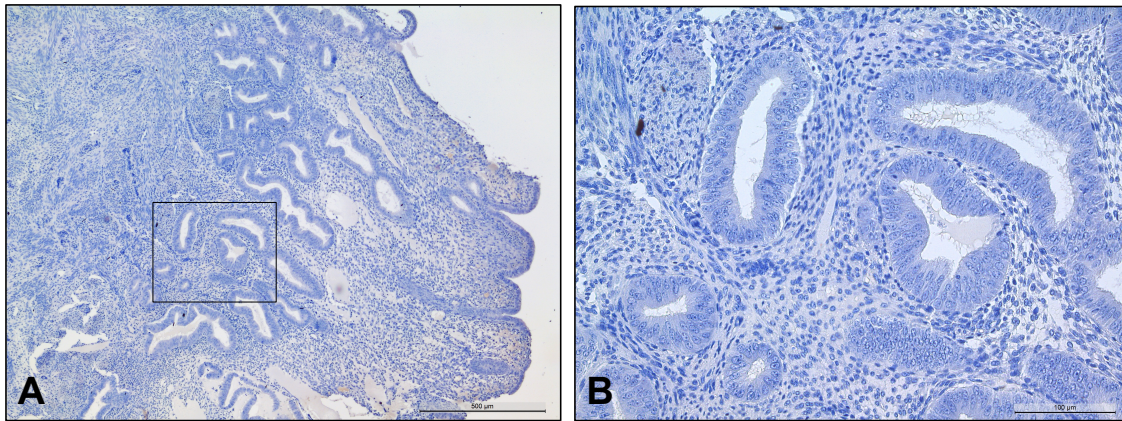


Abbildung 3.2: Endometrium einer Patientin mit Endometriose in der sekretorischen Zyklusphase. Beispielhafte Negativkontrolle (Standardprotokoll, jedoch ohne Verwendung eines Primärantikörpers). Es liegt keine Braunfärbung vor und die Gewebestrukturen sind durch das Hämatoxylin bläulich gefärbt. (A) 200-fache, (B) 400-fache Vergrößerung

Zunächst wurde mit der Vorbehandlung der Gewebeschnitte gestartet und es erfolgte eine Entparaffinierung mit NeoClear und eine Rehydrierung mit Ethanol (Tab. 3.11).

Tabelle 3.11: Protokoll zur Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte

<i>Substanz</i>	<i>Anzahl</i>	<i>Dauer</i> <i>Min.</i>	<i>in Temperatur</i>	<i>Arbeitsschritt</i>
NeoClear	1	20	Inkubator 40°C	Entparaffinieren
NeoClear	2	20	RT	Entparaffinieren
Ethanol 100%	2	5	RT	Rehydrierung
Ethanol 95%	2	5	RT	Rehydrierung
Ethanol 70%	2	5	RT	Rehydrierung
destilliertes H ₂ O	1	5	RT	Waschen

RT=Raumtemperatur, H₂O= Wasser

Ein Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6 wurde bereits während der Rehydrierung im Gourmet Garer für 10 Minuten auf 100° C erhitzt. Die Schnitte wurden nach dem Waschen in PBS-Puffer für 20 Minuten im Citratpuffer gekocht. Zur Abkühlung wurden die Objektträger zusammen mit dem Puffer aus dem Dampfgerar herausgenommen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden drei Waschgänge für jeweils 5 Minuten mit PBS-Puffer unter dauerhaftem Schütteln durchgeführt. Die

Blockade der endogenen Peroxidase konnte mit einem angefertigten Gemisch aus eiskaltem Methanol und 3%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) erzielt werden. Darin wurden die abgedeckten Proben für 30 Minuten geschüttelt. Nach dem Abgießen des Gemisches unter dem Abzug wurden die Proben erneut dreimal für 5 Min mit PBS-Puffer gespült. Nun vollzog man das 20-minütige Schütteln im Rinderserumalbumin-Puffer (1,5%iger BSA-Puffer) zur Blockade von unspezifischen Bindungsstellen. Danach wurden die auf dem Objektträger befindlichen Gewebeschnitte mit dem DAKO Pen umrandet und der Primärantikörper darauf pipettiert. Schließlich erfolgte die Inkubation der Objektträger in einer „Feuchtkammer“ über Nacht bei 4° C.

Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper von den Schnitten abgekippt und dreimal mit PBS-Puffer für je 5 Min. gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper auf die Schnitte pipettiert und diese wurden in der geschlossenen „Feuchtkammer“ für 30 Minuten bei RT inkubiert. Dann erfolgten drei Waschgänge für 5 Minuten mit PBS unter Schütteln. Während des letzten Waschganges konnte das DAB bestehend aus 1 mL Substratpuffer und 1 Tropfen Wasserstoffperoxid- Chromogen-3,3' Diaminobenzidin unter dem Abzug hergestellt werden. Die Gewebeschnitte wurden unter dem Abzug aus der Küvette entnommen und in DAB-Lösung auf die Schnitte gegeben. Mit dem ersten Tropfen wurde die Zeit gestoppt. Bei erstmaliger Testung des Antikörpers wurde unter lichtmikroskopischer Beobachtung die Zeit bis zum Farbumschlag gestoppt und notiert. Die optimale Färbezeit wurde für jeden Antikörper einmalig definiert und für jedes weitere Präparat eingehalten, um so eine objektive Vergleichbarkeit zu schaffen.

Zum Stoppen der Reaktion wurde das DAB abgekippt und die Proben in eine Küvette mit destilliertem Wasser gestellt. Die Gewebeschnitte wurden dann 4-mal für je 5 Minuten mit destilliertem Wasser auf dem Schüttler gewaschen. Danach erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 5 Minuten in der „Feuchtkammer“ bei RT. Die Schnitte wurden daraufhin mit destilliertem Wasser abgespült und unter fließendem Leitungswasser fand das „Bläuen“ statt. Im vorletzten Schritt wurden die Objektträger unter dem Abzug in aufsteigender Alkoholreihe entparaffiniert und mit Xylol dehydriert (Tab. 3.12). Zuletzt wurde das Gewebe mit einem Tropfen Eukitt und anschließend mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach etwa zwei Stunden waren die Proben getrocknet und die immunhistochemische Färbung war abgeschlossen.

Tabelle 3.12: Protokoll der umgekehrten Entparaffinierung, Dehydrierung und Eindeckung der Gewebeschnitte

Substanz	Anzahl	Dauer in Min.	Temperatur	Arbeitsschritt
Ethanol 70%	2	2	RT	Entparaffinieren
Ethanol 96%	2	2	RT	Entparaffinieren
Ethanol 100%	2	2	RT	Entparaffinieren
Xylol	2	2	RT	Dehydrierung
Eukitt	1	-	RT	Eindecken

RT=Raumtemperatur, Min.=Minuten

3.2.2.3 Auswertung und Dokumentation

Der H-Score dient zur quantitativen Datenerhebung in der Immunhistochemie und stellt eine Anlehnung an den immunreaktiven Score (IRS) dar. Für jeden Gewebeschnitt wurde der H-Score ermittelt. Dabei wurde für jedes Präparat die Farbintensität aller Drüsen definiert und analysiert. Die Farbintensität der Drüsen wurde in 4 Stufen unterteilt (Tab. 3.13). Der Anteil des angefärbten Gewebes (in 5% Schritten) wurde mit dem korrespondierenden Färbegrad zwischen 0-3 multipliziert. Daraus resultiert der H-Score mit Werten zwischen 0 bis 300 (Pirker *et al.*, 2012), der sich mit folgender Formel errechnet:

$$\text{H-Score} = (0 \times \text{Zellen in \%}_{\text{nicht}}) + (1 \times \text{Zellen in \%}_{\text{schwach}}) + (2 \times \text{Zellen in \%}_{\text{moderat}}) + 3 \times (\text{Zellen in \%}_{\text{stark}})$$

Tabelle 3.13: Einteilung der Farbintensität mit Hilfe des H-Scores

Intensität	Skala
Nicht gefärbt (negativ)	0
Schwach gefärbt	1
Moderat gefärbt	2
Stark gefärbt	3

3.2.3 ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay)

3.2.3.1 Grundlagen der Methode

Der ELISA steht für die Abkürzung *Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay*. Dabei handelt es sich um ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Im Rahmen dieser Methode werden spezifische Antikörperbindungen und die darauffolgenden Interaktionen mit dem nachzuweisenden Stoff (=Antigen) eingesetzt. Es gibt 3 verschiedene ELISA Methoden: den direkten, den indirekten und den kompetitiven ELISA. Für diese Arbeit wurde ein indirekter Sandwich-ELISA angewandt. Die Methode des indirekten ELISAs basiert auf der Bindung eines Primärantikörpers an das Antigen mit anschließender Bindung eines Sekundärantikörpers an den Primärantikörper. Vorteil dieses Verfahrens ist die signalverstärkende Wirkung. Beim direkten ELISA muss zur Erkennung der Antigene, jedes an einen Antikörper gebunden werden. Folglich ist die Gefahr für eine geringe Farbstärke sehr hoch.

Eine Kreuzreaktivität in dem in dieser Studie verwendeten ELISA-Kits des Herstellers Abcam (ab136936) bestand zu 100% zu Lys-Bradykinin, zu < 1% zu Les-Des-Arg9-Bradykinin und zu <0,1% zu BK1-5 als stabile Abbauprodukte. Die Sensitivität, also die geringste Dosis an Bradykinin, die detektiert werden kann, lag bei 24,9 pg/mL.

Die vom Hersteller Abcam mitgelieferte Mikrotiter-Platte war bereits mit einem Beschichtungsantikörper (*Capture Antibody*) belegt. In die *Wells* der Platte wurde das zu untersuchende Material pipettiert und es bildete sich ein Komplex aus Beschichtungsantikörper und Antigen (Abb. 3.3). Die anschließende Ergänzung des mit Biotin konjugierten Primärantikörpers gewährleistet die Detektion des Antigens. Beschichtungsantikörper und Primärantikörper binden an unterschiedliche Epitopstrukturen dieses Antigens, was die Bildung eines Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich) initiierte. Das Enzym Biotin war bereits an den Primärantikörper gebunden und reagierte mit dem ergänzten HRP konjugierten Streptavidin. Das Hinzugeben eines farblosen Substrats (TMB-Substrat) ermöglichte nun eine durch Streptavidin-HRP katalysierte Farbreaktion. Es wurde eine Stopplösung aus Schwefelsäure dazugegeben, die wiederum eine Unterbrechung der Farbreaktion auslöste. Der Farbumschlag wurde dann mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen und

quantifiziert. Die Menge eines Proteins stand in Korrelation zum Ausmaß des Farbumschlags einer Probe.

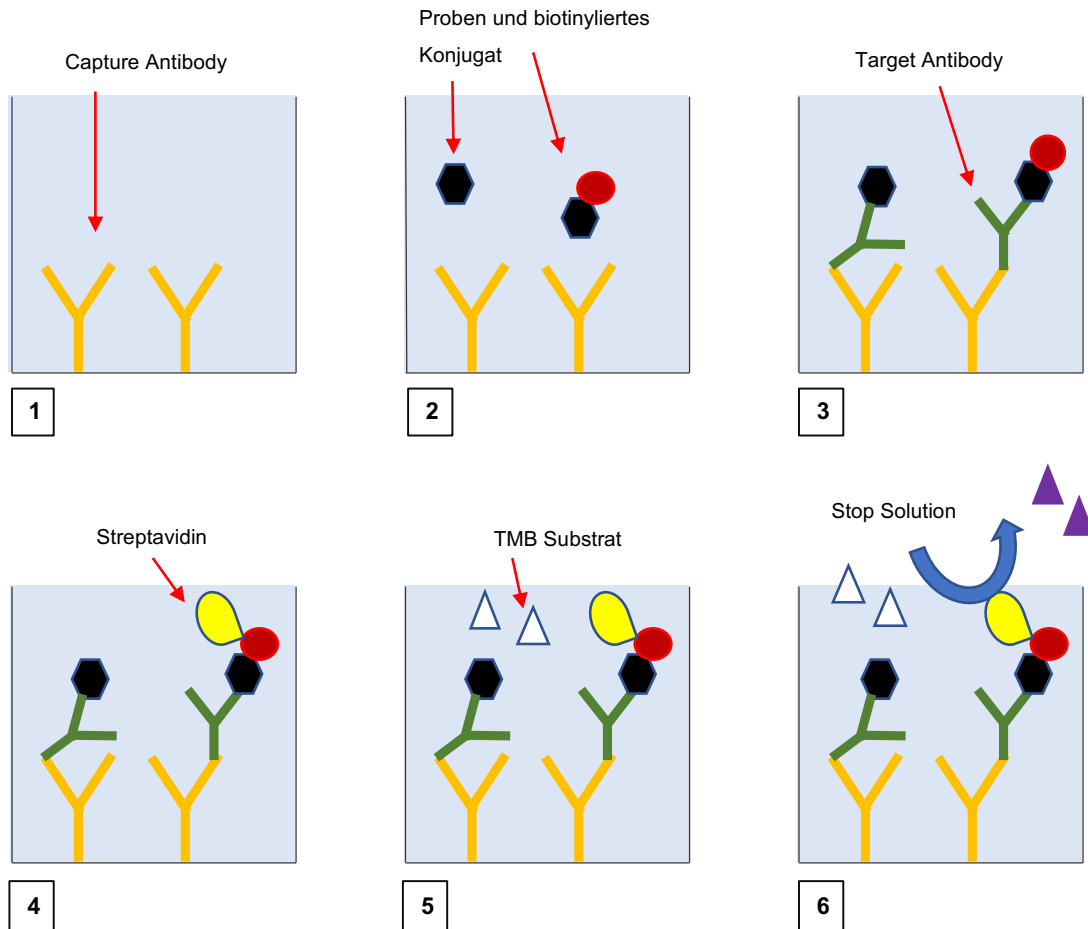


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Reaktionen im Rahmen eines Sandwich-ELISAs (in Anlehnung an die schematische Darstellung des Protokolls der Firma Abcam)

1. Vorpräparierte Wells mit „Capture Antibody“
2. Hinzufügen der Proben und des biotinylierten Konjugats
3. Ergänzung des „Target Antibody“
4. Das mit HRP konjugierte Streptavidin wird in vorgesehene Wells pipettiert
5. Farbloses TMB Substrat wird in jedes Well pipettiert
6. Beendigung der Farbreaktion durch „Stop Solution“

3.2.3.2 Protokoll zur Bradykinin-Bestimmung

Die quantitative Bestimmung des humanen Bradykinins in den endozervikalen Proben wurde mit dem ELISA-Kit des Herstellers Abcam (ab136936) erhoben.

Zunächst erfolgte die Präparation der benötigten Reagenzien nach Herstellerprotokoll. Das Konzentrat des bereitgestellten *Wash Buffers* wurde vor Verwendung mit

destilliertem Wasser 20-fach verdünnt. Aus dem Streptavidin-HRP wurde durch das Hinzufügen von 250 µl destilliertem Wasser in ein *Vial* der Grundstock hergestellt. Aus diesem Grundstock erfolgte die Herstellung der Arbeitslösung durch die 1000-fache Verdünnung mit dem *Wash Buffer*. Danach wurde der tiefgefrorene Standard zentrifugiert und mit 1 mL des bereitgestellten *Assay Buffer* konstituiert. Nun konnte eine doppelte Verdünnungsreihe unter Verwendung des *Assay Buffers* hergestellt werden. Der *Assay Buffer* wurde erst mit PIC und PSMF jeweils 1000-fach verdünnt, um anschließend alle Proben mit dem *Assay Buffer* jeweils 5-fach zu verdünnen. Die bereitgestellte ELISA Platte beinhaltet insgesamt 96 Vertiefungen. Diese lieferte der Hersteller gebrauchsfertig und mit dem *Capture Antibody* beschichtet mit. Somit konnte die Platte nach Entfernung der Abdeckung sofort verwendet werden. Das vom Hersteller empfohlene Plattenlayout wurde übernommen (siehe Originalprotokoll).

Nachdem alle Reagenzien und Proben vorbereitet und auf Raumtemperatur gebracht wurden, konnte der *Assay* beginnen. Anfangs wurden 150 µL des *Assay Buffer* in die gekennzeichnete Vertiefungen NSB pipettiert. Danach kamen 100 µL *Assay Buffer* in das *B₀ Well*. Jeweils 100 µL der vorbereiteten Standards #1 - #6 wurden dann unter Berücksichtigung des Layouts in die entsprechenden *Wells* pipettiert. Nun wurden 50 µL Bradykinin Konjugat in die NSB, *B₀*, Standard und Sample *Wells* pipettiert. Im Anschluss wurde die Platte für zwei Stunden auf einem Plattenschüttler mit 500 rpm bei Raumtemperatur inkubiert. Danach konnten die Flüssigkeiten der Platte abgekippt und auf saubere Papiertücher abgeklopft werden. Nun wurde die Platte mit 400 µL *Wash Buffer* unter zu Hilfenahme einer Multikanal-Pipette gewaschen. Dieser Waschvorgang erfolgte insgesamt 4-mal. Wichtig war, dass nach dem letzten Waschvorgang die *Wells* vollständig frei von *Wash Buffer* waren, um eine nachfolgende Verdünnung der zugeführten Substanzen zu verhindern. Als nächstes konnten je 200 µL Streptavidin-HRP Arbeitslösung (1X) in die NSB, *B₀*, Standard und Proben *Wells* pipettiert werden. Anschließend wurde die ELISA Platte für 30 Min. auf dem Schüttler mit 500 rpm bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden erneut die 4 Waschgänge, wie bereits oben beschrieben, durchgeführt. Hiernach erfolgte das Pipettieren von 200 µL bereitgestelltem TMB-Substrat in alle Vertiefungen mit anschließender Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur. Nachdem die Farbreaktion im letzten Schritt mit 50 µL der *Stop Solution* beendet wurde, erfolgte die Datenanalyse im Standard Microplate Reader (Tecan-I-Control) bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm. Um eine

Bestimmung der Proteinkonzentration zu erzielen, wurden die bekannten Standards mit den Messwerten korreliert.

3.3 Statistische Auswertung

In dieser Studie wurden alle Werte als Mittelwerte angegeben bzw. als Mediane +/- Standardfehler (SEM). Bei den immunhistochemischen Auswertungen wurde zunächst eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt und im Anschluss erfolgte beim Vergleich von zwei Gruppen die Auswertung mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney Test und bei dem Vergleich von mehr als zwei Gruppen der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test. Für den ELISA wurde eine Roc-Kurve erstellt, die als Hilfestellung zur Bestimmung des Grenzwertes (=Cut-Off) diente. Im Anschluss wurde ein 4-Feldertest durchgeführt, zur Ermittlung von Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert sowie die Likelihood-Ratio. Dies ermöglicht eine Einordnung der diagnostischen Wertigkeit für das Bradykinin in den endozervikalen Mucusproben. Für alle statistischen Auswertungen wurden p-Werte von $\leq 0,05$ als signifikant festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistochemie:

4.1.1 Auswahl und Testung von Markern mit bekannter Schmerzmodulation

In der vorgestellten Arbeit werden zunächst Rezeptoren mit Hilfe von PubMed und dem Proteinatlas (www.proteinatlas.com) ausgewählt, welche eine wichtige Rolle in der Verarbeitung und Weiterleitung von Schmerzen in entzündlichem Gewebe darstellen und deren Expression bereits im uterinen Gewebe nachgewiesen wurde. Ziel ist es, Abweichungen des Färbemusters oder der Farbintensität zwischen dem physiologischen, uterinen Drüsengewebe und den pathologischen ektopen Endometriose-Herden zu erkennen. Unterschiede im Expressionsmuster der Rezeptoren zwischen gesundem und krankem Gewebe könnten eine mögliche Beteiligung in der multimodalen Schmerzentstehung bei Patientinnen mit Endometriose zeigen und so zu einem besseren Verständnis der Schmerzpathogenese verhelfen (Marceau und Regoli, 2004). In dieser Arbeit werden zwei Proteine tiefergehend immunhistochemisch analysiert und statistisch ausgewertet. Die anderen Proteine werden nicht näher ausgewertet, da diese in Bezug auf die Färbung ein deutlich schlechteres Hintergrund-Signal-Verhältnis aufweisen.

Das Protein CGRP kann im uterinen Drüsengewebe und im stromalem, endometrialem Gewebe nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.1). Auch das Myometrium mit all seinen Strukturen weist keine Positivität der Zellen auf. CGRP wird somit in keiner Gewebestruktur des menschlichen Uterus exprimiert und wurde nicht weiter analysiert.

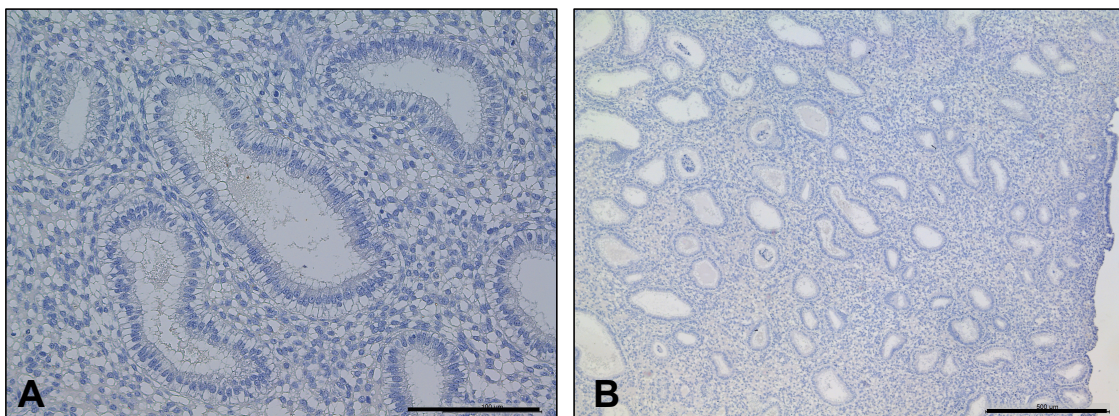


Abbildung 4.1: Immunhistochemische Färbung mit CGRP ohne Nachweis einer Proteinlokalisierung in den uterinen Gewebeschnitten einer Patientin mit Endometriose und vorliegender Adenomyose in

der sekretorischen Zyklusphase. Sowohl im Endometrium als auch im Myometrium sind keine Zellen gefärbt. (A) 100 µm und (B) 500 µm.

LPAR1 wurde ebenfalls untersucht. Es ist in den uterinen Gewebedrüsen und teilweise im stromalem, endometrialem Gewebe lokalisiert (Abb. 4.2). Zudem sind glatte Muskelzellen sowie die Gefäße gefärbt. Die Proteinlokalisierung ist jedoch nicht konstant vorhanden und befindet sich nur stellenweise im endometrialen Stroma bei stark variierender Intensität mit schwacher bis sehr starker zytoplasmatischer Färbung. Das Protein befindet sich zudem diffus zytoplasmatisch in den endometrialen Drüsenzellen und variiert ebenfalls in der Farbintensität. Zusammenfassend ist der Hintergrund unspezifisch mit gefärbt und nicht klar abgrenzbar von den Drüsenzellen. Darüber hinaus ist LPAR1 in Gefäßendothelien und glatten Muskelzellen nachweisbar.

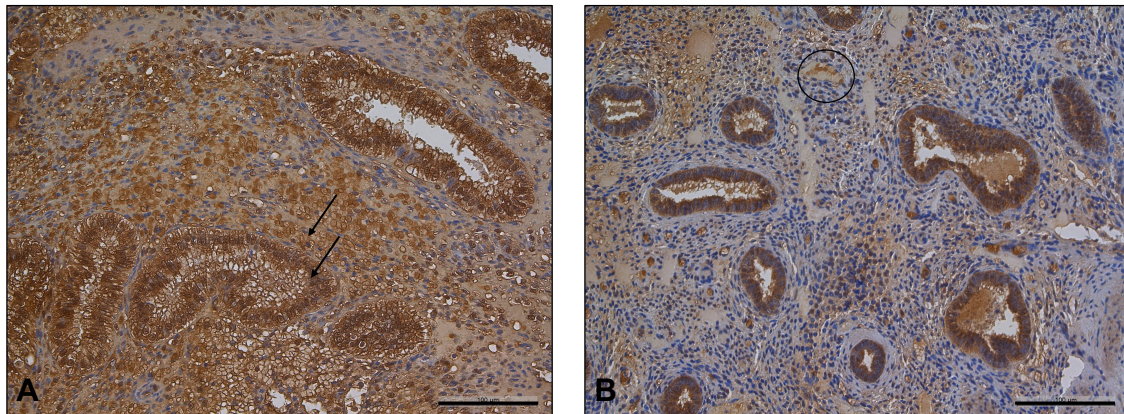


Abbildung 4.2: Immunhistochemischer Nachweis von LPAR1 im uterinen Drüsengewebe einer Patientin ohne Endometriose in der sekretorischen Zyklusphase (A) und einer Patientin mit Endometriose in der proliferativen Zyklusphase (B). Es zeigt sich eine diffuse Färbung des Endometriums meist ohne klare Abgrenzung zwischen den Drüsenzellen und dem stromalen Endometrium (Pfeile). Die Farbintensität der Drüsenzellen variiert sehr stark und die Lokalisation befindet sich meist diffus zytoplasmatisch. Zudem kann das Protein in Gefäßen und glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (Kreis). (A) und (B) 100 µm.

Die immunhistochemische Methode zum Nachweis von LPAR2 zeigt, dass dieses Protein nur sehr schwach zytoplasmatisch in den Drüsenzellen nachzuweisen ist (Abb. 4.3). Zudem ist die Differenzierung zum Hintergrund deutlich erschwert, da dieser stellenweise ebenfalls einer leichten Positivität unterliegt. Folglich wurde auf eine weiterführende Analyse verzichtet.

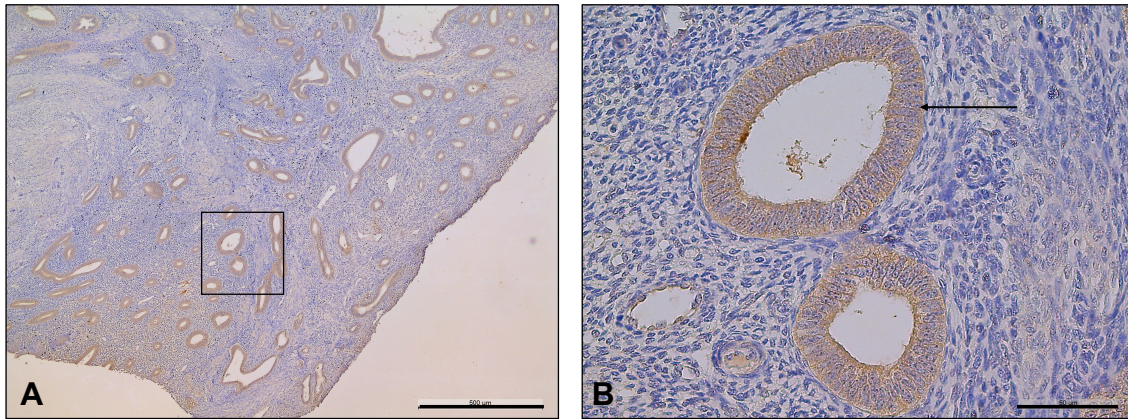


Abbildung 4.3: Immunhistochemischer Nachweis von LPAR2 eines uterinen Gewebeschnitt einer Patientin ohne Endometriose in der proliferatorischen Zyklusphase (A, B). Die Proteinlokalisierung befindet sich zyttoplasmatisch im endometrialen Drüsengewebe als auch vereinzelt im endometrialen Stroma. Die Positivität ist sehr schwach. (A) 500 µm und (B) 50 µm.

Die Proteinlokalisierung von LPAR3 zeigt sich vereinzelt in wenigen endometrialen Drüsenzellen (Abb. 4.4). Dabei liegt eine starke Farbtintensität vor und die Zellen sind intrazellulär unter Aussparung des Zellkerns gefärbt. Diese Färbung beschränkt sich auf vereinzelte Zellen einer Drüse und größtenteils sind die endometrialen Drüsenzellen ohne jegliche Positivität. Zur weiteren Verifizierung dieses Proteins untersuchten wir einige endometriale Läsionen. In diesem Gewebe wurde LPAR3 nicht exprimiert.

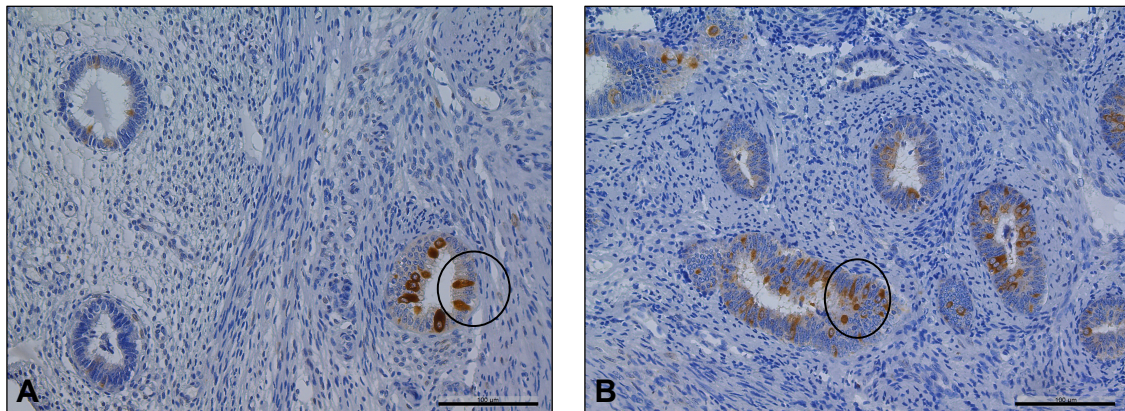


Abbildung 4.4: Immunhistochemischer Nachweis von LPAR3 in zwei verschiedenen uterinen Gewebeschnitten bei vorliegender Endometriose (A, B). Innerhalb einiger Drüsen ist der Nachweis von LPAR3 in vereinzelten Zellen mit intensiver Färbung zu erheben (Kreis). Die Färbung befindet sich zyttoplasmatisch mit stärkster Ausprägung im perinukleären Bereich. Der größte Teil der endometrialen Drüsenzellen unterliegt jedoch keiner Positivität. Das endometriale Stroma ist nicht gefärbt. (A) und (B) 100 µm.

4.1.2 Qualitative und Quantitative Beurteilung von BR1

4.1.2.1 *Qualitative Analyse von BR1*

Die immunhistochemische Färbung führt zur Visualisierung der Proteinexpression des Bradykinin-Rezeptors Typ 1 und ermöglicht so die qualitative Analyse dieses Proteins. Durch die optimale Verdünnung dieses Antikörpers stellt sich ein gutes Rausch-Signal-Verhältnis mit kaum vorhandener Hintergrundfärbung ein (Abb. 4.5).

Es zeigt sich durchweg eine spezifische Färbung der endometrialen Drüsen und der luminalen Epithelzellen der uterinen Gewebeschnitten von Patientinnen mit als auch ohne Endometriose (Abb. 4.5). Die Proteinlokalisierung der endometrialen hochprismatischen Drüsenzellen beschränkt sich auf das Zytoplasma mit deutlicher Betonung auf den apikalen und basalen Bereichen. Die apikalen und basalen Zellpole sind häufig gleich stark gefärbt und nur in wenigen Proben liegt eine verstärkte Färbung am apikalen, seltener am basalen Zellpol vor (Abb. 4.5A,B). Die laterale und perinukleäre Proteinlokalisierung stellt sich als die Schwächste dar. Im direkten Vergleich liegen keine Unterschiede der Drüsenfärbungen bezüglich Intensität zwischen Gewebeschnitten von gesunden Patientinnen und von Patientinnen mit Endometriose vor. Auch in der Proteinlokalisierung lassen sich keine nennenswerten Unterschiede erheben. Die Farbintensität variiert zwischen den unterschiedlichen Drüsenzellen von der häufigen moderaten bis zur seltenen starken Färbung. Das Oberflächenepithel stellt die Grenze zwischen dem Endometrium und der Cavitas uteri dar. Es präsentiert sich als einschichtiges zylindrisches Epithel, dass bei Frauen in gebärfähigem Alter mit Mikrovilli besetzt ist. Diese Luminalzellen sind zytoplasmatisch mit Fokus auf die apikalen, basalen und lateralen Zellbereiche gefärbt und es besteht eine konstant moderate bis starke Farbintensität (Abb. 4.5C,D). Die endometrialen Drüsenverbände sind im stromalen, endometrialen Gewebe eingebettet. Die Dichte der Zellabstände, die Größe und die Form des endometrialen Stromas variiert in Abhängigkeit von der Zyklusphase. In der Abbildung 4.5C liegt die sekretorische Zyklusphase vor und die endometrialen Stromazellen sind locker gelagert mit diffusen Zellgrenzen. Basal grenzen sie an das Myometrium an. Das endometriale Stroma weist größtenteils keine Färbung auf. Nur bei einzelnen Proben liegt eine schwache und inhomogene zytoplasmatische Proteinexpression vor, die häufig von luminal nach myometrial abnimmt (Abb. 4.5C,D).

