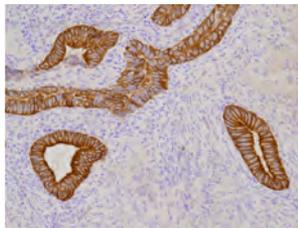
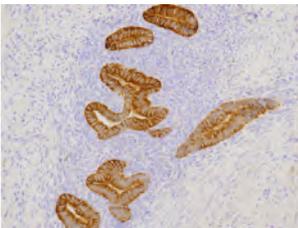


Judith Gronbach

Charakterisierung der epithelialen Drüsen im Endometrium und endometriotischen Foci

Suche nach Ähnlichkeiten und Unterschieden zwischen
Endometrium und endometriotischem Gewebe

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



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Charakterisierung der epithelialen Drüsen im
Endometrium und endometriotischen Foci –
Suche nach Ähnlichkeiten und Unterschieden zwischen
Endometrium und endometriotischem Gewebe**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Judith Gronbach

aus Schwäbisch-Hall

Gießen 2015

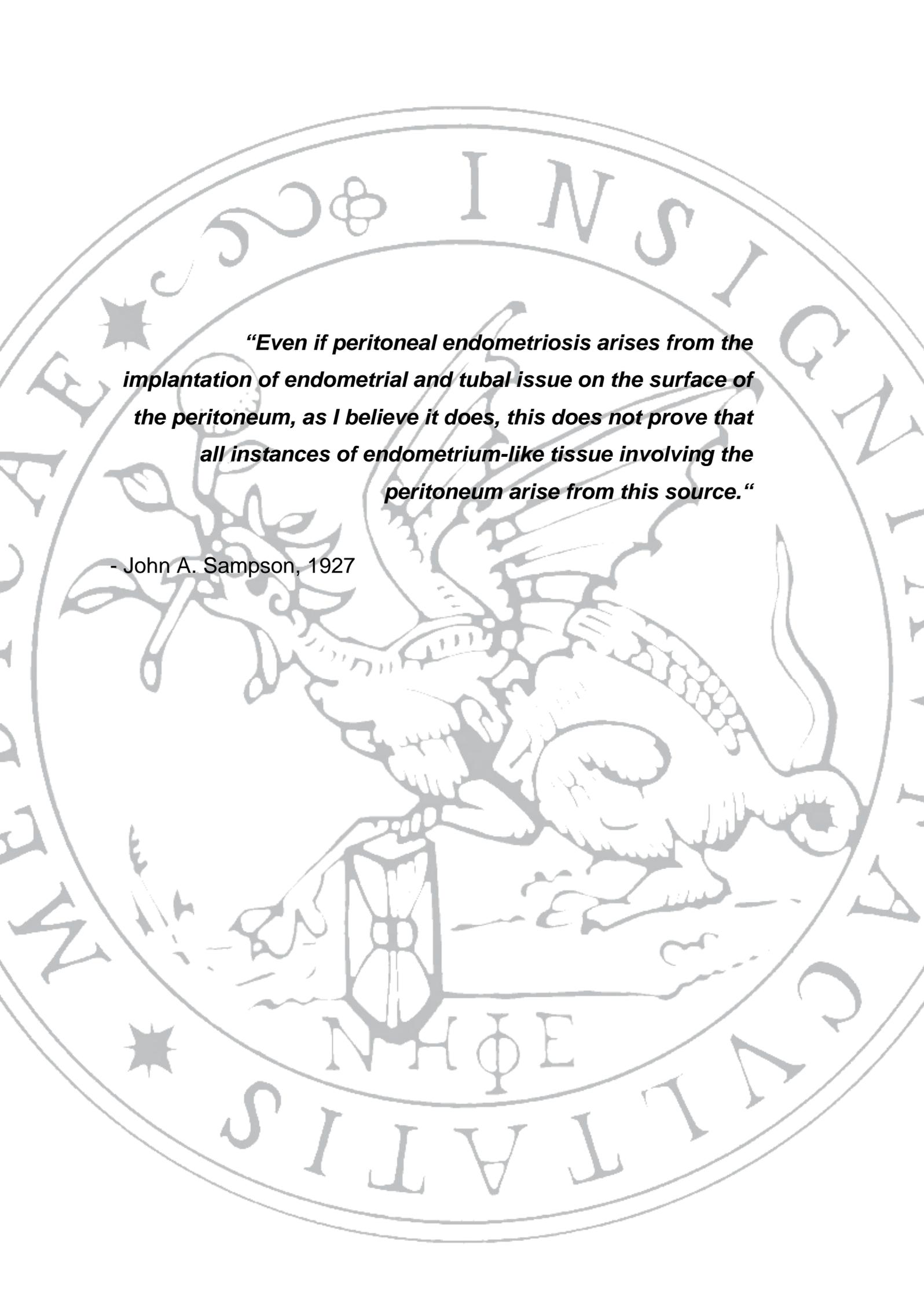
Aus dem Zentrum für
Frauenheilkunde und Geburtshilfe
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. H.-R. Tinneberg

Gutachter: PD Dr. L. Konrad

Gutachter: Prof. Dr. R. Middendorff

Tag der Disputation: 21.06.2016



“Even if peritoneal endometriosis arises from the implantation of endometrial and tubal issue on the surface of the peritoneum, as I believe it does, this does not prove that all instances of endometrium-like tissue involving the peritoneum arise from this source.”

- John A. Sampson, 1927

4. Ergebnisse.....	34
4.1 Analyse von Patientinnen mit peritonealer Endometriose.....	40
4.2 Analyse von Patientinnen mit tief infiltrierender Endometriose (DIE).....	46
4.3 Analyse von Patientinnen mit ovarieller Endometriose.....	51
4.4 Markerspezifität.....	56
4.5 Multifocaler Befall bei Endometriose.....	59
4.6 Detailaufnahmen und Färbecharakteristika der Marker.....	62
5. Diskussion.....	66
5.1 Markeranalyse.....	66
5.1.1 Cytokeratine.....	66
5.1.1.1 Cytokeratin 18 und 19.....	67
5.1.2 Mucine.....	68
5.1.2.1 Mucin-1.....	68
5.2 Interpretation der Markerlokalisationen.....	70
5.3 Ätiologische Konsequenzen.....	72
5.4 Ausblick.....	79
6. Zusammenfassung (zweisprachig).....	80
7. Abkürzungsverzeichnis.....	82
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	84
9. Literaturverzeichnis.....	86
10. Anhang.....	96
11. Ehrenwörtliche Erklärung.....	97
12. Danksagung.....	98

1. Einleitung

1.1 Definition und Einteilung der Endometriose

Die gynäkologische Erkrankung Endometriose (altgr. ἔνδον *endon* „innen“, μέτρα *metra* „Gebärmutter“ und ωσις *osis* „Erkrankung“) wird durch benigne Verwachsungen von aus dem Cavum uteri verschlepptem endometrialem Gewebe hervorgerufen. Die endometriotischen Herde sind östrogenabhängig und können zu chronischen Entzündungen führen (Vercellini et al., 2014). Die abgesiedelten Gewebefragmente gelangen hauptsächlich retrograd über die Tuben in den Bauchraum und zeigen zahlreiche Manifestationsorte (Abb.1).

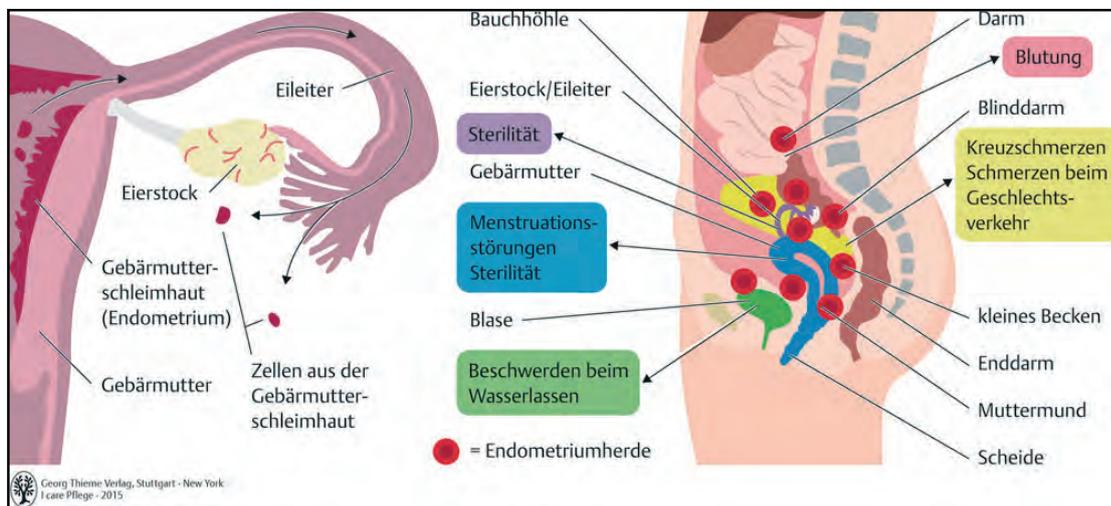


Abb. 1: Darstellung der retrograden Menstruation und mögliche Lokalisationen der Endometriose,

https://www.thieme.de/statics/dokumente/thieme/final/de/dokumente/tw_pflegepaedagogik/abb-64-11-endometriose.jpg

Durch hervorgerufene Adhäsionen und das invasive Wachstum der Läsionen, ist das Krankheitsbild der Endometriose durch starke, meist perimenstruelle Schmerzen und Blutungen gekennzeichnet. Auch leiden die Patientinnen häufig unter Infertilität aufgrund von Tubenverschlüssen, Ovulationsstörungen, oder wegen des veränderten peritonealen Milieus (Badawy et al., 1984; Berkley et al., 2005; Schweppe, 2011).

Die Endometriose chronifiziert in den meisten Fällen, da die Ätiologie weitestgehend ungeklärt ist und die Behandlungsmöglichkeiten durch die häufig zu späte korrekte Diagnosestellung sehr eingeschränkt sind (Waller und Shaw, 1993).

Daraus resultiert eine hohe wirtschaftliche Belastung für das Gesundheitswesen, welche die Kosten anderer chronischer Erkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn und Migräne, übersteigen. 2007 lagen die jährlichen Kosten für die Endometriose in den USA bei 22 Billionen US-Dollar (Simoens et al., 2007). In Deutschland betrug 2006 die Belastung pro Patient bei 3056€ und die Gesamtkosten für deutsche Krankenhäuser beliefen sich auf über 40 Millionen Euro (Oppelt et al., 2012).

Klinischer Erstbeschreiber der Erkrankung war der deutsche Arzt Schroen (Crause und Schrön, 1690). Histologisch wurde die Endometriose 1860 erstmalig von Carl von Rokitansky beschrieben und als Adenomyoma bezeichnet (Rokitansky, 1860). Den Begriff Endometriose prägte später der amerikanische Gynäkologe John A. Sampson (Sampson, 1921), der das bis heute von den meisten anerkannte Erklärungsmodell der Transplantationstheorie lieferte und mit seinen detaillierten wissenschaftlichen Arbeiten zum Verständnis der Pathogenese bedeutend beitrug (Sampson, 1927).

Bezüglich ihrer Lokalisation wird die Endometriose eingeteilt in Endometriosis genitalis interna, Endometriosis genitalis externa (Ovarien, Parametrien, Douglas-Raum) und Endometriosis extragenitalis (Blase, Darm, Lunge). Die erste Gruppe schließt die Sonderform der Adenomyosis uteri mit ein, bei der es sich um endometriotisches Gewebe im Myometrium handelt (Renner et al., 2009).

Nisolle und Donnez (1997) unterteilten die Formen der Endometriose in drei separate Gruppen: peritoneale Endometriose, ovarielle Endometriose und rektovaginale Endometriose. Diese Gruppen entsprechen der gängigen Einteilung in der aktuellen Literatur (Haas et al., 2013).

Im ICD-10 Katalog der WHO ist die Endometriose eigenständig unter der Ziffer N80 in der Gruppe der nichtentzündlichen Krankheiten des Genitaltraktes aufgeführt.

1.2 Morphologie und Lokalisationen

Das histomorphologische Erscheinungsbild der Endometriose gründet auf dem Nachweis von endometriotischen Drüsen und endometriotischem zytogenem Stroma. Beide Komponenten sind histologisch identisch mit dem Epithel des Endometriums (Clement, 2007).

Intraoperativ sind die Endometrioseherde ab einer Gewebegröße von 1mm³ laparoskopisch sichtbar (Murphy et al., 1989; Balasch et al., 1996). Die erkennbaren Auflagerungen sind je nach ihrem Aktivitätsgrad blau, braun, schwarz, oder weiß. Läsionen von aktiver peritonealer Endometriose erscheinen durch ihre Hypervaskularisierung rot und liegen in einem entzündlich-ödematösen Gewebeverband. Sie zeigen sowohl in den Drüsen als auch im Stroma eine hohe Mitoserate und damit eine deutliche proliferative Aktivität (Abb.2). Erscheinen die betroffenen Areale eher bräunlich, handelt es sich meist um inaktive Läsionen (Schweppe, 2002).

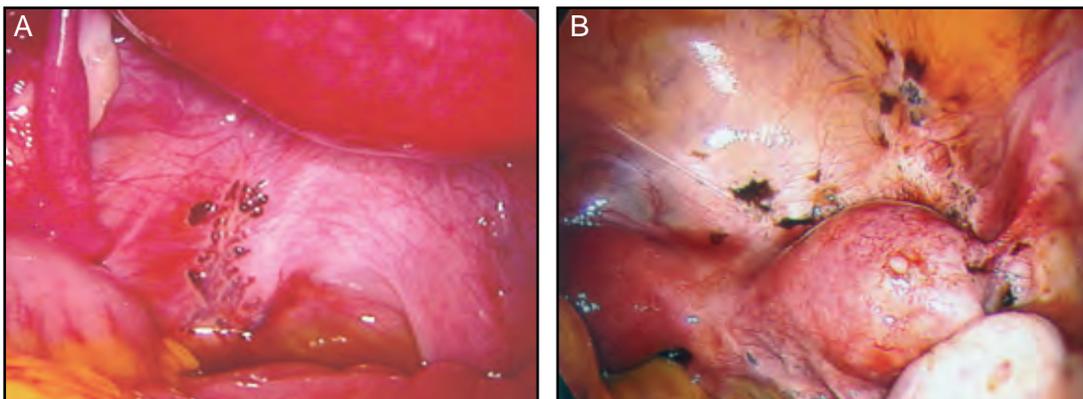


Abb. 2: Darstellung von aktiven (A) und inaktiven (B) Herden peritonealer Endometriose,

<http://www.yaman.at/de/gynaekologie/endometriose/>

Die abgesiedelten Endometrioseherde können invasiv Nachbarorgane penetrieren und infiltrieren (Abb. 3). An den Ovarien entwickeln sich die endometriotischen Läsionen zu großlumigen und eingebluteten Zysten, den sog. Schokoladenzysten. Etwa 52% der Endometrioseherde sind dort lokalisiert. In 60% der Fälle manifestiert sich die peritoneale Endometriose an den Ligg. sacrouterina. Weitere häufig betroffene Lokalisationen sind die Blase und das Rektum, sowie der anatomisch angrenzende Douglas-Raum (Schweppe, 1989; Abb. 3).

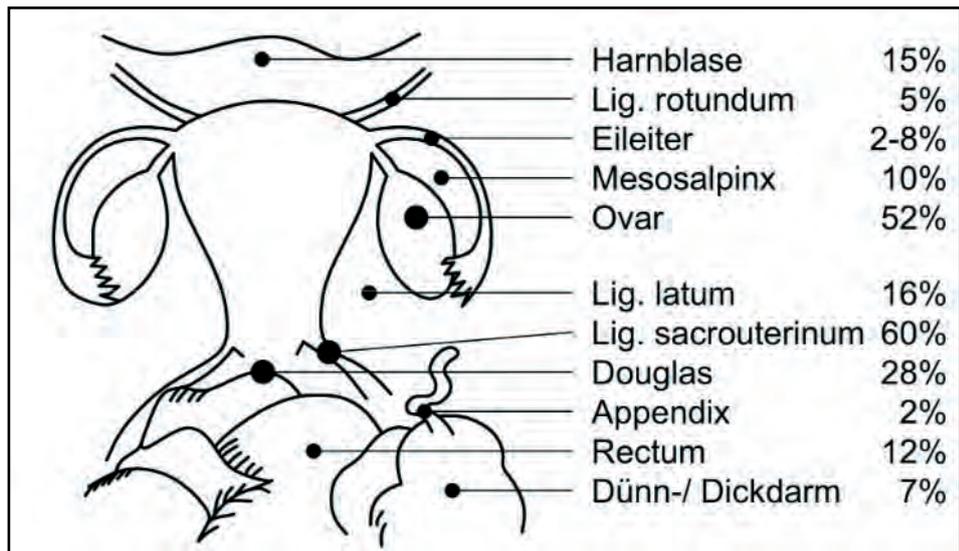


Abb. 3: Lokalisationen peritonealer Endometriose (Schweppe, 1989)

1.3 Epidemiologie der Endometriose

Die gängige Angabe zur internationalen Prävalenz der an Endometriose erkrankten Frauen wird mit 10% der weiblichen Gesamtpopulation angegeben (Eskenazi und Warner, 1997; Viganò et al., 2004). Abbas et al. (2012) zeigten in aktuellen Studien jedoch, dass die Prävalenz der Erkrankung niedriger ist (7,6%), als angenommen. Gründe für die Korrektur der bisherigen Daten könnten der Fortschritt in der medizinischen Diagnostik und die differenziertere populationsspezifische Betrachtung der Statistik sein, wie z.B. die Aufschlüsselung des Patientenkollektivs in Altersgruppen, die Abgrenzung zu endometriose-assoziierten Erkrankungen und umfangreiche (durch Krankenkassen unterstützte) Follow-up-Studien. Diese nach unten korrigierte Prävalenz korreliert auch besser mit der bereits publizierten Inzidenz in der prospektiven „Nurses’ Health Study“. Diese zeigt eine Neuerkrankungsrate von 3 auf 1000 Personen pro Jahr in der Altersspanne von 25-52 (Missmer et al., 2004).