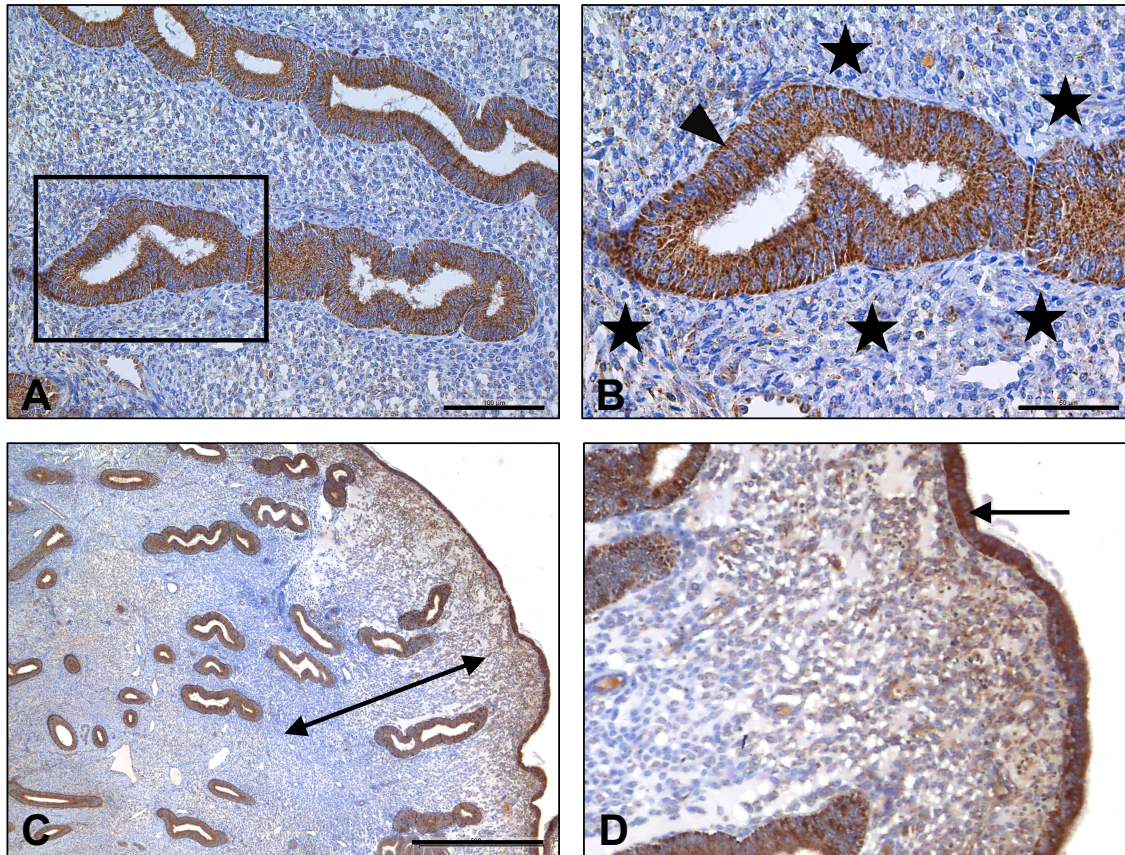


Abbildung 4.5: Immunhistologischer Nachweis von BR1 an einem uterinen Gewebeschnitt einer Patientin ohne Endometriose in der sekretorischen Zyklusphase. Die Färbung ist homogen in fast allen endometrialen Drüsenzellen (Pfeilkopf) und in allen epithelialen Luminalzellen (Pfeil) nachzuweisen. Das endometriale Stroma wird schwach bis nicht angefärbt (Stern) und die Farbintensität nimmt von luminal nach myometrial ab (Doppelpfeil). (A) 100 μm , (B) 50 μm und (C) 500 μm . (D) als Ausschnittsvergrößerung aus (C).

Auffallend ist, dass bei 15 der insgesamt 36 uterinen Gewebeschnitte vereinzelte zellkerngroße und stark gefärbte Zellen zwischen den Drüsenzellen verstreut zu finden sind (Abb. 4.6). Diese befinden sich in wenigen Drüsen eines Gewebeschnittes und stehen in keinem Zusammenhang mit der Zyklusphase, den Schmerzparametern oder dem Vorliegen einer Endometriose.

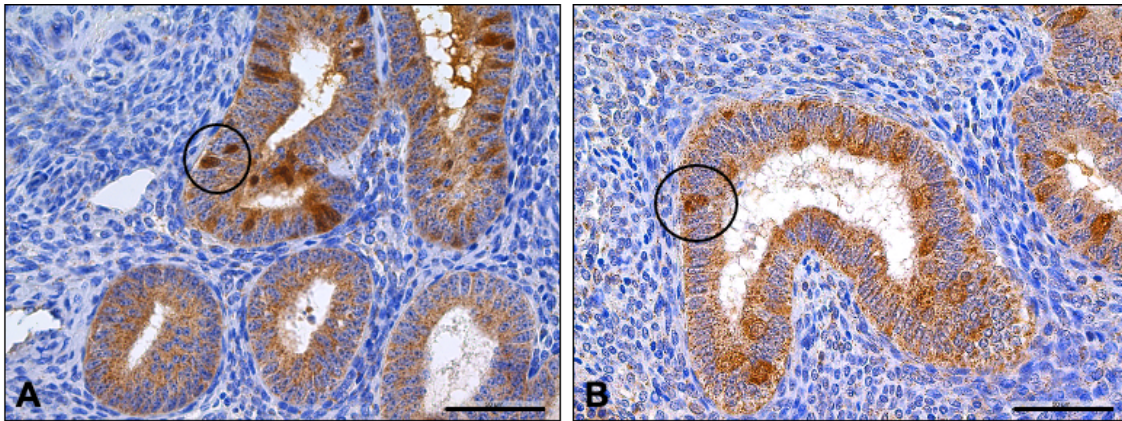


Abbildung 4.6: Immunhistochemischer Nachweis von BR1 an einem uterinen Gewebeschnitt (A) einer Patientin ohne Endometriose in der sekretorischen Zyklusphase und (B) an einem uterinen Gewebeschnitt einer Patientin ohne Endometriose in der proliferativen Zyklusphase. Bei beiden Proben zeigen sich stark gefärbte Zellen, die diffus verteilt in den endometrialen Drüsenzellen (Kreis) vorkommen. (A) und (B) 100 μm .

Zudem befindet sich der Bradykinin-Rezeptor Typ 1 im intrazellulären, zytoplasmatischen Bereich von glatten Muskelzellen des Myometriums und ist dort inhomogen verteilt (Abb. 4.7A,C). Die Färbung ist sehr schwach ausgeprägt und partiell nicht vorhanden. Es liegt keine durchgängige Färbung der Myozyten des Endometriums vor. Wenn die glatten Muskelzellen längs angeschnitten werden, präsentieren sie sich als langgezogene Zellen mit einem zentral gelegenen flachen Zellkern. Wird die glatte Muskulatur quer angeschnitten, dann ist die Zellform rundlich und der kugelförmige Zellkern liegt zentral. Das Myometrium und das Endometrium sind mit Blutgefäßen durchzogen, die eine Versorgung des Gewebes gewährleisten. Die Gefäßendothelien und die vereinzelt glatten Muskelzellen der größeren Gefäße weisen eine zytoplasmatische schwache Färbung auf. Diese ist jedoch nicht durchgängig und auf vereinzelte Gefäße beschränkt (Abb. 4.7B). Weder das Myometrium noch die Gefäße sind für diese Arbeit von großem Interesse. In Abbildung 4.7 liegt eine Adenomyose vor. Die Diagnosestellung erfolgt durch den histologischen Nachweis von Endometriumzellen bzw. endometrialen Drüsenverbänden eingebettet in die kräftige Tunica muscularis des Myometriums. Das Protein BR1 ist bei den endometrialen Drüsenzellen der Adenomyose meist schwach bis moderat vorhanden und dominiert in den basalen und apikalen Zellbereichen. Bei einer Adenomyose umgibt das endometriale zytogene Stroma die ektopen Drüsen und ist häufig zytoplasmatisch schwach bis nicht gefärbt (Abb. 4.7A,B).

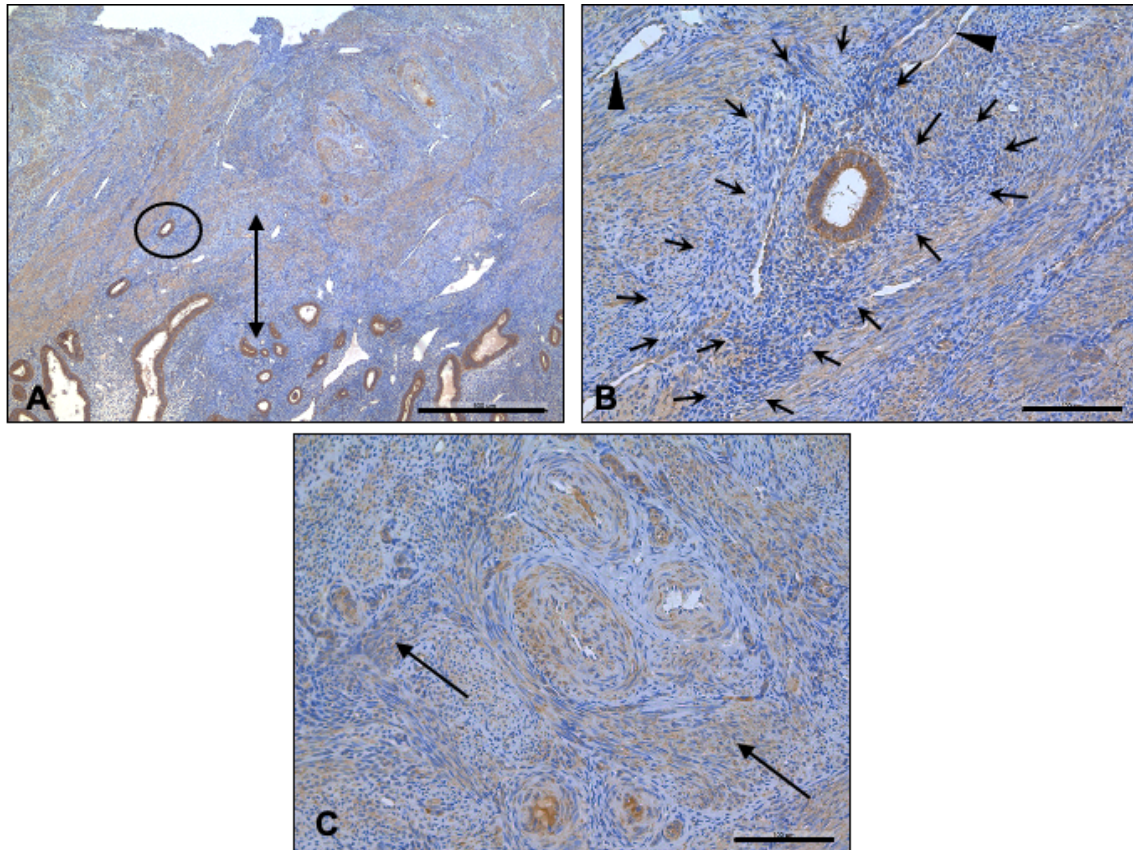


Abbildung 4.7: Immunhistochemischer Nachweis des Bradykinin-Rezeptors Typ 1 an einem uterinen Gewebeschnitt einer Patientin mit Endometriose und Adenomyose in der sekretorischen Zyklusphase. (A) Übergang vom Endometrium in das darunter liegende Myometrium (Doppelpfeil). Die im Myometrium eingebettete Drüse bestätigt die Diagnose einer AM (schwarzer Kreis). (B) Das Gefäßendothel (Pfeilkopf) und die längs angeschnittenen glatten Muskelzellen (Pfeile) sind zytoplasmatisch schwach gefärbt. Die ektopy Drüse wird von dicht gepacktem zytogenem Stroma umrahmt (kleine Pfeile) (C) Inhomogene, zytoplasmatische Färbung der quer angeschnittenen glatten Muskelzellen (Pfeil). (A) 50 µm, (B) und (C) 100 µm.

Im Folgenden werden die drei Entitäten der endometriotischen Läsionen (ovariell, peritoneal und tief infiltrierend) vorgestellt. Bei der in Abbildung 4.8 dargestellten Gewebeprobe liegen multifokale Läsionen im Bereich des Ovars vor. Weitere EM-Herde sind nicht bekannt. Die Drüsenformation spricht für eine ovarielle Endometriose und befindet sich an der Oberfläche mit Eröffnung in die Cavitas pelvica. Dabei stellt sie sich in ihrer Form als zystische Läsion dar. Das hochprismatische Drüsenepithel präsentiert sich im gestreckten Bereich typisch einschichtig. Im gewundenen Bereich scheint das einschichtige Drüsenepithel zwei- bis mehrschichtig, was auf die tangentielle Schnittführung des Gewebepräparates zurückzuführen ist. Das Färbemuster überwiegt weitgehend zytoplasmatisch mit Dominanz im basalen und apikalen Bereich. Die Positivität der Drüsenzellen ist bei fast allen Zellen stark ausgeprägt. Das umliegende

zytogene, endometriale Stroma ist dicht gelagert und die Proteinlokalisierung befindet sich im intrazellulären Bereich unter Aussparung des Zellkerns.

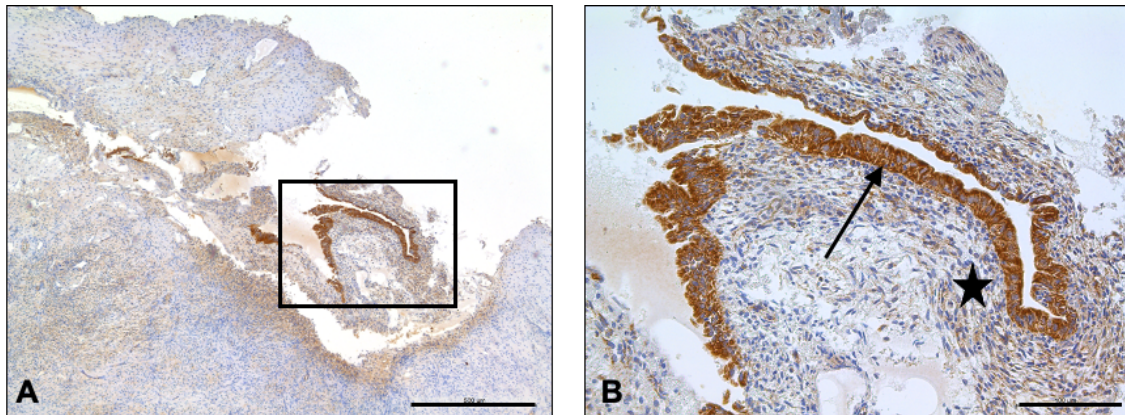


Abbildung 4.8: Immunhistochemischer Nachweis von BR1 an einer ovariellen Zyste mit multifokalen EM-Herden. Nachweis der stark zytoplasmatischen Färbung der ektopen, endometrialen Drüsenzellen (Pfeil) sowie der inhomogenen und schwach zytoplasmatischen Färbung des zytogenen, endometrialen Stromas (Stern). (A) 500µm und (B) 100µm.

Bei dem in Abbildung 4.9 dargestellten Gewebeschnitt liegt eine peritoneale Endometriose mit multiplem Befall des rechten Lig. sacrouterinum vor. Weitere Endometriosefoci liegen im Ovar rechts sowie auf dem Lig. sacrouterinum sinistra. Die stark verzweigte und geschlängelte Drüsenmorphologie kommt durch den zunehmenden Progesteroneinfluss in der sekretorischen Zyklusphase zustande. Die Epithelzellen sind kubisch bis hochprismatisch konfiguriert und umgeben das Lumen einschichtig (Abb. 4.9B). Die Proteinlokalisierung dominiert homogen zytoplasmatisch mit basaler und luminaler Betonung. Das dicht gelagerte und nach unten strangartig auslaufende endometriale Stroma ist kaum gefärbt. Neben den glatten Muskelzellen in Drüsennähe, sind kleine Blutgefäße und multiple Einblutungen im Bereich der Drüsumgebung als typisches Zeichen einer EM zu erkennen. Auffallend ist, dass die vielzähligen, dicht gepackten glatten Muskelzellen der Umgebung einer deutlichen Positivität unterliegen. Es entsteht die Vermutung, dass es sich dabei um eine SMM (*Smooth Muscle Metaplasie*) handeln könnte. Dabei sind vermehrt Ansammlungen von glatten Muskelzellen in der „Wirtsumgebung“ des endometriotischen Implantates nachweisbar. SMM kommen typischerweise bei oberflächlich peritonealen, aber auch bei ovariellen und tief infiltrierenden Läsionen vor (Anaf, 2000; Kim *et al.*, 2015) und wird später ausführlich diskutiert.

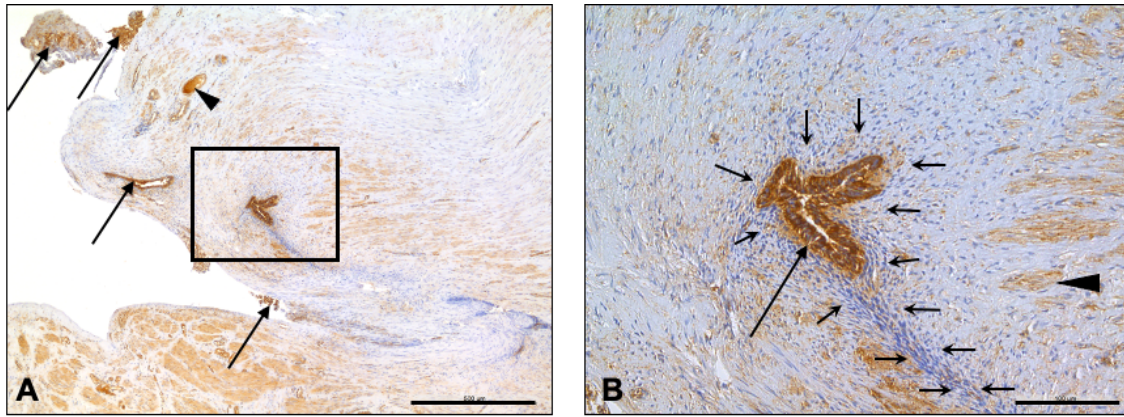


Abbildung 4.9: Immunhistochemischer Nachweis von BR1 an multiplen peritonealen EM-Läsionen im Lig. sacrouterinum einer Probandin. (A) Die insgesamt 5 ektopen Drüsenherde befinden sich nahe der Oberfläche. Zwei davon stellen sich in Form von intakten Drüsen dar, während drei nur als Drüsenreste zu erkennen sind (Pfeile). Zusätzlich sind in dem Präparat Einblutungen zu sehen (Pfeilkopf). (B) Die kubischen Epithelzellen sind stark zytoplasmatisch gefärbt (langer Pfeil). Das endometriale Stroma zeigt eine schwache Färbung, die auf wenige Zellen beschränkt ist und es verläuft strangartig nach unten aus (kurze Pfeile). Die EM-Läsionen sind umgeben von bündelartig und dicht gepackten glatten Muskelzellen, die eine homogene und moderate zytoplasmatische Positivität aufweisen (Pfeilkopf). (A) 500 µm und (B) 100 µm.

Bei den multiplen endometriotischen Läsionen in Abbildung 4.10 handelt es sich um den Befall der Blasenumschlagsfalte bei bestätigter tief infiltrierender EM. Hinzu kommen Endometriosefoci in der Tube links und auf beiden Seiten des Lig. sacrouterinum. Die Drüsen sind zystisch aufgeweitet und stark verzweigt. Die Epithelzellen sind kubisch geformt und umrahmen das Lumen größtenteils einschichtig. Die Positivität der ektopen Drüsenzellen ist moderat bis stark ausgeprägt und die Lokalisation des Bradykinin-Rezeptor Typ 1 findet sich meist zytoplasmatisch mit luminalem und basalem Fokus. Sie sind umgeben von fibrotisch verändertem Gewebe mit eingelagerten Fett- und Bindegewebszellen. Das zytogene, endometriale Stroma ist sowohl herdförmig verdichtet als auch periglandulär locker gelagert. Teilweise liegt eine schwache, zytoplasmatische und inhomogene Positivität vor. Es fällt auf, dass in der direkten Umgebung mehr BR1-positive Zellen des „Wirtsgewebes“ zu finden sind als weiter entfernt (vgl. 4.9).

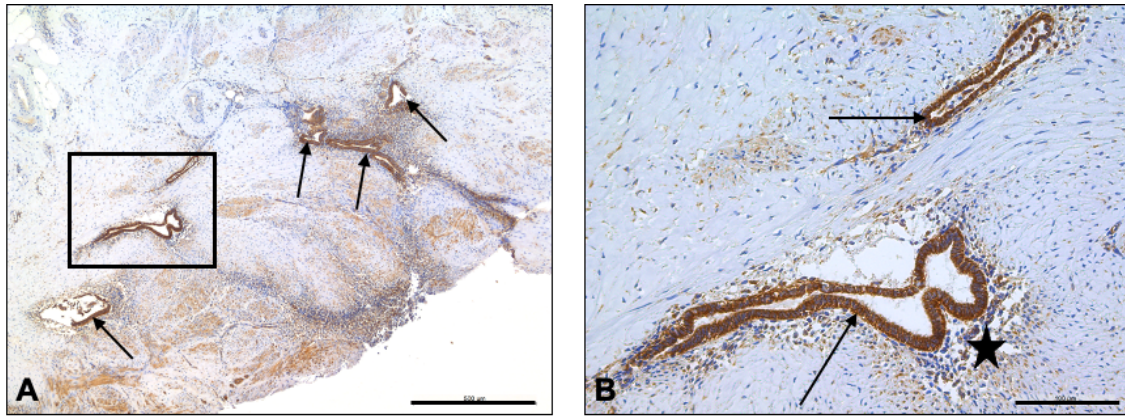


Abbildung 4.10: Immunhistochemischer Nachweis von BR1 an multiplen tief infiltrierenden Läsionen (Pfeile) innerhalb der Blasenumschlagsfalte neben multiplen anderen EM-Foci. (A) Insgesamt sind etwa 6 verstreute Drüsenherde auszumachen. In der direkten Umgebung der Drüsen liegt eine deutliche Positivität des „Wirtsgewebes“ vor. (B) Es findet sich eine starke zytoplasmatische Färbung des kubischen Drüsenepithels (Pfeile), welches in lockeres und zytoplasmatisch schwach gefärbtes zytogenes, endometriales Stroma eingebettet ist (Stern). (A) 500 µm und (B) 100 µm.

Die in Abbildung 4.11 dargestellte immunhistochemische Färbung von BR1 an eutopen sowie ektopen endometriotischen Drüsenverbänden der gleichen Patientin mit bekannter Endometriose verdeutlicht die verstärkte Farbintensität in den Läsionen (Abb. 4.11). Es ist zu erkennen, dass die ektopen, pathologischen Drüsen im Spatio rectovaginale (Abb. 4.11B) zum einen stärker gefärbt sind und zum anderen eine wesentlich intensivere intrazelluläre Färbung unter Aussparung des perinukleären Bereiches als die physiologischen, uterinen Drüsen aufweisen (Abb. 4.11A). Die uterinen Drüsen sind vor allem in den basalen und luminalen Zellbereichen gefärbt.

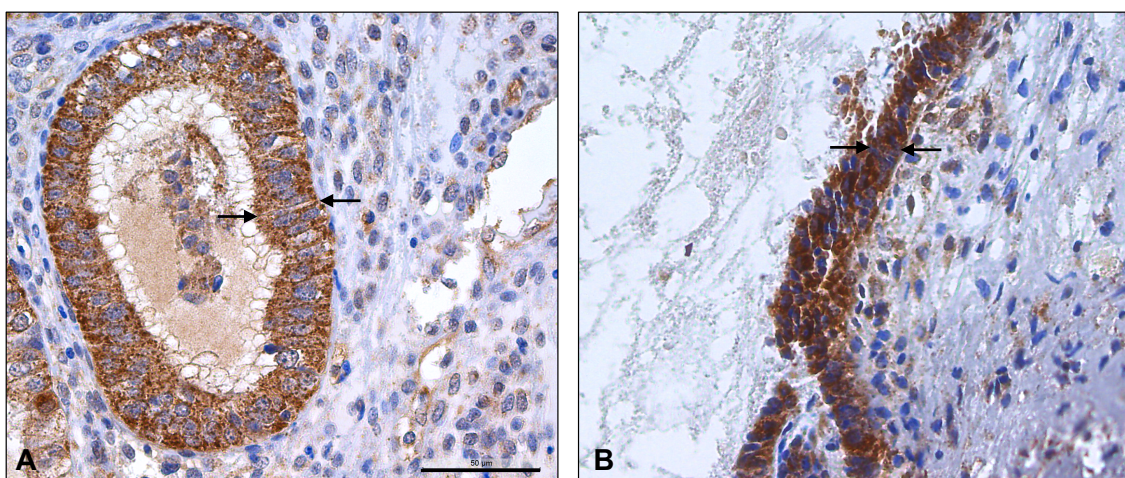


Abbildung 4.11: (A) Immunhistochemischer Nachweis von BR1 an einem uterinen Gewebeschnitt in der proliferativen Zyklusphase. Das Protein lässt sich schwach zytoplasmatisch mit basaler und luminaler Dominanz nachweisen (Pfeile). (B) Immunhistochemischer Nachweis von BR1 in einer ektopen endometriotischen Drüsenverbänden der gleichen Patientin mit bekannter Endometriose.

peritonealen EM-Läsion im Spatio rectovaginale der gleichen Patientin wie in (A). Die ektopen, endometriotischen Drüsenzellen sind homogen und stark zytoplasmatisch mit basaler, apikaler und lateraler Dominanz gefärbt (Pfeil). (A) 50 µm, (B) Ausschnittvergrößerung aus 100 µm.

Zusammenfassend konnte in den meisten ektopen EM-Herden ein homogenes Färbemuster nachgewiesen werden. Die Proteinlokalisierung in den ektopen Läsionen dominiert größtenteils einheitlich zytoplasmatisch, während in den eutopen Drüsenzellen meist eine Dominanz mit basalen und apikalen Bereichen zu erkennen ist. Häufig liegt bei den ektopen, endometrialen Epithelzellen zusätzlich eine starke zytoplasmatische Färbung mit Dominanz im apikalen und basalen aber auch im lateralen Zellbereich vor. Dies ist bei den eutopen endometriotischen Drüsen in der hohen Rezeptorquantität und insbesondere im lateralen Zellbereich nur selten zu sehen. Das dicht gepackte stromale Gewebe der EM-Läsionen ist durch eine inhomogene und meist schwache zytoplasmatische Färbung charakterisiert. Teilweise ist das zytogene Stroma nicht gefärbt. Das endometriale Stroma im Uterus ist nur selten schwach von luminal nach apikal abnehmend gefärbt. Die stärkere Färbung der EM-Läsionen im Vergleich zu den eutopen, endometriotischen Läsionen führt zur Annahme einer erhöhten Proteinexpression von BR1 in den ektopen Drüsenzellen.

4.1.2.2 *Semi-quantitative Analyse von BR1*

Zunächst werden mit Hilfe des H-Scores die proliferativen, sekretorischen und ruhenden Zyklusphasen der eutopen Drüsenzellen analysiert (Tab. 4.1). Die Mittelwerte liegen nah beieinander, wodurch keine nennenswerten statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen bestehen. Darüber hinaus erfolgt eine Analyse der Farbintensität der uterinen Gewebeschnitte bei Patientinnen mit sowie ohne Endometriose. Auch hier liegen die Ergebnisse dicht aneinander und es gibt keine signifikanten Divergenzen.

Tabelle 4.1: Statistische Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von BR1 an uterinen Gewebeschnitten in den verschiedenen Zyklusphasen

Endometrium ohne EM			Endometrium mit EM		
Zyklusphase	Proliferativ	Sekretorisch	Proliferativ	Sekretorisch	Ruhend
Gruppe	A	B	C	D	E
Mittelwert	198	201	179	200	160
(n)	(10)	(8)	(16)	(16)	(4)
SEM	18	20	13	10	18
SD	57	56	50	39	36
Median±SD	43±9,0	42±3,9	39,5±7,2	42±6,9	40±5,5
(Spannweite)	(28-54)	(34-45)	(23-47)	(28-53)	(33-45)
P-Wert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Alle Endometrien ohne EM			Alle Endometrien mit EM		
Mittelwert	199		186		
(n)	(18)		(36)		
SEM	13		8		
SD	55		45		
Median±SD	42±7,0		40,5±6,9		
(Spannweite)	(28-54)		(23-53)		
P-Wert	n.s.		n.s.		

n.s., nicht signifikant; Mittelwert des H-Scores; SEM, Standardfehler; SD, Standardabweichung; P-Wert: Signifikanz $\leq 0,05$; EM, Endometriose; (n), Anzahl Probandinnen; Median und Spannweite bezieht sich auf das Alter

Nun kann ein Vergleich zwischen den Endometrien und den drei Entitäten der endometrialen Läsionen durchgeführt werden (Tab. 4.2). Die Rezeptorexpression ist in den ovariellen endometriotischen Läsionen am stärksten vorhanden. Der Mittelwert des H-Scores aller ovariellen Läsionen ist mit 273 am höchsten. Bei den peritonealen und tief infiltrierenden Läsionen liegt der Mittelwert etwas niedriger, jedoch deutlich über 200. In den Endometrien liegt er unter 200 und ist somit signifikant am niedrigsten. Auch die

Adenomyose wird in die Statistik mit aufgenommen. Diese zeigt eine durchschnittliche Rezeptorexpression, die unter dem Mittelwert der Endometrien liegt.

Tabelle 4.2.: Statistische Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von BR1 in den Endometrien und den verschiedenen Läsionslokalisationen

	Endometrien	Ovar	TIE	PE	AM
Gruppe	A	B	C	D	E
Mittelwert	191	273	235	236	172
(n)	(54)	(22)	(28)	(18)	(13)
SEM	7	7	10	11	10
SD	48	33	53	46	36
Median±SD	43±7	33±4,6	32±4,7	35±4,5	44±6,4
(Spannweite)	(28-54)	(25-45)	(25-46)	(26-40)	(28-53)
P-Wert	s. vorne	A-B: <0,0001	A-C: <0,0035	A-D: <0,0179	A-E: n.s.

n.s., nicht signifikant; (n), Anzahl der Probandinnen; Mittelwert des H-Scores; SEM, Standardfehler; SD, Standardabweichung; P-Wert: Signifikanz $\leq 0,05$; TIE, tief infiltrierende Endometriose; PE, peritoneale Endometriose; AM, Adenomyose

Zur statistischen Auswertung dieser 5 Gruppen wird der nicht parametrische, zweiseitige Kruskal-Wallis-Test verwendet. Dieser Test zeigt, dass die Rezeptorexpression in den ovariellen, in den tief infiltrierenden und in den peritonealen Läsionen gegenüber den uterinen Gewebeschnitten der Probandinnen an Endometriose erkrankte als auch gesunde Frauen signifikant höher ist (Tab. 4.2). Für die Adenomyose können keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Ergebnisse

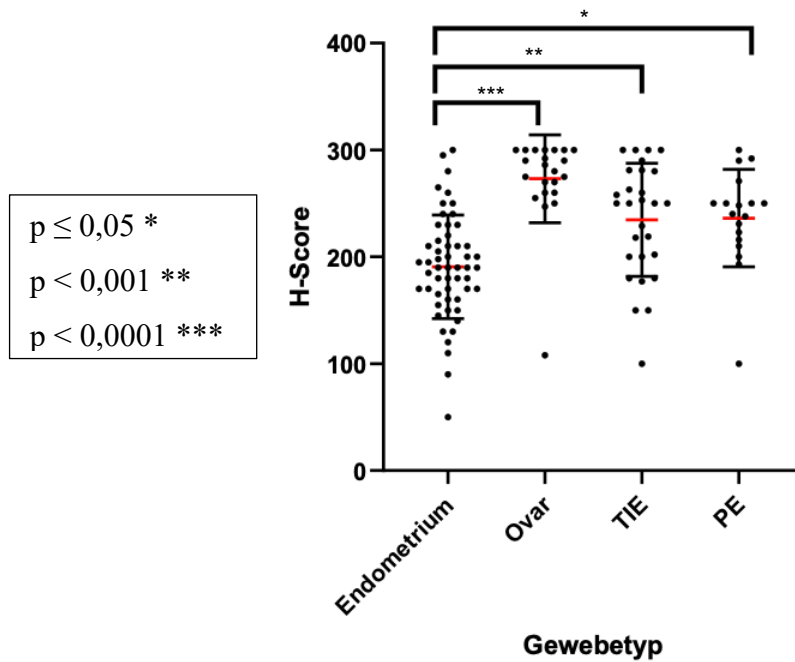


Abbildung 4.12: Whisker-Plot zur Veranschaulichung der quantitativen Rezeptorexpression von BR1 in den verschiedenen Gewebetypen. TIE, tief infiltrierende Endometriose; PE, peritoneale Endometriose.

In der Abbildung 4.12 werden anhand des Whisker-Plots die Mittelwerte für jedes Präparat einer Entität aufgetragen, um so die visuelle Verteilung der H-Scores für die Gewebeschnitte zu verdeutlichen. Es wird klar ersichtlich, dass bei den ektopen endometrialen Implantaten eine Häufung der einzelnen H-Scores im oberen Bereich vorliegt. So liegt auch der Mittelwert aller Präparate, der in Form eines roten Querbalkens eingezeichnet ist, bei den EM-Läsionen eindeutig über 200 und so über dem der Endometrien.

4.1.3 Qualitative und quantitative Beschreibung von BR2

4.1.3.1 Qualitative Analyse von BR2

Im Anschluss erfolgt die immunhistochemische Färbung und Analyse von Bradykinin-Rezeptor Typ 2. Auch hier stellt sich ein gutes Rausch-Signal-Verhältnis ein und die Proteinlokalisierung ist eindeutig abzulesen.

Der Bradykinin-Rezeptor Typ 2 ist in fast allen eutopen Drüsen- und luminalen Epithelzellen des Uterus bei gesunden und an Endometriose erkrankten Patientinnen zu finden (Abb. 4.13). Es liegt ein spezifisches und wiederkehrendes Färbemuster vor. Die

eutopen Drüsenzellen in Abbildung 4.13 präsentieren sich durch eine zytoplasmatische Färbung mit Betonung in gleichem Maße auf die luminalen und basalen Zellbereiche. Die Proteinlokalisierung lässt sich in den meisten Fällen in den eutopen Drüsenepithelien nachweisen. Das Epithel ist einreihig, iso- bis hochprismatisch aufgebaut. Die Drüsen verlaufen sowohl gestreckt als auch gewunden und sind in ihrer Zahl relativ spärlich vorhanden, was auf ein spätes Stadium der proliferativen Zyklusphase hindeutet. In vereinzelt Drüsenlumina sind Ablagerungen zu erkennen. Dabei könnte es sich um ein muköses Sekret handeln, welches in der sekretorischen und spät proliferativen Zyklusphase sezerniert wird (Abb. 4.13A,B). Die luminalen Epithelzellen sind zylindrisch geformt und begrenzen das Endometrium vom Lumen der Cavitas uteri einschichtig ab. Sie weisen eine meist moderate bis starke zytoplasmatische Positivität mit Dominanz in den basalen und luminalen Zellbereichen auf (Abb. 4.13C,D). Die luminalen Bereiche, die an die Cavitas Uteri angrenzen, sind in nur wenigen Präparaten erhalten. Das umliegende endometriale Stroma enthält spindelförmige Zellen und ist dicht gepackt. Hier ist der Bradykinin-Rezeptor Typ 2 meist partiell schwach und inhomogen im Zytoplasma der Zellen lokalisiert (Abb. 4.13A,B).

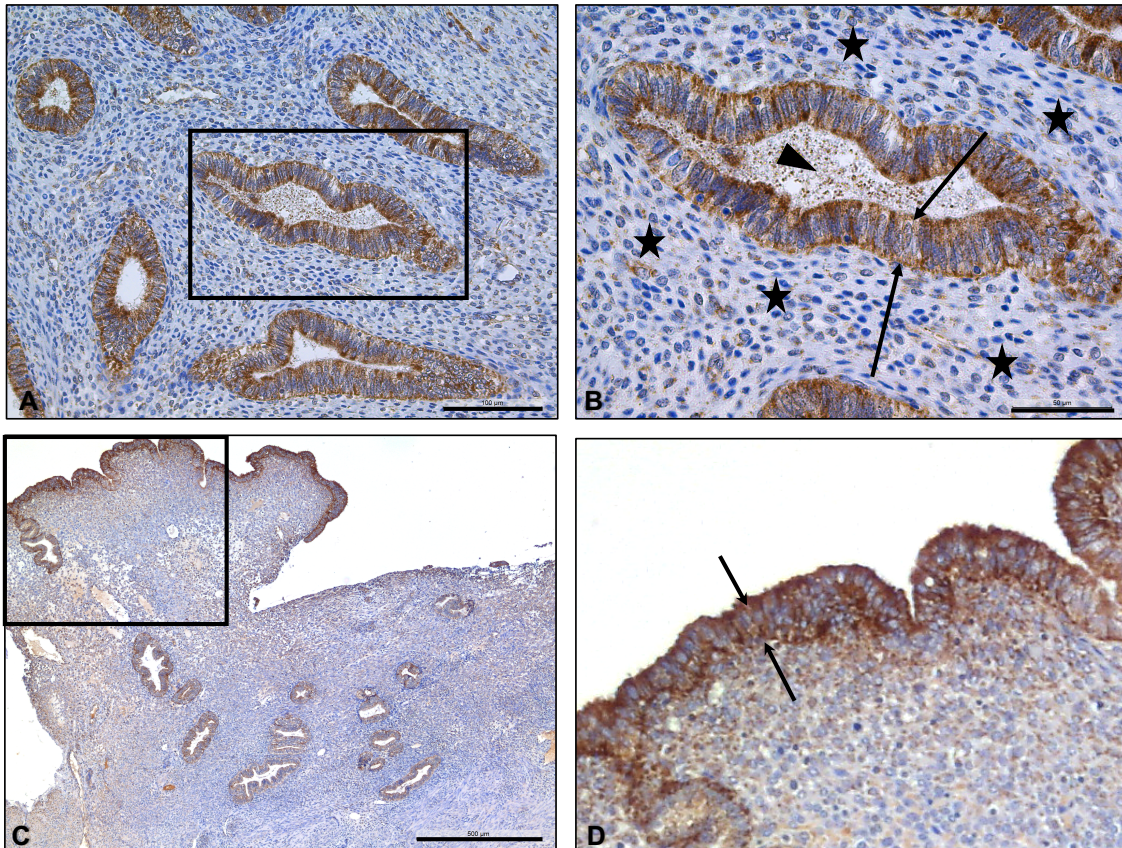


Abbildung 4.13: (A) und (B): Immunhistologischer Nachweis von BR2 im uterinen Gewebeschnitt bei bekannter Endometriose in der proliferativen Zyklusphase. Das Drüsengewebe (Pfeile) weist eine basale und luminaler Färbung auf. Das endometriale Stroma ist sehr schwach bis nicht zyttoplasmatisch gefärbt (Stern). Innerhalb des Drüsenlumens befinden sich Ablagerungen (Pfeilkopf). (C) und (D): Immunhistologischer Nachweis von BR2 im uterinen Gewebeschnitt einer gesunden Patientin in der proliferativen Zyklusphase. Die luminalen Epithelzellen sind zyttoplasmatisch gefärbt, mit basaler und luminaler Betonung (Pfeile). (A) 100 μm , (B) 50 μm , (C) 500 μm und (D) als Ausschnittsvergrößerung aus (C).

Die Gefäße zur Versorgung des Gewebes sind essenziell. Sie liegen verstreut im Myo- und Endometrium. In Abbildung 4.14 zeigen die Gefäßendothelien unabhängig von ihrer Lokalisation eine sehr schwache und inhomogene zyttoplasmatische Positivität. Einige Gefäße sind nicht gefärbt. Teilweise kommen in den großen Blutgefäßen luminaler Blutreste vor und im Gewebe sind vereinzelt Einblutungen zu erkennen. Auch die glatten Muskelzellen sind inhomogen, schwach zyttoplasmatisch und stellenweise nicht gefärbt. Das Myometrium ist längs angeschnitten, wodurch sich die glatten Muskelzellen spindelförmig mit einem länglich geformten Zellkern präsentieren. Es liegt eine klare Abgrenzung zwischen Endometrium und Myometrium vor, wie in dieser Abbildung zu erkennen ist. Auf Grund der geringen Zahl und der teilweise zystisch erweiterten Drüsen

liegt in der Abbildung 4.14A ein atrophes bzw. ruhendes Endometrium vor. In diesem Fall ist die Grenze zwischen der Basalis und Functionalis des Endometriums nicht klar abgrenzbar und das Gewebe ist charakterisiert durch multiple Einblutungen. In der Abbildung 4.14B deuten die kubischen Drüsenzellen und die geschlängelten Drüsenformationen auf die sekretorische Zyklusphase hin.

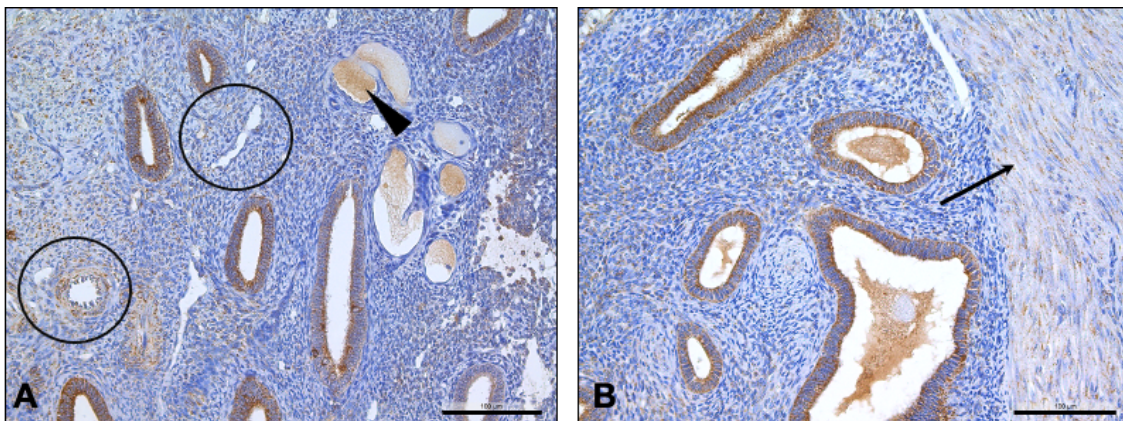


Abbildung 4.14: (A) Immunhistochemische Färbung von BR2 eines uterinen Gewebeschnittes einer Patientin mit Endometriose bei ruhender Zyklusphase. Im Gefäßendothel (schwarzer Kreis) lässt sich das Protein stellenweise zytoplasmatisch lokalisieren. In diesem Präparat sind gelegentlich Gefäßlumina mit Blutresten gefüllt (Pfeilkopf). (B) Immunhistochemische Färbung von BR2 an einem uterinen Präparat bei Endometriose in der sekretorischen Zyklusphase. Die glatten Muskelzellen (Pfeil) sind stellenweise leicht zytoplasmatisch gefärbt. (A) und (B) 100 µm.

Im nächsten Abschnitt erfolgt eine kurze Einführung zur Analyse der ektopen Läsionen. Die Fotografie der EM-Herde in Abbildung 4.15 präsentiert sich als eine ovarielle Zyste innerhalb des linken Ovars. Die Patientin hat einen weiteren EM-Fokus im Lig. infundibulum pelvicum. Der dargestellte Zystenbalg weist eine langgezogene und zum Lumen der Bauchhöhle gerichtete endometriotische Läsion auf. Die Drüsen dominieren in der ganzen Länge im unteren Bereich des Gewebepreparates. Die epithelialen Zellen liegen einschichtig vor und besitzen eine kubische Zellform. Die Färbung ist homogen über die ganze Zelle unter Aussparung der Zellkerne verteilt, die sich deutlich blau abheben. Die Farbintensität präsentiert sich durchgehend als stark, bis auf den moderat gefärbten perinukleären Bereich. Das anliegende, dichte zytogene endometriale Stroma wird von spindelförmigen Zellen gebildet und unterliegt einer zytoplasmatischen Positivität, die jedoch im Vergleich zum Drüsenepithel schwächer und inhomogener ausgeprägt ist. Auch diese Zellen erstrecken sich in voller Länge und schließen sich kaudal an das Drüsenepithel an. Es fällt auf, dass auch der angrenzende ovarielle Cortex

deutlich positiv ist. Die Proteinlokalisierung ist inhomogen zytoplasmatisch und in vielen Zellen des ovariellen Cortex vorhanden.

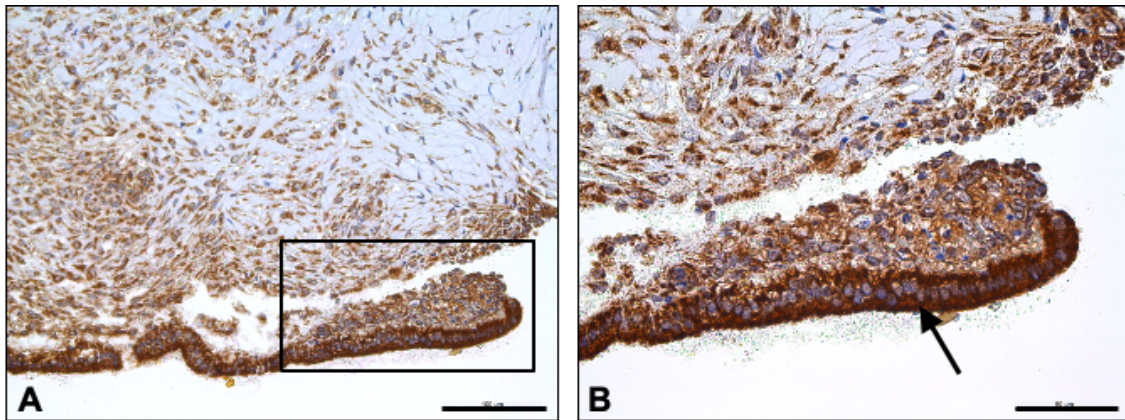


Abbildung 4.15 (A) und (B): Repräsentativer immunhistochemischer Nachweis von BR2 in einer ovariellen Läsion innerhalb eines zystischen Ovars links. Es zeigt sich ein ausgeprägter Befall des Zystenbalgs mit stark aufgeweiteten endometrialen Drüsen (Pfeile). Auch das zytoгене, endometriale Stroma und der angrenzende ovarielle Kortex weist eine zytoplasmatische Positivität auf (Sterne). (A) 100 µm und (B) 50 µm.

In der folgenden Abbildung 4.16 sind mehrere endometriotische Implantate im Peritoneum des kleinen Beckens dargestellt. Die Patientin hat darüber hinaus multiple EM-Herde im Bereich der Zervix und im Myometrium (Adenomyose). In diesem Präparat sind einige zystisch dilatierte und große Läsionen dargestellt. Diese liegen nahe an der Oberfläche und werden somit als peritoneale Läsionen klassifiziert. Das Drüsenepithel ist einschichtig und kubisch geformt. Die apikalen Zellpole der epithelialen Drüsen sind übersät mit Mikrovilli, die in das Lumen hineinragen. Die in Abbildung 4.16 abgebildeten Drüsenlumina sind mit inhomogen verteilten Ablagerungen angereichert, wobei es sich wahrscheinlich um Drüsensekret handelt. Die Positivität der Epithelzellen ist meist stark ausgeprägt, insbesondere an den basalen, apikalen und lateralen Bereichen. Im perinukleären Anteil liegt eine moderate Farbintensität vor. Dieses Lokalisationsmuster findet sich größtenteils in den anderen Läsionen wieder. Die Drüsen werden sowohl von dicht gepacktem als auch von locker anliegendem zytoگem endometrialem Stroma umrahmt. Diese Zellen sind spindelförmig und weisen an manchen Stellen eine leichte und inhomogene zytoplasmatische Färbung auf. Das zytoگene endometriale Stroma ist bei den peritonealen Läsionen selten gefärbt (Abb. 4.16B). Das Präparat enthält multiple Fettzellen, die meist eng aneinander liegen und in

das lockere Bindegewebe eingelagert sind (Abb. 4.16A). Diese Form der Anhäufung von Fettzellen ist typisch für das Peritoneum.

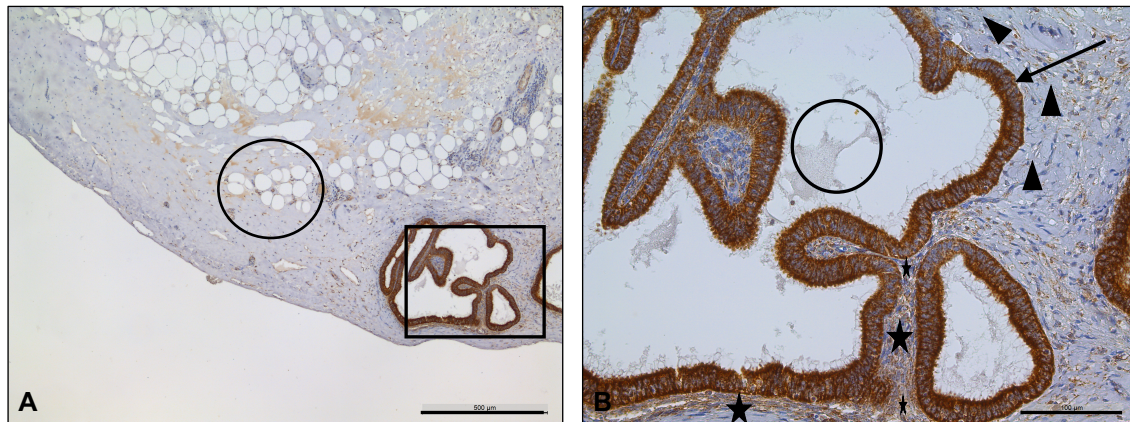


Abbildung 4.16: (A) und (B): Immunhistochemischer Nachweis von BR2 in einer oberflächlichen peritonealen Läsion des Peritoneums. (B) Die Drüsen sind meist stark apikal, basal und lateral gefärbt (Pfeil). In den Lumina der Drüsen sind inhomogene Ablagerungen zu erkennen (schwarzer Kreis). Das umgebende zytogene endometriale Stroma ist partiell leicht oder nicht gefärbt und kommt sowohl dicht gelagert (Stern) als auch locker anliegend (Dreieck) vor. (A) Die umliegende „Wirtsumgebung“ unterliegt keiner Positivität. Die Fettzellen (schwarzer Kreis) verteilen sich über das ganze Peritoneum. (A) 500 µm und (B) 100 µm.

In Abbildung 4.17 liegt eine Endometriose in Form von vielzähligen Läsionen im Bereich des Lig. sacrouterinum sinistra vor. Die Patientin weist ferner multiple EM-Herde in der Bauchdecke, der Fossa ovarica dextra, dem Musculus psoas sinistra und dem Lig. sacrouterinum dextra auf. Die epithelialen endometrialen Drüsenzellen sind kubisch geformt und liegen einschichtig vor. Das ganze Implantat ist zystisch erweitert und präsentiert sich als großer EM-Herd. Die Proteinlokalisierung ist zytoplasmatisch und dominiert in den basalen, luminalen und lateralen Zellbereichen, während die perinukleäre Farbintensität als moderat eingestuft wird (Abb. 4.17B). Das dichte endometriale, stromale Gewebe ist stellenweise leicht zytoplasmatisch gefärbt und beinhaltet viele kleine Gefäße, Einblutungen und vernarbte, bindewebige Netzwerke. Diese Strukturen umrahmen die endometriotischen Implantate. In Abbildung 4.18 ist das uterine Gewebe der gleichen Patientin dargestellt. Das Präparat enthält in diesem Fall nur die endometriale Schicht des Uterus. Anhand der Drüsenformation kann auf die proliferative Zyklusphase geschlossen werden. Das Epithel ist kubisch geformt und es liegt eine schwache bis moderate Positivität der basalen und luminalen Zellbereiche vor. Im direkten Vergleich zur Läsion in Abbildung 4.17 ist die Divergenz der Farbintensität

klar zu erkennen. Diese spiegelt sich sowohl in einer stärkeren Färbung des zytogenen endometrialen Stromas als auch des ektopen Drüsenepithels der Läsionen wider. Vor allem die basalen, apikalen und lateralen Zellbereiche der EM-Implantate weisen eine durchaus intensivere Positivität auf.

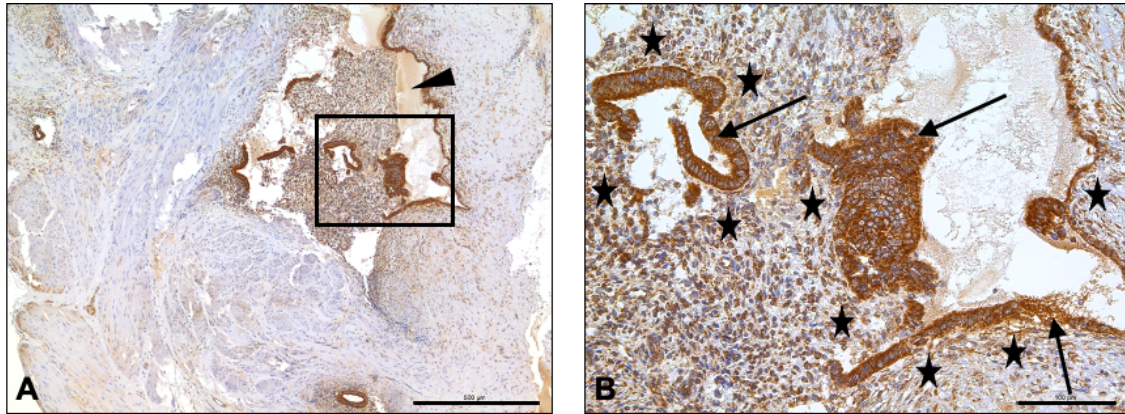


Abbildung 4.17: (A) und (B): Tief infiltrierende Läsionen im Lig. sacrouterinum mit dem immunhistochemischen Nachweis von BR2. Es zeigen sich stark gefärbte tief infiltrierende endometriotische Drüsen (Pfeil), die von moderat gefärbtem zytogenem Stroma umgeben sind (Stern). Die Drüsen sind zystisch dilatiert und im Lumen kommen multiple Einblutungen vor (Pfeilkopf). (A) 500 µm und (B) 100 µm.

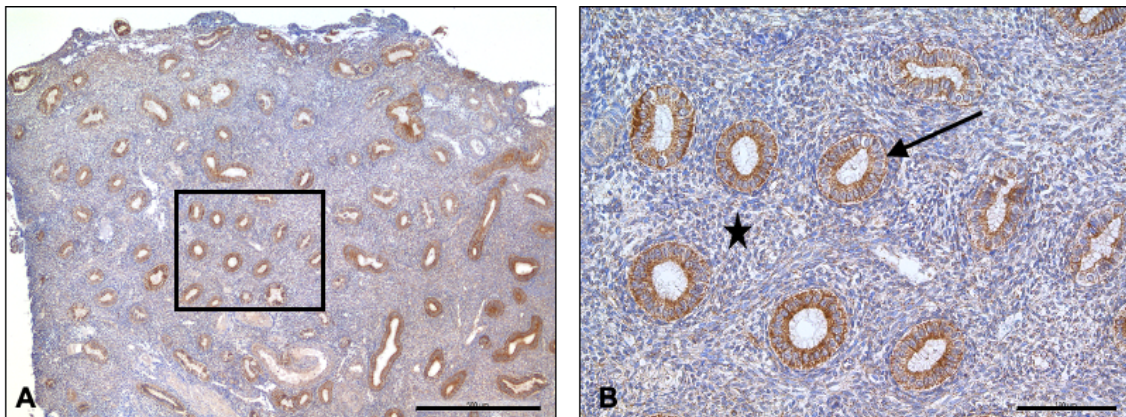


Abbildung 4.18: (A) und (B): Immunhistochemischer Nachweis von BR2 im uterinen Präparat einer Patientin mit Endometriose in der proliferativen Zyklusphase. Die Drüsenzellen sind vollständig schwach bis moderat im basalen und luminalen Zellbereich gefärbt (Pfeil). Das zytogene, endometriale Stroma ist nicht bis schwach gefärbt (Stern). (A) 500 µm und (B) 100 µm.

Die nachgewiesene starke Farbintensität der Läsionen ermöglicht den Rückschluss, dass eine sehr hohe apikale, basale und interzelluläre Expression des Bradykinin-Rezeptor Typ 2 in den ektopen epithelialen Zellen vorliegt. Zusätzlich ist das basal liegende, zytogene Stroma moderat mitgefärbt. Im Gegenzug sind in den uterinen Drüsenzellen insbesondere

die basalen und luminalen Zellpole gefärbt, während die lateralen und perinukleären Bereiche eine deutlich schwächere Positivität aufweisen. Das eutope stromale Endometrium ist schwächer bzw. nicht gefärbt im Vergleich zum ektopen zytogenem endometrialem Stroma.

4.1.3.2 *Quantitative Analyse von BR2*

Im folgenden Kapitel wird die immunhistochemische Positivität des Bradykinin-Rezeptor Typ 2 in den verschiedenen Gewebetypen quantitativ analysiert. Die uterinen Präparate werden in Bezug auf die verschiedenen Zyklusphasen betrachtet. Es erfolgt eine Unterteilung in Gewebeschnitte von Frauen mit Endometriose vs. ohne Endometriose. Anschließend werden diese nach den jeweiligen drei Zyklusphasen (sekretorisch, proliferativ und ruhend) zusammengefasst und statistisch bewertet (Tab. 4.3).

Tabelle 4.3: Statistische Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von BR2 in Bezug auf die verschiedenen Zyklusphasen der uterinen Gewebeschnitte

Endometrium ohne EM			Endometrium mit EM		
Zyklusphase	Proliferativ	Sekretorisch	Proliferativ	Sekretorisch	Ruhend
Gruppe	A	B	C	D	E
Mittelwert	185	144	188	197	210
(n)	(10)	(8)	(16)	(16)	(4)
SEM	12	7	10	9	11
SD	39	19	40	37	22
Median± (Spannweite)	43±9 (28-54)	42±3,9 (34-45)	39,5±7,2 (23-47)	42±6,9 (28-53)	40±5,5 (33-45)
P-Wert	n.s.	n.s.	n.s.	D-B: <0,03	n.s.
Alle Endometrien ohne EM			Alle Endometrien mit EM		
Mittelwert	167		195		
(n)	(18)		(36)		
SEM	9		6		
SD	38		37		
Median±SD (Spannweite)	43±7,0 (28-54)		40±6,9 (23-53)		
P-Wert	n.s.		n.s.		

n.s., nicht signifikant; Mittelwert des H-Scores; SEM, Standardfehler; SD, Standardabweichung; P-Wert: Signifikanz $\leq 0,05$; EM, Endometriose; (n), Anzahl Probandinnen; Median und Spannweite beziehen sich auf das Alter der Probandinnen

Es wird konstatiert, dass zwischen den verschiedenen Gruppen eine einzige signifikante Abweichung des durchschnittlichen H-Scores vorliegt (Tab. 4.3). Die Endometrien der Probandinnen ohne Endometriose in der sekretorischen Zyklusphase kennzeichnen sich durch einen signifikant geringeren Mittelwert des H-Scores im Vergleich zu den Endometrien der Probandinnen mit Endometriose in der sekretorischen Zyklusphase aus. Ansonsten liegen keine relevanten Veränderungen oder Zusammenhänge vor, da die Mittelwerte nah beieinander liegen.

Im nächsten Schritt werden die uterinen Gewebeschnitte der Frauen mit als auch ohne Endometriose mit den drei ektopen Entitäten der Endometriose und der Adenomyose verglichen (Tab. 4.4).

Tabelle 4.4: Statistische Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von Bradykinin-Rezeptor Typ 2 in den Endometrien und den verschiedenen Läsionen

	Endometrium ohne EM	Endometrium mit EM	Ovar	TIE	PE	AM
Gruppe	A	B	C	D	E	F
MW	167	195	273	244	249	203
(n)	(18)	(36)	(22)	(27)	(17)	(13)
SEM	9	6	9	9	9	12
SD	38	37	41	49	36	42
Median±SD	43±7	40±6,9	33±4,6	32±4,8	35±4,6	44±6,4
(Spannweite)	(28-54)	(23-53)	(25-45)	(25-46)	(26-40)	(28-53)
P-Wert	s. vorne	s. vorne	A-C: <0,0001 B-C: <0,0001	A-D: <0,0001 B-D: <0,002	A-E: <0,0001 B-E: <0,005	n.s.

n.s., nicht signifikant; s. vorne, siehe vorne; (n), Anzahl der Probandinnen; MW, Mittelwert als Mittelwert des H-Scores; SEM, Standardfehler; SD, Standardabweichung; P-Wert: Signifikanz $\leq 0,05$; TIE, tief infiltrierende Endometriose; PE, peritoneale Endometriose; AM, Adenomyose; Spannweite und Median beziehen sich auf das Alter der Probandinnen

Der Mittelwert der epithelialen Drüsenzellen mit und ohne Endometriose liegt jeweils unter 200 (Tab. 4.4). Bei den ovariellen EM-Herden ist der durchschnittliche H-Score aller Präparate eindeutig am höchsten, während er bei den tief infiltrierenden EM-Herden und den peritonealen Läsionen ebenfalls weit über 200 liegt. Diese Daten werden statistisch ausgewertet. Es kann im Vergleich zu beiden Gruppen des Endometriums eine wesentlich höhere Expression des Bradykinin-Rezeptor Typ 2 in den ektopen, endometriotischen Implantaten nachgewiesen werden. Das Ergebnis erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Expression von BR2 in dem ektopen, pathologischen Drüsengewebe signifikant höher als im physiologischen, uterinen Drüsengewebe ist. Dies trifft sowohl auf Probandinnen mit als auch ohne Endometriose zu. Für die Adenomyose konnten keine signifikanten Werte ermittelt werden. Um die Verteilung der jeweiligen

H-Scores innerhalb der verschiedenen Gruppen visuell zu demonstrieren, wird ein Whisker-Plot zur Veranschaulichung verwendet (Abb. 4.19).

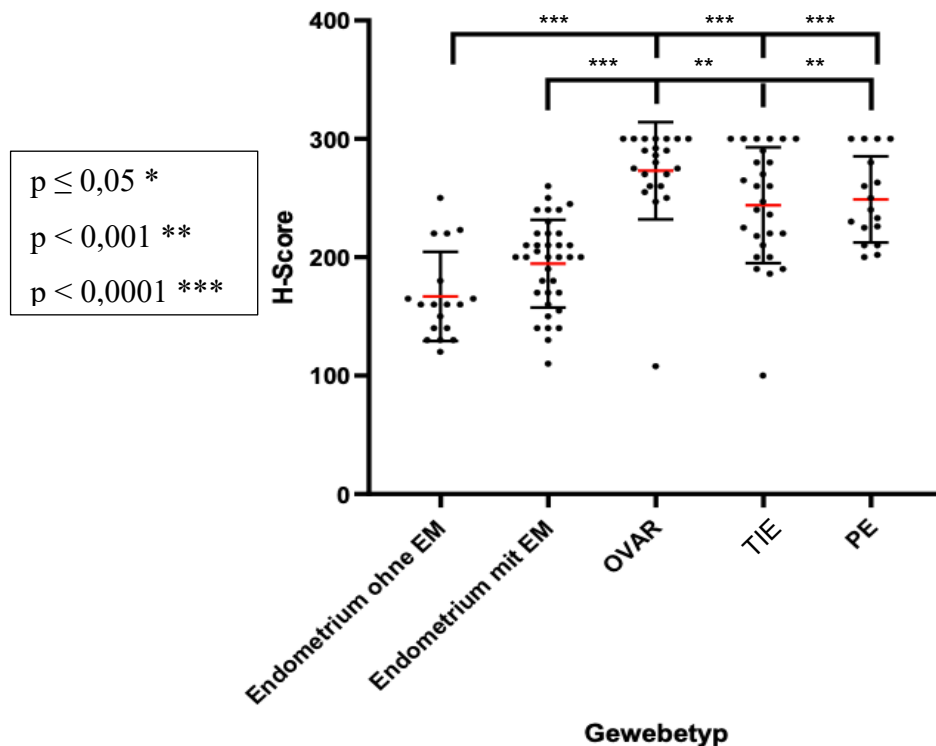


Abbildung 4.19: Whisker-Plot zur Veranschaulichung der Rezeptorexpression von BR2 in den verschiedenen Gewebetypen. TIE, tief infiltrierende Endometriose; PE, peritoneale Endometriose

Der Whisker-Plot in Abbildung 4.19 zeigt die Verteilungen der H-Scores jedes einzelnen Gewebepräparates innerhalb der verschiedenen Gruppen. Bei den drei ektopen, endometriotischen Entitäten ist eine auffällige Häufung im oberen Drittel der Y-Achse nachweisbar. Dies bedeutet, dass die H-Scores der endometriotischen Implantate tendenziell höher angesiedelt sind als die der Drüsenzellen des Endometriums.