Die Diagnose Endometriose gehört in den USA zum dritthäufigsten gynäkologischen Hospitalisierungsgrund, dies demonstriert die Präsenz der Erkrankung (Velebil et al., 1995).

Von den Prävalenzen zur Gesamtbevölkerung sind die Untersuchungen von Populationen mit endometriose-assoziierten Symptomen abzugrenzen. Hier sind die Werte deutlich höher, z.B. lag bei Patientinnen mit Dysmenorrhoe in 24,6% der Fälle und bei unspezifischen abdominellen Beschwerden in 45,1% der Fälle eine Endometriose vor (Ballard et al., 2008; Abbas et al., 2012).

Die Angaben zur Prävalenz zeigen, dass diese immer eine intensive Auseinandersetzung mit dem jeweiligen Patientenkollektiv erfordern. Viele Fälle von Endometriose sind „unterdiagnostiziert“, dies hat verschiedene Gründe: manche Frauen akzeptieren ihre perimenstruellen Beschwerden, ohne sich mit möglichen Pathologien zu beschäftigen. Andere sind zwar erkrankt, haben aber nur milde, bis keine Symptome (z.T. durch den Gebrauch von hormonellen Kontrazeptiva) und suchen deshalb oft keine gynäkologische Fachklinik auf (Ballard et al., 2006). Darüber hinaus ist der Goldstandard der Laparoskopie nicht in allen Ländern etabliert, bzw. auf demselben medizinischen Niveau. Somit wird bei manchen Patientinnen keine spezifische Diagnostik betrieben, bzw. der Kostenfaktor ist für manche Gesundheitssysteme zu hoch. Zusätzlich zu diesen Aspekten fehlt in vielen Regionen das Bewusstsein und Fachwissen zu der oft verkannten Erkrankung Endometriose. Anamnestisch rückt die Endometriose oft in den Hintergrund, oder sie wird durch ihre multifaktorielle Symptomatik maskiert.

Ein weiteres Kriterium für statistische Angaben zur Endometriose ist der Aspekt der Infertilität. Unter diesem Gesichtspunkt betrachtet, liegt die Rate der Endometrioseerkrankungen bei diesem Patientenkollektiv bei 30-50% (Rogers et al., 2009). 60% der Frauen, die aufgrund von Fertilitätsproblemen eine diagnostische Laparoskopie durchlaufen haben, zeigten in den Untersuchungen eine Endometriose (Ledger, 1999). Der Zusammenhang zwischen Endometriose und Infertilität besteht oft in der mechanischen Beeinträchtigung durch die Läsionen. Es kommt zu Adhäsionen und in 34% der Fälle zu sekundären Tubenverschlüssen (Schmeisser et al., 1996). Auch die Qualität des ovariellen Gewebes und der Oozyten ist deutlich herabgesetzt. Das gesamte peritoneale Milieu ist darüber hinaus durch inflammatorische Zytokine und die aktivierte zelluläre Immunabwehr erhöhten Entzündungswerten ausgesetzt (Manolopoulos und Tinneberg, 2005). Diese Faktoren erhöhen die Problematik der Infertilität bei Endometriosepatientinnen.

Die dargestellten Daten zeigen, dass die jeweiligen epidemiologischen Angaben immer im Kontext gesehen werden müssen und der Bezug klar sein muss, um sie differenziert zu interpretieren.

1.3.1 Risikofaktoren der Endometriose

Es sind einige Risikokonstellationen bekannt, die eine Endometrioseerkrankung begünstigen. Die gängigsten Faktoren beziehen sich auf die Menstruation und Reproduktion (Missmer und Cramer, 2003). Die Risikofaktoren mit der höchsten Übereinstimmung für eine Endometriose waren ein frühes Alter der Menarche, ein

kurzer menstrueller Zyklus und Nulliparität. Ein umgekehrtes Verhältnis ergab sich für die Höhe des Body Mass Index.

Auch die Untersuchung von relevanten Umweltfaktoren, welche eine Endometriose begünstigen könnten, sind bereits diskutiert worden. Beispielsweise zeigte sich bei der Analyse von Rhesusaffen, welche einer hohen radioaktiven Strahlenbelastung ausgesetzt waren, eine höhere Disposition zur Endometriose (Fanton und Golden, 1991). Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen einer Dioxin-Belastung und Endometrioseerkrankungen im Tiermodell bestätigt werden (Rier et al., 1993). Basierend auf diesen Daten wurde in Belgien (einem Land mit nachweislich höherer Dioxin Exposition) eine Untersuchung durchgeführt, in der sich eine deutliche Steigerung in der Häufigkeit und Schwere der Ausprägung von Endometriosefällen beobachten ließ (Koninckx et al., 1994). Diese Vermutung wird durch die erhöhte Inzidenz von Endometrioseerkrankungen unter Dioxin-Belastung bestärkt (Mayani et al., 1997).

Ein weiterer prädisponierender Faktor ist der Einfluss von oxidativem Stress. Es wurde gezeigt, dass bei Endometriosepatientinnen ein Missverhältnis zwischen Oxidantien und Antioxidantien vorliegt. Die Rolle von freien Radikalen und die erhöhte Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies („ROS“, z.B. Superoxidanionen und Hydrogenperoxid) im Endometriosesekret, konnte mehrfach nachgewiesen werden (Szczepańska et al., 2003; Agarwal et al., 2004). Jedoch bleibt fraglich, ob freie Radikale die Erkrankung begünstigen, oder ob sie lediglich als eine natürliche Abwehrreaktion des Körpers auf Endometriose zu werten sind.

1.3.2 Genetik der Endometriose

Weitere epidemiologische Datenerhebungen beschäftigen sich mit dem Aspekt einer erblichen Komponente der Endometriose. Tatsächlich konnten in mehreren Studien erhöhte Prävalenzen von Endometriosefällen bei Verwandten 1. Grades festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigten sich sowohl im Tiermodell bei Primaten, als auch bei humanen Untersuchungspopulationen (Kennedy et al., 1995; Kennedy, 1997). Moen (1994) zeigte darüber hinaus in Studien von homozygoten Zwillingen eine erhöhte Korrelation von symptomatischer Endometriose.

Um ethnische Unterschiede in der Ausprägung und Häufigkeit von Endometriose darzustellen, wurden Patientinnen aus Malaysia und England verglichen (Arumugam und Templeton, 1992). Es zeigten sich mehr Fälle von Endometriose bei den asiatischen Frauen. Im Vergleich dazu waren ultra-orthodoxe Frauen verhältnismäßig seltener von Endometriose betroffen (Bocker et al., 1994). Bei der

Interpretation dieser Daten muss jedoch bedacht werden, dass es sich um sehr kleine und selektierte Populationen handelt. Damit ist keine statistisch klare und randomisierte Auswahl getroffen worden. Die Daten sind nur begrenzt auswertbar und auf die jeweilige Gesamtpopulation nicht zu übertragen.

Eine genetische Ursache der Endometriose wird bis heute kontrovers diskutiert. Ein spezifisches „Endometriose-Gen“, oder ein bestimmter Gen-Locus konnte jedoch bisher, trotz der Entschlüsselung des Genoms, nicht identifiziert werden. Jedoch wurden bereits 904 DNA-Sequenzen mit noch unbekanntem Funktionen (sog. „ESTs“, Expressed Sequence Tags) gefunden, welche spezifisch für Endometriosegewebe sind, fünf lokationsspezifische Gen-Cluster wurden identifiziert und 79 Signalwege gefunden, in denen diese Gene eine Rolle spielen (Wu et al., 2006). Auch Variationen im Gen für Cytochrom P450 (CYP2C19) werden im Zusammenhang mit Endometriose diskutiert (Painter et al., 2014).

Auch wenn dieser Durchbruch irgendwann gelingen würde, wäre es noch ein sehr langer Prozess, bis sich daraus eine therapeutische Relevanz im klinischen Alltag ergeben würde, bzw. wäre zuerst an eine diagnostische Relevanz für eine Subgruppe zu denken (wie z.B. BRCA1/2 beim Mamma-Ca).

1.4 Ätiologie und Pathogenese der Endometriose

Es existieren viele Erklärungsmodelle zur Entstehung der Endometriose. Trotz jahrzehntelanger Endometrioseforschung und einer immensen Anzahl von Publikationen auf diesem Gebiet konnte die Pathogenese noch nicht in Gänze geklärt werden. Die wichtigsten Theorien werden im Folgenden dargestellt. Deren Konsequenz und Interpretation wird in der Diskussion (Kapitel 5) ausführlich erläutert.

1.4.1 Transplantationstheorie

Die 1927 von John A. Sampson postulierte Transplantationstheorie (Synonym: Implantationstheorie) basiert auf der Annahme, dass eutopes Endometrium über retrograde Menstruation in die Bauchhöhle verschleppt wird und dort durch Implantation zu endometriotischen Verwachsungen führt (Sampson, 1921, 1927). Diese älteste Hypothese zur Ätiologie der Endometriose wurde durch zahlreiche Studien bekräftigt:

Es konnte nachgewiesen werden, dass der Prozess der retrograden Menstruation bei 90% aller Frauen im reproduktiven Alter vorkommt (Halme et al., 1984; Liu und

Hitchcock, 1986). Damit ist dieses Phänomen als physiologisch anzusehen und gilt vor allem für die peritoneale Endometriose als anerkannte und akzeptierte Erklärung. Im retrograden Gewebe des Menstrualblutes konnten sowohl endometriale Drüsen als auch endometriales Stroma nachgewiesen werden (Cron und Gey, 1927; Halme et al., 1984; Witz, 2002).

Sampson geht in seinem Modell davon aus, dass eutopes endometriales Gewebe, ähnlich wie bei der Metastasierung von Tumorzellen, in die Bauchhöhle disseminiert und sich dort als endometriotische Foci adhäreren und dann implantieren.

Warum dann nicht der Großteil der Frauen an Endometriose erkranken, und welche weiteren Faktoren (immunologisch, genetisch und embryonal) bei der Pathogenese eine Rolle spielen, konnte von Sampson nicht beantwortet werden und ist bis heute Gegenstand der Forschung.

1.4.2 Metaplasietheorie

Die (Zölo-) Metaplasietheorie schreibt dem pluripotenten Zölomepithel der Urogenitalfalte den Ursprung der Endometriose zu (Meyer, 1919). Dabei wird eine metaplastische Umwandlung des peritonealen Mesothels in Endometriumgewebe angenommen. Es wird vermutet, dass dieser Prozess in manchen Lokalisationen exogenen und lokalen Stimuli unterliegt (Nap et al., 2004). Basierend auf diesen Daten postulierten Nisolle und Donnez (1997) drei Entitäten der Endometriose mit jeweils spezifischen Formen der Pathogenese:

Das Metaplasie-Potenzial von peritonealem Zölo-Mesothel verursacht die Endometrioseherde in der Bauchhöhle. Als weitere Entität entstehen die Läsionen und Zysten im Ovar aus Invaginationen des Cortex und metaplastischem Zölomepithel. Die dritte Entität der rektovaginalen Endometriose erklärten Nisolle und Donnez (1997) mit der Metaplasie der Reste des Müller-Gangepithels und durch sekundäre Infiltration peritonealer Endometriose in den Douglas-Raum. Auch vermuteten sie dabei die Abhängigkeit von exogenen Stimuli.

Die beiden dargestellten Erklärungsmodelle der Transplantations- und Metaplasietheorie wurden in der sog. Induktionstheorie vereint:

Endometriose entsteht laut dieser Theorie aus undifferenzierten Zellen, welche sich durch endogene immunologische und biochemische Stimuli des Endometriums zu Endometrioseherden entwickeln (Witz, 1999).

Außerdem wurde das Konzept der retrograden Menstruation dahingehend modifiziert, dass es sich bei den verschleppten Zellen nicht um eutopes,

differenziertes Endometrium handelt, sondern um embryonale und adulte Stammzellen. Es konnten spezifische Oberflächenmarker identifiziert werden, sodass Anhänger dieser Theorie davon ausgehen, dass sich die Stammzellen in die Bauchhöhle implantieren und dort metaplastisch zu Endometrioseherden differenzieren (Götte et al., 2008).

1.4.3 Archimetra-Konzept, Tissue injury and repair (TIAR)

Leyendecker und Wildt (2012) gehen anatomisch von einer zweigeteilten Struktur des Uterus aus. Die „Archimetra“ besteht aus dem Endometrium und dem Stratum subvasculare des Myometriums. Ihr werden die Funktionen der Reproduktion und Infektabwehr zugeschrieben. Die zweite Komponente ist die sog. „Neometra“ und setzt sich aus den zwei äußeren Muskelschichten (Stratum vasculare und subvasculare) zusammen und erfüllt mechanische Aufgaben während des Geburtsvorganges (Leyendecker und Wildt, 2012).

Die Endometriose wird als eine Erkrankung der Archimetra angesehen. Dabei handelt es sich um Veränderungen im eutopen Endometrium und eine archimetrale Funktionsstörung, die sich in Hyper- und Dysperistaltik äußert. Die Veränderungen im Endometrium werden als Folge von wiederkehrenden Autotraumatisierungen gesehen und auf den erhöhten intrauterinen Druck von Endometriosepatientinnen zurückgeführt. Diese Traumata lösen Prozesse des Gewebeumbaus aus, führen zu einem lokalen archimetralen Hyperestrogenismus und resultieren in einer erhöhten Peristaltik (Leyendecker et al., 2009). Dieser komplexe Prozess aus Gewebetraumatisierung- und reparatur wird in Abb. 4 dargestellt.

Durch die verstärkte Desquamation und die veränderten Druckverhältnisse gelangt zusätzlich ein Anteil der Basalis retrograd in die Bauchhöhle. Die endometriotischen Verwachsungen resultieren demnach aus einer Hypermenorrhoe von tiefem Endometrium (Leyendecker, 2002).

(Javert, 1952; Mechsner et al., 2008). Diese Beobachtungen könnten die seltenen Fälle von extraperitonealer Endometriose erklären.

Letztlich scheint das Immunsystem zusätzlich zu den vielfältigen Erklärungsmodellen eine Rolle zu spielen. In der Literatur sind Veränderungen in der humoralen und zellulären Immunabwehr bei Endometriosepatientinnen (z.B. die Aktivität von regulatorischen T-Lymphozyten) und im peritonealen Sekret beschrieben (Gogacz et al., 2014).

Beispielsweise zeigt ektopes Endometrium eine Expression des Komplementfaktors C3 und hat damit die Fähigkeit zur Induktion des unspezifischen humoralen Immunsystems (Isaacson et al., 1989). Darüber hinaus wurde die Aktivierung von Makrophagen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren in peritonealem Sekret, ausgehend von endometriotischen Foci, beobachtet (Gazvani und Templeton, 2002). Die Frage bleibt, ob diese Phänomene die Erkrankung Endometriose ursächlich hervorrufen, oder ob sie lediglich eine Folgeerscheinung der Endometriose sind und damit aus der Reaktion der peritonealen Umgebung entstehen.

1.5 Klinik und Symptomatik der Endometriose

Das Leitsymptom der Endometriose ist mit einer Häufigkeit von 60-88% die sekundäre Dysmenorrhoe, welche mit krampfartigen und anhaltenden Schmerzen vor und während der Menstruation einhergeht (Schindler, 2007). 38-84% der Patientinnen geben einen unspezifischen Unterbauchschmerz an. In 25-76% der Fälle berichten die betroffenen Frauen zusätzlich von einer Dyspareunie (schmerzhafter Geschlechtsverkehr). Weitere Symptome sind Menorrhagien (starke und lange Periodenblutungen) und Abdominalbeschwerden. Je nach der Lokalisation des Endometrioseherdes, kommt es häufig zu Dyschezie und rektalen Blutungen, sowie zu Hämaturie und Dysurie (Schindler, 2007).

Die beschriebene Symptomatik tritt verstärkt perimenstruell auf, da auch das ektoper endometriale Gewebe einem hormonabhängigen Zyklus unterliegt. Patientinnen berichten jedoch häufig von einer Chronifizierung der Schmerzen. Die Intensität der Schmerzen und das jeweilige Stadium der Endometrioseerkrankung korrelieren dabei jedoch nicht miteinander (Fedele et al., 1990; Berkley et al., 2005). Mechsner et al. (2007) konnten den direkten Kontakt zwischen sensiblen Nervenfasern und Läsionen peritonealer Endometriose korrelieren. Es wurden schmerzleitende Substanz-P positive Nervenfasern in der direkten Umgebung von Endometrioseherden gefunden. Dieser Aspekt könnte die immense Schmerzentwicklung im Verlauf der Erkrankung erklären.