Schlussfolgernd kann eine gesteigerte Expression von BR1 und BR2 in den endometriotischen Läsionen signifikant bewiesen werden. Dies beruht möglicherweise auf einem inflammatorischen Prozess. Der Kausalzusammenhang für diese Entzündung ist noch nicht geklärt. Zur Verifizierung eines Zusammenhangs zwischen dem Schmerz bzw. der Endometriose und den Bradykinin-Rezeptoren wird Bradykinin als Ligand untersucht. Zuerst wird immunhistochemisch das Bradykinin-Protein betrachtet. Es stellt sich ein schlechtes Rausch-Signal-Verhältnis mit geringer Spezifität ein und somit bleibt eine Analyse dieser Färbung aus (Abb. 4.20). Auf Grund dessen wird das Protein

Bradykinin quantitativ in den endozervikalen Proben von Probandinnen mit Hilfe eines ELISAs untersucht.

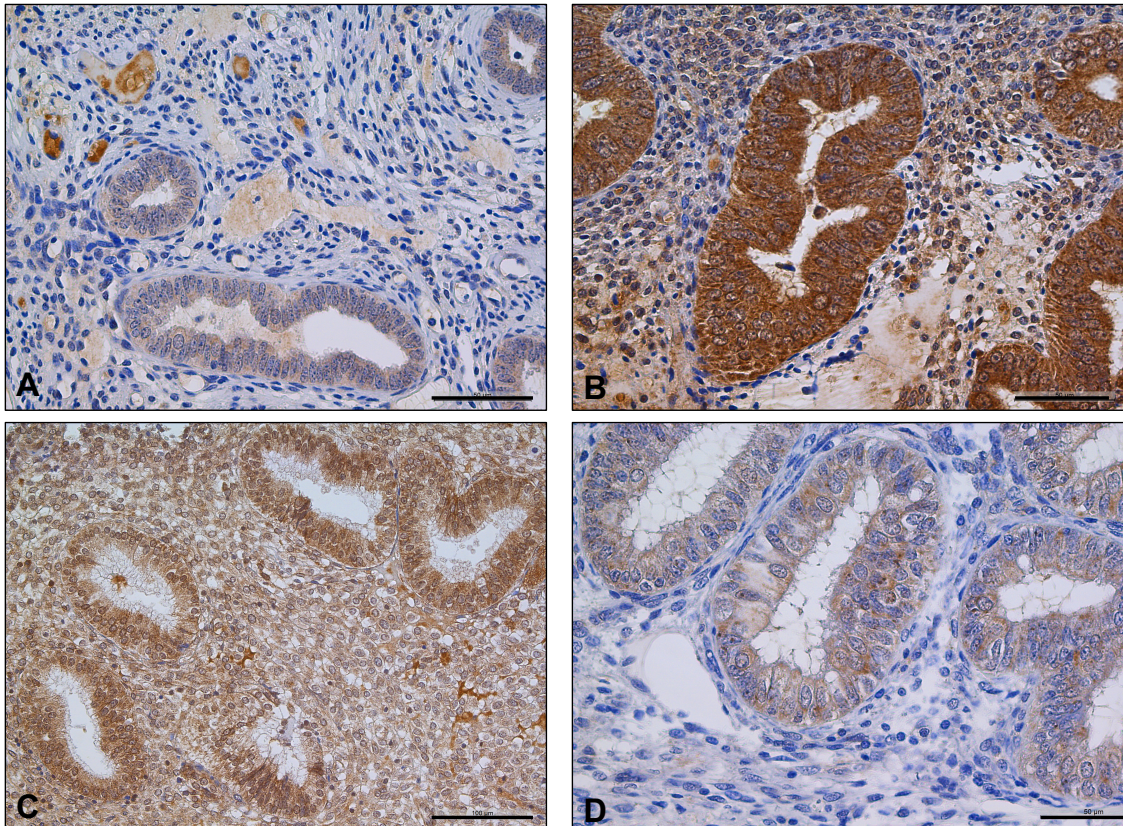


Abbildung 4.20: Immunhistochemischer Nachweis von Bradykinin in vier verschiedenen Gewebeschnitten von Frauen mit Endometriose (A, B), als auch von Frauen ohne Endometriose (C,D). In den vier Schnittbildern, die als repräsentative Auswahl visuell zur Darstellung kommen, zeigt sich keine konstante bzw. wiederkehrende Proteinlokalisierung. Der Nachweis von Bradykinin variiert stark und befindet sich sowohl in den Drüsen als auch im umliegenden endometrialen, stromalen Gewebe. Zudem befindet sich die Proteinlokalisierung diffus zytoplasmatisch und die Farbtintensitäten differieren von sehr schwach bis stark. (A), (B), (C) 100 µm und (D) 50 µm.

4.2 ELISA:

4.2.1 Quantitative Analyse von Bradykinin

Ergänzend zur Analyse der Proteinlokalisierung von BR1 und BR2 im Gewebe, wurde Bradykinin als einer der wichtigsten Liganden der Rezeptoren untersucht. Zur quantitativen Untersuchung dieses Proteins in den endozervikalen Proben der Probandinnen erfolgte die Bestimmung des Bradykinins mit Hilfe des ELISAs als

angewandte Methodik. Die ausgewählte Kohorte umfasst einige endozervikale Mucusproben aus unserer bereits bestehenden und umfangreichen Datenbank. Insgesamt bestand die Kohorte aus 102 Patientinnen, die in eine Gruppe mit „Patientinnen mit Pilleneinnahme“ und in eine Kontrollgruppe „ohne Pilleneinnahme“ unterteilt wurden (Tab. 4.5). Die durchschnittlichen Bradykinin-Gehalte in den endozervikalen Proben dieser beiden Kategorien konnten so gegenübergestellt und mit Hilfe des Mann-Whitney-Test statistisch untersucht werden (Abb. 4.21).

Tabelle 4.5: Statistische Auswertung der Bradykinin-Konzentrationen in den endozervikalen Proben in Bezug auf zwei Patientengruppen

	Ohne Pille	Mit Pille
Gruppe	A	B
n	51	51
MW [pg/mL]	3232	1753
SD	2929	2957
SEM	410	288
Median±SD	32±6,2	31±8,1
(Spannweite)	(21 – 44)	(18 – 49)
p-Wert	A-B: 0,0009	

MW, Mittelwert in [pg/mL]; SEM, Standardfehler; SD, Standardabweichung; P-Wert: Signifikanz $\leq 0,05$; Spannweite und Median beziehen sich auf das Alter der Probandinnen; Dysmen., Dysmenorrhoe; (n), Anzahl an Probandinnen; Proteingehalt im endozervikalen Schleim als Mittelwert

Ergebnisse

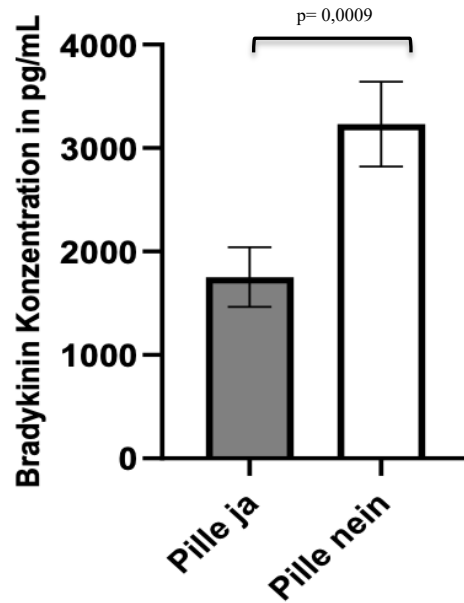


Abbildung 4.21: Bradykinin-Konzentration [pg/mL] in den endozervikalen Proben in Abhängigkeit zur Pilleneinnahme.

Die durchschnittliche Bradykinin-Konzentration bei den „Patientinnen ohne Pilleneinnahme“ ist mit 3232 pg/mL wesentlich höher als bei den „Patientinnen mit Pilleneinnahme“ mit 1753 pg/mL (Abb. 4.21). Ableitend aus den oben angeführten Daten sind die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen hoch signifikant (Tab. 4.5). Die Pilleneinnahme resultiert folglich in einer deutlichen Verringerung des Bradykinin-Gehalts im endozervikalen Mucus der Patientinnen. Anschließend erfolgte die Unterteilung in 4 weitere Gruppen. Dabei wurde neben dem Merkmal der Pilleneinnahme zusätzlich die Dysmenorrhoe mit eingeschlossen. Zur Auswertung der Daten wurde eine statistische Analyse mit dem Kruskal Wallis Test durchgeführt (Tab. 4.6).

Tabelle 4.6: Statistische Darstellung der Bradykinin-Konzentrationen in den Mucusproben der verschiedenen Patientengruppen

	Mit Pille Dysmen. ja	Mit Pille Dysmen. nein	Ohne Pille Dysmen. ja	Ohne Pille Dysmen. nein
Gruppe	A	B	C	D
n	12	39	42	9
MW [pg/mL]	1327	1884	3408	2415
SEM	406	355	481	563
SD	1407	2218	3119	1689
Median±SD	25,5±5,9	33±8,3	32±6,3	31±6,2
Spannweite	19 – 39	18 – 49	21 – 44	23 – 39
P-Wert	n.s.	C-D: <0,03	C-D: <0,03	n.s.

n.s., nicht signifikant; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler; SD, Standardabweichung; P-Wert: Signifikanz $\leq 0,05$; Spannweite und Median beziehen sich auf das Alter der Probandinnen; Dysmen., Dysmenorrhoe; (n), Anzahl Probandinnen; Proteingehalt im endozervikalen Schleim als Mittelwert, pg= Pikogramm, mL= Milliliter

Die Analyse der 4 Kategorien ergab eine signifikant niedrigere Konzentration bei „Patientinnen mit Pille, keine Dysmenorrhoe“ im Vergleich zu den „Patientinnen ohne Pille, keine Dysmenorrhoe“. Zwischen den anderen Kategorien liegen keine signifikanten Abweichungen der Bradykinin-Konzentrationen vor, obwohl die Mittelwerte deutlich voneinander abweichen. Insbesondere zwischen der Gruppe [A] mit einem Mittelwert von 1327 pg/mL und der Gruppe [C] mit einem Mittelwert von 3408 pg/mL würde man einen signifikanten Unterschied vermuten. Ein möglicher Grund für das Ausbleiben der Signifikanz ist die geringe Anzahl von 12 Probandinnen in der Gruppe [A], während die Gruppe [C] insgesamt 42 Probandinnen beinhaltet. Die geringe Anzahl an Probandinnen einer Teilgruppe könnte als mögliche Erklärung dienen, da die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Unterschiedes zwischen zwei verschieden großen Gruppen erhöht ist. In diesem Fall hat der Test eine geringere Power.

Zur Visualisierung der statistisch analysierten Daten der Tabelle 4.6 wird in der folgenden Abbildung 4.22 ein Diagramm verwendet. Dabei erfolgte die Unterteilung in die Gruppe der „Patientinnen mit Pille“ und der „Patientinnen ohne Pille“. Zur Darstellung wurden zwei Balken herangezogen, welche zusätzlich die Mittelwerte der Dysmenorrhoe beinhalten. Dabei kann gezeigt werden, dass in der Gruppe der Patientinnen ohne Pille

wesentlich mehr Frauen an Dysmenorrhoe leiden. Dies ist jedoch, wie bereits erwähnt, nicht signifikant. In der Gruppe der „Patientinnen ohne Pille“ liegen die Mittelwerte der Frauen ohne vs. mit Dysmenorrhoe eng beieinander.

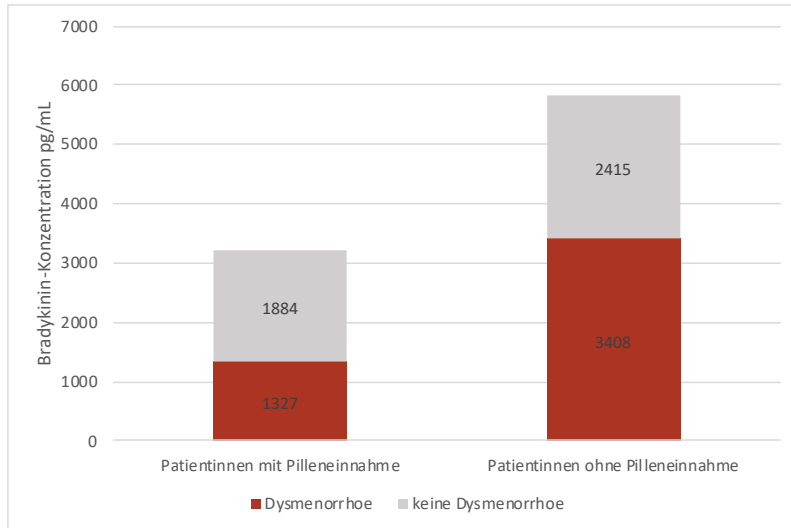


Abbildung 4.22: Mittelwerte der Bradykinin-Konzentrationen in den endozervikalen Proben in den 4 verschiedenen Patientengruppen.

Die ROC-Kurve (*Receiver-Operating-Characteristic*) ermöglicht die Visualisierung und Beurteilung von diagnostischen Gütekriterien eines Tests. Dabei wird mit Hilfe eines Koordinatensystems der Zusammenhang zwischen den richtig positiv getesteten unter den Erkrankten (Sensitivität in %) auf der Y-Achse und den falsch positiv getesteten unter den Gesunden (100% minus die Spezifität in %) auf der X-Achse dargestellt. Somit beinhaltet die gebogene Linie die Wertepaare jedes beliebigen Grenzwertes und die Verschiebung dieser Linie resultiert in einer Veränderung der Sensitivität und Spezifität. Sobald die ROC-Kurve als winkelhalbierende Linie verläuft, ist das Ergebnis zufällig und ermöglicht keine Diagnoseerhebung. Der Bereich unterhalb der Kurve wird als AUC (*Area under the Curve*) bezeichnet und gibt Auskunft über die Testqualität (Metz, 1978). Zur Ermittlung der diagnostischen Wertigkeit von Bradykinin in Bezug auf die Pille wurde mit Hilfe der ROC-Kurve ein Grenzwert bei 1774 pg/mL ermittelt (Abb. 4.23).

Ergebnisse

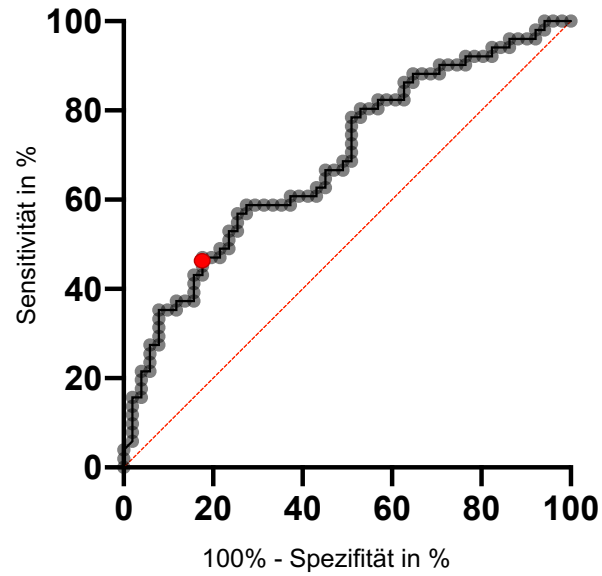


Abbildung 4.23: ROC-Kurve zur Ermittlung des Grenzwertes der Bradykinin-Konzentration. Dieser wird bei einer Konzentration von 1774 pg/mL gesetzt.

Alle Probandinnen, die sich unterhalb des Grenzwertes befinden, werden als Pille positiv gewertet und alle die sich darüber befinden als negativ. Im Anschluss wird eine „Vierfeldertafel“ erstellt, die eine allgemeine Darstellung der diagnostischen Testergebnisse und Zusammenhänge ermöglicht (Tab. 4.7).

Tabelle 4.7: 4-Felder Test zur Erhebung klinisch relevanter Faktoren

	Ohne Pille „Krank“	Mit Pille „Gesund“	Alle Testergebnisse	
Test positiv (unter CutOff)	n=28 (richtig positiv)	n=18 (falsch positiv)	n=46 (Alle positiven Ergebnisse)	PPV 61%
Test negativ (über CutOff)	n=23 (falsch negativ)	n=33 (richtig negativ)	n=56 (Alle negativen Ergebnisse)	NPV 59%
Gesamt	n=51	n=51	n=102	
	Richtig positiv (=Sensitivität) 55%	Richtig negativ (=Spezifität) 65%	LR+ = 1,57 LR- = 0,69	

LR=Likelihood Ratio (Verhältnis), LR+= positives Likelihood Verhältnis, LR-= negatives Likelihood Verhältnis, NPV=negativer Vorhersagewert, PPV=positiver Vorhersagewert, n=Anzahl Probandinnen

Aus der Vierfeldertafel lässt sich ablesen, dass 28 der 51 Probandinnen als korrekt positiv in Bezug auf die fehlende Einnahme der Pille getestet werden (Tab. 4.7). Daraus ergibt sich eine Sensitivität von 55%. Bei den Patientinnen mit Pilleneinnahme konnten 33 korrekterweise als richtig negativ eingestuft werden, während bei 18 Patientinnen ein falsch positives Ergebnis vorliegt. Aus diesen beiden Werten lässt sich eine Spezifität von 65% berechnen. Der positive Vorhersagewert gibt an wie viele der positiv getesteten wirklich krank sind. Hier befindet er sich bei 61%. Im Gegensatz dazu ermittelt der negative Vorhersagewert die tatsächlich Gesunden aller negativen Testergebnisse und liegt bei 59%. Die positive und die negative Likelihood Ratio resultiert aus der Spezifität und Sensitivität. Sie dienen als diagnostische Tests und ermitteln die Chance auf das Vorliegen einer Krankheit. Eine LR- unter 0,1 und eine LR+ unter 0,3 wird als akzeptabel angesehen (Sackett *et al.*, 1985; Parikh *et al.*, 2009). Es wurde eine LR+ bei 1,57 und eine LR- bei 0,69 ermittelt. Somit liegt eine nur schwache Wertigkeit dieses Tests vor. Die Ergebnisse der Spezifität und Sensitivität haben eine geringe Zuverlässigkeit, wodurch eine direkte Übertragung auf den klinischen Alltag nicht möglich ist. Auch der positive und negative Vorhersagewert sind zu gering, was die Wahrscheinlichkeit für korrekte Testergebnisse reduziert. Dennoch zeigt sich eine Tendenz und somit ein Anreiz für zukünftige Forschungsprojekte an inflammatorischen Markern, insbesondere Bradykinin.

In Bezug auf die anderen Schmerzlokalisationen wie Dyspareunie, Dyschezie, Dysurie, chronische Unterbauchschmerzen, aber auch bezogen auf den neuropathischen (zum Beispiel brennend, kälte/hitzeempfindlich etc.) und den aktuellen Schmerz können keine wesentlichen Veränderungen der Bradykinin-Konzentrationen ermittelt werden. Zusätzlich wurde ein Vergleich des Bradykinin-Gehalts in Bezug auf die Endometriose erhoben (Abb. 4.24).

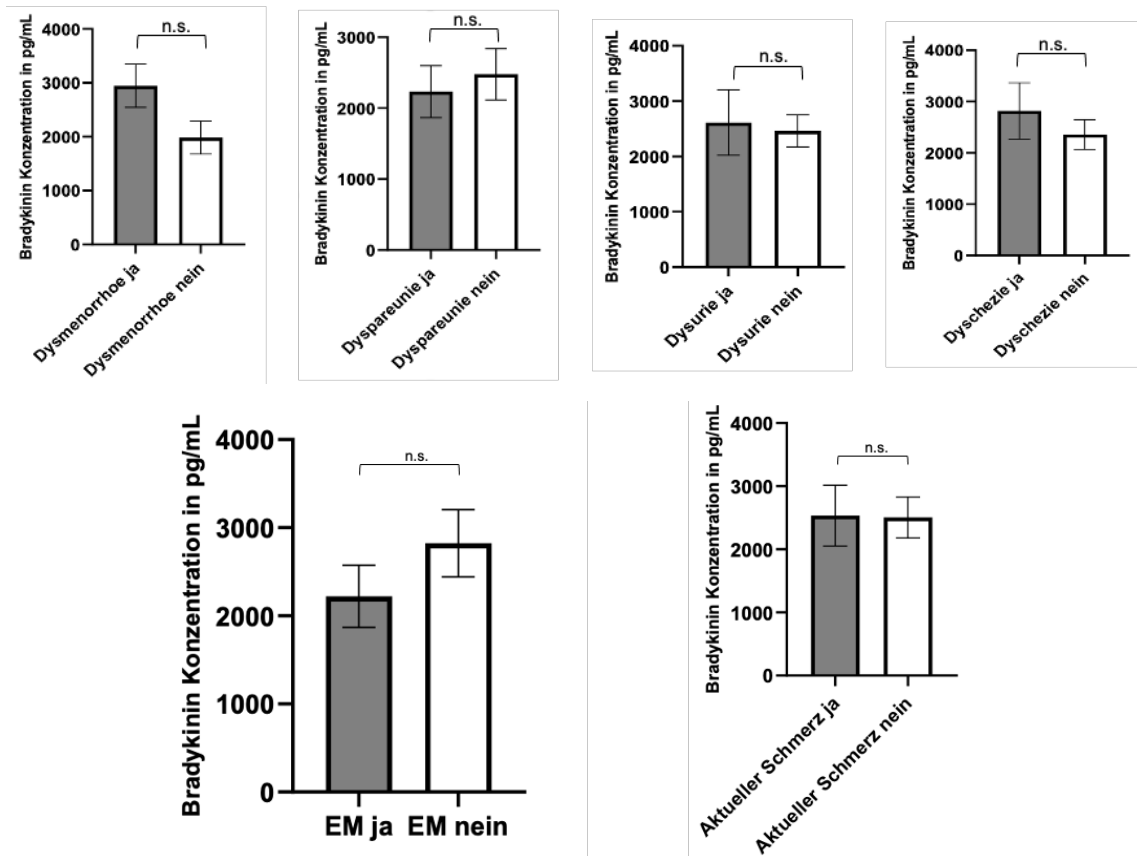


Abbildung 4.24: Darstellung der Mittelwerte von Bradykinin in Bezug auf die verschiedenen Schmerzmodalitäten, den aktuellen Schmerz und die Endometriose.

Die Diagramme stellen alle relevanten klinischen Schmerzsymptome (Dysmenorrhoe, Dyspareunie, Dysurie, Dyschezie, aktueller Schmerz), den aktuellen Schmerz und die Endometriose dar. Sie dienen zur Veranschaulichung der Mittelwerte in Abhängigkeit zur Patientengruppe und beinhalten Informationen zur Signifikanz. Es kann gezeigt werden, dass in keiner der vorliegenden Gruppen eine signifikante Korrelation in Bezug auf die durchschnittliche Bradykinin-Konzentration besteht.

Darüber hinaus erfolgte eine detaillierte statistische Analyse, wobei das Merkmal der Endometriose mit dem der Pilleneinnahme ergänzt wird (Tab. 4.8).

Tabelle 4.8 Statistische Auswertung der Bradykinin-Konzentrationen in den Mucusproben in den verschiedenen Patientengruppen

	EM ja	EM nein	EM ja Pille ja	EM ja Pille nein	EM nein Pille ja	EM nein Pille nein
Gruppe	A	B	C	D	E	F
n	56	46	28	28	23	23
MW [pg/mL]	2221	2823	2042	2401	1402	4245
SEM	354	381	429	570	365	528
SD	2650	2586	2270	3087	1748	6185
Median	33±6,7	28±7,5	32,5±7,5	34±5,9	26±8,5	29±6,3
(Spannweite)	(18-49)	(19-46)	18-49	22-44		21-43
P-Wert	n.s.	n.s.	C-F: 0,002	D-F: 0,0157	E-F: 0,0002	F-C: 0,002 F-D: 0,0002 F-E: 0,0157

n.s., nicht signifikant; MW, Mittelwert; SEM, Standardfehler; SD, Standardabweichung; P-Wert: Signifikanz $\leq 0,05$; Spannweite und Median beziehen sich auf das Alter der Probandinnen, Dysmen., Dysmenorrhoe; (n), Anzahl an Probandinnen; EM, Endometriose; Proteingehalt als Mittelwert, pg= Pikogramm, mL= Milliliter

Wie bereits erwähnt, kann bei den Patientinnen mit EM im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Korrelation ermittelt werden. Im Hinblick auf die Unterteilung in 4 Gruppen zeigte sich, dass die „Patientinnen ohne EM, ohne Pille“ im Vergleich zu den 3 anderen Gruppen signifikant höhere Werte haben.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass die Pilleneinnahme einen möglichen Einfluss auf die Bradykinin-Konzentration hat. Den Ergebnissen zu Folge ist die Bradykinin-Konzentration im endozervikalen Schleim unter Pilleneinnahme signifikant reduziert. In der Gruppe „Patientinnen ohne Pille, keine Dysmenorrhoe“ ist eine signifikant höhere Bradykinin-Konzentration als in der Gruppe der „Patientinnen mit Pille, keine Dysmenorrhoe“ nachweisbar. Da der Bradykinin-Gehalt mit der Pilleneinnahme korreliert, kann dies indirekt auf einen Zusammenhang mit dem Schmerz hinweisen. Der Schmerz unterliegt einer multimodalen Genese und wird von unterschiedlichsten Faktoren beeinflusst. Darüber hinaus können keine wegweisenden Korrelationen in Bezug auf die Endometriose erhoben werden. Jedoch wird unter der Mitbeurteilung der Pilleneinnahme ein signifikant höherer Bradykinin-Gehalt bei „Frauen ohne EM, ohne Pille“ im Vergleich zu den 3 anderen Gruppen ermittelt.

4.3 Analyse der Fragebögen zur Endometriose

Die Analyse der Endometriose-Fragebögen soll Informationen über die Schmerzmodalitäten und deren Prävalenzen liefern. Es werden verschiedene Merkmale betrachtet und miteinander verglichen. Dazu zählen die Schmerzlokalisationen und Schmerzformen, die Pilleneinnahme und die Erkrankung an Endometriose. Insgesamt werden 102 Fragebögen analysiert. Die Abbildung 4.25 veranschaulicht die Schmerzmodalitäten und Schmerzformen und zeigt deren Häufigkeitsverteilungen in Abhängigkeit zur Pilleneinnahme.

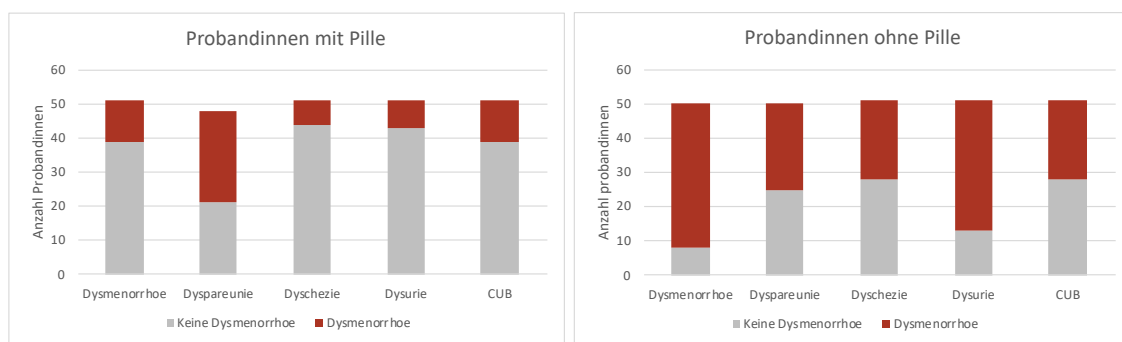


Abbildung 4.25: Patientinnen mit verschiedenen Schmerzmodalitäten in Bezug auf die Pilleneinnahme

Es kann quantitativ ermittelt werden, dass die Gruppe der Probandinne mit regelmäßiger Pilleneinnahme seltener Schmerzen während der Periode, während der Defäkation, und dem Wasserlassen äußern. Außerdem klagten sie seltener über chronische Unterbauchschmerzen. Bei der Dyspareunie lässt sich ein nur minimaler Unterschied zwischen den beiden Gruppen erheben (Abb. 4.25).

Die Analyse des neuropathischen Schmerzfragebogens *PainDetect* gibt wichtige Erkenntnisse über die spezifische Klassifizierung von Schmerzen und wurde ursprünglich für Patientinnen mit Rückenschmerzen angewandt. In dieser Studie erfolgte die Anwendung des *PainDetect* bei Endometriose-assoziierten Schmerzen und wurde somit von Frauen mit aktuellen oder in der Vergangenheit durchlebten Endometriose-assoziierten Schmerzen ausgefüllt. Somit werden von den 102 Endometriose-Fragebögen insgesamt 57 „PainDetect“-Fragebögen zur Ermittlung des neuropathischen Schmerzes in der Statistik analysiert. Bei den restlichen 45 Patientinnen lag kein Schmerz vor, womit folglich alle Werte bei null liegen. Es stellt sich die Frage, ob eine Zuordnung in

neuropathische, inflammatorische oder nozizeptive Schmerzen möglich ist oder ob es vielmehr ein Zusammenspiel aus allen Komponenten darstellt.

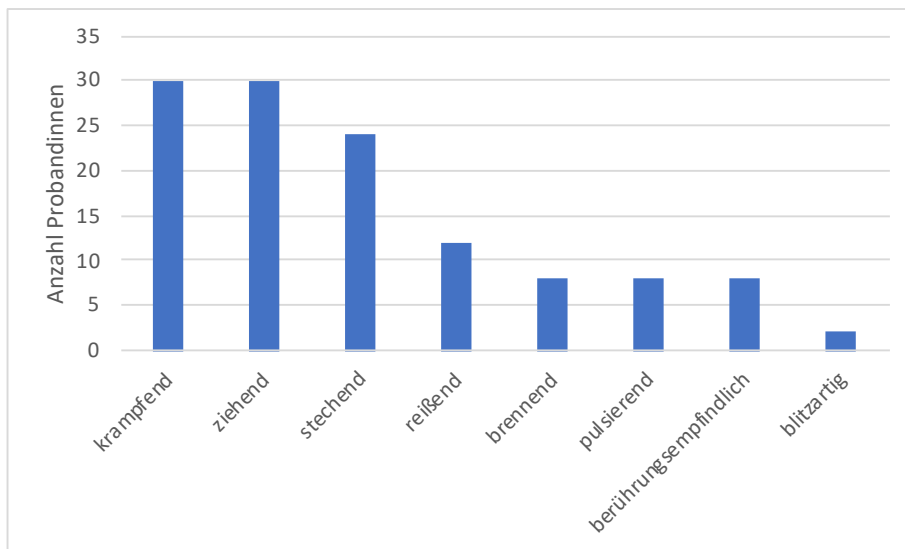


Abbildung 4.26: Absolute Häufigkeiten der verschiedenen Schmerzarten bei einer Gesamtzahl von 57 „PainDetect“- und Endometriose-Fragebögen.

Die Prävalenzen der verschiedenen Schmerzarten werden mit Hilfe eines Diagramms visuell dargestellt. Es wird gezeigt, dass die Frauen den Schmerz im Rahmen der Endometriose unabhängig von der Lokalisation sehr häufig als krampfend, stechend und ziehend bewerten (Abb. 4.26). Diese Art von Schmerzen werden in die Kategorie der nozizeptiven bzw. mechanischen Schmerzen eingeordnet. Die an Endometriose erkrankten Probandinnen beschreiben die Schmerzen sehr selten als typisch neuropathische Schmerzen wie brennend, kälte- und hitzeempfindlich, pulsierend, berührungsempfindlich oder blitzartig. Im Hinblick auf den *PainDetect* wird in der Gesamtauswertung bei keinem der 57 Patientinnen ein *Endscore* von über 19 erreicht. Folglich wird bei dem Screening bei keiner der Probandinnen die Diagnose eines vorliegenden neuropathischen Schmerzes gestellt. Bei 11 Patientinnen liegt der *Endscore* im unklaren Bereich zwischen 12 und 18 Punkten. Hier ist das Vorhandensein von neuropathischen Schmerzkomponenten unklar. Die restlichen 46 Probandinnen erzielten finale Punktwerte kleiner gleich 12, was auf keine neuropathischen Schmerzkomponenten hindeutet. Schlussfolgernd ist im Hinblick auf den *PainDetect* die neuropathische Schmerzkomponente bei den Endometriose-assoziierten Schmerzen nur sehr gering ausgeprägt.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die beiden Rezeptoren Bradykinin Typ 1 und Typ 2 im eutopen Endometrium von Frauen ohne Endometriose, mit dem der Frauen mit Endometriose verglichen. Es erfolgte die Analyse dieser beiden Gruppen mit der Adenomyose und den 3 Entitäten der ektopen endometriotischen Läsionen (TIE, PE, ovarielle Endometriose). Durch Untersuchungen von endozervikalen Proben konnte die lokale Konzentration des pro-inflammatorischen Hauptliganden Bradykinin der beiden Rezeptoren ermittelt werden. Die beiden Rezeptoren und das Bradykinin sind Teil des Kallikrein-Kinin-Systems und haben vielzählige Aufgaben (Costa-Neto *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurden insbesondere die inflammatorischen und algetischen Mechanismen berücksichtigt. Die analysierten EM-Fragebögen ermöglichten die Herstellung eines Bezugs zu den verschiedenen Schmerzarten, -intensitäten und -lokalisationen und beinhalten Informationen zu weiteren klinischen Fakten. Der *PainDetect* diente als Scoring System für den neuropathischen Schmerz. Dies ermöglichte einen Vergleich zwischen der Bradykinin-Konzentration und den Schmerzen bzw. anderen relevanten Faktoren wie bspw. der Pilleneinnahme. Ziel der aufgeführten Untersuchungen war es, die bereits formulierte Hypothese eines möglichen durch pro-inflammatorische Mediatoren eingeleiteten Schmerzpfad zu bekräftigen und so gegebenenfalls einen Schmerzmarker für den klinischen Gebrauch zu erheben.

5.1 Studienkohorte

In der Studie erfolgte die Untersuchung von Gewebe- und endozervikalen Proben von Probandinnen mit als auch ohne Endometriose. Insgesamt wurden 54 uterine Gewebeprobe untersucht, wobei davon 36 Frauen an einer Endometriose erkrankt waren und 18 Frauen keine Endometriose hatten. Davon litten 13 Patientinnen an einer Adenomyose. Als limitierender Faktor galt hier die Tatsache, dass die Gruppe der Frauen ohne Endometriose anderen gynäkologischen Erkrankungen (Myome, schwere Entzündungen, Tumore der Gebärmutter) unterlagen, die eine Hysterektomie indizierten. Sie waren demnach nicht vollständig gesund. Die drei Gruppen der endometriotischen Läsionen beinhalten 22 Proben der ovariellen Endometriose, 18 bzw. 17 Proben der peritonealen Läsionen und 28 bzw. 27 Proben der TIE. Betrachtete man das Alter der Frauen aus der Gruppe der ektopen EM-Läsionen im Vergleich zu dem der Endometrien,

wurde ersichtlich, dass eine Abweichung von etwa 10 Jahren zu erkennen war mit deutlich jüngeren Probandinnen in der Gruppe der EM-Läsionen. Grund hierfür ist, dass eine Hysterektomie im Rahmen einer EM erst mit fortgeschrittenem Alter und nach Abschluss der Familienplanung in Frage kommt.

In dieser Studie wurde das Material aus dem endozervikalen Kanal von insgesamt 102 Probandinnen untersucht. Dabei war bei 56 Probandinnen eine Endometriose diagnostiziert und die weiteren 46 Probandinnen waren bislang gesund. Hier galt als stark modulierende Komponente die häufig erst nach langem Krankheitsprozess durchgeführte invasive und sichere Diagnostik über eine Laparoskopie. Folglich bestand die Möglichkeit, dass Frauen mit aber auch ohne Dysmenorrhoe noch nicht ausreichend diagnostiziert waren und somit in die Kategorie der Probandinnen ohne EM zugeordnet wurden.

Der NAS-Score diente zur Einordnung der Schmerzintensitäten für die Probandinnen. Der Schmerz stellte eine subjektive Wahrnehmung dar und variierte stark in Abhängigkeit verschiedener Individuen. Somit unterlag der als statistischer Messwert herangezogene NAS-Score einer begrenzten Aussagekraft und Vergleichbarkeit.

Es konnten keine direkten und kausalen Verbindungen zwischen den Ergebnissen der Gewebeproben und der endozervikalen Proben bzw. den Schmerzfragebögen gestellt werden. Grund dafür war, dass wir bis zu diesem Zeitpunkt kaum Patientinnen in die Studie aufnehmen konnten, die zeitgleich den Fragebogen ausfüllten, eine gynäkologische Untersuchung mit Probenentnahme aus der Zervix und eine operative Entfernung von endometriotischen Läsionen oder eine Hysterektomie durchgeführt haben. Auch das Ausbleiben von wiederholten Messungen der endozervikalen Proben der Patientinnen im Verlauf, vor allem in Abhängigkeit des weiblichen Zyklus, stellte eine limitierende Komponente dar. Das Problem war die mögliche hormonell bedingte Modifikation der Proteinkonzentration in Abhängigkeit zum Zyklustag der Frau. Zusätzlich wäre eine Wiederholung des Schmerzfragebogens und der endozervikalen Proben vor und nach einer operativen Entfernung in Zukunft von großer Bedeutung. So könnten quantitative Veränderungen der Proteine nach einer Operation wegweisende Informationen liefern. Aus logistischen und koordinativen Gründen war eine detaillierte und weitergehende Erhebung von Proben und Daten der Patientinnen nicht möglich.

Daher musste bei dieser Arbeit mit einmaligen Proben gearbeitet werden, was die Erhebung eines Proteins mit möglichen kausalen Korrelationen zu den Schmerzmodalitäten oder der Endometriose deutlich erschwerte.

5.2 Bradykinin-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2

Das Kallikrein-Kinin-System wurde erstmals Anfang des 20. Jahrhunderts untersucht. Dabei zeigten Abelous und Bardier (1909) die blutdrucksenkende Komponente des menschlichen Urins. Auf Grund der Vielschichtigkeit dieses Systems weckte es großes Interesse bei den Wissenschaftlern und schaffte somit immer wieder neue Anreize für Forschungen (Moreau *et al.*, 2005). Dies resultierte in den Veröffentlichungen von vielen wissenschaftlichen Arbeiten. Die Bradykinin-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 sind essentielle Bestandteile dieses Systems und werden durch die Bindung von Bradykinin-Vorläufer-Peptide, Bradykinin und Kinin (Bradykinin bezogene Peptide) als wichtigste Liganden angesteuert und aktiviert (Bhoola *et al.*, 1992; Moreau *et al.*, 2005). Dabei handelt es sich um zwei G-protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die an eine Phospholipase C (PLC) geknüpft sind. Die Bindung der Liganden an die Rezeptoren führt zur Aktivierung der PLC und resultiert mit Hilfe von Inositol 1,4,5-triphosphat in einer Calciummobilisation. Somit werden weitere intrazelluläre Signalkaskaden induziert, die schlussendlich einen biologischen Effekt erzielen (Marceau und Regoli, 2004). Im humanen Genom befinden sich beide Rezeptoren clusterförmig im gleichen Genlokus auf Chromosom 14. Die B1 und B2 Rezeptoren präsentieren sich an der Oberfläche mit insgesamt 7 Transmembranstrukturen, die einen extrazellulären N-Terminus sowie einen intrazellulären C-Terminus besitzen. Der Unterschied dieser zwei Rezeptoren liegt in ihrem pharmakologischen Verhalten und in den Expressionsmerkmalen (Moreau *et al.*, 2005). Der humane Bradykinin-Rezeptor Typ 1 wird normalerweise nicht konstitutiv und auf keinem signifikanten Niveau in normalem Gewebe exprimiert. Die Expression wird vielmehr über verschiedene externe Faktoren, die im Rahmen einer Inflammation oder Gewebeschädigung verstärkt synthetisiert werden, reguliert. Mögliche pathologische Stimuli für eine Hochregulation sind Zytokine wie TNF α , IL-1 β und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). Diese aktivieren wiederum intrazelluläre Mechanismen wie die Proteinkinase C, ER-Kinase oder Tyrosin-Kinase die eine Hochregulation des Rezeptors bewirken (Calixto *et al.*, 2004). Es konnte bewiesen werden, dass die Kontrolle des BR1 Genareals über den Transkriptionsfaktor NF κ B reguliert wird (Ni *et al.*, 1998).

Es sind die gleichen Umgebungs- als auch Transkriptionsfaktoren für die Regulation verantwortlich, wie bei der induzierbaren COX-2 (Calixto *et al.*, 2004). Zusammenfassend wirken verschiedenste externe inflammatorische Faktoren und intrazelluläre Proteinkinasen bei der Regulation von BR1 mit. Eine Ausnahme in Bezug auf die nicht-konstitutive Expression stellt das zentrale Nervengewebe dar. Dort wird der Rezeptor konstitutiv exprimiert (Wotherspoon und Winter, 2000). Nachdem ein Agonist an BR1 gebunden hat, wird der Rezeptor weder phosphoryliert noch wird er über den endozytotischen Vorgang in die Zelle aufgenommen. Dies könnte der Grund für die fehlende Desensibilisierung darstellen (Marceau und Regoli, 2004). Der wichtigste und potenteste Agonist des humanen B1 Rezeptors ist Lys-des-Arg-BK, während der B2 Rezeptor effektiv von BK und Lys-BK (Kallidin) angesteuert wird (Menke *et al.*, 1994).

Der Bradykinin-Rezeptor Typ 2 unterliegt einer konstitutiven Expression und konnte in den meisten Gewebetypen, besonders im Gefäßendothel, in glatten Muskelzellen, Fibroblasten, mesangialen Zellen, Neuronen des Rückenmarks und Astrozyten identifiziert werden. Dennoch führt zum Beispiel IL-1 α zu einer Hochregulation von BR2 (Moreau *et al.*, 2005). In der Behandlung mit Agonisten kommt es schnell zu einer Desensibilisierung dieses Rezeptors, da dieser endozytotisch in die Zelle aufgenommen, abgebaut und erneut an der Oberfläche präsentiert wird (Bachvarov *et al.*, 2001).

5.3 Bradykinin

Bradykinin ist ein im Blut oder Gewebe zirkulierendes Oligopeptid und zählt zu den Gewebshormonen. Es entsteht im Rahmen einer über das Enzym Kallikrein katalysierten Abspaltungsreaktion aus dem Vorläufer Peptid Kininogen. Dieses Oligopeptid ist Teil des Kallikrein-Kinin-Systems und zählt in die Gruppe der Kinine, die als kurzlebige und sehr potente Mediatoren gelten (Golias *et al.*, 2007). Die Messung der Kinin Konzentrationen ist dennoch schwierig, da sie insbesondere parakrine Wirkmechanismen vermitteln und meist nur lokal erhöht sind. Grund dafür ist die schnelle Hydrolyse über eine Peptidyl-Dipeptidase, die über verschiedenste Enzyme wie Acetylcholinesterasen, Aminopeptidasen, und Carboxypeptidasen katalysiert wird. Bradykinin führt als Agonist an den Rezeptoren B1 und B2 in Abhängigkeit vom Gewebetyp zu typischen inflammatorischen Reaktionen, wie Schmerzen, Rötung, Schwellung und Überwärmung. Es wirkt stark vasoaktiv, indem die Stimulation von Gefäßendothelien über die

Freisetzung von NO und die Stimulation von glatten Muskelzellen über die Freisetzung von Prostaglandinen eine gesteigerte Permeabilität und Weitstellung mit Rötung und Überwärmung induziert. Eine direkte Stimulation über Rezeptoren an nicht-myelinisierten, afferenten Nervenendigungen kann Schmerzen an das ZNS übermitteln. Zudem initiieren diese eine Muskelkontraktion nach Bindung von Bradykinin (Prado *et al.*, 2002; Marceau und Regoli, 2004). Die häufigste Reaktion auf die im Blut zirkulierenden Bradykinin ähnlichen Peptide ist die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren wie beispielsweise Prostaglandin I₂, NO, Prostaglandin E₂, Zytokine (IL-1 β , IL-6), TNF α und Histamin (Dray und Perkins, 1993; Campos und Calixto, 1995).

5.4 Interpretation des Bradykinin-Rezeptor Typ 1 in den Endometrien und den ektopen endometriotischen Entitäten

In den ersten Schritten dieser Arbeit konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden, dass der B1 Rezeptor im Drüsenepithel des Endometriums und den ektopen EM-Läsionen exprimiert wird. Dabei lagen quantitativ signifikante Expressionsunterschiede vor. Im Hinblick auf die Proteinlokalisierung war der Bradykinin-Rezeptor Typ 1 in beiden Gruppen zytoplasmatisch mit Dominanz in den basalen und apikalen Bereichen vorhanden. Bisher gibt es keine Studien zur Expression von BR1 im humanen oder tierischen Gewebepreparaten des Uterus. Somit ist das Expressionsverhalten im uterinen Gewebe sowie im bereits erforschten Nervengewebe eine Ausnahme für die konstitutive Expression (Moreau *et al.*, 2005). Auch im Myometrium lag eine schwache, zytoplasmatische Positivität der glatten Muskelzellen vor, die jedoch nicht näher beurteilt wurde. Die quantitative Proteinexpression von BR1 in den ektopen EM-Läsionen ist signifikant höher als im endometrialen Drüsengewebe. Die Proteinlokalisierung dominierte neben den basalen und apikalen Zellpolen zusätzlich an den lateralen Bereichen. Das zytogene, endometriale Stroma unterlag häufig einer moderaten bis starken Positivität und teilweise war die „Wirtsumgebung“ mitgefärbt. In manchen Präparaten konnten vermehrt Ansammlungen von glatten Muskelzellen in der „Wirtsumgebung“ des endometriotischen Implantates nachgewiesen werden, die einer moderaten Expression von BR1 unterlagen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine Metaplasie von glatten Muskelzellen (SMM), die typischerweise bei oberflächlich peritonealen, aber auch bei ovariellen und tief infiltrierenden Läsionen vorkommen (Anaf, 2000; Kim *et al.*, 2015). Der nachgewiesene Bradykinin-Rezeptoren Typ 1 in den

SMM könnte in Folge einer Aktivierung die Kontraktionen der glatten Muskelzellen einleiten (Prado *et al.*, 2002) und durch die so induzierten Spannungen verantwortlich für Endometriose-assoziierte Schmerzen sein (de Arellano und Mechsner, 2014). Bislang gibt es keine Studien, die eine Rezeptorexpression von BR1 in den ektopen EM-Läsionen und der Umgebung untersucht haben, um diese Erkenntnisse zu stützen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass BR1 in vielen Organsystemen nicht konstitutiv oder nur auf einem sehr niedrigen Level exprimiert wird und insbesondere inflammatorische Prozesse oder Gewebeerkrankungen zur verstärkten Expression beitragen (Marceau *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 2005). Einer Studie zu Folge konnte rein quantitativ in nasalen Gewebeproben bei gesunden Patienten ein niedriges und konstitutives Expressionslevel der BR1 mRNA über eine real time-PCR nachgewiesen werden. Bei Patienten mit allergischer Rhinitis war das BR1 Level deutlich höher, was auf den inflammatorischen Prozess zurückzuführen sein könnte (Christiansen *et al.*, 2002). Auch im Nierengewebe erfolgte im Rahmen einer inflammatorischen Glomerulonephritis der Nachweis von BR1 und es wurde eine Assoziation zwischen der BR1 Expression und der Inflammation erhoben (Klein *et al.*, 2010). Folglich liegt eine Hochregulation unter entzündlichen Begebenheiten vor. Verschiedene Forschungsgruppen postulierten, dass die BR1 Rezeptorexpression durch die Exposition von Zytokinen (IL-1 β , TNF α), bakteriellen Endotoxinen oder im Rahmen einer Inflammation und Gewebeerkrankung stimuliert wird. Molekulare Mechanismen wie die MAP-Kinase, ERK, Proteinkinase C und Transkriptionsfaktoren leiteten die intrazellulären Signalkaskaden ein (Calixto *et al.*, 2004; Moreau *et al.*, 2005). In Bezug auf die Endometriose wurde in zahlreichen Studien bewiesen, dass diese Erkrankung einem inflammatorischen Prozess unterliegt und ständig inflammatorische Antworten produziert. In den peritonealen Flüssigkeiten von Frauen mit Endometriose konnten Erhöhungen von TNF α , IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1 im Vergleich zu den Frauen ohne EM ermittelt werden (Howard, 2009; Siedentopf, 2009). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass der *Nerve growth factor* (NGF) in den endometriotischen Implantaten stärker exprimiert wurde als in den eutopen Endometrien, was auf eine verstärkte Innervierung der Läsionen hindeutet (Anaf *et al.*, 2002). Dieses inflammatorische Milieu im Rahmen der Endometriose stellt eine mögliche Ursache für die Hochregulation des BR1 Rezeptors in den endometriotischen Implantaten dar. Die Aktivierung von BR1 induziert beispielsweise eine Akkumulation von Leukozyten in Mäusen (Pesquero *et al.*, 2000). So wird das inflammatorische Milieu weiter stimuliert und es entsteht ein *circulus vitiosus*. Solch eine Inflammation ist häufig mit akuten

Schmerzen verbunden, was einer physiologischen Reaktion entspricht. Folglich geht eine Chronifizierung der Inflammation auch mit einer Chronifizierung der Schmerzen einher (Howard, 2009) und der Rezeptor B1 nimmt als stimulierender Faktor des entzündlichen Milieus eine modulierende Rolle ein. Dieser Pathomechanismus bekräftigt die Hypothese der inflammatorischen Schmerzgenese. Weiterführend konnte in Tierstudien gezeigt werden, dass bei genmanipulierten Mäusen ohne B1 Rezeptor eine verminderte Schmerzwahrnehmung besteht. Bei der akut hervorgerufenen nozizeptiven Reizung der Neurone mit Hilfe von Capsaicin oder Formalin präsentierten sich diese Mäuse mit einer deutlichen Hypoalgesie (Pesquero *et al.*, 2000). Zudem wurde gezeigt, dass die direkte Injektion eines B1 Rezeptor Antagonisten in die Hinterläufe von Mäusen bei einem großen Teil (53%) den akuten nozizeptiven Schmerz inhibiert (Beirith *et al.*, 2003). Weiterführend könnte der B1 Rezeptor über eine Aktivierung von TRPV1 möglicherweise eine Schmerzeinleitung hervorrufen (Hamza *et al.*, 2010). Dennoch ist nicht klar, ob ein Kausalzusammenhang zwischen der Hochregulation dieses Rezeptors und der Einleitung des Schmerzes besteht. Was jedoch angenommen werden kann, ist, dass die verstärkte Expression von BR1 die Hypothese des inflammatorischen Milieus der endometriotischen Implantaten bekräftigt.

5.5 Interpretation des Bradykinin-Rezeptor Typ 2 in den Endometrien und den ektopen endometriotischen Entitäten

Der Bradykinin-Rezeptor Typ 2 wurde immunhistochemisch in der vorliegenden Arbeit in den epithelialen Drüsenzellen des uterinen Gewebes nachgewiesen. Die Proteinexpression war schwach bis moderat und konstant im endometrialen Drüsengewebe zu finden. Im Hinblick auf das Lokalisationsmuster war eine Ähnlichkeit zum BR1 zu erkennen und befand sich beim B2 Rezeptor ebenfalls zytoplasmatisch mit Fokus auf die basalen und apikalen Zellbereiche. Die Adenomyose präsentierte sich in Bezug auf das Lokalisationsmuster und die Proteinlokalisierung vergleichbar zum eutopen, endometriotischen Drüsengewebe. Bisher wurden einige Untersuchungen an uterinen Gewebeschnitten von Ratten durchgeführt, die besagen, dass der B2 Rezeptor im endometrialen Drüsengewebe als auch im endometrialen Stroma nachweisbar ist. Dabei unterliegt dieser zyklusabhängigen Expressionsvariationen, die über Östrogen und womöglich auch über Progesteron gesteuert werden (Figuroa *et al.*, 1997; Murone *et al.*, 1999). Auch im humanen uterinen Gewebe wird der Rezeptor B2 exprimiert und variiert

in Abhängigkeit zur Zyklusphase. Shams *et al.* (1996) postulierten, dass eine Zunahme der Expressionsdichte im humanen Endometrium von der frühen Proliferationsphase bis zur Sekretionsphase vorlag. In dieser Arbeit konnte keine signifikante Variation in der Expressionsstärke von BR2 in Bezug auf die Zyklusphase erhoben werden und auch die beschriebene Proteinlokalisierung im endometrialen Stroma des Uterus konnte nur in vereinzelten Präparaten nachgewiesen werden. Zusätzlich ist der B2 Rezeptor im Myometrium lokalisiert (Murone *et al.*, 1999), was in dieser Studie gleichermaßen ermittelt wurde, jedoch nicht von Interesse war. Die endometriotischen Implantate differierten im Vergleich zu den Endometrien im Hinblick auf die Proteinexpression. Es lag eine signifikant höhere Expressionsdichte in den EM-Läsionen vor und das Protein war zytoplasmatisch in allen Zellbereichen wesentlich stärker nachweisbar. Bisher gibt es keine stützenden Forschungsergebnisse zur Expression von BR2 in endometriotischen Implantaten.

Der Bradykinin-Rezeptor Typ 2 unterliegt einer konstitutiven Expression in nicht myelinisierten, afferenten Neuronen. Mit der Bindung des Liganden Bradykinin erfolgt eine direkte akute Schmerzantwort, die über eine Aktivierung der Proteinkinase C oder die Freisetzung von DAG (Diacylglycerol) initiiert wird (Moreau *et al.*, 2005). Ist der Rezeptor jedoch in glandulärem oder muskulärem Gewebe lokalisiert, wie beispielsweise in den endometriotischen Implantaten, ist keine direkte nozizeptive Schmerzleitung möglich. Vielmehr erfolgt diese dann über die Aktivierung des Rezeptors B2 mit darauffolgender Ausschüttung von verschiedenen pro-inflammatorischen Mediatoren, wie Zytokinen (IL-8, IL-1 β , TNF α) oder Prostaglandinen (PGE₂, PGI₂; Dray, 1997; Poole *et al.*, 1999), die wiederum an spezifischen Rezeptoren agieren und ein *downstream Signaling* initiieren. Darüber hinaus werden wiederum andere Rezeptoren wie zum Beispiel Glutamat-Rezeptoren, Natriumkanäle und transiente vanilloid Rezeptoren moduliert und führen zur Exzitation und Sensibilisierung von Nervenfasern mit Schmerzinduktion (Üçeyler *et al.*, 2009). Die Hochregulation von BR2 in den endometriotischen Implantaten auf Grund des inflammatorischen Milieus induziert über die verstärkte Synthese von entzündlichen Mediatoren eine Stimulation von Nervenendigungen. Einer Studie zu Folge kommt es nach der Einnistung von endometrialem Gewebe in ektopen Bereichen des Körpers zur Neuroangiogenese, was die sensible Versorgung mit Nervenfasern und die Stimulation dieser Dendriten durch die inflammatorischen Substanzen erklären könnte (Asante und Taylor, 2011)

5.6 Bradykinin in Bezug auf Inflammation und Hyperalgesie

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Pilleneinnahme bei Frauen mit als auch ohne Endometriose eine signifikante Reduktion des Bradykinin-Gehalts in den endozervikalen Proben im Vergleich zu den Frauen ohne Pilleneinnahme erzielte. Die Besonderheit dieser Untersuchung besteht in der Gewinnung der Proben. Die Ermittlung von Markern erfolgte nicht in Blutseren, sondern in endozervikalen Proben der Patientinnen. Der Vorteil dieser Probenanalyse ist, dass die Marker im inneren Genital der Frauen bestimmt werden und somit lokale Veränderungen stärker ins Gewicht fallen. Insbesondere bei der quantitativen Erhebung von Bradykinin mittels ELISA, welches vor allem parakrinen Wirkungsmechanismen unterliegt, ist die lokale Analyse sinnvoll.

Die „Langzeiteinnahmen“ von hormonellen Kontrazeptiva werden als essentielle Therapeutika bei Patientinnen mit Endometriose-assoziierten Schmerzen verwendet und erzielen eine signifikante Schmerzlinderung (Weisberg und Fraser, 2015). Somit steht die Reduktion der Bradykinin-Konzentration durch die Pille indirekt auch in Zusammenhang mit der Abnahme von Endometriose-assoziierten Schmerzen wie beispielsweise der Dysmenorrhoe. Meresman (2002) beobachtete, dass die Einnahme von oralen Kontrazeptiva für 30 Tage zu einer deutlichen Regression der Zellproliferation des eutopen Endometriums und des endometrialen, zytogenen Stromas führt. Dieser Effekt könnte die relevante Rolle von Bradykinin in der Schmerzpathogenese der EM bestärken. Im Hinblick auf die weitere Gruppenunterteilung nach der Dysmenorrhoe waren in der Kategorie der Frauen mit Pille keine großen Unterschiede zu finden. Grund dafür könnte ein möglicher modulierender Effekt von Kontrazeptiva auf die Bradykinin-Konzentration sein. In der Kategorie der Probandinnen ohne Pille wurde deutlich, dass die „Frauen ohne Dysmenorrhoe“ (n=9) einen wesentlich geringeren Bradykinin-Gehalt im Vergleich zu den „Frauen mit Dysmenorrhoe“ (n=42) aufweisen. Dennoch lag keine Signifikanz vor. Als limitierend galt hier die niedrige Zahl innerhalb der Kontrollgruppe von nur 9 Frauen ohne Dysmenorrhoe. Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise dafür, dass das Kallikrein-Kinin-System eine beeinflussende Wirkung auf Endometriose-assoziierten Schmerzen hat und durch die Einnahme von Kontrazeptiva moduliert wird. Die Vierfeldertafel ergab eine geringe Spezifität von 65 % und Sensitivität von 55% wodurch eine positive LR von 1,57 ermittelt wurde. Diese Gütekriterien sind zu schwach für eine Übertragung in den

klinischen Alltag. Dennoch wirkt Bradykinin unter vielen weiteren Mediatoren wahrscheinlich als modulierender Faktor in die Schmerzpathogenese der Endometriose ein. Es sind ergänzende Untersuchungen im Hinblick auf das Kallikrein-Kinin-System von großer Bedeutung.

Bedaiwy *et al.* (2002) suchten bereits nach Korrelationen zwischen pro-inflammatorischen Mediatoren (insgesamt 6 Zytokine und TNF α) im Serum bzw. in der peritonealen Flüssigkeit und der Endometriose. Ziel dabei war die Erhebung einer nicht-invasiven Screening Methode für die EM. Dabei stellte sich heraus, dass die IL-6 und TNF α Konzentration in direkter Korrelation zur EM standen. Als limitierend in dieser Studie galt die zu geringe Probandenzahl (Bedaiwy, 2002). Seeber *et al.* (2008) versuchten ein Screening Verfahren im Serum bestehend aus multiplen Proteinen zu generieren. Diese Kombination aus verschiedenen Markern resultierte bei 51% der Probandinnen in einer korrekten Diagnosestellung der EM und ist somit aussagekräftiger als die Erhebung einzelner Proteine. Trotz der Fülle an untersuchten Proteinen, gibt es bis heute keine valide, in die Klinik übertragbare und nicht-invasive diagnostische Marker für die Endometriose oder die Endometriose-assoziierten Schmerzen (Fassbender *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2020). Grund dafür sind die multiplen Faktoren, die in der Schmerzregulation bei der Endometriose mitwirken und die noch immer unklare Ätiologie dieser Erkrankung. Vermutlich liegt eine Kombination aus verschiedenen Schmerzmediatoren vor, die möglicherweise zyklusabhängigen Schwankungen unterliegen. Ziel weiterer Forschungen könnte die redundante Probeentnahme darstellen.

5.7 EM-Fragebögen und *PainDetect*

Mit Hilfe der EM-Fragebögen konnte quantitativ beobachtet werden, dass innerhalb der Gruppe der „Probandinnen mit Pilleneinnahme“ wesentlich seltener Endometriose-assoziierte Schmerzen auftreten. Dies wurde für die Dysmenorrhoe, Dysurie, Dyschezie und den chronischen Unterbauchschmerz nachgewiesen. Nur bei der Dyspareunie, die häufig durch eine tief infiltrierende Endometriose verursacht wird, erzielte die Einnahme der Kontrazeptiva keine Schmerzlinderung. Die Erkenntnis, dass die Kontrazeption zur Reduktion der Dysmenorrhoe führt, wird von Harada *et al.* (2008) bekräftigt.

Der *PainDetect* ist ein Screening Test und dient als Hilfestellung bei der Diagnose von neuropathischen Schmerzen und wurde primär für Rückenschmerzen generiert. In dieser Studie wurden die Patientinnen gebeten, diesen Test in Bezug auf die Endometriose-assoziierten Schmerzen auszufüllen. Bei den insgesamt 57 Probandinnen mit Schmerzen lag bei keinem Screening-Ergebnis der Hinweis auf eine neuropathische Schmerzkomponente mit über 90%iger Wahrscheinlichkeit vor. Bei 46 Probandinnen ist auf Grund des Endergebnisses die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines neuropathischen Schmerzes sehr gering (<15%), während bei 11 der Probandinnen ein unklares Ergebnis vorlag und somit keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. Dies gibt einen deutlichen Hinweis auf eine geringe neuropathische Schmerzkomponente im Rahmen der Endometriose-assoziierten Schmerzen. Somit sind primär die inflammatorischen, mechanischen und nozizeptiven Komponenten für die Schmerzentstehung mit verantwortlich. Im Übersichtsartikel von Howard (2009) werden verschiedene Manuskripte aufgeführt, die eine verstärkte Innervation von Endometrium, Myometrium und Peritoneum von Frauen mit EM postulieren. Dies könnte ein Hinweis auf eine periphere neuropathische Schmerzkomponente sein, jedoch fehlen weitere beweisende Untersuchungen.

Im Rahmen der Menses wird durch den starken Hormonabfall eine Apoptose, Nekrose und schlussendlich eine Abschuppung des stratum functionale des Endometriums induziert. Verschiedenste Immunzellen wie natürliche Killerzellen, Makrophagen und Neutrophile Granulozyten ermöglichen diesen Vorgang. Im Rahmen dieses Zelluntergangs, der sowohl innerhalb der Läsionen als auch im eutopen Endometrium stattfindet, werden verschiedene inflammatorische Mediatoren ausgeschüttet und in die peritoneale Flüssigkeit abgegeben (Laux-Biehlmann *et al.*, 2015). Die Immunantwort konnte in den Läsionen bereits mehrfach nachgewiesen werden und es zeigte sich eine Erhöhung der inflammatorischen Zytokine, der *Growth Factors*, der Neutrophile und Prostaglandine innerhalb der peritonealen Höhle von Frauen mit EM (Donnez *et al.*, 1998; Sacco *et al.*, 2012; Králíčková und Vetvicka, 2015). All diese Mediatoren sind bei Frauen mit Endometriose und chronischem UB Schmerz erhöht (Ryan *et al.*, 1995; Barcz *et al.*, 2000; Bedaiwy *et al.*, 2002; Scholl *et al.*, 2009) und haben die Fähigkeit, sensorische Nervenendigungen direkt zu aktivieren, was den inflammatorischen Mechanismus bei der EM als wichtige Rolle in der Schmerzentstehung deklariert (Wu *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2018). Im Hinblick auf diesen Mechanismus kann davon

ausgegangen werden, dass sowohl zu viel Schmerz als auch gar kein Schmerz während der Menses als pathologisch gewertet werden kann.