Einen weiteren großen Teilaspekt stellt die Infertilität dar. Die Problematik des häufig unerfüllten Kinderwunsches von Endometriosepatientinnen wurde bereits in Kapitel 1.3 dargestellt.

Mögliche Differentialdiagnosen sind symptomgebunden und reichen vom Fachgebiet der Urologie (z.B. chronischer Harnwegsinfekt, rezidivierende/akute Zystitis, Blasen-Ca) bis hin zur Gastroenterologie (z.B. Colitis, Divertikulose, Obstipation) (Schindler, 2007). Diese Bandbreite zeigt die Schwierigkeiten in der Diagnosestellung der Endometriose. Eine vergleichende Studie von Endometriosepatientinnen aus Deutschland und Österreich zeigte, dass im Durchschnitt zwischen dem Auftreten der ersten endometriotischen Symptome bis hin zur exakten Diagnose, ca. 10,4 Jahre vergehen. Die Konsultationszeit bis zum ersten gynäkologischen Arztbesuch lag bei 2,7 Jahren und die Latenz bis zur Diagnosesicherung betrug noch einmal 7,7 Jahre (Hudelist et al., 2012). Diese Angaben zur Verzögerung der Diagnostik liegen über den bereits publizierten Daten von Ballard et al. (2006) und könnten auf folgende Aspekte zurückzuführen sein:

Manche Symptome bessern sich evtl. schon nach der Gabe von NSAR durch den Allgemeinarzt und werden erst zu einem späteren Zeitraum wieder klinisch manifest. Auch die Einnahme von oralen Kontrazeptiva kann die Erkrankung supprimieren und die Diagnose hinauszögern. Manche Frauen akzeptieren diese zyklischen Beschwerden jedoch auch bis zu einem hohen Schmerz-Niveau. Die Zahl der Frauen, die mindestens eine Fehldiagnose im Verlauf ihrer Erkrankung bekamen, liegt bei 74,3% und ist hoch signifikant für die beschriebene Grundproblematik (Hudelist et al., 2012).

Das Risiko einer malignen Entartung auf der Grundlage einer Endometriose, ist mit weniger als 1% sehr selten. In diesen Fällen handelt es sich zu 80% um Ovarialkarzinome multifaktorieller Genese (Ulrich et al., 2003).

1.6 Klassifikationssysteme der Endometriose

Da die Laparoskopie als Goldstandard in der Diagnostik der Endometriose gilt, wurden bestimmte Klassifikationsmodelle eingeführt, die intraoperativ Aufschluss über das jeweilige Stadium der Erkrankung liefern. Sie sollen ein standardisiertes Verfahren darstellen, um das Ausmaß, die Lokalisation und die Größe der Läsionen zu dokumentieren und sie statistisch auswertbar zu machen.

Die 1979 erstmalig formulierte Klassifikation der „American Fertility Society“ (seit 1995 „American Society for Reproductive Medicine“) unterscheidet vier Stadien der Endometriose und wurde 1985 überarbeitet. Der aktuelle „rAFS-Score“ (Abb. 5)

bezieht sich auf die Anzahl, Größe und Lokalisation der Endometriose. Anhand der Schweregrade können der Verlauf und die Therapieoptionen abgeschätzt werden (Revised American Fertility Society classification of endometriosis: 1985). Ein Nachteil dieses Systems ist, dass es weder die Endometriosemanifestationen in der Vagina, im Darm und in der Blase erfasst, noch die meist tief infiltrierenden Läsionen in extraperitonealen Lokalisationen einschließt. Auch über den makroskopischen Aktivitätsgrad gibt die rAFS-Klassifikation keine Auskunft.

Um besonders die tief infiltrierenden Endometrioseherde klassifizieren und eine Aussage über die Penetration von Nachbarorganen treffen zu können, wurde 2003 die „ENZIAN-Klassifikation“ entwickelt (Tuttlies et al., 2005). Die Defizite der rAFS-Klassifikation sollten damit ausgeglichen und ergänzt werden. Dieses, von der Stiftung für Endometriose-Forschung Deutschland und der Villacher-Endometriose-Arbeitsgruppe verfasste System, lehnt sich an das Prinzip eines onkologischen Stagings an. Nicht nur die drei Raumachsen werden zur Angabe der Lokalisation verwendet, sondern auch die Infiltrationsfläche- und tiefe sind in der Stadieneinteilung enthalten. Außerdem ist eine Erweiterung für extragenitale Manifestationen hinzugefügt worden (Tuttlies et al., 2005). Das in Abb. 6 dargestellte Klassifikationsmodell soll den bereits weltweit anerkannten rAFS-Score ergänzen und besonders bei der tief infiltrierenden Endometriose eine qualitativ hochwertigere Dokumentation gewährleisten. Beide Systeme wurden vergleichend analysiert und besonders die ENZIAN-Klassifikation gilt es aufgrund ihrer einfachen Handhabung und Vollständigkeit über den deutschsprachigen Raum hinaus zu etablieren (Haas et al., 2013).



AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE
REVISED CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS

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 _____

PERTONEUM		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	
	TUBE	R	Filmy	1	2	4
			Dense	4*	8*	16
		L	Filmy	1	2	4
Dense			4*	8*	16	

Abb. 5: Die rAFS-Klassifikation der Endometriose (Revised American Fertility Society classification of endometriosis: 1985)

ENZIAN Score

3 Raumachsen

- A Douglas -Septum rectovaginale -Scheide
- B Ligg sacrouterinae - Beckenwand
- C Organüberschreitung zum Rektum

Ergänzungen

- » Blase
- » Darm
- » Ureter
- » Andere (Diaphragma,...)

rev ENZIAN

Raumachse / Stadium	A Septum rectovaginale Scheide	B Ligg. Sacrouterinae Beckenwand	C Rektum/ Sigma
1 <1 cm	RevE1A <1 cm	RevE1B <1 cm	RevE1C <1 cm
2 1-3 cm	RevE2A <1-3 cm	RevE2B <1-3 cm	RevE2C <1-3 cm
3 3 cm	RevE3A >3 cm	RevE3B >3 cm	RevE3C >3 cm

rev ENZIAN / Extragenitale Erweiterung

FA / Adenomyse Uterus FB / Blase FU / Ureter intrinsisch FI / Intestinum Sigma, Coecum, term. Ileum andere Lokalisationen Diaphragma,...

Abb. 6: Die ENZIAN- Klassifikation der Endometriose (Tuttliet et al., 2005)

1.7 Diagnostik und histologische Klassifikation der Endometriose

Bis heute gibt es noch kein anerkanntes Screening-Verfahren für Endometriosepatientinnen. Die grundsätzliche Diagnostik beginnt daher bei endometriose-assoziierten Schmerzen immer mit einer ausführlichen gynäkologischen Anamnese und körperlichen Untersuchung. Diese beinhaltet die Inspektion, eine bimanuelle Untersuchung und eine transvaginale Ultraschalluntersuchung (Hudelist et al., 2010). Bei dem Verdacht auf eine tief infiltrierende Endometriose, ist eine digital-rektale Untersuchung unerlässlich. Weitere bildgebende Verfahren, wie CT und MRT Untersuchungen, sind nur in bestimmten Fällen indiziert, jedoch zur Abschätzung der Infiltration von Nachbarorganen bei der tief infiltrierenden Endometriose nützlich (Bianek-Bodzak et al., 2013). Darüber hinaus ist ein laborchemischer und damit nichtinvasiver Nachweis der Endometriose bisher noch nicht gelungen. Zwar ist die Konzentration des Tumormarkers CA125 bei Patientinnen mit Endometriose erhöht, jedoch ist dieser nicht spezifisch für die Erkrankung und wird wenn überhaupt nur zur Detektion von postoperativen Rezidiven genutzt. Die Identifikation weiterer Biomarker ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Fassbender et al., 2013). Die intraoperativ entnommenen Präparate gilt es daher aufzubereiten und auf ihre Dignität hin histologisch zu beurteilen. Der in der Onkologie gängige immunhistochemische Marker CD10 wird auch in Fällen von Endometriose zur Detektion und Abgrenzung potentieller Herde verwendet. Zusätzlich wird das epitheliale Antigen Ber-Ep4 für die histologische Klassifikation diskutiert (Capobianco et al., 2013). Immunhistochemische Marker, welche Endometriosefoci in allen Lokalisationen mit derselben Sensitivität und Intensität darstellen, sowie auch Frühformen der Endometriose erfassen, sind bisher nicht bekannt und Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Trotz der Möglichkeit einer immunhistochemischen Färbung ist die zusätzliche histologische Begutachtung der Biopsien durch einen Pathologen obligat, um mögliche Differentialdiagnosen, wie z.B. Ovarialzysten anderer Genese, Ovarialkarzinome, oder Endometriumkarzinome auszuschließen.

1.8 Therapieansätze der Endometriose

Insgesamt gibt es drei Therapieansätze zur Behandlung von Endometrioseherden. Diese beinhalten sowohl medikamentöse, als auch operative und kombinierte Verfahren. Eine konservative medikamentöse Therapie orientiert sich an der

Östrogenabhängigkeit der Endometriose (Evans et al., 1999). Die hypoöstrogene Therapie basiert auf der Suppression hypophysärer Gonadotropine und verursacht eine Atrophie des eutopen und ektopen Endometriums. Die operative Therapie mithilfe der laparoskopischen Entfernung der Läsionen stellt den Goldstandard dar (Abbott et al., 2004). Die nachfolgende histologische Sicherung der Diagnose ist dabei obligat und immer abzuwarten, da die makroskopischen Befunde nicht immer eindeutig sind (Walter et al., 2001). Insgesamt sind jedoch der Therapieerfolg und das Rezidivrisiko sowohl von der Schwere der Erkrankung, als auch vom Erkrankungsalter abhängig (Waller und Shaw, 1993). Darüber hinaus steigt die Wahrscheinlichkeit für die Erhaltung der Fertilität und für einen milden Krankheitsverlauf mit einer frühzeitigen Diagnosestellung (ACOG Committee Opinion, 2005).

Die im Folgenden dargestellten Algorithmen zum Behandlungskonzept der Endometriosemanifestationen ist der offiziellen S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Endometriose entnommen (Deutsche, Österreichische, Schweizerische und Tschechische Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V., 2013). Alle Behandlungen setzen eine ausführliche und symptombezogene gynäkologische Anamnese voraus.

Bei der Diagnostik der Adenomyose ist die vaginale Sonografie das Mittel der Wahl. Zur zusätzlichen Darstellung der genauen Infiltrationstiefe, kann eine MRT-Untersuchung ergänzt werden. Beweisend ist jedoch letztendlich der histologische Befund im Hysterektomie-Präparat. Bei abgeschlossener Familienplanung und anhaltender Symptomatik ist das operative Verfahren der Hysterektomie der Goldstandard. Die Einlage eines Gestagen-IUP und eine medikamentös induzierte Amenorrhoe, durch den Gebrauch eines oralen Kontrazeptivums im Dauerzyklus, sind Alternativen. Zur Verkleinerung der Adenomyose kann eine vorläufige Therapie mit GnRH-Analoga versucht werden.

Für die Behandlung der peritonealen Endometriose steht ebenfalls eine kombinierte Therapie im Vordergrund. Die Medikamente beziehen sich auf eine therapeutische Amenorrhoe durch die Suppression der ovariellen Funktion (Gestagene, orale Kontrazeptiva und bei Dysmenorrhoe GnRH-Analoga). Der Nutzen einer postoperativ medikamentösen Rezidivprophylaxe ist nicht erwiesen. Neben der vaginalen und rektalen Untersuchung ist die diagnostische und therapeutische Laparoskopie bei der peritonealen Endometriose das Mittel der Wahl. Dabei ist noch nicht geklärt, ob die Verfahren der Koagulation, Vaporisation und Exzision gleichwertig sind. Eine zusätzliche Bildgebung (MRT, CT und Ultraschall) ist bei dem Ausschluss einer zusätzlichen tief infiltrierenden, oder ovariellen Endometriose, nicht

indiziert. Eine alleinige medikamentöse Therapie kann „off-label“ über den Gebrauch eines IUP mit Levonogestrel erfolgen. Die Kosten und Nebenwirkungen der Medikamente sind hoch, jedoch liefert das Progestin und orale Gestagen Dienogest (©Visanne) viel versprechend anhaltende und gute klinische Effekte.

Die tief infiltrierende Endometriose wird meist allein aus der Klinik gestellt. Die Spekulum Untersuchung und rektovaginale Tastuntersuchung, sowie der vaginale und transabdominelle Ultraschall, sind dabei obligat. Eine rektale Endosonografie und eine MRT-Untersuchung sind bei tiefen Rektuminfiltrationen und Herden im Sigmoid indiziert. Die Sanierung der Herde sollte operativ *in toto* erfolgen, dabei müssen in Einzelfällen Kompromisse für den Erhalt der Fertilität getroffen werden. Diese Entscheidungen sollten aufgrund der Komplexität des Eingriffes in spezifischen Fachkliniken unter interdisziplinärem Konsens erfolgen. Wegen der Gefahr einer stummen Hydronephrose, sollte eine postoperative Ultraschalluntersuchung der Nieren dringend durchgeführt werden. Auch der Nutzen einer postoperativen Gestagenmonotherapie ist erwiesen.

Die ovarielle Endometriose wird über die vaginale Sonografie diagnostiziert. Sie zeigt ein typisches Echomuster und ist oft mit tief infiltrierender Endometriose vergesellschaftet. Für bessere Operationsbedingungen können GnRH-Analoga die Herde verkleinern, postoperativ zeigen sie keinen Nutzen zur Rezidivprophylaxe. Die Primärtherapie besteht in der operativen Entfernung des Zystenbalgs. Eine alleinige medikamentöse Therapie ersetzt die operative Sanierung nicht und ist unzureichend. Die Operation erfolgt in der Regel ovarerhaltend, wobei ein extraktionsbedingter Oozytenverlust zur Einschränkung der Fertilität führen kann.

Insgesamt liegen jedoch die Rezidivraten für erneute perimentruelle Schmerzen und weitere Endometrioseherde fünf Jahre nach einer operativ und medikamentös behandelten Endometriose trotzdem zwischen 20 und 80% (Waller und Shaw, 1993; Borghese et al., 2014).

Die Einbußen in der Lebensqualität der Patientinnen, sowohl im Berufs- als auch im Privatleben, machen die Integration von psychosomatischen Behandlungsaspekten unverzichtbar. Durch einen langjährig unerfüllten Kinderwunsch und häufig assoziierte somatoforme Schmerzstörungen, ist die Entwicklung von multidisziplinären Therapiekonzepten besonders wichtig. Auch das Angebot von Selbsthilfegruppen und Rehabilitationsmaßnahmen sollte in Anspruch genommen werden.

Abschließend verdeutlicht Abb. 7 das praktische Vorgehen und die Behandlungsprinzipien zur Abklärung der Dysmenorrhoe und zyklischen

Unterbauchbeschwerden, sowie das Procedere bei endoskopisch diagnostizierter Endometriose.

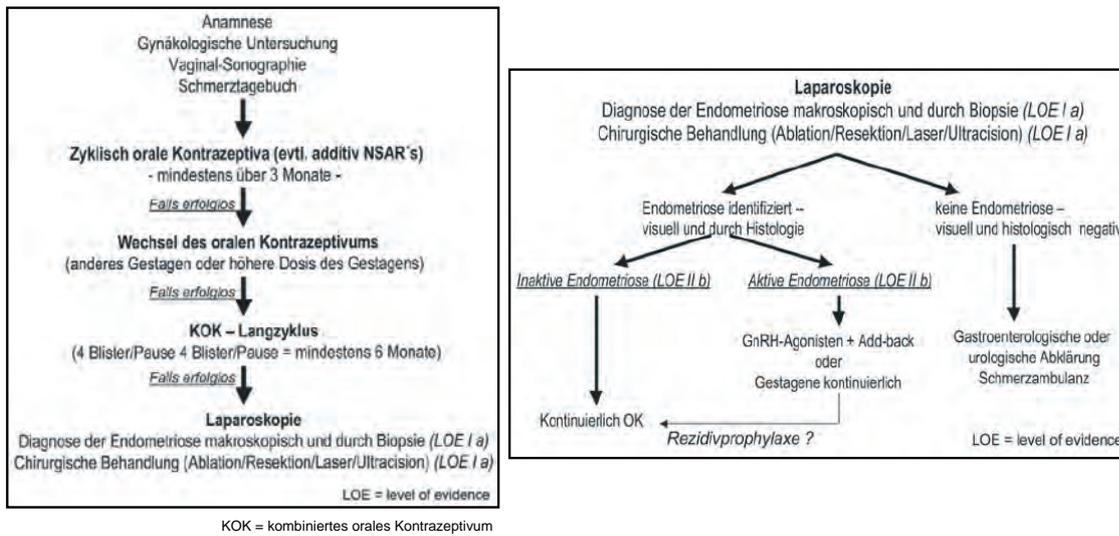


Abb. 7: Behandlungsschemata (Schweppe, 2011)

2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Pathogenese der Endometriose ist bis heute nur unzureichend geklärt. Die Literatur diskutiert verschiedenste Ansätze und Theorien zur Entstehung der Erkrankung. Die klinische Relevanz der Klärung dieser Debatte zeigt sich in der hohen Prävalenz der Endometriose und im Leidensdruck der Patientinnen.

Die Arbeit soll einen Beitrag leisten zur Erfassung und Abgrenzung des gynäkologischen Krankheitsbildes der Endometriose in verschiedenen eutopen Geweben. Dabei lag der Focus auf der Identifikation von Epithelialmarkern, welche in Kombination mit der histologischen Beurteilung das Endometrium von erkrankten und gesunden Frauen sensitiv und einheitlich darstellen.

Das Prinzip eines solchen histologischen Nachweises zur Detektion von Geweben desselben Ursprungs wird schon lange interdisziplinär angewendet. Verschiedenste Biomarker für spezifische Gewebe werden zum Staging von malignen und benignen Neoplasien verwendet und geben Aufschluss über das jeweilige Ausmaß der Erkrankung und das ursprüngliche Gewebemuster. Somit kann zum Beispiel mithilfe von charakterisierten Biomarkern bei unklaren Metastasen der Primärtumor identifiziert werden. Diese Vorgehensweise entspricht dem Konzept der vorliegenden Arbeit.

Im weiteren Verlauf sollte demnach erörtert werden, ob die erfassten Proteine auch in endometriotischen Läsionen exprimiert werden und wenn ja in welcher Intensität. Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede sollten erarbeitet und immunhistochemisch dargestellt werden. Um die Ergebnisse statistisch auswerten zu können, wurden in der Studie die drei wichtigsten Erscheinungsbilder der Endometriose (in den Ovarien, im Peritoneum und tief infiltrierende Endometriose) mit besonderer Berücksichtigung der endometriotischen Drüsen untersucht. Die Klassifizierung und Analyse der spezifischen Lokalisationen wurde vergleichend analysiert.

Die Fragestellung der Arbeit zielte auf die Verifizierung oder Falsifizierung der Behauptung, dass es sich bei ovarieller, peritonealer und tief infiltrierender Endometriose um verschiedene Entitäten handle. Dazu galt es in erster Linie die geeigneten Marker zu identifizieren und die Datenerhebung statistisch auswertbar zu machen. Des Weiteren lag das Ziel der Arbeit darauf, die Endometrioseherde vergleichend zu klassifizieren, um den Gewebeer sprung der endometriotischen Drüsen möglichst genau zu analysieren. Damit sollte ein klinischer Ansatz zur histologischen Detektion von Endometriose verfolgt werden, um evtl. ein Screening für verdächtige Biopsien zu ermöglichen, aber auch eine therapeutische Relevanz aus diesem monoklonal vermuteten Ursprung zu entwickeln.

3. Material und Methode

3.1 Material

3.1.1 Gewebeproben

In der vorliegenden Studie wurden seit 2009 Gewebeproben in einer Datenbank gesammelt und analysiert. Die Zustimmung der Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen erfolgte im selben Jahr (95/09). Die Einwilligung zur Gewebeentnahme wurde durch einen Aufklärungsbogen unter ärztlicher Aufsicht schriftlich bestätigt. Über die Teilnahme an einem Forschungsvorhaben waren alle mit Verdacht auf Endometriose erkrankten Patientinnen informiert und einverstanden. Für die zusätzliche Erfassung klinischer Informationen wurde bei jeder Patientin ein Endometriose-Fragebogen ausgewertet. Dieser wurde vom Institut für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Gießen entworfen und umfasst anamnestische Fragen zur Familie der Patientin, deren Alltagsgewohnheiten, aktuelle Beschwerden und Zyklusanalysen, sowie Fragen zum Krankheitsverlauf (kompletter Fragebogen im Anhang).

In Fällen von tief infiltrierender Endometriose (DIE) wurde neben der klinischen Untersuchung auch das bildgebende Verfahren des MRTs genutzt. Intraoperativ wurden die Herde anhand des international anerkannten rAFS-Scores und mithilfe der ENZIAN-Klassifikation beurteilt (Haas et al., 2013).

Alle Biopsien wurden laparoskopisch entnommen und anschließend für ca. 48 Stunden unter Lichtausschluss in Bouin'scher Lösung fixiert. Für die histologische Abklärung durch einen Pathologen wurde auch Formaldehyd verwendet. Nach der Fixierung erfolgte die Bearbeitung und Einbettung der Biopsien mithilfe eines Paraffineinbettungsautomaten (TP1050, Firma Leica). Dieser Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat entwässert die Proben und bettet diese mit flüssigem Paraffin ein (Tabelle 1). Die Biopsie härtete dann in einer quadratischen Gießform auf einer Kühlplatte aus. Die abgekühlten Gewebelöcher wurden vor der Bearbeitung mit dem Rotationsmikrotom im Kühlschrank gelagert und vor der weiteren Bearbeitung für mindestens 24 Stunden gekühlt.

Durch ein speziell entworfenes Codierungs-System wurden die Patientendaten der jeweiligen Präparate vor der immunhistochemischen Bearbeitung verblindet. Durch die Codierung wurde eine formale Anonymisierung der Daten und eine

untersucherunabhängige, unvoreingenommene Auswertung der Studie gewährleistet. Die jeweiligen Gegenfärbungen wurden mit Hämatoxylin durchgeführt.

Tab. 1: Protokoll des Paraffineinbettungsautomaten TP1050 (Firma Leica)

Arbeitsschritte	Wiederholung	Zeit	Material	Temperatur
1. Entwässerung	1x	2 Std.	Ethanol (80%)	Raumtemperatur
	1x	2 Std.	Ethanol (96%)	Raumtemperatur
	3x	3 Std.	Ethanol (100%)	Raumtemperatur
2. Klärung	1x	1 Std.	Xylol	Raumtemperatur
	2x	45 Min.	Xylol	Raumtemperatur
3. Einbettung	3x	40 Min.	Paraffin	59°C

In der vorliegenden Arbeit wurden 158 Proben aus einem Kollektiv von 115 Patientinnen und insgesamt 102 immunhistochemisch nachgewiesenen endometriotischen Foci untersucht. Das Alter der Patientinnen lag zwischen 25 und 71 Jahren. Die Präparate wurden in fünf Gruppen aufgeteilt: Uteri mit und ohne Endometriose, peritoneale Endometriose, ovarielle Endometriose und tief infiltrierende Endometriose (DIE). Die Aufteilung entspricht den gängigen Entitäten für die Einteilung der Erkrankung (Nisolle und Donnez, 1997).

Tabelle 2 fasst das untersuchte Patientenkollektiv zusammen und gibt einen Überblick über die Verteilung in den jeweiligen Gruppen. Bei den methodisch negativen Präparaten war kein Endometriosegewebe im Anschnitt vorhanden. Somit konnten diese nicht in die Kontrollgruppe mit aufgenommen werden. Bei den statistisch negativen Präparaten fand sich keine Endometrioseläsion im Anschnitt, dafür aber in anderen Lokalisationen. Demnach gehörten diese Patientinnen im Kollektiv zur Auswertungsgruppe der an Endometriose erkrankten Frauen, jedoch konnte der einzelne negative Serienschnitt nicht in die Gesamtwertung mit aufgenommen werden.

Die Selektion der zur Verfügung gestellten Präparate erfolgte anhand der pathologischen Gutachten des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen (Institutsdirektor Prof. Dr. S. Gattenlöhner). Diese beinhalteten eine Einschätzung der Einsendung und der Makroskopie des Präparates, eine abschließende histologische Beurteilung und Hinweise für Malignität.

Unabhängig von diesen offiziellen Gutachten, wurde der Großteil der gefärbten Biopsien zusätzlich vergleichend von Dr. M. Frank (Institut für Pathologie am

Universitätsklinikum Gießen) beurteilt. Die Präparate wurden auch hier verblindet und ohne zusätzliche Gewebeeinformation bearbeitet, sodass die Analyse der Endometrioseläsionen und der Lokalisationsprofile der Marker objektiv war.

Tab. 2: Übersicht über das ausgewertete Patientenkollektiv

	Uterus ohne Endometriose	Uterus mit Endometriose	Peritoneale Endometriose	Ovarielle Endometriose	DIE*
Patienten	16	26	33	36	14
Foci	16	28	54	43	17
Positivkontrolle					
Foci	11	17	43	28	17
Negativkontrolle					
Foci	5	11	11	15	0
Statistisch					
negativ	0	11	5	2	0
Methodisch					
negativ	5	0	6	13	0
Median	45,5 Jahre	45 Jahre	34,5 Jahre	34 Jahre	33 Jahre
(Range)	(30-67 Jahre)	(25-69 Jahre)	(22-46 Jahre)	(25-49 Jahre)	(28-46 Jahre)

* DIE= deep infiltrating endometriosis, tief infiltrierende Endometriose

3.1.2 Puffer und Chemikalien

Im Folgenden werden die für die Immunhistochemie verwendeten Puffer und Chemikalien aufgeführt.

Zur Gewebefixierung wurde Bouin'sche Lösung verwendet. Die Stammlösung besteht aus 500ml Pikrinsäure (Firma Fluka, Sigma-Aldrich) und 167ml Formaldehyd 37% (Firma Merck). Die Gebrauchslösung beinhaltet 30ml Stammlösung und 1,5ml Eisessigsäure 100% (Firma Merck).

Für die Spülvorgänge wurde phosphatgepufferte Salzlösung (0,02 M) verwendet. Der PBS-Puffer („Phosphate buffered saline“) wurde mit 1000ml destilliertem Wasser und vier PBS-Tabletten (ohne Calcium, Magnesium und Phenolrot, pH 7,4) der Firma Gibco® (Life Technologies) hergestellt.

Zur Antigendemaskierung wurde ein Citratpuffer genutzt. Dieser besteht aus einem pH-basierten Gemisch aus Zitronensäure und Natriumcitrat. Zur Herstellung dieses Puffers wurden 21,01g einer Zitronensäure (Endkonzentration: 0,1 M) der Firma Merck und 1000ml destilliertes Wasser zu einer Lösung A vermischt. Die Lösung B

(0,1 M Natriumcitratlösung) wurde aus 29,41g Natriumcitrat (Firma Merck) und 1000ml destilliertem Wasser hergestellt. Die Gebrauchslösung für die Immunhistochemie setzt sich zusammen aus 25ml Lösung B mit 290ml destilliertem Wasser. Unter einer pH-Kontrolle wurde dann die Lösung A hinzugegeben bis der gewünschte pH-Wert von 6,0 erreicht wurde.

Für die Antigendemaskierung wurde eine Wasserstoffperoxid/Methanol-Lösung verwendet. Diese beinhaltete 5ml von 30%igem H₂O₂ (Firma Roth) mit 45ml gekühltem Methanol (Firma Sigma-Aldrich).

Zur besseren Auswertung der Marker und zur Reduktion von Hintergrundfärbungen wurde zusätzlich 1,5% Rinderserumalbumin verwendet. Dieser BSA-Puffer („Bovine Serum Albumin“) bestand aus 1g BSA Pulver aus proteinasefreiem Albumin der Fraktion V (Firma Roth) und 70ml PBS-Puffer, sowie aus 21µl des nichtionischen Tensides Triton-X100 (Firma Merck).

Für die eigentliche Färbereaktion wurde eine DAB-Lösung (Wasserstoffperoxid-Chromogen-3,3' Diaminobenzidin aus dem EnVision+™ System der Firma Dako) verwendet. Als Nachweis von gewebeigenen Peroxidasen und als Substrat der Meerrettichperoxidase (HRP) wurde 1ml Substrat Puffer und 1 Tropfen Chromogen zu einer Gebrauchslösung vermischt. Diese Lösung wurde kurz vor der Detektion immer frisch angesetzt.

Sonstige verwendete Chemikalien waren für die Entparaffinierung Ethanol (>99,6% Neutralalkohol, Firma Berkel AHK), Xylol (Firma VWR) und der Xylol-Ersatz Neo-Clear (Firma Merck Millipore). Weiterhin wurde Hämalau nach Mayer (Firma Waldeck GmbH) und Eosin B (Firma Sigma- Aldrich) für die Gegenfärbung und die HE-Färbung verwendet, sowie das Eindeckmedium Eukitt® (Firma Fluka, Sigma-Aldrich), Real Antibody Diluent (Firma Dako) und Paraffin zur Einbettung der Biopsien (Firma Prolab).

3.1.3 Antikörper

Zur Detektion der im Endometrium und in den endometriotischen Foci exprimierten Proteine wurden drei Antikörper identifiziert.

3.1.3.1 Primärantikörper

Das epitheliale Transmembran-Antigen (EMA) Mucin-1 (MUC-1) gilt als Marker für apikale Lokalisationen und Differenzierungsprozesse. Es findet sich in fast allen Epithelzellen und besitzt eine besonders lange extrazelluläre Domäne (Brayman et

al., 2004). Der monoklonale Mausantikörper der Firma DakoCytomation (Dänemark) wurde bei 2-8°C gelagert und in der Studie zunächst mit einer 1:100 Verdünnung getestet. Das optimale Verdünnungsverhältnis für die Biopsien der Endometriosepatientinnen lag bei 1:200 mit einer DAB-Färbezeit von 46 Sekunden. Das niedermolekulare Typ A Cytokeratin 18 (CK18) wird in einfachen Epithelien, Flimmerepithelien und ductalen Epithelien exprimiert und gehört zur Gruppe der Intermediärfilamente (Bader et al., 1988). Der monoklonale Kaninchenantikörper der Firma Epitomics (Abcam® Company, USA) wurde bei -20°C gelagert. Die Anfangsverdünnung des Anti-Cytokeratin 18 Antikörpers wurde bei 1:100 belassen und die DAB-Färbezeit lag bei 22 Sekunden.

Das saure Typ A Cytokeratin 19 (CK19) wird vornehmlich in normalen Epithelzellen exprimiert, auch in Drüsenepithelien und eingeschränkt ebenfalls in mehrschichtigen Epithelien (Bártek et al., 1986). Der polyklonale Kaninchenantikörper der Firma Novus Biologicals® (GB) wird bei -20°C gelagert und wurde mit einer Verdünnung von 1:100 getestet. Die besten immunhistochemischen Ergebnisse wurden mit einer Verdünnung von 1:300 bei einer DAB-Färbezeit von 46 Sekunden erzielt.

3.1.3.2 Sekundärantikörper

Die verwendeten Sekundärantikörper für die immunhistochemischen Färbungen werden im Folgenden beschrieben.

Für den Nachweis der endometriotischen Foci wurde das EnVision+System – HRP Labelled Polymer der Firma Dako (Hamburg, DE) angewendet. Die Sekundärantikörper der entsprechenden Spezies waren gebrauchsfertig und wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (oder über Nacht bei 4°C).

Die Färbungen mit MUC-1 wurden mit dem Sekundärantikörper Ziegen-*Anti-Maus* Ig (K4001, Firma Dako) bearbeitet. Für die Darstellungen mit den Markern CK18 und CK19 wurde der Sekundärantikörper Ziegen-*Anti-Kaninchen* Ig (Firma Dako, K4003) verwendet.

3.1.4 Laborgeräte und sonstige Materialien

Die zusätzlich verwendeten Geräte, Computerprogramme und Materialien werden im Folgenden aufgelistet:

- Softwareprogramme: Adobe Photoshop CS2; Adobe Illustrator CS2; FSX-BSW Software (Olympus); Microsoft Office Word, Powerpoint und Exel 2003
- Fotomikroskop FSX100 (Firma Olympus)
- Lichtmikroskope: Mikroskop Dialux 20 (Firma Leitz), Mikroskop Leitz Laborlux S (Firma Leica Biosystems)
- Rotationsmikrotom mit Wasserbad (Firma Leica Biosystems)
- Paraffineinbettungsautomat TP1050 (Firma Leica Biosystems)
- pH-Meter „SevenEasy“ (Firma Mettler Toledo)
- Gourmetgarer „MultiGourmet *plus* FS20R“ (Firma Braun)
- Inkubator „Function line UT12“ (Firma Heraeus)
- Mini-Zentrifuge (Firma Sprout)
- Schüttelgerät (Firma IKA)
- Magnetrührer (Firma Roth)
- Pipetten und Pipettenspitzen (Firma Eppendorf)
- Deckgläser 20x26, 22x22 (Firma R. Langenbrinck)
- „SuperFrost Plus“ Objektträger (Firma R. Langenbrinck)
- Dako-Pen (Firma Dako)
- Küvetten (Firma Roth)
- Feuchte Kammern
- Bleiblöckchen

3.2 Methode

3.2.1 Paraffinschnitte

Die Gewebebiopsien wurden in Paraffin eingebettet (Tab. 1). Daraufhin wurden von den gekühlten und ausgehärteten Gewebelöcken mit einem Rotationsmikrotom 5µm dünne Serienschnitte erstellt. Nach dem Schneiden rutschten die Schnitte in ein Wasserbad (Raumtemperatur). Anschließend ließ man sie zunächst in einem weiteren Wasserbad auf einer Wasseroberfläche (45 °C) aufschwimmen, um sie durch die Oberflächenspannung zu glätten. Dann wurden beschichtete SuperFrost Plus Objektträger unterhalb der Wasseroberfläche schräg unter die Schnitte geschoben, welche durch Adhäsionskräfte am Glas hängen blieben und somit auf die Objektträger aufgezogen wurden.