Die Forschungsgruppe Lee *et al.* (2010) versuchte die Wirkung von Prostaglandin E2 auf die endometriotischen Läsionen im Hinblick auf die Wachstumsstimulation und Modifikation der EM-Läsionen zu ermitteln. Hierfür wurden humane endometriotisch epitheliale und stromale Zellen *in vitro* herangezogen und selektiven PGE2 Inhibitoren ausgesetzt. Dies hatte zur Folge, dass die Zellproliferation in beiden Populationen blockiert wurde. Diese Studie erbrachte als erste einen direkten molekularen Bezug und stellt eine bedeutsame Option für nicht-östrogene und nicht-steroidale Therapieformen dar. Arosh *et al.* (2015) setzten die Forschungen an Prostaglandin E2 fort und postulierten, dass neben dem Wachstum der endometriotischen Läsionen zusätzlich andere Bereiche beeinflusst werden. Die Angiogenese und Innervation der endometriotischen Implantate werden gesenkt. Zudem wird das proinflammatorische und östrogenreiche Milieu der EM-Läsionen reduziert. In dem Review von Starzinski-Powitz (2001) wird beschrieben, dass diese ektopen Läsionen, egal ob durch Implantation oder Metaplasie entstanden, einer großen Plastizität unterliegen. In dieser fremden Umgebung entsteht dann der Phenotyp eines endometriotischen Herdes. Auch im Hinblick auf Bradykinin, wäre es von großer Bedeutung weitere *in vitro* Forschungen voranzutreiben, um Ausschau für ähnliche direkte molekulare Wirkungsmechanismen im Hinblick auf die Proliferation der endometriotischen Läsionen zu eruieren.

6 Zusammenfassung

Die Endometriose (EM) ist eine gynäkologische Erkrankung, die durch endometriotisches Gewebe außerhalb des Cavum Uteri gekennzeichnet ist. Als Leitsymptome gelten die Dysmenorrhoe, der chronische Unterbauchschmerz und die Infertilität. Nach aktueller Lage ist die Schmerzentstehung bei der Menstruation noch nicht vollständig geklärt. Fehlregulationen des nozizeptiven und neuropathischen Systems sowie inflammatorische Prozesse werden als relevante Mechanismen angesehen. In dieser Arbeit wurde versucht, an der Schmerzpathogenese beteiligte Proteine im Endometrium und den EM-Läsionen nachzuweisen. Dabei ließ sich immunhistochemisch eine signifikant erhöhte Expression der Bradykinin-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 in den endometriotischen Implantaten im Vergleich zu den uterinen Drüsenzellen nachweisen. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Hochregulation im Zusammenhang mit der Entstehung des Schmerzes steht. Einer der wichtigsten Liganden der beiden Rezeptoren ist das Bradykinin und wurde quantitativ mittels ELISA in endozervikalen Proben von insgesamt 102 Patientinnen untersucht. Als Informationsquelle wurde ein EM-Fragebogen herangezogen, der Symptome und klinische Fakten beinhaltet. Zwischen den Schmerzen und der Bradykinin-Konzentration konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Bemerkenswert war jedoch, dass die Einnahme von hormonellen Präparaten mit einer signifikanten Reduktion der Bradykinin-Konzentrationen in den Endozervikalproben korreliert. Da Hormone als effektive Schmerztherapie der EM angesehen werden, könnte dies darauf hinweisen, dass Bradykinin einen unterhaltenden Faktor in der Schmerzpathogenese darstellt. Die verschiedenen Schmerzvariablen der insgesamt 102 Fragebögen wurden ebenfalls analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Schmerzqualitäten krampfend und ziehend am häufigsten als beschreibend für EM-assoziierte Schmerzen herangezogen wurden. Dies spricht für eine mechanische bzw. Muskel-assoziierte Schmerzform. Zudem erfolgte die Analyse von 57 neuropathischen Schmerzfragebögen, die in Bezug auf die EM-assoziierten Schmerzen angewandt wurden. Dabei lag bei keiner Patientin in der Endauswertung ein Hinweis für einen nozizeptiven Schmerz vor. Die experimentellen Ergebnisse bekräftigen die Theorie, dass inflammatorische Prozesse einen unterhaltenden Stimulus in der Schmerzgenese einnehmen und motivieren zu weiteren Untersuchungen mit der Perspektive einer möglichen Targettherapie zur Schmerzlinderung.

7 Abstract

Endometriosis (EM) is a benign gynecological disease characterized by endometriotic tissue outside the cavum uteri. The main symptoms are dysmenorrhoe, infertility and chronic lower abdominal pain. According to the current scientific situation, the origin of menstrual pain isn't fully understood. Dysregulation of the nociceptive and neuropathic systems and inflammatory processes are considered relevant mechanisms. The aim of this study was to find receptors in the endometrium or endometriotic lesions, which are involved in the development of pain. Thereby, immunohistochemistry revealed a significantly increased expression of bradykinin receptor type 1 and type 2 in the endometriotic implants compared to the uterine glandular cells. This suggests that upregulation of bradykinin might be related to the development of pain. One of the most important ligands of these two receptors is bradykinin. This oligopeptid was examined quantitatively with ELISA in the endocervical samples of 102 patients. An important information source to the patients was a questionnaire that has been maintained since 2009 and includes symptoms and other clinical facts. No significant relationship was demonstrated between pain and bradykinin concentrations. However, it was noteworthy that the use of hormonal contraceptions caused a significant reduction in bradykinin concentrations in the endocervical samples. Because hormones are considered to be an effective pain treatment for EM, this may indicate that bradykinin is a maintaining factor in pain pathogenesis. The different pain variables of the total 102 questionnaires were also analyzed. It could be shown, that cramping and stabbing were the most common pain qualities describing endometriosis related pain. This suggests a mechanical or muscle-associated form of pain. In addition analysis of 57 neuropathic pain questionnaires applied to endometriosis-associated pain was performed. None of the patients showed evidence of nociceptive pain in the final evaluation. The experimental results reinforce the theory that inflammatory processes might be an important stimulus in pain genesis and motivate further investigations with the perspective of a possible target therapy for pain relief.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.....	Abbildung
ABC.....	<i>Avidin-Biotin-Complex</i>
ACID Kanäle.....	Acid sensible Ionenkanäle
AFS.....	<i>American Fertility Society</i>
altgr.....	Altgriechisch
ASRM.....	<i>classification of the American Society of Reproductive Medicine</i>
ANOVA.....	<i>analysis of variance</i>
ATP.....	Adenosintriphosphat
BR1.....	Bradykinin-Rezeptor Typ 1
BR2.....	Bradykinin-Rezeptor Typ 2
BSA.....	„Bovine Serum Albumin“
bsp.....	beispielsweise
bzw.....	beziehungsweise
C.....	Celsius
ca.....	circa
CGRP.....	<i>Calcitonin Gene related peptid</i>
cm.....	Zentimeter
COX1.....	Cyclooxygenase 1
CT.....	Computertomographie
CUB.....	chronischer Unterbauchschmerz
DAB.....	3,3' - Diaminobenzidin
DAG.....	Diacylglycerin
DIE.....	<i>Deep infiltrating Endometriosis</i>
DNA.....	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ELISA.....	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMT.....	<i>Epithelial mesenchymal Transition</i>
EM.....	Endometriose
ERK.....	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
etc.....	etcetera
g.....	Gramm
GnRH.....	<i>Gonadotropin-Releasing-Hormon</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

Abkürzungsverzeichnis

HRP.....	<i>Horseradish peroxidase</i>
IASP.....	<i>International Association for the study of pain</i>
ICD.....	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
i.v.....	intravenös
i.m.....	intramuskulär
IHC.....	Immunhistochemie
IL-6.....	Interleukin-6
IUP.....	Intrauterinpeessar, „Spirale“
Lig.....	Ligamentum
LPAR 1-3.....	<i>lysophosphatidic acid Rezeptor</i>
LSAB.....	<i>Labelled (Strept-)Avidin-Biotin</i>
LUNA.....	laparoskopische uterine Nervenablation
M.....	Mol
M.....	Musculus
MAPK.....	<i>Mitogen-activated protein Kinase</i>
MCP-1.....	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
Min.....	Minuten
ml.....	Milliliter
mm ³	Kubikmillimeter
MRKH.....	Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom
MRT.....	Magnetresonanztomographie
MUC-1.....	Mucin-1
NAS-Score.....	Numerische Analog Skala
nm.....	Nanometer
NGF.....	<i>Nerve growth factor</i>
NHL.....	Non-Hodgkin-Lymphom
NO.....	Stickstoffmonoxid
NPV.....	negativer Vorhersagewert
NRS.....	Numerische Rating-Skala
NSAR.....	Nichtsteroidale Antirheumatika
NSB.....	nicht spezifische Bindung
P2X ₃	Purinorezeptor
PBS.....	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion

Abkürzungsverzeichnis

PEDF.....	<i>Pigment epithelium-derived factor</i>
PGP9.5.....	<i>Protein Gene Product 9.5</i>
pg.....	pikogramm
PGE2.....	Prostaglandin-E 2
PGI2.....	Prostaglandin-I 2
PIC.....	Picoalylamin
PLL.....	Prolymphozyten
PPV.....	positiver Vorhersagewert
rASMR.....	<i>revised American Society of Reproductive Medicine</i>
Roc.....	<i>Receiver-Operating-Characteristics</i>
rpm.....	Revolutions per minute
RT.....	Raumtemperatur
s.c.....	subcutan
s.S.	siehe Seite
SEM.....	Standardfehler
SEN.....	Sensitivität
SMM.....	<i>Smooth Muscle Metaplasie</i>
SNP.....	<i>Single nucleotid Polymorphism</i>
sog.	sogenannte
SPE.....	Spezifität
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TMB.....	Tetramethylbenzidin
TNF1.....	Tumor Nekrose Faktor Alpha
TIAR.....	<i>Tissue injury and repair</i>
TIE.....	tief infiltrierende Endometriose
TRPV1.....	Transiente Rezeptor-Potential-Kationenkanal Subtyp 1
UKGM.....	Universitätsklinikum Gießen und Marburg
µl.....	Mikroliter
VAS.....	Visuelle Analog Skala
VEGF.....	<i>Vascular Endothelial Growth Factors</i>
WHO.....	<i>World Health Organization</i>
z.B.....	zum Beispiel
ZNS.....	zentrales Nervensystem

Abkürzungsverzeichnis

z.T.....zum Teil

X.....Konzentrationsverhältnis

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ABBILDUNG 1.1: FOTOGRAFIE VON EM-HERDEN WÄHREND EINER LAPAROSKOPISCHEN OPERATION. A: DARSTELLUNG VON MULTIPLER DUNKELROTER BIS SCHWARZER EM-HERDEN, LOKALISIERTE AUF DEM BAUCHFELDE ZWISCHEN UTERUS UND VESICAE. B: ÖFFNUNG EINER PRALLEN, BLÄULICH GEFÄRBTEN ENDOMETRIOTISCHEN ZYSTE, DADURCH TRIT KOAGULIERTES BLUT IN DIE BAUCHHÖHLE. C: ES SIND WEIÖE UND RÖTLICHE EM-HERDE AM ZWERCHFELDE ZU ERKENNEN, DIE MIT HITZE DESTRIERT WERDEN. D: DARSTELLUNG VON MULTIPLER SCHWARZER EM-HERDEN IM DOUGLASRAUM UND EINE DUNKELROTE LÄSION AUF DEM RECHTEN LIGAMENTUM SACROUTERINUM (QUELLE: HTTPS://WWW.WIKIWAND.COM/DE/ENDOMETRIOSE). EM, ENDOMETRIOSE.	3
ABBILDUNG 1.2: LOKALISATION DER EM-HERDE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER EINDRINGTIEFE MIT DIFFERENZIERUNG IN DIE OVARIELLE, OBERFLÄCHLICH PERITONEALE UND TIEF INFILTRIERENDE ENDOMETRIOSE (HORNE UND SAUNDERS, 2019).....	5
ABBILDUNG 1.3: DER RASRM GILT ALS WEIT VERBREITETES UND FÜR PATIENTEN EINFACH ZU VERSTEHENDES KLASSIFIKATIONSSYSTEM. ES WERDEN 4 VERSCHIEDENE KRANKHEITSTADIEN UNTERSCHIEDEN. DER ENZIAN-SCORE WURDE VON DER STIFTUNG FÜR ENDOMETRIOSE-FORSCHUNG ENTWICKELT. ER BEURTEILT DIE TIE UND DIENET SO ALS ERGÄNZUNG ZUM RASRM (QUELLE: HTTPS://WWW.ENDOMETRIOSE-SEF.DE/AKTIVITAETEN/KLASSIFIKATION-ENZIAN/).....	7
ABBILDUNG 1.4: VISUELLE DARSTELLUNG VERSCHIEDENER SCHMERZFORMEN BASIEREND AUF DEN UNTERSCHIEDLICHEN PATHOGENETISCHEN VORGÄNGEN (SCHAIBLE, 2019).	23
ABBILDUNG 3.1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER POLYMERBASIERTE UND ZWEISTUFIGE IHC METHODE.....	42
ABBILDUNG 3.2: ENDOMETRIUM EINER PATIENTIN MIT ENDOMETRIOSE IN DER SEKRETORISCHEN ZYKLUSPHASE. BEISPIELHAFTE NEGATIVKONTROLLE (STANDARDPROTOKOLL, JEDOCH OHNE VERWENDUNG EINES PRIMÄRANTIKÖRPERS). ES LIEGT KEINE BRAUNFÄRBUNG VOR UND DIE GEWEBESTRUKTUREN SIND DURCH DAS HÄMATOXYLIN BLÄULICH GEFÄRBT. (A) 200-FACHE, (B) 400-FACHE VERGRÖÖBERUNG	43
ABBILDUNG 3.3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERSCHIEDENEN REAKTIONEN IM RAHMEN EINES SANDWICH-ELISAS (IN ANLEHNUNG AN DIE SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PROTOKOLLS DER FIRMA ABCAM)	47
ABBILDUNG 4.1: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG MIT CGRP OHNE NACHWEIS EINER PROTEINLOKALISATION IN DEN UTERINEN GEWEBESCHNITTEN EINER PATIENTIN MIT ENDOMETRIOSE UND VORLIEGENDER ADENOMYOSE IN DER SEKRETORISCHEN ZYKLUSPHASE. SOWOHL IM ENDOMETRIUM ALS AUCH IM MYOMETRIUM SIND KEINE ZELLEN GEFÄRBT. (A) 200-FACHE [100 µM] VERGRÖÖBERUNG UND (B) 100-FACHE [500 µM] VERGRÖÖBERUNG.....	50
ABBILDUNG 4.2: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON LPAR1 IM UTERINEN DRÜSENGEWEBE EINER PATIENTIN OHNE ENDOMETRIOSE IN DER SEKRETORISCHEN ZYKLUSPHASE (A) UND EINER PATIENTIN MIT ENDOMETRIOSE IN DER PROLIFERATIVEN ZYKLUSPHASE (B). ES ZEIGT SICH EINE DIFFUSE FÄRBUNG DES ENDOMETRIUMS MEIST OHNE KLARE ABGRENZUNG ZWISCHEN DEN DRÜSENZELLEN UND DEM STROMALEN ENDOMETRIUM (PFEILE). DIE FARBINTENSITÄT DER DRÜSENZELLEN VARIERT SEHR STARK UND DIE LOKALISATION BEFINDET SICH MEIST DIFFUS ZYTOPLASMATISCH. ZUDEME KANN DAS PROTEIN IN GEFÄÖEN UND GLATTEN MUSKELZELLEN NACHGEWIESEN WERDEN (KREIS). (A) UND (B) 200-FACHE [100 µM] VERGRÖÖBERUNG.	51
ABBILDUNG 4.3: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON LPAR2 EINES UTERINEN GEWEBESCHNITTES EINER PATIENTIN OHNE ENDOMETRIOSE IN DER PROLIFERATORISCHEN ZYKLUSPHASE (A, B). DIE PROTEINLOKALISATION BEFINDET SICH STETS ZYTOPLASMATISCH IM ENDOMETRIALEN DRÜSENGEWEBE ALS AUCH VEREINZELT IM ENDOMETRIALEM STROMA. DIE POSITIVITÄT IST SEHR SCHWACH. (A) 100-FACHE [500 µM] UND (B) 300-FACHE [50 µM] VERGRÖÖBERUNG.....	52
ABBILDUNG 4.4: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON LPAR3 IN ZWEI VERSCHIEDENEN UTERINEN GEWEBESCHNITTEN BEI VORLIEGENDER ENDOMETRIOSE (A, B). INNERHALB EINIGER DRÜSEN IST DER NACHWEIS	

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

VON LPAR3 IN VEREINZELTEN ZELLEN MIT INTENSIVER FÄRBUNG ZU ERHEBEN (KREIS). DIE FÄRBUNG BEFINDET SICH ZYTOPLASMATISCH MIT STÄRKSTER AUSPRÄGUNG IM PERINUKLEÄREN BEREICH. DER GRÖßTE TEIL DER ENDOMETRIALEN DRÜSENZELLEN UNTERLIEGT JEDOCH KEINER POSITIVITÄT. DAS ENDOMETRIALE STROMA IST NICHT GEFÄRBT. (A) UND (B) 200-FACHE [100 µM] VERGRÖßERUNG.	52
ABBILDUNG 4.5: IMMUNHISTOLOGISCHER NACHWEIS VON BR1 AN EINEM UTERINEN GEWEBESCHNITT EINER PATIENTIN OHNE ENDOMETRIOSE IN DER SEKRETORISCHEN ZYKLUSPHASE. DIE FÄRBUNG IST HOMOGEN IN FAST ALLEN ENDOMETRIALEN DRÜSENZELLEN (PFEILKOPF) UND IN ALLEN EPITHELIALEN LUMINALZELLEN (PFEIL) NACHZUWEISEN. DAS ENDOMETRIALE STROMA WIRD SCHWACH BIS NICHT ANGEFÄRBT (STERN) UND DIE FARBINTENSITÄT NIMMT VON LUMINAL NACH MYOMETRIAL AB (DOPPELPFEIL). (A) 200-FACHE [100 µM], (B) 300-FACHE [50 µM] UND (C) 100-FACHE VERGRÖßERUNG [500 µM]. (D) ALS AUSSCHNITTSVERGRÖßERUNG AUS (C). ..	54
ABBILDUNG 4.6: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON BR1 AN EINEM UTERINEN GEWEBESCHNITT (A) EINER PATIENTIN OHNE ENDOMETRIOSE IN DER SEKRETORISCHEN ZYKLUSPHASE UND (B) AN EINEM UTERINEN GEWEBESCHNITTES EINER PATIENTIN OHNE ENDOMETRIOSE IN DER PROLIFERATIVEN ZYKLUSPHASE. BEI BEIDEN PROBEN ZEIGEN SICH STARK GEFÄRBT ZELLEN, DIE DIFFUS VERTEILT IN DEN ENDOMETRIALEN DRÜSENZELLEN (KREIS) VORKOMMEN. (A) UND (B) 200-FACHE [100 µM] VERGRÖßERUNG.....	55
ABBILDUNG 4.7: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DES BRADYKININ-REZEPTORS TYP 1 AN EINEM UTERINEN GEWEBESCHNITTES EINER PATIENTIN MIT ENDOMETRIOSE UND ADENOMYOSE IN DER SEKRETORISCHEN ZYKLUSPHASE. (A) ÜBERGANG VOM ENDOMETRIUM IN DAS DARUNTER LIEGENDE MYOMETRIUM (DOPPELPFEIL). DIE IM MYOMETRIUM EINGEBETTETE DRÜSE BESTÄTIGT DIE DIAGNOSE EINER AM (SCHWARZER KREIS). (B) DAS GEFÄßENDOTHEL (PFEILKOPF) UND DIE LÄNGS ANGESCHNITTENEN GLATTEN MUSKELZELLEN (PFEILE) SIND ZYTOPLASMATISCH SCHWACH GEFÄRBT. DIE EKTOP DRÜSE WIRD VON DICHT GEPACKTEM ZYTOGENEM STROMA UMRÄHMT (PFEILSPITZEN) (C) INHOMOGENE, ZYTOPLASMATISCHE FÄRBUNG DER QUER ANGESCHNITTENEN GLATTEN MUSKELZELLEN (PFEIL). (A) 100-FACHE [50 µM], (B) UND (C) 200-FACHE [100 µM] VERGRÖßERUNG. .	56
ABBILDUNG 4.8: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON BR1 AN EINER OVARIELLEN ZYSTE MIT MULTIFOKALEN EM-HERDEN. NACHWEIS DER STARK ZYTOPLASMATISCHEN FÄRBUNG DER EKTOPEN ENDOMETRIALEN DRÜSENZELLEN (PFEIL) SOWIE DER INHOMOGENEN UND SCHWACH ZYTOPLASMATISCHEN FÄRBUNG DES ZYTOGENEN, ENDOMETRIALEN STROMAS (STERN). (A) 100-FACHE [500µM] UND (B) 200-FACHE [100µM] VERGRÖßERUNG.....	57
ABBILDUNG 4.9: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON BR1 AN MULTIPLER PERITONEALEN EM-LÄSION IM LIG. SACROUTERINUM EINER PROBANDIN. (A) DIE INSGESAMT 5 EKTOPEN DRÜSENHERDE BEFINDEN SICH NAHE AN DER OBERFLÄCHE. ZWEI DAVON STELLEN SICH IN FORM VON INTAKTEN DRÜSEN DAR, WÄHREND DREI NUR ALS DRÜSENRESTE ZU ERKENNEN SIND (PFEILE). ZUSÄTZLICH SIND IN DEM PRÄPARAT EINBLUTUNGEN LOKALISIERT (PFEILKOPF). (B) DIE KUBISCHEN EPITHELZELLEN SIND STARK ZYTOPLASMATISCH GEFÄRBT (LANGER PFEIL). DAS ENDOMETRIALE STROMA BERUHT AUF EINER SCHWACHEN FÄRBUNG, DIE AUF WENIGE ZELLEN BESCHRÄNKT IST UND ES VERLÄUFT STRANGARTIG NACH UNTEN AUS (KURZE PFEILE). DIE EM-LÄSIONEN SIND UMGEBEN VON BÜNDELARTIG UND DICHT GEPACKTEN GLATTEN MUSKELZELLEN, DIE EINE HOMOGENE UND MODERATE ZYTOPLASMATISCHE POSITIVITÄT AUFWEISEN (PFEILKOPF). (A) 100-FACHE [500 µM] UND (B) 200-FACHE [100 µM] VERGRÖßERUNG.....	58
ABBILDUNG 4.10: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON BR1 AN MULTIPLER TIEF INFILTRIERENDEN LÄSIONEN (PFEILE) INNERHALB DER BLASENUMSCHLAGSFALTE NEBEN MULTIPLER ANDEREN EM-FOCI. (A) INSGESAMT SIND ETWA 6 VERSTREUTE DRÜSENHERDE AUSZUMACHEN. IN DER DIREKTEN UMGEBUNG DER DRÜSEN LIEGT EINE DEUTLICHE POSITIVITÄT DES „WIRTSGEWEBES“ VOR. (B) ES FINDET SICH EINE STARKE ZYTOPLASMATISCHE FÄRBUNG DES KUBISCHEN DRÜSEN-EPITHEL (PFEILE), WELCHES IN LOCKERES UND ZYTOPLASMATISCH SCHWACH GEFÄRBTES ZYTOGENES, ENDOMETRIALES STROMA EINGEBETTET IST (STERN). (A) 100-FACHE [500 µM] UND (B) 200-FACHE [100 µM] VERGRÖßERUNG.	59

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<p>ABBILDUNG 4.11: (A) IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON BR1 AN EINEM UTERINEN GEWEBESCHNITT IN DER PROLIFERATIVEN ZYKLUSPHASE. DIE PROTEINLOKALISATION LÄSST SICH SCHWACH ZYTOPLASMATISCH MIT BASALER UND LUMINALER DOMINANZ NACHWEISEN (PFEILE). (B) IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON BR1 IN EINER PERITONEALEN EM-LÄSION IM SPATIO RECTOVAGINALE DER GLEICHEN PATIENTIN WIE IN (A). DIE EKTOPEN, ENDOMETRIOTISCHEN DRÜSENZELLEN SIND HOMOGEN UND STARK ZYTOPLASMATISCH MIT BASALER, APIKALER UND LATERALER DOMINANZ GEFÄRBT (PFEIL). (A) 200-FACHE [100 µM] VERGRÖßERUNG, (B) AUSSCHNITTVERGRÖßERUNG AUS EINER 100-FACHEN VERGRÖßERUNG.</p>	59
<p>ABBILDUNG 4.12: WHISKER-PLOT ZUR VERANSCHAULICHUNG DER QUANTITATIVEN REZEPTOREXPRESSION VON BR1 IN DEN VERSCHIEDENEN GEWEBETYPEN. TIE, TIEF INFILTRIERENDE ENDOMETRIOSE; PE, PERITONEALE ENDOMETRIOSE.....</p>	63
<p>ABBILDUNG 4.13: (A) UND (B): IMMUNHISTOLOGISCHER NACHWEIS VON BR2 IM UTERINEN GEWEBESCHNITT BEI BEKANNTER ENDOMETRIOSE IN DER PROLIFERATIVEN ZYKLUSPHASE. DAS DRÜSENGEWEBE (PFEILE) WEIST EINE BASALE UND LUMINALE FÄRBUNG AUF. DAS ENDOMETRIALE STROMA IST SEHR SCHWACH BIS NICHT ZYTOPLASMATISCH GEFÄRBT (STERN). INNERHALB DES DRÜSEN LUMENS BEFINDEN SICH ABLAGERUNGEN (PFEILKOPF). (C) UND (D): IMMUNHISTOLOGISCHER NACHWEIS VON BR2 IM UTERINEN GEWEBESCHNITT EINER GESUNDEN PATIENTIN IN DER PROLIFERATIVEN ZYKLUSPHASE. DIE LUMINALEN EPITHELZELLEN SIND ZYTOPLASMATISCH GEFÄRBT, MIT BASALER UND LUMINALER BETONUNG (PFEILE). (A) 200-FACHE [100 µM], (B) 400-FACHE [50 µM], (C) 100-FACHE [500 µM] VERGRÖßERUNG UND (D) ALS AUSSCHNITTVERGRÖßERUNG AUS (C).</p>	65
<p>ABBILDUNG 4.14: (A) IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON BR2 EINES UTERINEN GEWEBESCHNITTES EINER PATIENTIN MIT ENDOMETRIOSE BEI RUHENDER ZYKLUSPHASE. IM GEFÄßENDOTHEL (SCHWARZER KREIS) LÄSST SICH DAS PROTEIN STELLENWEISE ZYTOPLASMATISCH LOKALISIEREN. IN DIESEM PRÄPARAT SIND GELEGENTLICH GEFÄßLUMINA MIT BLUTRESTEN GEFÜLLT (PFEILKOPF). (B) IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON BR2 AN EINEM UTERINEN PRÄPARAT BEI ENDOMETRIOSE IN DER SEKRETORISCHEN ZYKLUSPHASE. DIE GLATTEN MUSKELZELLEN (PFEIL) SIND STELLENWEISE LEICHT ZYTOPLASMATISCH GEFÄRBT. (A) UND (B) 200-FACHE [100 µM] VERGRÖßERUNG.....</p>	66
<p>ABBILDUNG 4.15 (A) UND (B): REPRÄSENTATIVER IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON BR2 IN EINER OVARIELLEN LÄSION INNERHALB EINES ZYSTISCHEN OVARS LINKS. ES ZEIGT SICH EIN AUSGEPRÄGTER BEFALL DES ZYSTENBALGS MIT STARK AUFGEWEITETEN ENDOMETRIALEN DRÜSEN (PFEILE). AUCH DAS ZYTOGENE ENDOMETRIALE STROMA UND DER ANGRENZENDE OVARIELLE KORTX WEIST EINE ZYTOPLASMATISCHE POSITIVITÄT AUF (STERNE). (A) 200-FACHE [100 µM] UND (B) 400-FACHE [50 µM] VERGRÖßERUNG.....</p>	67
<p>ABBILDUNG 4.16: (A) UND (B): IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON BR2 IN EINER OBERFLÄCHLICHEN PERITONEALEN LÄSION DES PERITONEUMS. (B) DIE DRÜSEN SIND MEIST STARK APIKAL, BASAL UND LATERAL GEFÄRBT (PFEIL). IN DEN LUMINA DER DRÜSEN SIND INHOMOGENE ABLAGERUNGEN ZU ERKENNEN (SCHWARZER KREIS). DAS UMGEBENDE ZYTOGENE ENDOMETRIALE STROMA IST PARTIELL LEICHT ODER NICHT GEFÄRBT UND KOMMT SOWOHL DICHT GELAGERT (STERN) ALS AUCH LOCKER ANLIEGEND (DREIECK) VOR. (A) DIE UMLIEGENDE „WIRTSUMGEBUNG“ UNTERLIEGT KEINER POSITIVITÄT. DIE FETTZELLEN (SCHWARZER KREIS) VERTEILEN SICH ÜBER DAS GANZE PERITONEUM. (A) 100-FACHE [500 µM] UND (B) 200-FACHE [100 µM] VERGRÖßERUNG.</p>	68
<p>ABBILDUNG 4.17: (A) UND (B): TIEF INFILTRIERENDE LÄSIONEN IM LIG. SACROUTERINUM MIT BR2 ANTIKÖRPERN IMMUNHISTOCHEMISCH NACHGEWIESEN. ES ZEIGEN SICH STARK GEFÄRBT TIEF INFILTRIERENDE ENDOMETRIOTISCHE DRÜSEN (PFEIL), DIE VON MODERAT GEFÄRBTEM ZYTOGENEM STROMA UMGEBEN SIND (STERN). DIE DRÜSEN SIND ZYSTISCH DILATIERT UND IM LUMEN KOMMEN MULTIPLE EINBLUTUNGEN VOR (PFEILKOPF). (A) 100-FACHE [500 µM] UND (B) 200-FACHE [100 µM] VERGRÖßERUNG.</p>	69
<p>ABBILDUNG 4.18: (A) UND (B): IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON BR2 EINES UTERINEN PRÄPARATES BEI EINER PATIENTIN MIT ENDOMETRIOSE IN DER PROLIFERATIVEN ZYKLUSPHASE. DIE DRÜSENZELLEN SIND VOLLSTÄNDIG</p>	