3.2.2 Immunhistochemie (IHC)

3.2.2.1 Grundlagen der Methode

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Visualisierung von bestimmten Strukturen und Proteinen mithilfe von enzymgekoppelten Antikörpern. Dabei wird die Affinität von verschiedenen Gewebeeigenschaften, den sog. Epitopen, zu spezifischen Antikörpern genutzt. Diese gehen dann über eine Antigen-Antikörper-Reaktion eine hochaffine Bindung ein. In einem zweischrittigen Färbemechanismus wird dann die gesuchte Struktur sichtbar gemacht.

In der Wissenschaft gehört dieses Verfahren zu den gängigen Methoden zur Darstellung und Detektion von Proteinen. Diese können mithilfe der Immunhistochemie durch ihre spezifische Antigen-Expression identifiziert und klassifiziert werden.

Die einzelnen Schritte werden im Folgenden erläutert.

Das Einbettungsmedium Paraffin muss für die Bearbeitung der Biopsien zunächst gelöst werden. Dazu werden die Schnitte entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Bei der Fixierung mit Formalin und Bouin'scher Lösung entsteht eine Quervernetzung der Proteine (sog. „crosslinking“). Diese wird durch ein Hitze-induziertes Antigen-Retrieval (Epitop-Demaskierung) teilweise rückgängig gemacht und die Epitope liegen nun weitestgehend frei vor. In weiteren Schritten muss die endogene Peroxidase der Zellen blockiert und andere unspezifische Proteinreaktionen reduziert werden, damit lediglich die Peroxidase des

Sekundärantikörpers dargestellt wird. Dazu werden die Proben mit einem Wasserstoffperoxid/Methanol-Gemisch behandelt. Um weitere unspezifische Färbereaktionen und mögliche Hintergrundfärbungen zu reduzieren, werden die Proben zusätzlich mit Rinderserumalbumin blockiert. Auch längere Inkubationszeiten tragen zu einer optimalen Darstellung der Antigen-Antikörper-Reaktion bei. Auch wenn diese methodisch aufwändiger sind, ermöglichen sie auch einen besseren Nachweis von niederaffinen Antikörpern. Durch zu lange Inkubation kann jedoch durch Endproduktthemmung der Meerrettichperoxidasen (HRP) die Hintergrundfärbung ansteigen.

Die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Bindung erfolgte in der vorliegenden Arbeit mithilfe der zweischrittigen Methode des EnVision+™ Systems der Firma Dako. Diese polymerbasierte Detektion beruht auf einem Dextrangerüst mit einer Vielzahl von identischen Enzymmolekülen, welche an Sekundärantikörper binden, die spezifisch für Anti-Maus oder Anti-Kaninchen Immunglobuline sind (Abb. 8). Somit erfolgt eine universelle Reaktion mit jedem gewebegebundenen Antikörper, der meist einen Maus- oder Kaninchen Ursprung hat. Durch die polymerbasierte Erkennung ist die Sensitivität dieser Methode deutlich höher, als bei anderen immunhistochemischen Verfahren, wie z.B. der LSAB-, oder der ABC- Methode (Kumar und Rudbeck, 2009). Weiterhin ist die verwendete polymerbasierte Methode im direkten Vergleich mit den anderen durch ihr besseres Signal- und Hintergrundverhältnis qualitativ deutlich hochwertiger und besser auswertbar.

Im ersten Schritt der IHC bildet sich eine Primärantikörper-Antigen-Bindung aus. Die verwendeten Primärantikörper sind von Maus- oder Kaninchenhybridomen generiert. Der verwendete Sekundärantikörper ist dann entsprechend gegen Maus- oder Kaninchenimmunglobuline gerichtet, welche an ein Dextrangerüst geknüpft sind. Zusätzlich ist dieses Polymer mit mehreren tausend Meerrettichperoxidasen (HRP) gekoppelt. Im zweiten Schritt reagieren diese HRP-Enzyme dann mit der hinzugegebenen Wasserstoffperoxid-Chromogen-3,3' Diaminobenzidin (DAB)-Lösung. Diese markiert im Präparat dann das gekoppelte Epitop mit einer Braunfärbung und stellt den erfolgreich gebundenen Antikörper dar. Der Verstärkereffekt dieser Methode basiert damit auf den mehrfach gebundenen Peroxidasen, welche die Färbereaktion hervorrufen (Abb. 8).

Die Gegenfärbung zur Darstellung des Gesamtgewebes erfolgt mit Hämatoxilin und erzeugt eine Blaufärbung, welche in deutlichem Kontrast zu den braun markierten Strukturen steht und eine genaue Beurteilung der Expressionsmuster ermöglicht .

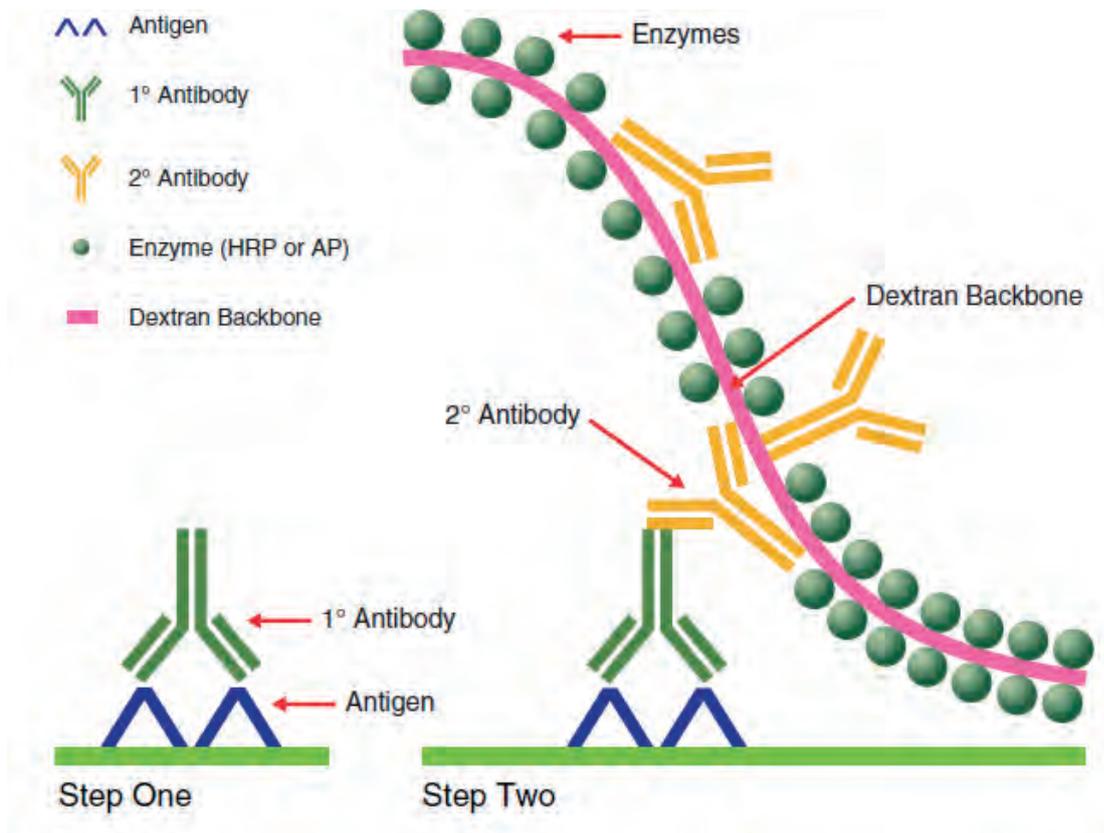


Abb. 8: Polymerbasierte Zweischritt- Methode mit dem Dako EnVision+™ System

3.2.2.2 Protokoll der Immunhistochemie an Formalin- und Bouin- fixierten Gewebeschnitten

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem speziell entwickelten und standardisierten IHC-Protokoll gearbeitet.

Zur Vorbehandlung wurde als erster Schritt die Paraffineinbettung der fixierten Gewebeschnitte zersetzt. Dazu wurden die Präparate für eine Stunde mit dem Xylol-Ersatz NeoClear behandelt und somit entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (Tab. 3).

Tab. 3: Protokoll zur Entparaffinierung und Rehydrierung von Gewebeschnitten bei Raumtemperatur

Arbeitsschritte	Wiederholungen	Zeit	Medium
1. Entparaffinierung	3x	20 Min.	NeoClear
2. Rehydrierung	2x	5 Min.	Ethanol (100%)
	2x	5 Min.	Ethanol (96%)
	2x	5 Min.	Ethanol (70%)
	1x	5 Min.	Destilliertes Wasser

Um die Vernetzung der Proteine Hitze-induziert zu lösen (Epitop-Demaskierung), wurden die Gewebeschnitte für 20 Minuten in einem Gourmetgarer bei 100°C erhitzt. Die Schnitte lagen dabei in einem Citratpuffer (pH 6), welcher zehn Minuten zuvor separat erwärmt worden war. Die Proben wurden für weitere 20 Minuten im Gourmetgarer abgekühlt. Daraufhin wurden die Schnitte drei Mal für fünf Minuten mit einem 0,02 M PBS-Puffer unter Schütteln gespült.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidasen wurden die Präparate für 30 Minuten mit einem dreiprozentigen Wasserstoffperoxid/Methanol-Gemisch bei Raumtemperatur versetzt. Das Methanolgemisch wurde unter dem Abzug abgegossen und die Schnitte wurden drei Mal für fünf Minuten mit 0,02 M PBS-Puffer gespült.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und damit Proteininteraktionen zu reduzieren, wurden die Proben für 20 Minuten mit 1,5%igem BSA-Puffer (Rinderserumalbumin) behandelt. Die Lösungsreste liefen von den Objektträgern auf Zellstoff ab und wurden vorsichtig mit faserfreien Tüchern trocken gewischt, wobei das Gewebe benetzt blieb. Dieser Bereich wurde dann mit dem Dako-Pen umzeichnet, um den später pipettierten Primärantikörper auf den umschriebenen Gewebebereich zu begrenzen, ohne dass er sich auf dem gesamten Objektträger verteilte.

Die verwendeten Primärantikörper (CK18, CK19 und MUC-1) wurden alle zunächst in einer 1:100 Verdünnung getestet. Als Verdünnungsmedium wurde die Lösung Real Antibody Diluent der Firma Dako verwendet. Die Verdünnungen wurden gewebespezifisch getestet und unter Berücksichtigung der Signalstärke und der Hintergrundfärbung (Signal-Rausch-Verhältnis) angepasst (Kapitel 3.1.3.1).

Pro Objektträger wurden auf das markierte Gewebestück 100µl der jeweiligen Primärantikörperverdünnung pipettiert. Die Präparate wurden über Nacht bei 4°C

(oder für 30 Minuten bei 37°C) inkubiert und zum Schutz vor Austrocknung in feuchten Kammern gelagert.

Am folgenden Tag ließ man den Überstand der Primärantikörper auf Zellstoff ablaufen. Der überschüssige, sowie nicht gebundene Anteil, wurde durch dreimaliges Spülen mit PBS-Puffer (0,02 M) für jeweils fünf Minuten abgewaschen.

Anschließend wurden ca. drei Tropfen der gebrauchsfertigen Sekundärantikörper der jeweiligen Spezies (Ziegen-*Anti-Maus* Ig für MUC-1 und Ziegen-*Anti-Kaninchen* Ig für CK18/19) auf die Gewebeschnitte verteilt. Die Präparate wurden dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4°C) in einer feuchten Kammer inkubiert. Die verwendeten feuchten Kammern sind lichtundurchlässige PVC-Behälter mit Deckeln. Die Objektträger liegen auf Stegen, welche an der Unterseite mit angefeuchtetem Zellstoff ausgekleidet sind. Somit trocknen die Präparate während den Inkubationszeiten nicht aus und sind vor äußeren Einflüssen geschützt. Der Überstand der Sekundärantikörper wurde wieder entfernt und die Objektträger wurden erneut drei Mal für fünf Minuten mit PBS-Puffer gespült. Danach wurden die Objektträger vorsichtig trocken gewischt und in einer feuchten Kammer unter dem Abzug positioniert.

Für die Färbereaktion des gebundenen Polymers wurde die DAB-Lösung aus dem Liquid DAB+ Substrate Chromogen System der Firma Dako verwendet. Es wurden pro Schnitt ca. drei Tropfen der DAB-Lösung auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Unter ständiger lichtmikroskopischer Kontrolle wurde der Färbegrad und die Färbezeit für die jeweiligen Antikörper beobachtet und dokumentiert (Kapitel 3.1.3.1). Die überschüssige DAB-Lösung wurde entfernt und der Färbeprozess durch das Eintauchen der Schnitte in destilliertes Wasser und dreimaliges Spülen (ebenfalls mit destilliertem Wasser) in einer Küvette beendet. Anschließend wurden die Präparate wieder in eine feuchte Kammer gelegt. Die Gegenfärbung des umliegenden Gewebes erfolgte für 15-20 Sekunden mit Hämatoxin nach Mayer. Diese Lösung enthält einen basischen Farblack in saurem Milieu (pH 3–4), welcher durch Chelatbildung an das Substrat bindet. So entsteht eine gegen weitere Spülgänge mit Ethanol resistente Färbung. Das überschüssige Hämatoxin wurde mit destilliertem Wasser abgespült und abschließend in einer Küvette für ca. zehn Minuten mit Leitungswasser gebläut. Durch den pH-Wert des Wassers (6,8–7,0) wurde der pH-Wert der Färbung angehoben. Damit zeigten die immunhistochemischen Präparate eine typische blau-violette Färbung.

Als letzter Schritt wurden die Gewebeschnitte eingebettet. Dazu wurden die Präparate rehydriert und mit Xylol versetzt. Nach einem letzten Spülvorgang für fünf Minuten mit destilliertem Wasser konnten die Gewebe mit dem Eindeckmedium

Eukitt® eingedeckt werden (Tab. 4). Dazu wurden die gewebefreien Areale der Objektträger mit faserfreien Tüchern trocken gewischt und die Biopsien mit einem Tropfen des Mediums benetzt. Die Deckgläser wurden bis zur Trocknung der Schnitte mit kleinen Bleiblöcken beschwert.

Tab. 4: Protokoll der Arbeitsschritte mit dem Eindeckmedium Eukitt®

Arbeitsschritte	Wiederholungen	Zeit	Medium
1. Rehydrierung	2x	2 Min.	Ethanol (70%)
	2x	2 Min.	Ethanol (96%)
	2x	2 Min.	Ethanol (100%)
2. Lösung	1x	2 Min.	Xylol
	1x	2 Min.	Xylol
3. Spülen	1x	5 Min.	Destilliertes Wasser
4. Eindecken			Eukitt®

3.2.3 Negativkontrollen

Parallel zu den immunhistochemischen Färbungen mit den beschriebenen Antikörpern, wurden negative Reagenzkontrollen durchgeführt. Damit konnte überprüft werden, ob die angewendeten Systeme ausschließlich die erwünschten Antigene markierten und spezifisch für die Antigen-Antikörper-Bindung waren. Diese Kontrollen wurden mit demselben immunhistochemischen Protokoll bearbeitet, jedoch anstelle der Primärantikörper wurde lediglich die Verdünnungslösung Real Antibody Diluent zur Inkubation auf die Gewebeschnitte gegeben. Dadurch konnten falsch-positive Reaktionen ausgeschlossen werden und das verwendete Detektionssystem wurde auf seine Sensitivität und Spezifität getestet.

Durch die eindeutige und reproduzierbare Beurteilung im Lichtmikroskop wurde kein weiterer Beweis für die Gültigkeit der Methode benötigt.

3.2.4 Auswertung und Dokumentation der immunhistochemischen Nachweise

Die Analyse der jeweiligen Lokalisationsprofile der getesteten Antikörper an den Biopsien der endometriotischen Läsionen erfolgte über eine lichtmikroskopische Beurteilung (Lichtmikroskop Dialux 20). Dabei lag der Schwerpunkt auf der Bewertung der angefärbten Drüsenherde, auf deren Epithel und auf der Stromalen Umgebung. Besonders wichtig waren die Gesichtspunkte der Sensitivität und Spezifität der Marker, sowie die durchgängige Erfassung der jeweiligen Strukturen. Alle positiven Endometriosefoci wurden mit dem Fotomikroskop FSX 100 fotografiert und dokumentiert. Die Übersichtsbilder wurden als Microsoft Office PowerPoint Präsentationen archiviert. Die standardisierte Bildbearbeitung wurde mit Adobe Photoshop durchgeführt. Zusätzlich wurden die codierten Patienteninformationen und der histopathologische Befund hinzugefügt. Die tabellarische Zusammenfassung des ausgewerteten Patientenkollektivs mit allen drei Markern erfolgte mit Microsoft Office Excel 2003. Die Aufteilung der Gruppen wurde mithilfe der folgenden Entitäten festgelegt: Endometriose des Uterus, peritoneale Endometriose, tief infiltrierende Endometriose und ovarielle Endometriose.

3.2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mithilfe einer Vierfelder-Kontingenztafel mit dem exakten Test nach Fisher. Die Klassifikation der Ergebnisse wurde über die Häufigkeitsverteilung der gefärbten Endometrioseherde in den verschiedenen Gruppen vorgenommen. Die Sensitivität wurde über den Anteil der korrekt als positiv klassifizierten Färbungen an der Gesamtheit der tatsächlich positiven Patientinnen berechnet. Diese „Richtig-Positiv-Rate“ wurde der „Falsch-Negativ-Rate“ (Anteil der fälschlich als negativ klassifizierten Präparate von erkrankten Frauen) gegenüber gestellt. Damit konnte ein positiver Vorhersagewert und eine bedingte Wahrscheinlichkeit für die analysierten Daten berechnet werden.

Da in allen Färbungen die dargestellten Herde komplett positiv waren, gab es keine Abstufungen in der Sensitivität der Positivkontrollen und somit keine Probleme in der Zuordnung der gefärbten Areale.

Bei den Präparaten der Uteri von gesunden Frauen waren alle Färbungen von physiologischem Endometrium ohne pathologischen Befund in der Positivkontrolle. Die Negativkontrolle beschränkte sich auf die methodisch negativen Präparate, bei

denen keine Endometriumdrüsen im Anschnitt dargestellt waren. Bei den Patientinnen mit Endometriosis genitalis interna, peritonealer Endometriose, tief infiltrierender Endometriose und ovarieller Endometriose wurden alle Schnitte mit gefärbten Endometrioseläsionen der Positivkontrolle zugeordnet. Die Gruppe der Negativkontrolle beschränkte sich auf methodisch und statistisch negative Präparate. Bei den methodisch negativen Färbungen war kein Endometriosegewebe im Anschnitt vorhanden. Bei den statistisch negativen Färbungen zeigte sich kein Endometrioseherd im angeschnittenen Gewebe, aber in Biopsien anderer Lokalisationen der gleichen Patientin.

4. Ergebnisse

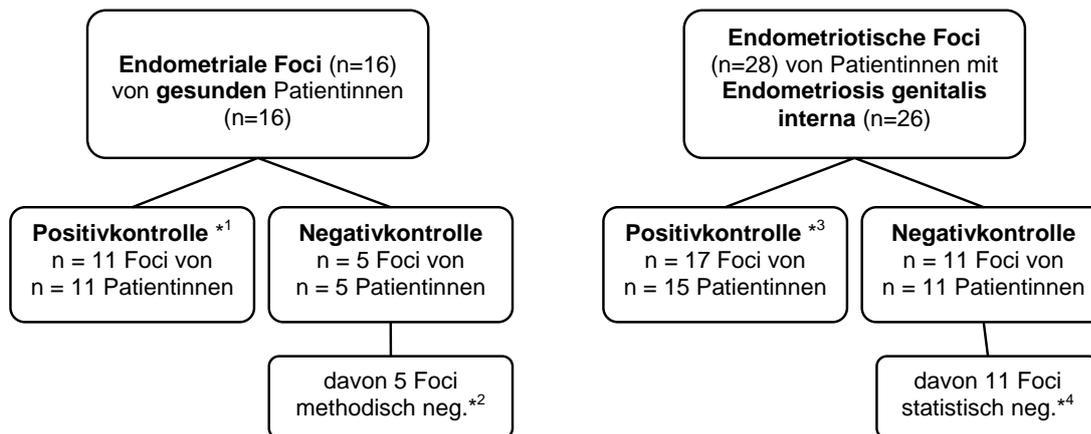
In der vorliegenden Arbeit wurde ein Klassifikationssystem entwickelt um physiologisches Gewebe des Urogenitaltraktes von pathologischem Gewebe abzugrenzen. Dabei lag der Schwerpunkt auf den Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen eutopem endometrialem Gewebe und ektopem endometriotischem Gewebe.

Das Prinzip des histologischen Nachweises zur Detektion von Geweben desselben Ursprungs wird schon lange in der Immunologie, der Onkologie und der Pathologie angewendet. Biomarker für spezifische Gewebe werden zum Staging von malignen und benignen Neoplasien verwendet und geben Aufschluss über das jeweilige Ausmaß der Erkrankung. Darüber hinaus kann mithilfe von Biomarkern ein Primärtumornachweis bei Metastasen unklaren Ursprungs erfolgen. Diese Vorgehensweise wurde in der vorliegenden Arbeit gewählt. Mit der Charakterisierung des physiologischen Gewebes durch die Epithelialmarker konnte ein Abgleich mit den ektopen Geweben erfolgen und die Kombination aus histologischer und immunhistochemischer Beurteilung ermöglichte einen genauen Vergleich der verschiedenen Entitäten.

In der Studie wurde demnach gezielt nach Proteinen gesucht, welche sowohl im physiologischen Endometrium, als auch in pathologisch veränderten endometriotischen Läsionen vorhanden sind. Die experimentelle Analyse sollte helfen die Pathogenese der Endometriose aufzuklären.

Für den immunhistochemischen Nachweis wurden die Cytokeratine CK18, CK19 und das Transmembranprotein MUC-1 als epitheliale Marker identifiziert. Die Untersuchung der Expressionsmuster erfolgte zunächst an 44 Biopsien des Uterus (n=42 Patientinnen). Es handelte sich um Präparate des Endometriums von Patientinnen mit und ohne Endometriose. In der Positivkontrolle wurden 17 Foci von 15 an Endometriose erkrankten Patientinnen untersucht. In der Gruppe der Endometriose-negativen Patientinnen wurden 11 Foci von 11 Patientinnen ausgewertet. Der Nachweis der drei Marker erfolgte an Serienschnitten, sodass die Lokalisation und das Muster der Herde nachvollziehbar und vergleichbar waren.

In Abb. 9 wird das ausgewertete Patientenkollektiv der positiven und negativen Endometriosepatientinnen aus der Gruppe der Uteri schematisch zusammengefasst.



*1 entspricht physiologischem Endometrium ohne pathologischen Befund

*2 keine Endometriumsdrüsen im Anschnitt

*3 davon 14 Foci von 12 Pat. mit Adenomyosis uteri

*4 keine Endometriose im untersuchten Gewebe, aber in anderer Lokalisation

Abb. 9: Schema des Patientenkollektivs der immunhistochemisch dargestellten Uteri

Alle drei Marker zeigten sich hoch sensitiv, sowohl für endometriale Drüsen, als auch für fast alle Epithelzellen. Alle Proteine waren im Zytoplasma der Epithelialzellen identisch lokalisiert und zeigten keine spezifischen Unterschiede im Färbemuster. Darüber hinaus waren sie in allen Drüsenstrukturen positiv und es zeigten sich keine Unterschiede zwischen Proben von gesunden Patientinnen und an Endometriose erkrankten Patientinnen (Abb. 10+11).

Das Zytoplasma der in Abb. 10A einschichtig hochprismatischen Drüsenepithelien ist homogen gefärbt mit einer leichten basal-luminalen Betonung bei allen drei Markern. In Abb. 10B ist das Epithel ebenfalls einschichtig, jedoch tangential angeschnitten und erscheint dadurch stellenweise mehrschichtig. Das Färbemuster bzgl. der Intensität und der Durchgängigkeit ist im MUC-1 und CK19 Präparat am deutlichsten. Die Drüsenherde liegen in beiden Darstellungen eingebettet im zytogenen Stroma, welches periglandulär dichter ist. Alle drei Marker zeigen identische Färbecharakteristika und sind sowohl in ihrer Intensität als auch in ihrem Lokalisationsprofil vergleichbar.

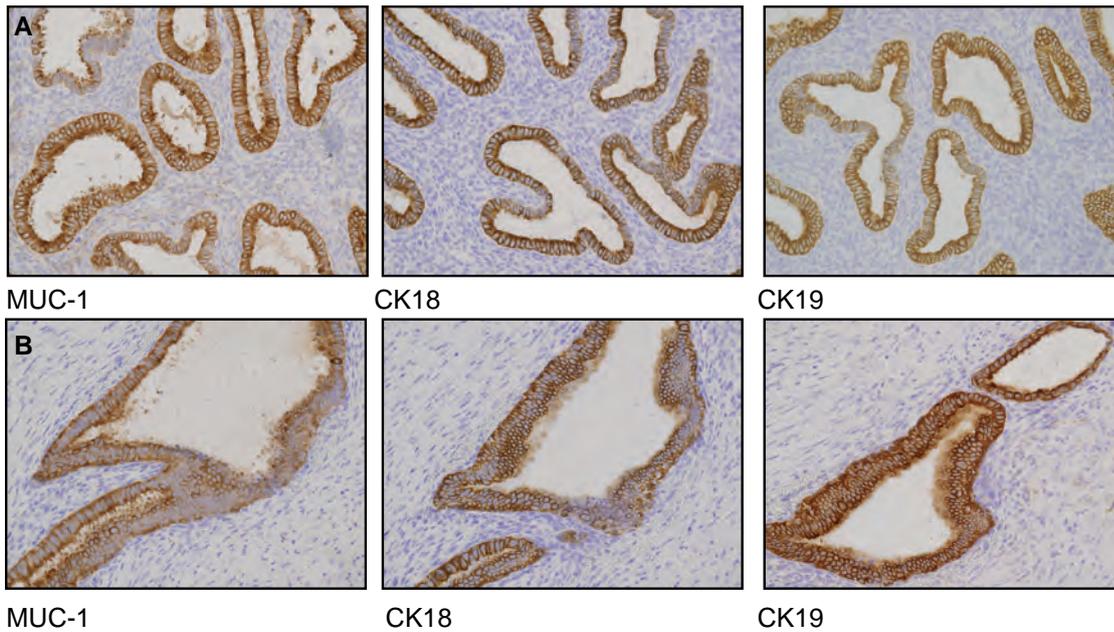


Abb. 10: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in einer Adenomyose an Präparaten des Uterus; A: Patientin mit herdförmiger Adenomyosis uteri, sowie Endometriosis genitalis externa. Vergrößerung x17; B: Patientin mit Anteilen einer Adenomyosis uteri der Uterushinterwand. Es zeigen sich Stromaverdichtungen und Blutungsresiduen. Vergrößerung x17

Die physiologischen Drüsenverbände aus dem Endometrium von Endometriose-negativen Patientinnen zeigen ein homogenes Färbemuster bei allen drei Markern (Abb. 11). Die vorwiegend einschichtig hochprismatischen Drüsenepithelien sind durchgängig dargestellt mit einer leichten luminalen Verstärkung. In der unmittelbaren Drüsenumgebung finden sich keine Formen von verdichtetem zytogenen Stroma. Das in Abb. 11A dargestellte Endometrium lässt sich klar vom Myometrium abgrenzen und liegt einheitlich im Gewebeverband.

Im direkten Vergleich der Lokalisationsprofile ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Endometrien der gesunden und der erkrankten Frauen. Auch die Intensität und die Homogenität der Färbungen sind in beiden Fällen identisch und das gesamte Drüsenepithel wird erfasst.

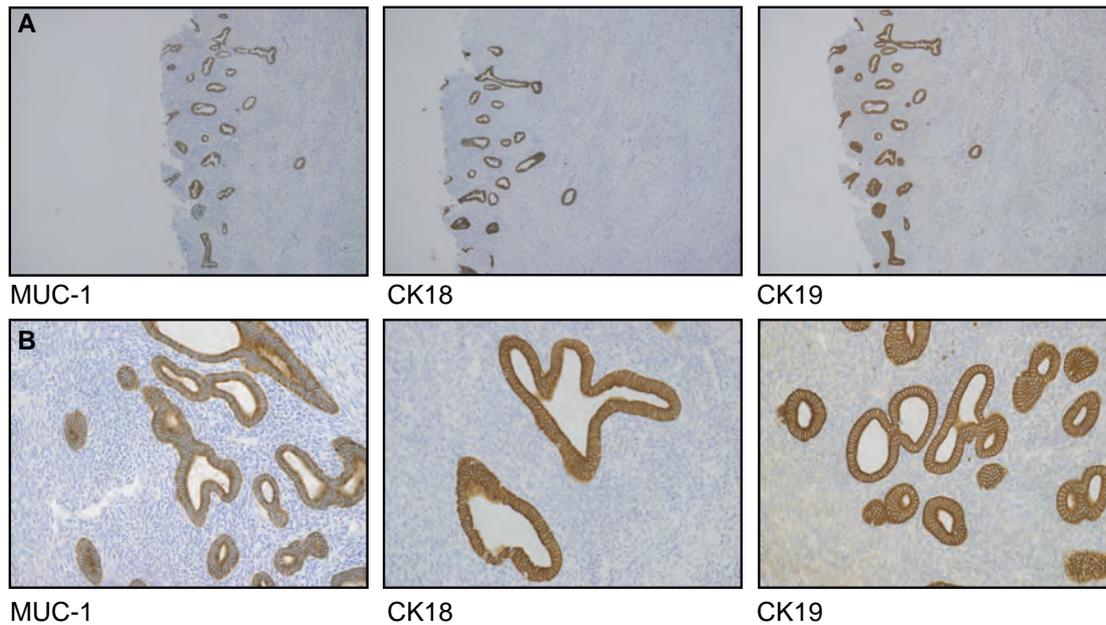


Abb. 11: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in physiologischem Endometrium an Präparaten des Uterus; A: Uteruspräparat einer gesunden Patientin mit physiologischem Endometrium in der Sekretionsphase. Vergrößerung x4,2; B: Uteruspräparat einer gesunden Patientin mit physiologischem Endometrium in der Proliferationsphase. Vergrößerung x17

Zusammenfassend sind in Tab. 5 die Ergebnisse der Färbungen mit allen drei Markern MUC-1, CK18 und CK19 und die statistisch erhobenen Parameter für die gesamte Gruppe der Uteri aufgelistet.

Tab. 5: Auswertung und statistische Kriterien der gefärbten Präparate aus dem Uterus (mit und ohne Endometriose)

Marker	Färbung	Drüsen*	Keine Drüsen	SEN	SPE	PPV	NPV ^{*1}
MUC-1	Färbung	28	0	1	1	1	1
	Keine Färbung	0	16				
CK18	Färbung	28	0	1	1	1	1
	Keine Färbung	0	16				
CK19	Färbung	28	0	1	1	1	1
	Keine Färbung	0	16				

* Endometriale Drüsen und Drüsen der Adenomyosis uteri

^{*1} SEN= Sensitivität; SPE= Spezifität; PPV= positiver Vorhersagewert; NPV= negativer Vorhersagewert

Um die Ergebnisse auf das ganze Spektrum der Erkrankung zu erweitern, wurden die Marker an den derzeit wichtigsten Entitäten der Endometriose getestet: peritoneale, ovarielle und tief infiltrierende Endometriose (DIE). Das Patientenkollektiv wurde den verschiedenen Gruppen zugeordnet und jeweils bezüglich der angefärbten endometriotischen Strukturen klassifiziert (Abb. 12).

Die genauen Lokalisationen der Foci aus dem Peritoneum und der Gruppe der tief infiltrierenden Endometriosen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Basierend auf den Ergebnissen der untersuchten Uteri wurde die Hypothese getestet, dass es sich bei den verschiedenen Gewebegruppen der Endometriose um einen monoklonalen Ursprung aus endometrialen Drüsen handelt. Die ausgewählten Marker schienen dafür geeignet und es sollte eruiert werden, ob sich das aufgezeigte Phänomen auch in ektopen Gewebeabsiedlungen beobachten lässt.

Um diese Hypothese zu verifizieren oder zu falsifizieren wurden die Marker an allen Endometriosebiopsien untersucht, um einen möglichen Unterschied in der Histologie der Entitäten festzustellen. Der Focus lag dabei auf der vergleichenden Analyse der Lokalisationsprofile.

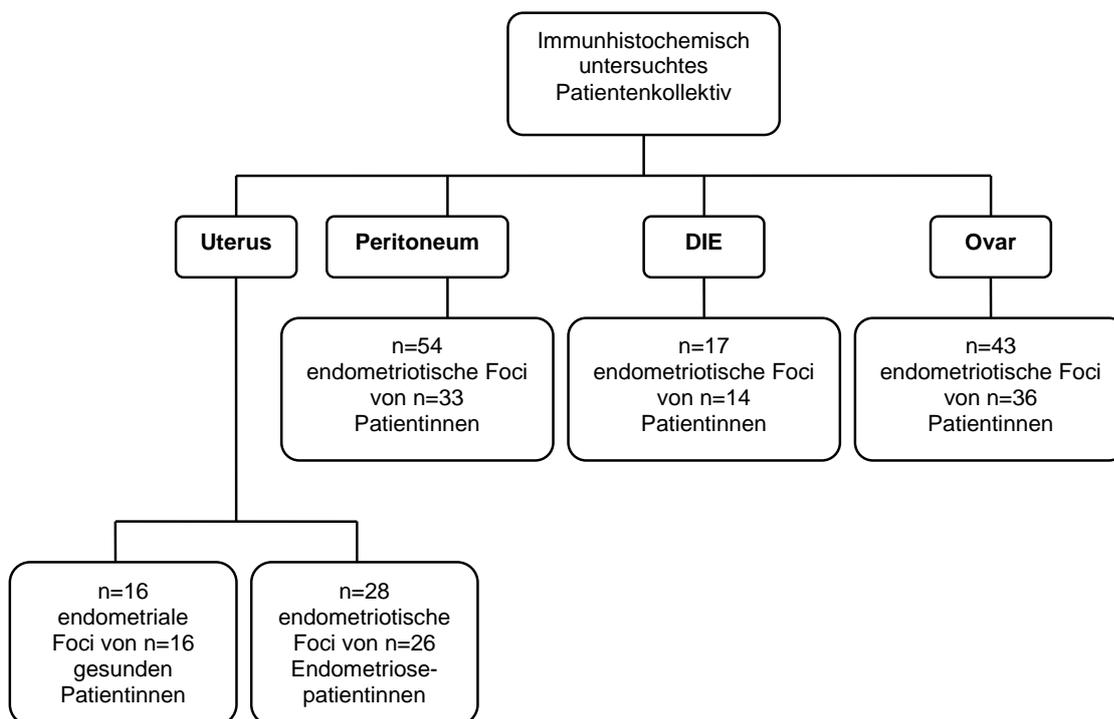


Abb. 12: Übersichts-Schema des gesamten untersuchten Patientenkollektivs (DIE= deep infiltrating Endometriosis)

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Färbungen mit CK18, CK19 und MUC-1 gegenüber gestellt und die markerspezifischen Muster und Lokalisationen analysiert.