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

SCHWACH BIS MODERAT IM BASALEN UND LUMINALEN ZELLBEREICH GEFÄRBT (PFEIL). DAS ZYTOGENE ENDOMETRIALE STROMA IST NICHT BIS SCHWACH GEFÄRBT (STERN). (A) 100-FACHE [500 µM] UND (B) 200-FACHE [100 µM] VERGRÖßERUNG.....	69
ABBILDUNG 4.19: WHISKER-PLOT ZUR VERANSCHAULICHUNG DER REZEPTOREXPRESSION VON BR2 IN DEN VERSCHIEDENEN GEWEBETYPEN. TIE, TIEF INFILTRIERENDE ENDOMETRIOSE; PE, PERITONEALE ENDOMETRIOSE .73	73
ABBILDUNG 4.20: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON BRADYKININ IN VIER VERSCHIEDENEN GEWEBESCHNITTEN VON FRAUEN MIT ENDOMETRIOSE (A, B), ALS AUCH VON FRAUEN OHNE ENDOMETRIOSE (C,D). IN DEN VIER SCHNITTBILDERN, DIE ALS REPRÄSENTATIVE AUSWAHL VISUELL ZUR DARSTELLUNG KOMMEN, ZEIGT SICH KEINE KONSTANTE BZW. WIEDERKEHRENDE PROTEINLOKALISATION. DER NACHWEIS VON BRADYKININ VARIERT STARK UND BEFINDET SICH SOWOHL IN DEN DRÜSEN ALS AUCH IM UMLIEGENDEN ENDOMETRIALEN STROMALEN GEWEBE. ZUDEM BEFINDET SICH DIE PROTEINLOKALISATION DIFFUS ZYTOPLASMATISCH UND DIE FARBINTENSITÄTEN DIFFERIEREN VON SEHR SCHWACH BIS STARK. (A), (B), (C) 200-FACHE [100 µM] UND (D) 400-FACHE [50 µM] VERGRÖßERUNG.....	74
ABBILDUNG 4.21: BRADYKININ-KONZENTRATION [pg/mL] IN DEN ENDOZERVIKALEN PROBEN IN ABHÄNGIGKEIT ZUR PILLENEINNAHME	76
ABBILDUNG 4.22: MITTELWERTE DER BRADYKININ-KONZENTRATIONEN IN DEN ENDOZERVIKALEN PROBEN IN DEN 4 VERSCHIEDENEN PATIENTENGRUPPEN	78
ABBILDUNG 4.23: ROC-KURVE ZUR ERMITTLUNG DES GRENZWERTES DER BRADYKININ-KONZENTRATION. DIESER WIRD BEI EINER KONZENTRATION VON 1774 pg/mL GESETZT.....	79
ABBILDUNG 4.24: DARSTELLUNG DER MITTELWERTE VON BRADYKININ IN BEZUG AUF DIE VERSCHIEDENEN SCHMERZMODALITÄTEN, DEN AKTUELLEN SCHMERZ UND DIE ENDOMETRIOSE.	81
ABBILDUNG 4.25: PATIENTINNEN MIT VERSCHIEDENEN SCHMERZMODALITÄTEN IN BEZUG AUF DIE PILLENEINNAHME ..	83
ABBILDUNG 4.26: ABSOLUTE HÄUFIGKEITEN DER VERSCHIEDENEN SCHMERZARTEN BEI EINER GESAMTZAHL VON 57 „PAINDETECT“- UND ENDOMETRIOSE-FRAGEBÖGEN.	84
TABELLE 1.1: AKTIVE UND INAKTIVE MAKROSKOPISCHE ERSCHEINUNGSFORMEN DER PERITONEALEN UND OVARIELLEN ENDOMETRIOSE (SCHINDLER, 2007)	2
TABELLE 1.2: LOKALISATION DER ENDOMETRIOSIS GENITALIS EXTERNA MIT DEN JEWELIGEN HÄUFIGKEITSANGABEN IN PROZENT (HERTLEIN <i>ET AL.</i> , 2012).....	4
TABELLE 1.3: LEITSYMPTOME DER ENDOMETRIOSE (SCHINDLER, 2007).....	15
TABELLE 3.1: ÜBERBLICK DER KOHORTE ZUR IMMUNHISTOCHEMISCHEN ANALYSE VON BR1 UND BR2	30
TABELLE 3.2: KOHORTE DER MIT BR1 UND BR2 ZU ANALYSIERENDEN GEWEBESCHNITTE	31
TABELLE 3.3: ÜBERBLICK DER KOHORTEN ZUR QUANTITATIVEN ANALYSE DER BRADYKININ-KONZENTRATION MITTELS SANDWICH-ELISA	32
TABELLE 3.4: KOHORTE DER PATIENTINNEN MIT SCHMERZFRAGEBOGEN UND <i>PAINDETECT</i>	33
TABELLE 3.5: LISTE ALLER GETESTETEN PRIMÄRANTIKÖRPER, WELCHE NICHT ALS SERIENUNTERSUCHUNG AN MENSCHLICHEM GEWEBE VERWENDET WURDEN	35
TABELLE 3.6: IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE DER KOHORTE MIT DEN BEIDEN PRIMÄRANTIKÖRPERN BR1 UND BR2	36
TABELLE 3.7: LISTE DER SEKUNDÄRANTIKÖRPER	36
TABELLE 3.8: AUFLISTUNG ALLER CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL IM RAHMEN DIESER STUDIE.....	37
TABELLE 3.9: AUFLISTUNG ALLER GERÄTE UND COMPUTERPROGRAMME IM RAHMEN DIESER STUDIE	38
TABELLE 3.10.: PROTOKOLL FÜR PARAFFINSCHNITTE MIT DEM EINBETTUNGSGERÄT LEICA TP1050.....	40
TABELLE 3.11: PROTOKOLL ZUR ENTPARAFFINIERUNG UND REHYDRIERUNG DER GEWEBESCHNITTE	43
TABELLE 3.12: PROTOKOLL DER UMGEKEHRTEN ENTPARAFFINIERUNG, DEHYDRIERUNG UND EINDECKUNG DER GEWEBESCHNITTE.....	45

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

TABELLE 3.13: EINTEILUNG DER FARBINTENSITÄT MIT HILFE DES H-SCORES.....	45
TABELLE 4.1: STATISTISCHE AUSWERTUNG DES IMMUNHISTOCHEMISCHEN NACHWEISES VON BR1 AN UTERINEN GEWEBESCHNITTEN IN DEN VERSCHIEDENEN ZYKLUSPHASEN	61
TABELLE 4.2.: STATISTISCHE AUSWERTUNG DES IMMUNHISTOCHEMISCHEN NACHWEISES VON BR1 IN DEN ENDOMETRIEN UND DEN VERSCHIEDENEN LÄSIONSLOKALISATIONEN	62
TABELLE 4.3: STATISTISCHE AUSWERTUNG DES IMMUNHISTOCHEMISCHEN NACHWEISES VON BR2 IN BEZUG AUF DIE VERSCHIEDENEN ZYKLUSPHASEN DER UTERINEN GEWEBESCHNITTE	71
TABELLE 4.4: STATISTISCHE AUSWERTUNG DES IMMUNHISTOCHEMISCHEN NACHWEISES VON BRADYKININ-REZEPTOR TYP 2 IN DEN ENDOMETRIEN UND DEN VERSCHIEDENEN LÄSIONEN	72
TABELLE 4.5: STATISTISCHE AUSWERTUNG DER BRADYKININ-KONZENTRATIONEN IN DEN ENDOZERVIKALEN PROBEN IN BEZUG AUF ZWEI PATIENTENGRUPPEN	75
TABELLE 4.6: STATISTISCHE DARSTELLUNG DER BRADYKININ-KONZENTRATIONEN IN DEN MUCUSPROBEN DER VERSCHIEDENEN PATIENTENGRUPPEN	77
TABELLE 4.7: 4-FELDER TEST ZUR ERHEBUNG KLINISCH RELEVANTER FAKTOREN	80
TABELLE 4.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER BRADYKININ-KONZENTRATIONEN IN DEN MUCUSPROBEN IN DEN VERSCHIEDENEN PATIENTENGRUPPEN	82

10 Literaturverzeichnis

Abbott, J. A., Hawe, J., Clayton, R.D., Garry, R., (2003): The effects and effectiveness of laparoscopic excision of endometriosis: a prospective study with 2-5 year follow-up. *Human reproduction*. 18(9), 1922–1927.

Abelous JE., Bardier E., (1909): Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *Comptes rendus des seances de la societe de biologie et de ses filiales*. 66, 511–520.

Agic, A., Xu, H., Finas, D., Banz, C., Diedrich, K., Hornung, D., (2006): Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? *Gynecologic and obstetric investigation*. 62(3), 139–147.

Anaf, V., (2000): Smooth muscles are frequent components of endometriotic lesions. *Human reproduction*. 15(4), 767–771.

Anaf, V., Simon, P., El Nakadi, I., Fayt, I., Simonart, T., Buxant, F., Noel, J.-C., (2002): Hyperalgesia, nerve infiltration and nerve growth factor expression in deep adenomyotic nodules, peritoneal and ovarian endometriosis. *Human reproduction*. 17(7), 1895–1900.

Anaf, V., Chapron, C., Elnakadi, I., Demoor, V., Simonart, T., Noel, J., (2006): Pain, mast cells, and nerves in peritoneal, ovarian, and deep infiltrating endometriosis. *Fertility and sterility*. 86(5), 1336–1343.

Anglesio, M.S., Papadopoulos, N., Ayhan, A., Nazeran, T.M., Noë, M., Horlings, H.M., Lum, A., Jones, S., Senz, J., Seckin, T., Ho, J., Wu, R.-C., Lac, V., Ogawa, H., Tessier-Cloutier, B., Alhassan, R., Wang, A., Wang, Y., Cohen, J.D., Wong, F., Hasanovic, A., Orr, N., Zhang, M., Popoli, M., McMahon, W., Wood, L.D., Mattox, A., Allaire, C., Segars, J., Williams, C., Tomasetti, C., Boyd, N., Kinzler, K.W., Gilks, C.B., Diaz, L., Wang, T.-L., Vogelstein, B., Yong, P.J., Huntsman, D.G., Shih, I.-M., (2017): Cancer-associated mutations in endometriosis without cancer. *New england journal of medicine*. 376, 1835–1848.

de Arellano, M.-L. B., Mechsner, S., (2014): The peritoneum—an important factor for pathogenesis and pain generation in endometriosis. *Journal of molecular medicine*. 92(6), 595-602.

Arning, K., Baron, R., (2008): Neues zur Diagnostik und Therapie neuropathischer Schmerzen. *Aktuelle Neurologie*. 35(10), 519–525.

Arosh, J. A., Lee J., Balasubramanian D., Stanley J.A., Long C. R., Meagher M.W., Osteen K.G., Bruner-Tran K.L., Burghardt R.C., Starzinski-Powitz A., Banu S. K., (2015): Molecular and preclinical basis to inhibit PGE2 receptors EP2 and EP4 as a novel nonsteroidal therapy for endometriosis. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 112(31), 9716–9721.

Asante, A., Taylor, R. N., (2011): Endometriosis: The role of neuroangiogenesis. *Annual review of physiology*. 73(1), 163–182.

Bachvarov, D. R., Houle, S., Bachvarova, M., Bouthillier, J., Adam, A., Marceau, F., (2001): Bradykinin B(2) receptor endocytosis, recycling, and down-regulation assessed using green fluorescent protein conjugates. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 297(1), 19–26.

Ballard, K., Seaman, H., de Vries, C., Wright, J., (2008): Can symptomatology help in the diagnosis of endometriosis? Findings from a national case-control study-Part 1. *An international journal of obstetrics and gynaecology*. 115(11), 1382–1391.

Barcz, E., Kamiński, P., Marianowski, L., (2000): Role of cytokines in pathogenesis of endometriosis. *Medical science monitor*. 6, 1042–1046.

Bazot, M., Darai, E., Hourani, R., Thomassin, I., Cortez, A., Uzan, S., Buy, J.-N., (2004): Deep pelvic endometriosis: MR imaging for diagnosis and prediction of extension of disease. *Radiology*. 232, 379–389.

Bazot, M., Lafont, C., Rouzier, R., Roseau, G., Thomassin-Naggara, I., Darai, E., (2009): Diagnostic accuracy of physical examination, transvaginal sonography, rectal endoscopic sonography, and magnetic resonance imaging to diagnose deep infiltrating endometriosis. *Fertility and sterility*. 92(6), 1825–1833.

- Becker, C. M., Laufer, M.R., Stratton, P., Hummelshoj, L., Missmer, S.A., Zondervan, K.T., Adamson, G.D., WERF EPHect Working Group, (2014): World endometriosis research foundation endometriosis phenome and biobanking harmonisation project: I. surgical phenotype data collection in endometriosis research. *Fertility and sterility*. 102(5), 1213–1222.
- Bedaiwy, M. A., Falcone T., Sharma R.K., Goldberg J.M., Attaran M., Nelson D.R., Agarwal A., (2002): Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Human reproduction*. 17(2), 426–431.
- Beirith, A., Santos, A. R. S., Calixto, J. B., (2003): The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. *Brain research*. 969(1–2), 110-116.
- Berkley, K. J., (2005): The pains of endometriosis. *Science*. 308(5728), 1587–1589.
- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D., Worthy, K., (1992): Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacological reviews*. 44(1), 1–80.
- Böcker, W. (2013): Entzündungen, in Klöppel, G., Kreipe H., Remmele W., Dietel M, (Hrsg.), *Pathologie: Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen*. Berlin, Heidelberg: Springer, 23–32.
- Brasil, D.L., Montagna, E., Trevisan, C.M., La Rosa, V.L., Laganà, A.S., Barbosa, C.P., Bianco, B., Zaia, V., (2020): Psychological stress levels in women with endometriosis: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Minerva medica*. 111, 90–102.
- Brown, J., Pan, A., Hart, R. J., (2010): Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. *The cochrane database of systematic reviews*. (12), CD008475.
- Brucker, C., (2003): Medikamentöse Therapie der Endometriose. *Der Gynäkologe*. 37(4), 353–365.

- Bruner-Tran, K.L., Yeaman, G.R., Crispens, M.A., Igarashi, T.M., Osteen, K.G., (2008): Dioxin may promote inflammation-related development of endometriosis. *Fertility and sterility*. 89, 1287–1298.
- Bulun, S. E., (2009): Endometriosis. *New england journal of medicine*, 360(3), 268–279.
- Burghaus, S., Klingsiek, P., Fasching, P., Engel, A., Häberle, L., Strissel, P., Schmidt, M., Jonas, K., Strehl, J., Hartmann, A., Lermann, J., Boosz, A., Thiel, F., Müller, A., Beckmann, M., Renner, S., (2011): Risk factors for endometriosis in a german case–control study. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 71, 1073–1079.
- Calixto, J. B., Medeiros, R., Fernandes, E.S., Ferreira, J., Cabrini, D.A., Campos, M.M., (2004): Kinin B₁ receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes: B₁ receptors in pain and inflammation. *British journal of pharmacology*. 143(7), 803–818.
- Campos, M. M., Calixto, J. B., (1995): Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *British journal of pharmacology*. 114(5), 1005–1013.
- Chen, I., Thavorn, K., Yong, P.J., Choudhry, A.J., Allaire, C., (2020): Hospital-associated cost of endometriosis in canada; A population-based study. *Journal of minimally invasive gynecology*. 27, 1178–1187.
- Christiansen, S. C., Eddleston, J., Woessner, K.M., Chambers, S.S., Ye, R., Pan, Z.K., Zuraw, B.L., (2002): Up-regulation of functional kinin B1 receptors in allergic airway inflammation. *The journal of immunology*. 169(4), 2054–2060.
- Clement, P. B., (2007): The pathology of endometriosis: a survey of the many faces of a common disease emphasizing diagnostic pitfalls and unusual and newly appreciated aspects. *Advances in anatomic pathology*. 14(4), 241–260.
- Cohen, M., Quintner, J., van Rysewyk, S., (2018): Reconsidering the international association for the study of pain, definition of pain. *PR9* 3, e634.
- Costa-Neto, C. M., Dillenburg-Pilla, P., Heinrich, T.A., Parreiras-e-Silva, L.T., Pereira, M.G.A.G., Reis, R.I., Souza, P.P.C., (2008): Participation of kallikrein–kinin system in different pathologies. *International immunopharmacology*. 8(2), 135–142.

Daniels, J., (2009): Laparoscopic uterosacral nerve ablation for alleviating chronic pelvic pain a randomized controlled trial. *Journal of american medical association*. 302(9), 955.

Danilov, A.B., Isagilyan, E.D., Mackaschova, E.S., (2018): Psychogenic pain. From *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni*. 118, 103.

Davis, A. J., Perkins, M. N., (1994): The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. *British journal of pharmacology*. 113(1), 63–68.

Deutsche, Österreichische, Schweizerische und Tschechische Gesellschaften für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (2013): ‚Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Endometriose‘. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Registernummer: 015 - 045. Verfügbar unter: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-045.html>

D’Hooghe, T. M., Bambra, C.S., Raeymaekers, B.M., De Jonge, I., Lauweryns, J.M., Koninckx, P.R., (1995): Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*). *American journal of obstetrics and gynecology*. 173(1), 125–134.

Donnez, J., Smoes, P., Gillerot, S., Casanas-Roux, F., Nisolle, M., (1998): Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Human reproduction*. 13, 1686–1690.

Drake, T. S., O’Brien, W.F., Ramwell, P.W., Metz, S.A., (1981): Peritoneal fluid thromboxane B2 and 6-keto-prostaglandin F1 alpha in endometriosis. *American journal of obstetrics and gynecology*. 140(4), 401–404.

Dray, A., Perkins, M., (1993): Bradykinin and inflammatory pain. *Trends in neurosciences*. 16(3), 99–104.

Dray, A., (1997): Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 75(6), 704–712.

Dunselman, G. a. J., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D’Hooghe, T., De Bie, B., Heikinheimo, O., Horne, A.W., Kiesel, L., Nap, A., Prentice, A., Saridogan, E.,

Soriano, D., Nelen, W., European Society of Human Reproduction and Embryology, (2014): ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Human reproduction*. 29, 400–412.

Ebert, A. D., Fuhr, N., David, M., Schnepfel, L., Papadopoulos, T., (2009): Histological confirmation of endometriosis in a 9-year-old girl suffering from unexplained cyclic pelvic pain since her eighth year of life. *Gynecologic and obstetric investigation*. 67(3), 158–161.

Eisenberg, V., Weil, C., Chodick, G., Shalev, V., (2018): Epidemiology of endometriosis: a large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members. *An international journal of obstetrics and gynaecology*. 125, 55–62.

El-Din Shawki, H., (2011): The efficacy of laparoscopic uterosacral nerve ablation (LUNA) in the treatment of unexplained chronic pelvic pain: a randomized controlled trial. *Gynecological surgery*. 8, 31–39.

Engel, J., Berkes, E., Tinneberg, H.R., (2015): Klassifikation der Endometriose. *Gynäkologe*. 48, 200–208.

Eskenazi, B., Warner, M.L., (1997): Epidemiology of endometriosis. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 24, 235–258.

Fassbender, A., Burney, R.O., F. O, D., D'Hooghe, T., Giudice, L., (2015): Update on biomarkers for the detection of endometriosis. *BioMed research international*. 2015, 1–14.

Ferreira, S. H., Lorenzetti, B.B., Cunha, F.Q., Poole, S., (1993): Bradykinin release of TNF- α plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. *Agents and actions*. 38(S2), C7–C9.

Ferrero, S., Esposito, F., Abbamonte, L.H., Anserini, P., Remorgida, V., Ragni, N., (2005): Quality of sex life in women with endometriosis and deep dyspareunia. *Fertility and sterility*. 83(3), 573–579.

Figuroa, C. D., Novoa, U., Valdes, G., Corthorn, J., Müller-Esterl, W., (1997): Localization of the bradykinin B2 receptor in uterus, bladder and Madin-Darby canine kidney cells. *Immunopharmacology*. 36(2–3), 127–133.

Fraser, I.S., Tokushige, N., Markham, R., Russell, P., (2008): Sensory nerve endings and endometriotic implants. *Fertility and sterility*. 89(6), 1847–1847.

Freyhagen, R., Baron, R., Gockel, U., Tölle, T.R., (2006): Pain detect: a new screening questionnaire to identify neuropathic components in patients with back pain. *Current medical research and opinion*. 22(10), 1911–1920.

Gainer, J. V., Morrow, J.D., Loveland, A., King, D.J., Brown, N.J., (1998): Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *New England journal of medicine*. 339(18), 1285–1292.

Gao, X., Outley, J., Botteman, M., Spalding, J., Simon, J.A., Pashos, C.L., (2006): Economic burden of endometriosis. *Fertility and sterility*. 86(6), 1561–1572.

Gargett, C.E., Schwab, K.E., Brosens, J.J., Puttemans, P., Benagiano, G., Brosens, I., (2014): Potential role of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of early-onset endometriosis. *Molecular human reproduction*. 20, 591–598.

Garry, R., (2004): The effectiveness of laparoscopic excision of endometriosis. *Current opinion in obstetrics and gynecology*. 16(4), 299–303.

George, J., Pulickal, S.J., Singh, A., Gautam, M., Prasoon, P., Kumar, R., Ray, S.B., (2014): Locally mediated analgesic effect of bradykinin type 2 receptor antagonist HOE 140 during acute inflammatory pain in rats. *Journal of burn care und research*. 35(6), e391–e398.

Golias, C., Charalabopoulos, A., Stagikas, D., Charalabopoulos, K., Batistatou, A., (2007): The kinin system--bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system--bradykinin. *Hippokratia* 11, 124–128.

Greene, A. D., Lang S. A., Kendzioriski J. A., Sroga-Rios J. M., Herzog T. J., Burns K., (2016): Endometriosis: where are we and where are we going? *Reproduction*. 152(3), R63-78.

Gronbach J., (2015): Charakterisierung der epithelialen Drüsen im Endometrium und endometriotischen Foci. Doktorarbeit an der JLU in Gießen.

Gruppo Italiano per lo Studio dell'Endometriosi (2001): Relationship between stage, site and morphological characteristics of pelvic endometriosis and pain. *Human reproduction*. 16(12), 2668–2671.

Haas, D., Chvatal, R., Habelsberger, A., Wurm, P., Schimetta, W., Oppelt, P., (2011): Comparison of revised american fertility society and ENZIAN staging: a critical evaluation of classifications of endometriosis on the basis of our patient population. *Fertility and sterility*. 95(5), 1574–1578.

Haas, D., Shebl, O., Shamiyeh, A., Oppelt, P., (2013a): The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses. *Acta obstetrica et gynecologica scandinavica*. 92(1), 3–7.

Haas, D., Oppelt, P., Shebl, O., Shamiyeh, A., Schimetta, W., Mayer, R., (2013b): Enzian classification: does it correlate with clinical symptoms and the rASRM score? *Acta obstetrica et gynecologica scandinavica*. 92(5), 562–566.

Halis, G., Mechsner, S., Ebert, A. D., (2010): The diagnosis and treatment of deep infiltrating endometriosis. *Deutsches Ärzteblatt international*. 107(25), 446–455.

Halme, J., Hammond, M.G., Hulka, J.F., Raj, S.G., Talbert, L.M., (1984): Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstetrics and gynecology*. 64(2), 151–154.

Hamza, M., Wang, X.-M., Adam, A., Brahim, J.S., Rowan, J.S., Carmona, G.N., Dionne, R.A., (2010): Kinin B₁ receptors contributes to acute pain following minor surgery in humans. *Molecular pain*. 6, 1744-8069-6–12.

- Harada, T., Momoeda, M., Taketani, Y., Hoshiai, H., Terakawa, N., (2008): Low-dose oral contraceptive pill for dysmenorrhea associated with endometriosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Fertility and sterility*. 90(5), 1583–1588.
- Hertlein, L., Lenhard, M., Burges, A., Friese, K., (2012): Unklarer Unterbauchschmerz: Denken Sie an eine Endometriose: Differenzialdiagnostik von Bauchschmerzen. *MMW - Fortschritte der Medizin*. 154(14), 64–69.
- Hickey, M., Ballard, K., Farquhar, C., (2014): Endometriosis. *British medical journal*. 348, g1752–g1752.
- Hobbs, J. E., Bortnick, A. R., (1940): Endometriosis of the lungs. *American journal of obstetrics and gynecology*. 40(5), 832–843.
- Horne, A.W., Saunders, P.T.K., (2019): SnapShot: endometriosis. *Cell*. 179, 1677-1677.e1.
- Howard, F. M., (2009): Endometriosis and mechanisms of pelvic pain. *Journal of minimally invasive gynecology*. 16(5), 540–550.
- Huang, J., Zhang, X., McNaughton, P., (2006): Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Current neuropharmacology*. 4(3),197–206.
- Hudelist, G., English, J., Thomas, A.E., Tinelli, A., Singer, C.F., Keckstein, J., (2011): Diagnostic accuracy of transvaginal ultrasound for non-invasive diagnosis of bowel endometriosis: systematic review and meta-analysis: Transvaginal ultrasound in the diagnosis of bowel endometriosis. *Ultrasound in obstetrics und gynecology*. 37(3), 257–263.
- Husby, G. K., Haugen, R. S., Moen, M. H., (2003): Diagnostic delay in women with pain and endometriosis. *Acta obstetrica et gynecologica scandinavica*. 82(7), 649–653.
- Isaacson, K. B., Coutifaris, C., Garcia, C.-R., Lyttle, C.R., (1989): Production and secretion of complement component 3 by endometriotic tissue. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. 69(5), 1003–1009.

Jacobson, T. Z., Barlow, D., Garry, R., Koninckx, P.R., (2001): Laparoscopic surgery for pelvic pain associated with endometriosis. Cochrane database of systematic reviews. (4):CD001300.

Jänig, W., (2014): Neurobiologie viszeraler Schmerzen. Schmerz. 28, 233–251.

Javert, C. T. (1952): The spread of benign and malignant endometrium in the lymphatic system with a note on coexisting vascular involvement. American journal of obstetrics and gynecology. 64(4), 780–806.

Jerman, L.F., Hey-Cunningham, A.J., (2015): The role of the lymphatic system in endometriosis: a comprehensive review of the literature¹. Biology of reproduction. 92(3), 64.

Joseph, S., Mahale, S.D., (2019): Endometriosis knowledgebase: a gene-based resource on endometriosis. Database. baz0622019.

Juhasz-Böss, I., Laschke, M., Müller, F., Rosenbaum, P., Baum, S., Solomayer, E., Ulrich, U., (2014): Endometriosis: survey of current diagnostic and therapeutic options and latest research work. Geburtshilfe und Frauenheilkunde. 74(08), 733–742.

Keckstein, J., Tuttlies, F., (1997): Die laparoskopische Therapie der Endometriose. Der Gynäkologe. 30(6), 473.

Kennedy, S., (2003): Genetics of endometriosis: a review of the positional cloning approaches. Seminars in reproductive medicine. 21(2), 111–118.

Kennedy, S., Bergqvist, A., Chapron, C., D'Hooghe, T., Dunselman, G., Greb, R., Hummelshoj, L., Prentice, A., Saridogan, E., (2005): ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. Human reproduction. 20(10), 2698–2704.

Kim, H.-S., Yoon, G., Ha, S.Y., Song, S.Y., (2015): Nodular smooth muscle metaplasia in multiple peritoneal endometriosis. International journal of clinical and experimental pathology. 8(3), 3370–3373.

Klein, J., Gonzalez, J., Decramer, S., Bandin, F., Neau, E., Salant, D.J., Heeringa, P., Pesquero, J.-B., Schanstra, J.-P., Bascands, J.-L., (2010): Blockade of the kinin B1

receptor ameliorates glomerulonephritis. *Journal of the american society of nephrology*. 21(7), 1157–1164.

Knapp, V. J., (1999): How old is endometriosis? Late 17th- and 18th-century European descriptions of the disease. *Fertility and sterility*. 72, 10–14.

Koga, K., Takamura, M., Fujii, T., Osuga, Y., (2015): Prevention of the recurrence of symptom and lesions after conservative surgery for endometriosis. *Fertility and sterility*. 104, 793–801.

Konrad, L., Dietze, R., Kudipudi, P.K., Horné, F., Meinhold-Heerlein, I., (2019a): Endometriosis in MRKH cases as a proof for the coelomic metaplasia hypothesis? *Reproduction science*. 158, R41–R47.

Konrad, L., Gronbach, J., Horné, F., Mecha, E.O., Berkes, E., Frank, M., Gattenlöhner, S., Omwandho, C.O.A., Oehmke, F., Tinneberg, H.-R., (2019b): Similar characteristics of endometrial and endometriotic epithelial cells. *Reproduction science*. 26, 49–59.

Konrad, L., Dietze, R., Riaz, M.A., Scheiner-Bobis, G., Behnke, J., Horné, F., Hoerscher, A., Reising, C., Meinhold-Heerlein, I., (2020): Epithelial–mesenchymal transition in endometriosis—when does it happen? *Journal of clinical medicine*. 9, 1915.

Králíčková, M., Vetvicka, V., (2015): Immunological aspects of endometriosis: a review. *The annals of translational medicine*. 3, 153.

Kunz, G., Leyendecker, G., (2002): Uterine peristaltic activity during the menstrual cycle: characterization, regulation, function and dysfunction. *Reproductive biomedicine online*. 4 Suppl 3, 5–9.

Latthe, P. M., Braunholtz, D.A., Hills, R.K., Khan, K.S., Lilford, R., (2005): Measurement of beliefs about effectiveness of laparoscopic uterosacral nerve ablation—An international journal of obstetrics and gynaecology. 112(2), 243–246.

Laux-Biehlmann, A., d’Hooghe, T., Zollner, T. M., (2015): Menstruation pulls the trigger for inflammation and pain in endometriosis. *Trends in pharmacological sciences*. 36(5), 270–276.

Lebovic, D. I., Mueller, M. D., Taylor, R. N., (2001): Immunobiology of endometriosis. *Fertility and sterility*. 75(1), 1–10.

Lee, J., Banu S.K., Royce Rodriguez B.S., Starzinski-Powitz A., Arosh J.A., (2010): Selective blockade of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 signaling inhibits proliferation of human endometriotic epithelial cells and stromal cells through distinct cell cycle arrest. *Fertility and sterility*. 93(8), 2498–2506.

Leng, J., Lang, J., Dai, Y., Li, H., Li, X., (2007): Relationship between pain symptoms and clinico-pathological features of pelvic endometriosis. *Zhonghua fu chan ke za zhi*. 42(3), 165–168.

Lenhard, M., Stieber, P., Hertlein, L., Kirschenhofer, A., Fürst, S., Mayr, D., Nagel, D., Hofmann, K., Krockner, K., Burges, A., (2011): The diagnostic accuracy of two human epididymis protein 4 (HE4) testing systems in combination with CA125 in the differential diagnosis of ovarian masses. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 49, 2081–2088.

Chapron, C., (2002): Management of ovarian endometriomas. *Human reproduction update*. 8, 591–597.

Leyendecker, G., Kunz, G., Noe, M., Herbertz, M., Beil, D., Huppert, P., Mall, G., (1999): Die Archimetra als neues morphologisch-funktionelles Konzept des Uterus sowie als Ort der Primärerkrankung bei Endometriose. *Reproduktionsmedizin*. 15(5), 356–371.

Leyendecker, G., Wildt, L., Mall, G., (2009): The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Archives of gynecology and obstetrics*. 280(4), 529–538.

Liang, Y., Xie, H., Wu, J., Liu, D., Yao, S., (2018): Villainous role of estrogen in macrophage-nerve interaction in endometriosis. *Reproduction biology and endocrinology*. 16, 122.

Macer, M. L., Taylor, H. S., (2012): Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 39(4), 535–549.

Manolopoulos K., Suwandinata F., Tinneberg HR., (2005): Endometriose und Infertilität. *Reproduktionsmedizin Endokrinologie*. 2 (5), 291-295.

Marceau, F., Hess, J. F. Bachvarov, D. R., (1998): The B1 receptors for kinins. *Pharmacological reviews*. 50(3), 357–386.

Marceau, F., Regoli, D., (2004): Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nature reviews drug discovery*. 3(10), 845–852.

Maruyama, T., Yoshimura Y., (2012): Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis. *Frontiers in bioscience*. E4, 2754–2763.

Matalliotakis, I. M., Arici, A., Cakmak, H., Goumenou, A.G., Koumantakis, G., Mahutte, N.G., (2008): Familial aggregation of endometriosis in the Yale Series. *Archives of gynecology and obstetrics*. 278(6), 507–511.

Matalliotakis, M., Zervou, M.I., Matalliotaki, C., Rahmioglu, N., Koumantakis, G., Kalogiannidis, I., Prapas, I., Zondervan, K., Spandidos, D.A., Matalliotakis, I., Goulielmos, G.N., (2017): The role of gene polymorphisms in endometriosis. *Molecular medicine reports*. 16(5), 5881–5886.

Mecha, E., Makunja R., Maoga J. B., Mwaura A. N., Riaz M. A., Omwandho C. O. A., Meinhold-Heerlein I., Konrad L., (2021): The importance of stromal endometriosis in thoracic endometriosis. *Cells*. 10(1), 180.

Mechsner, S., Schwarz, J., Thode, J., Loddenkemper, C., Salomon, D.S., Ebert, A.D., (2007): Growth-associated protein 43-positive sensory nerve fibers accompanied by immature vessels are located in or near peritoneal endometriotic lesions. *Fertility and sterility*. 88(3), 581–587.

Mechsner, S., (2016a): Endometriose: Eine oft verkannte Schmerzerkrankung. *Der Schmerz*. 30(5), 477–490.

Mechsner, S., (2016b): Hormonelle Zusammenhänge der Endometriose. *Zeitschrift für Komplementärmedizin*. 08(05), 16–21.

Melin, A., Sparen, P., Bergqvist, A., (2007): The risk of cancer and the role of parity among women with endometriosis. *Human reproduction*. 22(11), 3021–3026.

Menke, J. G., Borkowski, J.A., Bierilo, K.K., MacNeil, T., Derrick, A.W., Schneck, K.A., Ransom, R.W., Strader, C.D., Linemeyer, D.L., Hess, J.F., (1994): Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *The journal of biological chemistry*. 269(34), 21583–21586.