Tab. 6: Lokalisationen der peritonealen und tief infiltrierenden Foci

Lokalisation	Peritoneale Endometriose	DIE*
Blase	n=7	n=1
Blasenumschlagsfalte	n=11	
Lig. sacrouterinum	n=4	n=7
Fossa ovarica	n=6	n=1
Douglasraum	n=8	
Lig. rotundum	n=4	
Peritoneum	n=3	
Lig. infundibulum pelvicum	n=2	
Beckenwand	n=4	
Rectum		n=1
Septum rectovaginale	n=1	n=3
Paraurethral		n=1
Rectosigmoid		n=1
Tube	n=1	
Sigma		n=2
Peritoneum	n=3	

*DIE = deep infiltrating endometriosis; tief infiltrierende Endometriose

4.1 Analyse von Patientinnen mit peritonealer Endometriose

Die untersuchten Endometrioseherde mit Absiedelung in das Peritoneum umfassten die folgenden Lokalisationen: Douglasraum, Diaphragma, Beckenwand, Blasenumschlagsfalte, Blase, Blasendach, Infundibulum pelvicum, Fossa ovarica, Lig. rotundum, Lig. sacrouterinum, Septum rectovaginale, Tube, peritoneales Sigma und Peritoneum (nicht näher bezeichnet). Das folgende Schema erläutert die genaue Verteilung der Patientinnen innerhalb dieser Gruppe (Abb. 13).

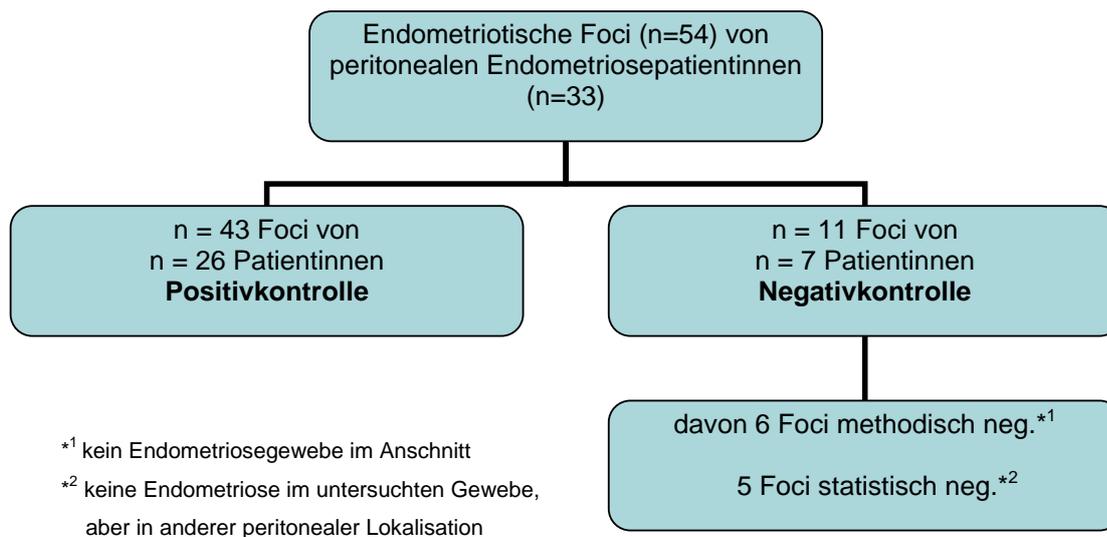


Abb. 13: Aufteilung des Patientenkollektivs der peritonealen Endometriose

Bei allen untersuchten peritonealen Foci zeigte sich ein homogenes Färbemuster des Drüsenepithels und eine stromale Verdichtung des umliegenden Zellverbandes (Abb. 14-19).

Die in Abb. 14 dargestellte Biopsie stellt einen Endometrioseherd der Blase einer multifocal befallenen Patientin dar. Im Gegensatz zu den basal-luminal verstärkten Färbungen des Endometriums liegt hier eine markante luminal betonte Färbung bei allen drei Gewebemarkern vor. Dabei ist das Epithel durchgängig gefärbt; dies ist jedoch bei CK18 deutlich schwächer ausgeprägt, vor allem in den basalen Anteilen. Das Drüsenepithel erscheint einschichtig hochprismatisch, in Anteilen tangential angeschnitten. Auch das Zytoplasma ist bei allen Marken morphologisch identisch und durchgängig gefärbt. Die stromale Umgebung ist zytogen verdichtet.

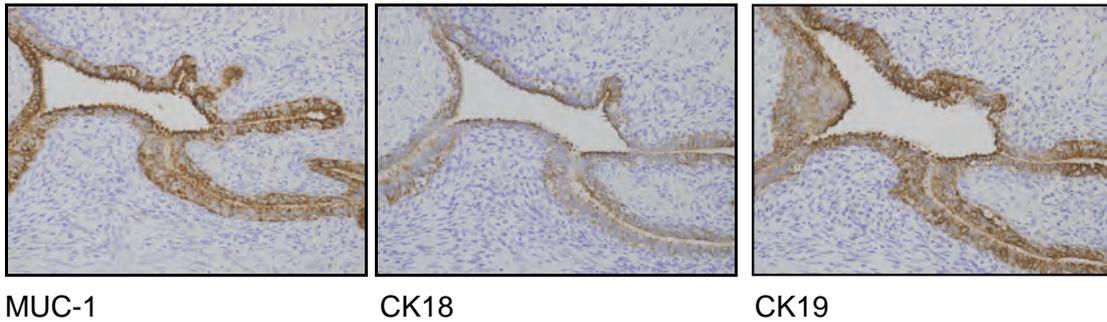


Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 bei einer Patientin mit Endometrioseherden und zytogenem Stroma aus einem Biopsat im Bereich der Blase. Im Präparat finden sich Einblutungen. Weitere Endometriose auch im Lig. rotundum, Ovar und im Infundibulum pelvicum; zusätzlich DIE in einem anderen Blasenabschnitt. Vergrößerung x17

Die Färbung in Abb. 15 zeigt einen Ausschnitt aus einem Präparat mit mehreren Endometrioseherden aus dem Lig. sacrouterinum der Parametrien. Umgeben von ungefärbtem verdichtetem Stroma findet sich ein positives einschichtiges, hochprismatisches Drüsenepithel in allen drei Färbungen. Die Verteilung des gefärbten Zytoplasmas ist homogen, jedoch bei CK18 deutlich schwächer ausgeprägt. Das Färbemuster des MUC-1 Präparates ist mit dem des CK19 Präparates am vergleichbarsten.

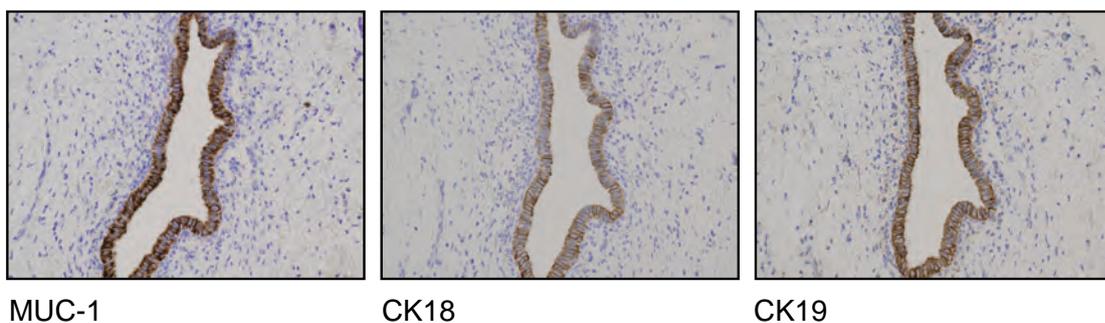


Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 bei einer Patientin mit mehreren Endometrioseherden im Lig. sacrouterinum und Blutungsresiduen mit zusätzlicher fokaler Epithelhyperplasie. Im Präparat befinden sich Verkalkungen aufgrund von Endosalpingiose. Weitere Endometriosefoci auch in der Blasenumschlagsfalte. Vergrößerung x17

In Abb. 16 wird eine weitere Lokalisation einer peritonealen Endometriose in der Fossa ovarica gezeigt. Das einschichtig hochprismatische Drüsenepithel des CK18

Präparates ist nicht durchgängig homogen gefärbt. Einzelne Anteile des Zytoplasmas sind vollständig positiv, jedoch zeigt sich keine basale, oder lumenale Betonung. Dieses Muster ist mit dem peritonealen Präparat des Lig. sacrouterinum (Abb. 15) sehr gut vergleichbar. In der CK19 Färbung ist ein homogenes Färbemuster des gesamten Drüsengebildes erfasst. Dieses ist der MUC-1 Färbung ähnlich, jedoch ist hier die Drüsenstruktur nicht ganz erhalten, sodass die Färbung medial aufgrund der Schnittebene etwas blasser erscheint. In den Färbungen mit MUC-1 und CK19 ist außerdem eine leichte Hintergrundfärbung zu erkennen (Abb. 16, Pfeile). Diese ist jedoch eher auf ein unzulängliches Signal-Rausch-Verhältnis zurückzuführen, als auf die Spezifität der Marker. Eine Veränderung der Färbezeit wurde als Korrektur vorgenommen. Alle drei Schnitte sind in ansonsten ungefärbtes, zytogenes Stroma eingebettet.

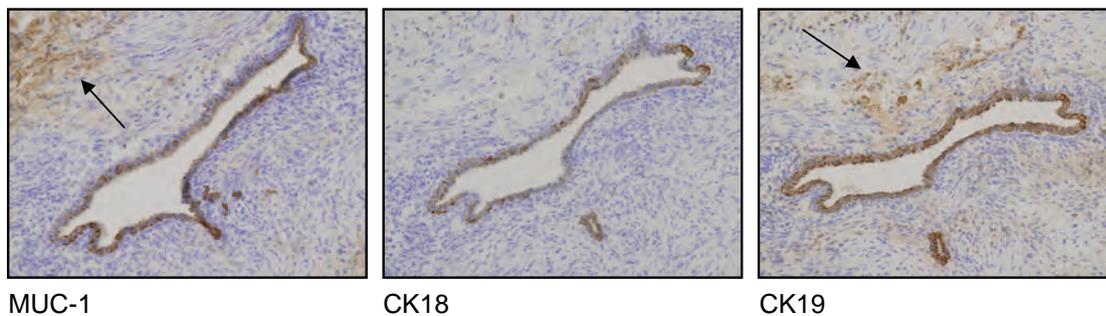


Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 bei einer Patientin mit oberflächlichen Anteilen einer Endometriosezyste im Weichgewebe der linken Fossa ovarica. Weitere Endometrioseherde auch am Nabel, in der Blase und im rechten Unterbauch. Vergrößerung x17, Pfeile: Hintergrundfärbung

Die Patientin in Abb. 17 weist ebenfalls einen sehr großen Endometriosebefall in der Blasenumschlagsfalte auf. Darüber hinaus hatte sie weitere multifokale Endometrioseherde und die Präparate zeigen erneut die bereits beschriebenen charakteristischen Färbemuster.

Drei große angeschnittene zystenartige Drüsenstrukturen sind mit Blutungsresiduen gefüllt und zeigen ein durchgängig gefärbtes, flaches Drüsenepithel (Abb. 17). In allen drei Präparaten sind diese von zytogenem Stroma umgeben und weisen keine basale oder lumenale Betonung auf. Die nahezu „sägeblattartig“ konfigurierte Drüse am medialen Bildausschnitt suggeriert das histologische Bild einer Drüse des Stratum functionale eines Endometriums in der späten Sekretionsphase. Auch diese Drüse ist in zytogenes Stroma eingebettet und weist bei allen drei Markern eine durchgängige Epithelfärbung auf. Bei den Zytokeratinen findet sich am medialen

Rand des Präparates eine weitere Oberflächenfärbung (Abb. 17, Pfeile), die dem Mesothel des Peritoneums entspricht und bei MUC-1 negativ ist. Dieser Aspekt ist einer der wenigen Unterscheide im Färbemuster der getesteten Marker. Das Phänomen einer zusätzlichen mesothelialen Oberflächenfärbung bei den Cytokeratinen konnte nicht nur in der Entität des Peritoneums gefunden werden, sondern auch im Ovar. Auf die Färbecharakteristika des Ovars, sowie auf die ovariellen Oberflächendifferenzierungen wird in Kapitel 4.3 näher eingegangen.

Die Mesothelfärbung mit CK18/CK19 stellt einen Unterschied in der Spezifität der drei verwendeten Marker dar. Eine Einschränkung in der Beurteilung endometriotischer Foci ergibt sich daraus jedoch nicht.

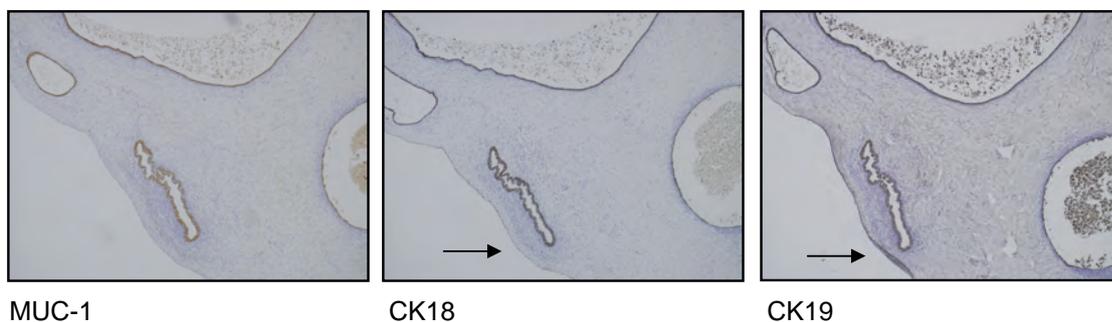


Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 bei einer Patientin mit großen Anteilen einer Endometriose in der rechten Blasenumschlagsfalte. Es zeigen sich zusätzlich Blutungsresiduen im Präparat. Weitere Endometriose auch im Lig. sacrouterinum, im Spatium rektovaginale und im Ovar. Vergrößerung x17, Pfeile: peritoneales Mesothel

In Abb. 18 wird eine endometroide Drüsenformation im Bereich des linken Peritoneums demonstriert. Die Patientin ist im gesamten Peritoneum multifokal befallen und weist erneut das charakteristische Färbemuster von CK18, CK19 und MUC-1 auf. Das hochprismatische Epithel ist in allen Schnitten z.T. stark gewunden und die Drüsen liegen in einer gruppierten Form vor.

Die drei dargestellten Drüsenschläuche liegen in stark herdförmig gruppiertem zytogenem Stroma. Des Weiteren zeigen besonders CK19 und MUC-1 eine luminal verstärkte Anreicherung. Die Färbung von CK18 scheint insgesamt weniger intensiv, aber dennoch ist das Drüsenepithel nahezu durchgängig gefärbt. Dieses Phänomen lässt sich damit in der gesamten Gruppe der peritonealen Endometrioseherde finden und stellt die Marker CK19 und MUC-1 zu deren Detektion in den Vordergrund. Für die Gesamtbeurteilung und vergleichende Analyse ist der Marker CK18 jedoch unentbehrlich.

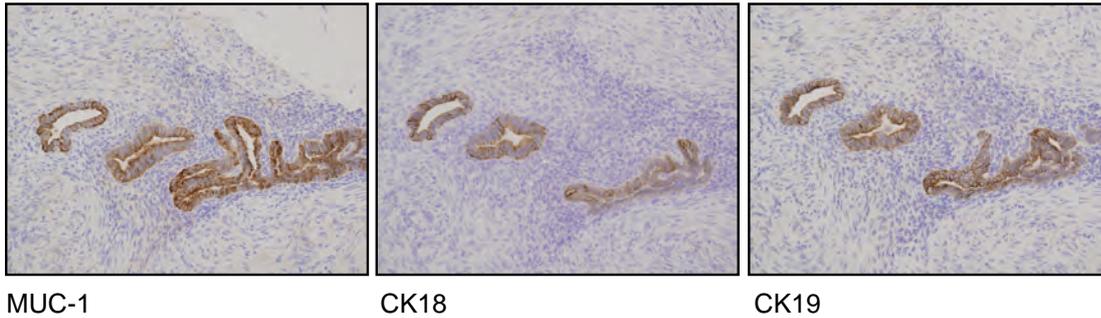


Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in einer Endometriose im Bereich des linken Peritoneums. Im Präparat findet sich fibrosiertes Fett-Bindegewebe mit herdförmigem zytothemem Stroma und endometroiden Drüsenformationen. Weitere Endometriosefoci auch in der Blasenumschlagsfalte und im Spatium rectovaginale.