Meresman, G., (2002): Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertility and sterility*. 77(6), 1141–1147.

Metz, C. E., (1978): Basic principles of ROC analysis. *Seminars in nuclear medicine*. 8(4), 283–298.

Meyer, R., (1919): Über den Stand der Frage der Adenomyosistis und Adenomyome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyosistis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zentralblatt Gynäkologie*. 1919 (43), 745–750.

Mok-Lin, E.Y., Wolfberg, A., Hollinquist, H., Laufer, M.R., (2010): Endometriosis in a patient with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome and complete uterine agenesis: evidence to support the theory of coelomic metaplasia. *Journal of pediatric and adolescent gynecology*. 23, e35–e37.

Mol, B. W., Bayram, N., Lijmer, J.G., Wiegerinck, M.A., Bongers, M.Y., van der Veen, F., Bossuyt, P.M., (1998): The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a meta-analysis. *Fertility and sterility*. 70(6), 1101–1108.

Moore, J., Kennedy, S., Prentice, A., (2000): Modern combined oral contraceptives for pain associated with endometriosis. *The cochrane database of systematic reviews*. (2), CD001019.

Morcos, R. N., Gibbons, W. E., Findley, W. E., (1985): Effect of peritoneal fluid on in vitro cleavage of 2-cell mouse embryos: possible role in infertility associated with endometriosis. *Fertility and sterility*. 44(5), 678–683.

Moreau, M. E., Garbacki, N., Molinaro, G., Brown, N.J., Marceau, F., Adam, A., (2005): The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *Journal of pharmacological sciences*. 99(1), 6–38.

Murji, A., Biberoglu, K., Leng, J., Mueller, M.D., Römer, T., Vignali, M., Yarmolinskaya, M., (2020): Use of dienogest in endometriosis: a narrative literature review and expert commentary. *Current medical research and opinion*. 36, 895–907.

Murone, C., Chai, S.Y., Müller-Esterl, W., Mendelsohn, F.A.O., Clements, J., (1999): Localization of bradykinin B₂ receptors in the endometrium and myometrium of rat uterus and the effects of estrogen and progesterone. *Endocrinology*. 140(7), 3372–3382.

Naidoo, Y., Bhoola, K., (1997): The kinin system and neutrophils. In *the Kinin System*. Elsevier. 187–196.

National Institute for Health and Care Excellence (2017): Endometriosis: diagnosis and management. NICE Guideline, Nummer 73.

Neziri, A. Y., Bersinger, N.A., Andersen, O.K., Arendt-Nielsen, L., Mueller, M.D., Curatolo, M., (2014): Correlation between altered central pain processing and concentration of peritoneal fluid inflammatory cytokines in endometriosis patients with chronic pelvic pain. *Regional anesthesia and pain medicine*. 39(3), 181–184.

Ni, A., Chao, L., Chao, J. (1998): Transcription factor nuclear factor κ B regulates the inducible expression of the human B₁ receptor gene in inflammation. *Journal of biological chemistry*. 273(5), 2784–2791.

Niskar, A.S., Needham, L.L., Rubin, C., Turner, W.E., Martin, C.A., Patterson, D.G., Hasty, L., Wong, L.-Y., Marcus, M., (2009): Serum dioxins, polychlorinated biphenyls, and endometriosis: a case-control study in Atlanta. *Chemosphere*. 74, 944–949.

Nisolle, M., Donnez, J., (1997): Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertility and sterility*. 68, 585–596.

O, D. F., Flores, I., Waelkens, E., D’Hooghe, T., (2018): Noninvasive diagnosis of endometriosis: Review of current peripheral blood and endometrial biomarkers. *Best practice and research clinical obstetrics and gynaecology*. 50, 72–83.

Ochs, H., Cirkel, U., Neiss, J., Schneider, H.P.G., (1993): Topografie von Endometrioseherden in Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 585–586.

Oral, E., Olive, D. L., Arici, A., (1996): The peritoneal environment in endometriosis. *Human reproduction update*. 2(5), 385–398.

Parikh, R., Parikh, S., Arun, E., Thomas, R., (2009): Likelihood ratios: clinical application in day-to-day practice. *Indian journal of ophthalmology*. 57(3), 217–221.

Pesquero, J. B., Araujo, R.C., Heppenstall, P.A., Stucky, C.L., Silva, J.A., Walther, T., Oliveira, S.M., Pesquero, J.L., Paiva, A.C.M., Calixto, J.B., Lewin, G.R., Bader, M., (2000): Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proceedings of the national academy of sciences*. 97(14), 8140–8145.

Pirker, R., Pereira, J.R., von Pawel, J., Krzakowski, M., Ramlau, R., Park, K., de Marinis, F., Eberhardt, W.E., Paz-Ares, L., Störkel, S., Schumacher, K.-M., von Heydebreck, A., Celik, I., O’Byrne, K.J., (2012): EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *The lancet oncology*. 13, 33–42.

Pizzo, A., Salmeri, F.M., Ardita, F.V., Sofo, V., Tripepi, M., Marsico, S., (2002): Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecologic and obstetric investigation*. 54(2), 82–87.

Poole, S., Lorenzetti, B.B., Cunha, J.M., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., (1999): Bradykinin B₁ and B₂ receptors, tumour necrosis factor α and inflammatory hyperalgesia: Bradykinin and inflammatory hyperalgesia. *British journal of pharmacology*. 126(3), 649–656.

Popoutchi, P., dos Reis Lemos, C.R., Silva, J.C.R.E., Nogueira, A.A., Feres, O., Ribeiro da Rocha, J.J., (2008): Postmenopausal intestinal obstructive endometriosis: case report and review of the literature. *Sao paulo medical journal*. 126(3), 190–193.

Porpora, M.G., Ingelido, A.M., di Domenico, A., Ferro, A., Crobu, M., Pallante, D., Cardelli, M., Cosmi, E.V., De Felip, E., (2006): Increased levels of polychlorobiphenyls in italian women with endometriosis. *Chemosphere*. 63, 1361–1367.

Prado, G. N., Taylor, L., Zhou, X., Ricupero, D., Mierke, D.F., Polgar, P., (2002): Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *Journal of cellular physiology*, 193(3), 275–286.

Pritts, E. A., Taylor, R. N., (2003): An evidence-based evaluation of endometriosis-associated infertility. *Endocrinology and metabolism clinics of north america*. 32(3), 653–667.

Proctor, M., Lathe, P., Farquhar, C., Khan, K., Johnson, N., (2005): Surgical interruption of pelvic nerve pathways for primary and secondary dysmenorrhoea. *Cochrane database of systematic reviews*. Edited by cochrane gynaecology and fertility group. 4, CD001896.

Qadri, F., Bader, M., (2018): Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation. *Expert opinion on therapeutic targets*. 22(1), 31–44.

Rabe T, Schweppe KW, Ebert AD, Mlynek-Kersjes ML Merkle E, Albring C, Bachmann A., (2017): Adenomyosis uteri // Adenomyosis. *Journal of reproductive medicine and endocrinology*. 14 (5), 211-218

Racinet, C., Morin, X., Martin, H., (1987): Adenomyosis. *Contributions to gynecology and obstetrics*. 16, 183–191.

Raja, S.N., Carr, D.B., Cohen, M., Finnerup, N.B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F.J., Mogil, J.S., Ringkamp, M., Sluka, K.A., Song, X.-J., Stevens, B., Sullivan, M.D., Tutelman, P.R., Ushida, T., Vader, K., (2020): The revised international association for the study of pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 161, 1976–1982.

Redwine, D. B., (1987): Age-related evolution in color appearance of endometriosis. *Fertility and sterility*. 48(6), 1062–1063.

Reichert, V.M., Isermann, R., Frick, N., Schmidt-Feuerheerd, N., Ulrich, U.A., (2017): Endometriose — ein Überblick. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 22, 42–50.

Revised american society for reproductive medicine classification of endometriosis: 1985, *Fertility and sterility*. 43(3), 351–352.

Rickes, D., Nickel, I., Kropf, S., Kleinstein, J., (2002): Increased pregnancy rates after ultralong postoperative therapy with gonadotropin-releasing hormone analogs in patients with endometriosis. *Fertility and sterility*. 78(4), 757–762.

Rier, S.E., Martin, D.C., Bowman, R.E., Dmowski, W.P., Becker, J.L., (1993): Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundamental and applied toxicology*. 21, 433–441.

Rizk, B., Fischer, A.S., Lotfy, H.A., Turki, R., Zahed, H.A., Malik, R., Holliday, C.P., Glass, A., Fishel, H., Soliman, M.Y., Herrera, D., (2014): Recurrence of endometriosis after hysterectomy. *Facts, views and visions in obstetrics and gynaecology*. 6, 219–227.

Rogers, P. A. W., D’Hooghe, T.M., Fazleabas, A., Gargett, C.E., Giudice, L.C., Montgomery, G.W., Rombauts, L., Salamonsen, L.A., Zondervan, K.T., (2009): Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop. *Reproductive sciences*. 16(4), 335–346.

Rogers, P. A. W., Adamson, G.D., Al-Jefout, M., Becker, C.M., D’Hooghe, T.M., Dunselman, G.A.J., Fazleabas, A. *et al.*, (2017): Research priorities for endometriosis: recommendations from a global consortium of investigators in endometriosis. *Reproductive sciences*. 24(2), 202–226.

Römer, T., (2018): Long-term treatment of endometriosis with dienogest: retrospective analysis of efficacy and safety in clinical practice. *Archives of gynecology and obstetrics*. 298, 747–753.

Ryan, I.P., Tseng, J.F., Schriock, E.D., Khorram, O., Landers, D.V., Taylor, R.N., (1995): Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertility and sterility*. 63, 929–932.

Sacco, K., Portelli, M., Pollacco, J., Schembri-Wismayer, P., Calleja-Agius, J., (2012): The role of prostaglandin E 2 in endometriosis. *Gynecological endocrinology*. 28, 134–138.

Sackett, D. L., Haynes, R. B., Tugwell, P., (1985): *Clinical epidemiology: a basic science for clinical medicine*. 46(5): 549.

Sampson, J. A., (1927a): Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *American journal of obstetrics and gynecology*. 14(4), 422–469.

Sampson, J. A., (1927b): Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *The american journal of pathology*, 3(2), 93-110.43.

Schaible, H.-G., (2019): Nozizeption und Schmerz. In Brandes, R., Lang, F., Schmidt, R. F. (Hrsg.) *Physiologie des Menschen*. Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch), 666–682.

Schindler, A. E., (2007): Epidemiologie, Pathogenese und Diagnostik der Endometriose. *Journal of reproduction and fertility*. 17 (4), 22–27.

Scholl, B., Bersinger, N.A., Kuhn, A., Mueller, M.D., (2009): Correlation between symptoms of pain and peritoneal fluid inflammatory cytokine concentrations in endometriosis. *Gynecological endocrinology*. 25, 701–706.

Schomacher, J., (2008): Gütekriterien der visuellen Analogskala zur Schmerzbewertung. *Physioscience*. 4(03), 125–133.

Schweppe K.-W., (2003): Differentialdiagnosen und Behandlungsstrategien bei Endometriose: Was tun - Wann? *Journal für Fertilität und Reproduktion*. 13 (3), 8-12.

Schweppe, K.-W. (2004): Operative Therapie bei Endometriose. *Gynäkologische Endokrinologie*. 2(4), 216–222.

Seeber, B., Sammel, M.D., Fan, X., Gerton, G.L., Shaunik, A., Chittams, J., Barnhart, K.T., (2008): Panel of markers can accurately predict endometriosis in a subset of patients. *Fertility and sterility*. 89(5), 1073–1081.

Sengupta, J.N., (2009): Visceral pain: the neurophysiological mechanism, in: Canning, B.J., Spina, D. (Hrsg.), *Sensory nerves, handbook of experimental pharmacology*. 31–74.

Shakiba, K., Bena, J.F., McGill, K.M., Minger, J., Falcone, T., (2008): Surgical treatment of endometriosis: a 7-year follow-up on the requirement for further surgery. *Obstetrics und gynecology*. 111, 1285–1292.

Shams, M., Sisi, P., Ahmed, A., (1996): Endocrinology and pacrinology: localization of bradykinin type II receptor mRNA in human endometrium. *Molecular human reproduction*. 2(1), 35–39.

Shigesi, N., Kvaskoff, M., Kirtley, S., Feng, Q., Fang, H., Knight, J.C., Missmer, S.A., Rahmioglu, N., Zondervan, K.T., Becker, C.M., (2019): The association between endometriosis and autoimmune diseases: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*. 25(4), 486–503.

Siedentopf, F., (2009): Chronic pelvic pain in women from a gynecologic viewpoint. *Der Urologe*. 48(10), 1193-1194,1196-1198.

Siedentopf, F., (2013): Chronischer Unterbauchschmerz, in Wacker, J., Sillem M., Bastert G., Beckmann M. W. (Hrsg.) *Therapieshandbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*. Springer Berlin Heidelberg, 187–198.

Siedentopf, F., (2015): Psychotherapeutische Therapieansätze, in Sillem, M., Siedentopf F., Mechsner, S. (Hrsg.) *Leitsymptom chronischer Unterbauchschmerz der Frau*. Springer Berlin Heidelberg, 91–93.

Sinaii, N., Plumb K., Cotton L., Lambert A., Kennedy S., Zondervan K., Stratton P., (2008): Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease. *Fertility and sterility*. 89(3), 538–545.

Siufi Neto, J., Kho, R.M., dos Santos Siufi, D.F., Baracat, E.C., Anderson, K.S., Abrão, M.S., (2014): Cellular, histologic, and molecular changes associated with endometriosis and ovarian cancer. *Journal of minimally invasive gynecology*. 21(1), 55–63.

Song, Y., Su, R.-W., Joshi, N.R., Kim, T.H., Lessey, B.A., Jeong, J.-W., Fazleabas, A.T., (2020): Interleukin-6 (IL-6) activates the NOTCH1 signaling pathway through E-Proteins in endometriotic lesions. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. 105(5), 1316–1326.

Soriano, D., Schonman, R., Nadu, A., Lebovitz, O., Schiff, E., Seidman, D.S., Goldenberg, M., (2011): Multidisciplinary team approach to management of severe endometriosis affecting the ureter: long-term outcome data and treatment algorithm. *Journal of minimally invasive gynecology*. 18(4), 483–488.

Soysal, M. E., Soysal, S., Gurses, E., Ozer, S., (2003): Laparoscopic presacral neurolysis for endometriosis-related pelvic pain. *Human reproduction*. 18(3), 588–592.

Starzinski-Powitz, A., Zeitvogel A., Schreiner A., Baumann R., (2001): In search of pathogenic mechanisms in endometriosis: The challenge for molecular cell biology. *Current molecular medicine*. 1(6), 655–664.

Stratton, P., Berkley, K.J., (2011): Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications. *Human reproduction update*. 17, 327–346.

Su, Y.-S. (2014): Molecular mechanism of inflammatory pain. *World journal of anesthesiology*. 3(1), 71.

Suryawanshi, S., Huang, X., Elishaev, E., Budiu, R.A., Zhang, L., Kim, S., Donnellan, N., Mantia-Smaldone, G., Ma, T., Tseng, G., Lee, T., Mansuria, S., Edwards, R.P., Vlad, A.M., (2014): Complement pathway is frequently altered in endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. *Clinical cancer research: An official journal of the american association for cancer research*. 20(23), 6163–6174.

Tian, Z., Chang, X.-H., Zhao, Y., Zhu, H.-L., (2020): Current biomarkers for the detection of endometriosis. *Chinese medical journal*. 133(19), 2346–2352.

Tiffany, C. W., Burch, R. M., (1989): Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Letters*. 247(2), 189–192.

Treloar, S.A., Wicks, J., Nyholt, D.R., Montgomery, G.W., Bahlo, M., Smith, V., Dawson, G., Mackay, I.J., Weeks, D.E., Bennett, S.T., Carey, A., Ewen-White, K.R., Duffy, D.L., O'connor, D.T., Barlow, D.H., Martin, N.G., Kennedy, S.H., (2005): Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26. *The american journal of human genetics*. 77, 365–376.

Troncon, J.K., Zani, A.C.T., Vieira, A.D.D., Poli-Neto, O.B., Nogueira, A.A., Rosa-e-Silva, J.C., (2014): Endometriosis in a Patient with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome. *Case reports in obstetrics and gynecology*. 2014, 1–4.

Tu, C.-H., Niddam, D.M., Chao, H.-T., Liu, R.-S., Hwang, R.-J., Yeh, T.-C., Hsieh, J.-C., (2009): Abnormal cerebral metabolism during menstrual pain in primary dysmenorrhea. *Neuroimage*. 47(1), 28–35.

Tu, C.-H., Niddam, D.M., Chao, H.-T., Chen, L.-F., Chen, Y.-S., Wu, Y.-T., Yeh, T.-C., Lirng, J.-F., Hsieh, J.-C., (2010): Brain morphological changes associated with cyclic menstrual pain. *Pain*. 150(3), 462–468.

Tuttles, F., Keckstein, J., Ulrich, U., Possover, M., Schweppe, K.W., Wustlich, M., Buchweitz, O., Greb, R., Kandolf, O., Mangold, R., Masetti, W., Neis, K., Rauter, G., Reeka, N., Richter, O., Schindler, A.E., Sillem, M., Terruhn, V., Tinneberg, H.R., (2005): ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis. *Zentralblatt Gynäkologie*. 127, 275–281.

Üçeyler, N., Schäfers, M., Sommer, C., (2009): Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. *Experimental brain research*. 196(1), 67–78.

Ulrich, U., U., Rhiem, K., Kaminski, M., Wardelmann, E., Trog, D., Valter, M., Richter, O.N., (2005a): Parametrial and rectovaginal adenocarcinoma arising from endometriosis. *International journal of gynecological cancer: official journal of the international gynecological cancer society*. 15(6), 1206–1209.

Ulrich, U., Hucke, J. und Schweppe, K.-W., (2005b): Recommendations for diagnosis and treatment of endometriosis. *Zentralblatt für Gynäkologie*. 127(5), 338–345.

Ulrich, U., Buchweitz, O., Greb, R., Keckstein, J., von Leffern, I., Oppelt, P., Renner, S. P., Sillem, M., Stummvoll, W., De Wilde, R.-L., Schweppe, K.-W. (2014): National german guideline (S2k): guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis: long version - AWMF Registry No.015-045. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 74(12), 1104–1118.

Ulukus, M., Arici, A., (2005): Immunology of endometriosis. *Minerva gynecologica*. 57(3), 237–248.

Vercellini, P., Trespidi, L., Colombo, A., Vendola, N., Marchini, M., Crosignani, P.G., (1993): A gonadotropin-releasing hormone agonist versus a low-dose oral contraceptive for pelvic pain associated with endometriosis. *Fertility and sterility*. 60(1), 75–79.

Vercellini, P., Viganò P., Somigliana E., Fedele L., (2014): Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nature reviews endocrinology*. 10(5), 261–275.

Vigano, P., Candiani, M., Monno, A., Giacomini, E., Vercellini, P., Somigliana, E., (2018): Time to redefine endometriosis including its pro-fibrotic nature. *Human reproduction*. 33, 347–352.

Vincent, K., Warnaby, C., Stagg, C.J., Moore, J., Kennedy, S., Tracey, I., (2011): Dysmenorrhoea is associated with central changes in otherwise healthy women. *Pain*. 152(9), 1966–1975.

von Theobald, P., Cottenet, J., Iacobelli, S., Quantin, C., (2016): Epidemiology of Endometriosis in France: A large, nation-wide study based on hospital discharge data. *BioMed research international* 2016, 1–6.

Walter, A. J., Hentz, J.G., Magtibay, P.M., Cornella, J.L., Magrina, J.F., (2001): Endometriosis: correlation between histologic and visual findings at laparoscopy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 184(7), 1407–1411; discussion 1411–1413.

Weisberg, E., Fraser, I. S., (2015): Contraception and endometriosis: challenges, efficacy, and therapeutic importance. *Open access journal of contraception*, 6, 105–115.

Wotherspoon, G., Winter, J., (2000): Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neuroscience letters*, 294(3), 175–178.

Wu, J., Xie, H., Yao, S., Liang, Y., (2017): Macrophage and nerve interaction in endometriosis. *Neuroinflammation*. 14, 53.

Xiao, T.S., (2017): Innate immunity and inflammation. *Cellular and molecular immunology*. 14, 1–3.

Yam, M., Loh, Y., Tan, C., Khadijah Adam, S., Abdul Manan, N., Basir, R., (2018): General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *International journal of molecular sciences*. 19(8), 2164.

Yoshino, O., Yamada-Nomoto, K., Kobayashi, M., Andoh, T., Hongo, M., Ono, Y., Hasegawa-Idemitsu, A., Sakai, A., Osuga, Y., Saito, S., (2018): Bradykinin system is

involved in endometriosis-related pain through endothelin-1 production. *European journal of pain*. 22(3), 501–510.

Zakhari, A., Edwards, D., Ryu, M., Matelski, J.J., Bougie, O., Murji, A., (2020): Dienogest and the risk of endometriosis recurrence following surgery: a systematic review and meta-analysis. *Journal of minimally invasive gynecology*. 27, 1503–1510.

11 Anhang

- Freynhagen R., Tölle T.R., Gockel U., Baron R. (2005, Pfizer Pharma GmbH): PainDETECT: A new screening questionnaire to identify neuropathic components in patients with back pain.

Endometriose-Fragebogen

Datum
Pat-ID

Name: _____ Vorname: _____

Geburtsdatum: _____

Größe: _____ Gewicht: _____

Ist in Ihrer Familie Endometriose bekannt?
Wenn ja, bei wem?

Ja Nein Weiß nicht
 Großmutter
 Mutter
 Schwester
 Tante

Sind in Ihrer Familie gynäkologische Krebserkrankungen bekannt?
Wenn ja, bei wem?

Ja Nein Weiß nicht
 Großmutter
 Mutter
 Schwester
 Tante

Ist in Ihrer Familie Magendarmkrebs bekannt?
Wenn ja, bei wem?

Ja Nein Weiß nicht
 Mutter
 Vater
 Schwester
 Bruder
 Großmutter
 Großvater
 Tante
 Onkel

Sind in Ihrer Familie andere Krebserkrankungen bekannt?
Wenn ja, bei wem?

Ja Nein Weiß nicht
 Mutter
 Vater
 Schwester
 Bruder
 Großmutter
 Großvater
 Tante
 Onkel

Rauchen Sie?
Wie viele Zigaretten am Tag?
Seit wievielen Jahren?

Ja Nein
 _____ Zigaretten

Trinken Sie Alkohol?

Nein
 gelegentlich
 regelmäßig
 übermäßig

Anhang

Welche Anti-Baby-Pille nehmen Sie zur Zeit? _____
Wenn ja, seit wann nehmen Sie diese? _____

Waren Sie schon einmal schwanger? Ja Nein
Wenn ja, wie oft? _____

Wie ist die Schwangerschaft eingetreten?
 natürlich _____ mal
 stimuliert durch Hormone _____ mal
 Insemination _____ mal
 IVF _____ mal
 ICSI _____ mal
 andere _____ mal
 weiß nicht _____ mal

Wurde bei Ihnen bereits künstliche Befruchtung durchgeführt? Ja Nein
War diese erfolgreich? Ja Nein

Wie wurden die Kinder entbunden? Auf natürlichem Weg, in welchem(n) Jahr(en)? _____
Per Kaiserschnitt, in welchem(n) Jahr(en)? _____
Per vaginaler Operation (Saugglocke oder ähnliches),
in welchem(n) Jahr(en)? _____

Wurde bei Ihnen eine Ausschabung nach der Geburt ihres Kindes
durchgeführt? Ja Nein
Wenn ja, in welchem(n) Jahr(en)? _____
Aus welchem Grund wurde die Ausschabung durchgeführt?
 Plazentalösungsstörung
 andere: _____

Besteht bei Ihnen aktuell Kinderwunsch? Ja Nein

Sind Sie ungewollt kinderlos? Ja Nein
Wenn ja, seit wann? _____

Ist bei Ihrem Partner diesbezüglich eine Fruchtbarkeits-
untersuchung durchgeführt worden? Ja Nein
Wenn ja, mit welchem Ergebnis?
 ohne Befund
 eingeschränkt

Seit wann besteht Kinderwunsch bei regelmäßigem Geschlechtsverkehr? _____

Haben Sie Schmerzen in Zusammenhang mit Ihrer Periode? Ja Nein
Wenn ja, wann?
 vorher
 währenddessen
 nachher

Wie stark sind die Schmerzen auf einer Skala von 1 bis 10?
kein Schmerz stärkster Schmerz
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Haben Sie chronische Schmerzen im Unterbauch? Ja Nein
Wenn ja, wie stark sind die Schmerzen auf einer Skala von 1 bis 10??
kein Schmerz stärkster Schmerz
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Anhang

	Jahr(e) _____
	Vaginal: Anzahl _____ Jahr(e) _____
Hatten Sie bereits Darmoperationen in der Vergangenheit? Wenn ja, in welchem(n) Jahr(en)?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein Bauchschnitte: Anzahl: _____ Jahr(e) _____
	Bauchspiegelungen: Anzahl: _____ Jahr(e) _____
Wurden Sie bereits aus anderen, noch nicht genannten Gründen, am Bauch operiert? Wenn ja, in welchem(n) Jahr(en)?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein Bauchschnitte: Anzahl: _____ Jahr(e) _____
	Bauchspiegelungen: Anzahl: _____ Jahr(e) _____
Hatten Sie bereits eine Ausschabung in der Vergangenheit? Wenn ja, warum und in welchem(n) Jahr(en)?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein Blutungsstörung: _____ Diagnostik: _____ Abort/Abbruch: _____
In welchem Alter haben Sie das erste Mal Ihre Regelblutung bekommen?	_____
In welchem Alter haben sie das erste Mal verhütet?	_____
Ist Ihr Zyklus regelmäßig? Wie viele Tage dauert Ihr Zyklus im Durchschnitt? Wie lange dauert Ihre Blutung im Durchschnitt? Wann war ihre letzte Blutung?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein _____ Tage _____ Tage _____ Datum
Wie beurteilen Sie Ihre Blutungsstärke bei der letzten Menstruation?	<input type="checkbox"/> unverändert <input type="checkbox"/> stärker <input type="checkbox"/> schwächer als sonst
Verhüten Sie zur Zeit? Wenn ja, wie verhüten Sie?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Anti-Baby-Pille <input type="checkbox"/> IUP (Spirale) <input type="checkbox"/> Hormonspirale (Mirena) <input type="checkbox"/> vaginal (Nuvaring) <input type="checkbox"/> Depot (Spritze/Stäbchen) <input type="checkbox"/> Kondom <input type="checkbox"/> Andere: _____
Seit wann verhüten Sie regelmäßig?	_____

Anhang

Leiden Sie an Allergien?
Wenn ja, welche?

- Ja Nein Weiß nicht
 Schmerzmedikamente
 Antibiotika
 Pflaster, Nickel,
andere Kontaktstoffe
 Heuschnupfen
 Andere: _____

Sind bei Ihnen chronische Erkrankungen
bzw. Vorerkrankungen bekannt?
Wenn ja, welche?

- Ja Nein Weiß nicht
 Asthma
 Autoimmunerkrankungen
 Diabetes
 Bluthochdruck
 Schilddrüsenerkrankung
 Andere: _____

Arbeiten Sie im Schichtdienst?
Wenn ja, seit wann?

- Ja Nein

Ist bei Ihnen Endometriose bereits diagnostiziert worden?
Wenn ja, wann?

- Ja Nein

Wurden Sie bereits aufgrund Ihrer Endometriose operiert?
Wenn ja, in welchem(n) Jahr(en)?

- Ja Nein
Bauchschnitte:
Anzahl: _____
Jahr(e): _____

Bauchspiegelungen:
Anzahl: _____
Jahr(e): _____

Vaginal _____
Anzahl: _____
Jahr(e): _____

Wurden Sie bereits wegen einer Ovarial-Zyste operiert?
Wenn ja, in welchem(n) Jahr(en)?

- Ja Nein
Bauchspiegelungen:
Anzahl: _____
Jahr(e): _____

Hatten Sie bereits andere gynäkologische
Bauchoperationen in der Vergangenheit?
Wenn ja, in welchem(n) Jahr(en)?

- Ja Nein
Bauchschnitte:
Anzahl: _____
Jahr(e) _____

Bauchspiegelungen:
Anzahl: _____

Anhang

Haben Sie Schmerzen beim Wasserlassen? Ja Nein
Wenn ja, wie stark sind die Schmerzen auf einer Skala von 1 bis 10??
kein Schmerz stärkster Schmerz
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Haben Sie Schmerzen beim Stuhlgang? Ja Nein
Wenn ja, wie stark sind die Schmerzen auf einer Skala von 1 bis 10??
kein Schmerz stärkster Schmerz
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Empfinden Sie Schmerzen beim Geschlechtsverkehr? Ja Nein
Wenn ja, wie stark sind die Schmerzen auf einer Skala von 1 bis 10??
kein Schmerz stärkster Schmerz
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Nehmen Sie Schmerzmittel? Ja Nein
Wenn ja, welche? _____
Wenn ja, welche Menge(n)? _____
Wenn ja, seit wann? _____
Wenn ja, wann nehmen Sie die Schmerzmittel?
 Regelmäßig
 bei Bedarf
 vor der Periode (Beginn)
 während der Periode

Können Sie Ihren Schmerz beschreiben?
 berührungsempfindlich pulsierend
 brennend reißend
 diffus stechend
 hitzeempfindlich ziehend
 krampfend

Haben Sie öfter Verstopfungen? Ja Nein
Wenn ja, wie oft, wie lange? _____

Haben Sie öfter Durchfall? Ja Nein
Wenn ja, wie oft, wie lange? _____

Haben Sie schon mal Blutauflagerung auf Ihrem Stuhlgang festgestellt? Ja Nein

Haben Sie schon einmal aufgrund Ihrer Endometriose eine Hormonbehandlung erhalten?
Wenn ja, welche Behandlung haben Sie in welchem Jahr erhalten?

Orale Kontrazeptiva: _____
GnRH: _____
IUD (Spirale): _____
Andere: _____

12 Publikationsverzeichnis und Förderungen

- Lutz Konrad, **Lea M. Fruhmann Berger**, Veronica Maier, Fabian Horné, Laura M. Neuheisel, Elisa V. Laucks, Muhammad A. Riaz, Frank Oehmke, Ivo Meinhold-Heerlein, Felix Zeppernick (2023): Predictive Model for the Non-Invasive Diagnosis of Endometriosis Based on Clinical Parameters. Journal of Clinical Medicine.
- Eine Förderung der Promotion im Rahmen dieser Dissertation erfolgte durch das JLU TRAINEE- Stipendium.

13 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

14 Danksagung

Hiermit möchte ich noch den Menschen Danke sagen, die mich während der Promotionsarbeit begleitet, unterstützt und motiviert haben.

Zu Beginn gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herr Dr. PD Konrad Lutz ein großes Dankeschön. Er ermöglichte mir den Eintritt in die Welt der Forschung und war stets für mich da. Mit Hilfe seines unglaublich weitgreifenden Wissens, seinen vielfältigen Ideen und den unzähligen Gesprächen und Diskussionen wurde diese Doktorarbeit überhaupt erst möglich. Er lehrte mich kritisch zu denken und war mir eine große Stütze während dieser anspruchsvollen und aufregenden Zeit.

Weiteres möchte ich mich bei den Labormitarbeiter/Innen bedanken, die mir die notwendige Schulung bzw. das Handwerk zur Forschung im Labor mit auf den Weg gaben. Sie erleichterten mir den Arbeitsalltag aufgrund ihrer Erfahrung und Hilfsbereitschaft.

Ich danke meinen Großeltern, Ferdinand und Helene Colp, sowie Rudolf und Brigitte Fruhmann Berger, die mich immer wieder positiv bestärkten.

Mein tiefer Dank gilt meinen Eltern, Annette und Andreas Fruhmann Berger, sowie meinem Bruder Nicolas Fruhmann Berger und meinem Lebenspartner. Sie begleiteten mich von Anfang an und gaben mir die notwendige Unterstützung. Ohne sie wäre das Medizinstudium nicht möglich gewesen. Sie gaben mir Halt und Orientierung und machten es möglich, dass ich diese Promotionsarbeit abschließen konnte. Ihnen möchte ich diese Doktorarbeit widmen.