Vergrößerung x17

Eine weitere peritoneale Lokalisation von Endometrioseabsiedlungen stellt die Abb. 19 dar. Diese Form der Endometriosis genitalis externa im Epithel der Tube ähnelt hier histologisch besonders dem Endometrium des Uterus. Der Drüsenverband liegt eingebettet in stark verdichtetem zytothemem Stroma und suggeriert anhand der Drüsenkonfiguration das Bild eines Endometriums in der späten Sekretionsphase. Der Endometrioseherd lässt sich scharf vom umliegenden Gewebe abgrenzen und die Übersichtsvergrößerung gibt Aufschluss über das Ausmaß der Läsion.

Erneut liegt bei allen drei Markern eine luminale Betonung vor. Die Epithelfärbung ist bei CK19 und MUC-1 deutlicher ausgeprägt und in allen erhaltenen Gewebeverbänden durchgängig. Am lateralen Bildrand zeigt sich ein Tubenanschnitt, dessen Oberflächenepithel durch alle drei Proteine komplett gefärbt wird (Abb. 19, Pfeile). In dieser Übersichtsdarstellung wird das Ausmaß von peritonealen Endometrioseverwachsungen deutlich. Die Infiltration von Nachbarorganen und die Integration in physiologisches Gewebe sind demnach bei peritonealer Endometriose von besonderer Bedeutung und könnten die klinischen Beschwerdebilder erklären.

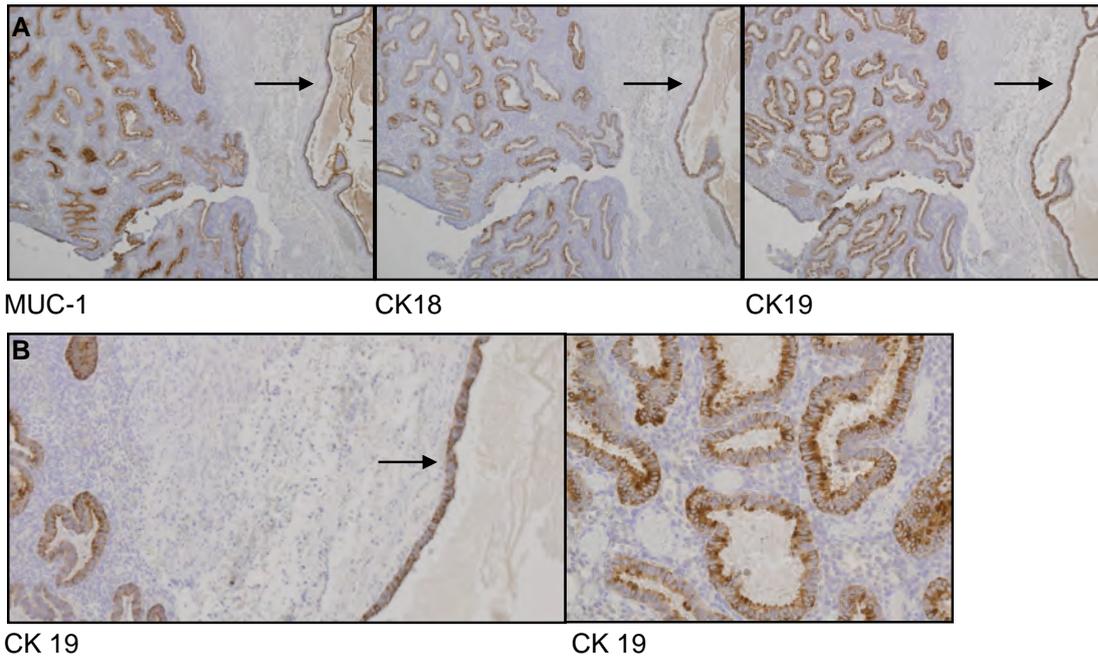


Abb. 19: A Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in einer Endometriosis genitalis externa der linken Tube. Die Patientin ist zusätzlich an einer Adenomyosis uteri und an einem Uterus myomatosus erkrankt. Vergrößerung x4,2, Pfeile: Tubenepithel

B Ausschnittsvergrößerung aus CK19, links Tubenepithel (Pfeil), rechts ovarielle Endometriose

In Tab. 7 sind abschließend die Ergebnisse der Färbungen mit allen drei Markern und die statistisch erhobenen Parameter dieser Gruppe aufgelistet.

Tab. 7: Auswertung und statistische Kriterien der gefärbten Präparate aus dem Peritoneum

Marker	Färbung	Endometriose, Drüsen	Endometriose, keine Drüsen	SEN	SPE	PPV	NPV*
MUC-1	Färbung	43	0	1	1	1	1
	Keine Färbung	0	11				
CK18	Färbung	43	0	1	1	1	1
	Keine Färbung	0	11				
CK19	Färbung	43	0	1	1	1	1
	Keine Färbung	0	11				

* SEN= Sensitivität; SPE= Spezifität; PPV= positiver Vorhersagewert; NPV= negativer Vorhersagewert

4.2 Analyse von Patientinnen mit tief infiltrierender Endometriose (DIE)

Die tief infiltrierende Endometriose wurde intraoperativ anhand des ENZIAN-Scores eingeteilt. Die vergebenen Stadien entsprechen der jeweiligen Infiltrationstiefe des Endometrioseherdes in cm (Stadium 1: <1cm, Stadium 2: 1-3cm, Stadium 3: >3cm) und der Penetration von Nachbarorganen.

In Abb. 20 ist das ausgewertete Patientenkollektiv der Gruppe der tief infiltrierenden Endometriosen dargestellt. Die folgenden Lokalisationen wurden in dieser Entität ausgewertet: tief infiltrierende endometriotische Läsionen im Lig. sacrouterinum, in der Blase, im paraurethralen Bereich, in der Rektumwand, im Septum rectovaginale, in der Fossa ovarica, im peritonealen Sigma und im Rectosigmoid. Da in allen Färbungen Herde von tief infiltrierender Endometriose detektiert werden konnten, entfällt in dieser Gruppe die statistische Auswertung mit einer Negativkontrolle.

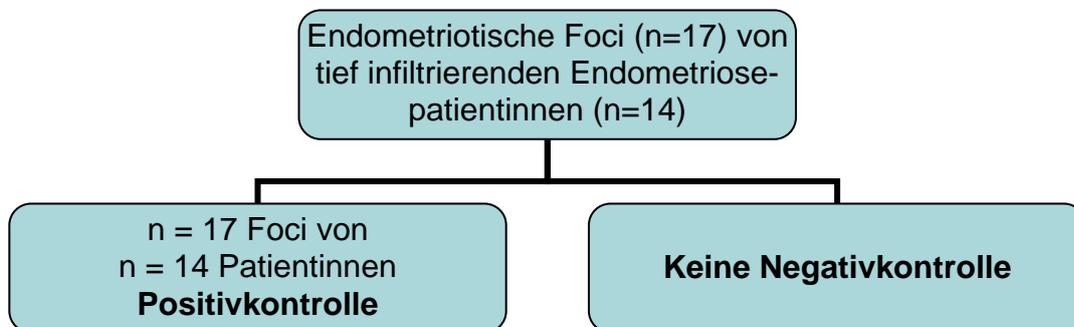
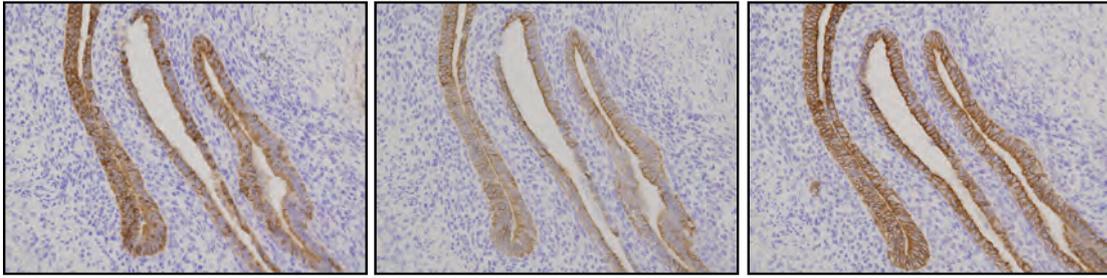


Abb. 20: Aufteilung des Patientenkollektivs der tief infiltrierenden Endometriose

Der Markernachweis wurde auch hier auf alle Präparate angewendet und wird im Folgenden charakterisiert:

Die Abb. 21 zeigt einen tief infiltrierenden Endometrioseherd in der Blase. Das histologische Bild ähnelt dem bereits beschriebenen peritonealen Befall (vgl. Abb. 14). Die Färbung mit CK18 ist im direkten Vergleich mit den anderen Markern etwas schwächer ausgeprägt, dennoch ist das mehrschichtig hochprismatische Drüsenepithel komplett gefärbt (Abb. 21). Dies gilt für alle drei Färbungen der lang gezogenen gruppierten Drüsenschläuche, welche in verdichtetem zytogenem Stroma liegen. Im CK19 Präparat findet sich eine leichte luminale Betonung und das Lokalisationsprofil scheint hier am differenziertesten ausgeprägt zu sein.

Im direkten Vergleich der tief infiltrierenden Präparate zu den Färbungen der peritonealen Endometriose finden sich keine Unterschiede im Markerprofil. Das Färbemuster erscheint identisch und die Epithelien sind vollständig erfasst. Demnach sind die Detektion der Foci und die Qualität der Marker unabhängig von der Infiltrationstiefe der Endometriose des jeweiligen Gewebes.



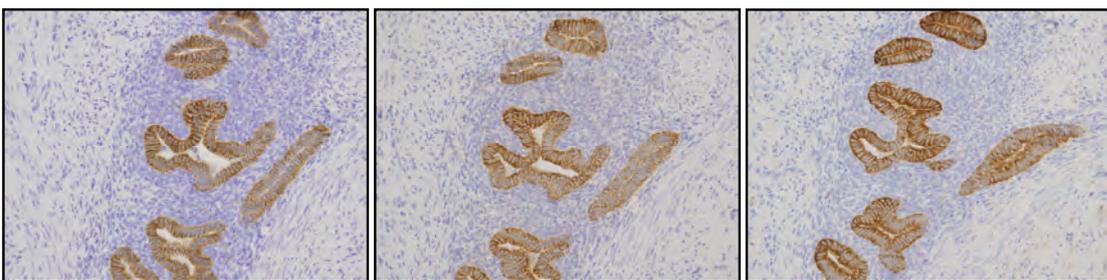
MUC-1

CK18

CK19

Abb. 21: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 bei einer Patientin mit tief infiltrierenden Endometrioseherden in der Blase. Zusätzlich findet sich im gesamten Präparat laut pathologischem Befund fibrosierend gefäßführendes Fett-Bindegewebe und muskuläres Weichgewebe mit atypiefreiem Zylinderepithel. Es zeigt sich zytogenes Stroma und eine granulierende Entzündung. Weitere Endometriosefoci waren auch im Lig. rotundum und im Infundibulum pelvicum. Vergrößerung x17

In der folgenden Abb. 22 ist eine tief infiltrierende Endometriose im Bereich des Spatium rektovaginale dargestellt. Die ausgedehnte Drüsengruppierung, umgeben von stark verdichtetem zytogenem Stroma, ist in allen drei Markerdarstellungen deutlich und durchgehend gefärbt, ohne eine basale oder lumenale Betonung. Das überwiegend einschichtig hochprismatische Epithel ist homogen und das jeweilige Zytoplasma ist markant hervorgehoben. In dieser Färbung sind alle Marker qualitativ und quantitativ gleichwertig sensitiv. Auch hier zeigen sich im Vergleich zu den bereits dargestellten Entitäten keine Unterschiede im Lokalisationsprofil.



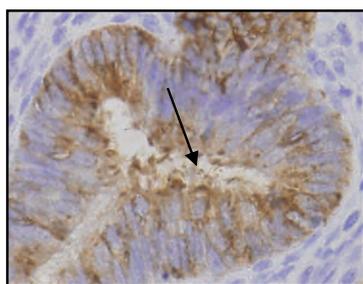
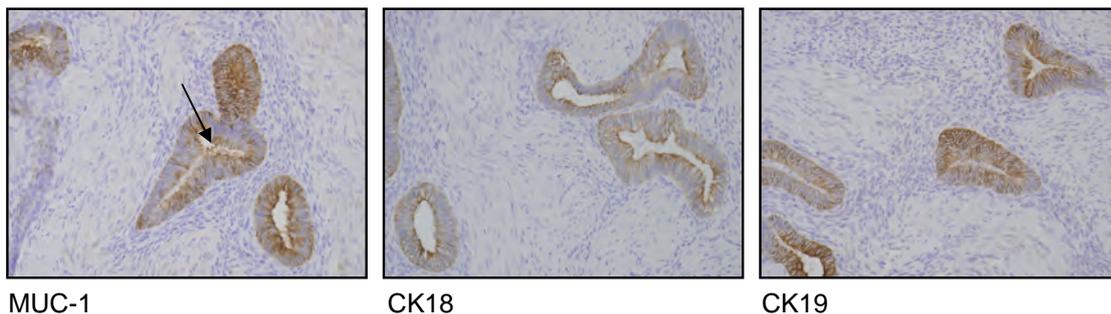
MUC-1

CK18

CK19

Abb. 22: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in einer tief infiltrierenden Endometriose im Spatium rektovaginale. Im Präparat zeigen sich herdförmiges zytogenes Stroma, sowie fibrosierendes Fett- und Bindegewebe. Weitere Endometrioseherde fanden sich auch im Peritoneum und in der Blasenumschlagsfalte. Vergrößerung x17

Die Abb. 23 stellt eine besonders tief infiltrierende Endometriose eines Sigmadivertikels dar. In allen Färbungen ist das Drüsenepithel leicht inhomogen gefärbt, gleichzeitig zeigt sich bei den kleineren Drüsenanschnitten eine luminale Betonung. Erneut ist das Färbemuster im direkten Vergleich bei CK18 etwas schwächer ausgebildet. Das Drüsenepithel ist einschichtig hochprismatisch und an manchen Stellen tangential angeschnitten. In der unmittelbaren Drüsenumgebung finden sich mehrere Herde von zytogen verdichtetem Stroma. Im MUC-1 Präparat lässt sich ein Sekretionsmechanismus in das Drüsenlumen beobachten. Die Vesikel sind in der Übersicht und in der Vergrößerung mit einem Pfeil gekennzeichnet.

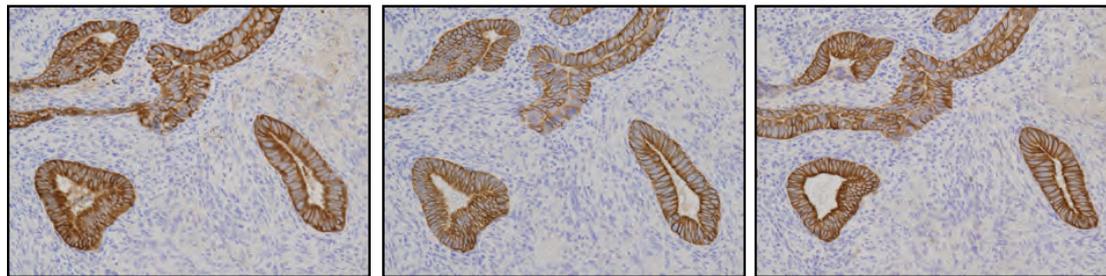


Ausschnittsvergrößerung MUC-1

Abb. 23: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in einer tief infiltrierenden Endometriose eines Sigmadivertikels. Im Präparat zeigt sich Gewebe aus dem Sigma mit florider Serositis und mehreren tief infiltrierenden Endometrioseherden. Weitere Endometriosen auch im Uterus und im Peritoneum. Vergrößerung x17, Pfeile: sezerniertes MUC-1

Die in Abb. 24 dargestellte Drüsenformation entspricht einer tief infiltrierenden Endometriose der Fossa ovarica. Es handelt sich um eine Patientin mit einem multifocalem Befall. Alle drei immunhistochemischen Färbungen imponieren mikroskopisch nahezu identisch. Das Färbemuster zeigt eine leichte basal-luminale Betonung. Das Zytoplasma lässt sich klar abgrenzen. Das Epithel ist bei den großlumigen Drüsenanschnitten einschichtig hochprismatisch, bei den stark

gewundenen Abschnitten im medialen Bildrand jedoch mehrschichtig. Das Lokalisationsprofil der drei Marker ist kaum voneinander zu unterscheiden und das Färbemuster ist auch in diesem Präparat konstant, sowie mit den vorherigen Färbungen der Gruppe vergleichbar. Das in den peritonealen Präparaten etwas schwächer exprimierte Cytokeratin 18 ist in den tief infiltrierenden Endometrioseläsionen gleichwertig mit den Färbungen von CK19 und MUC-1.



MUC-1

CK18

CK19

Abb. 24: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in einem tief infiltrierenden Endometrioseherd der Fossa ovarica. Die Läsion liegt in vernarbtem Weichgewebe mit Gefäß- und Nervenquerschnitten. Weitere Endometriosefoci auch im Ovar und in der Blasenumschlagsfalte. Vergrößerung x17

Auch die Parametrien können von tief infiltrierender Endometriose betroffen sein. Die folgende Übersichtsaufnahme zeigt ein Präparat mit einem ausgedehnten Befall des Lig. sacrouterinum (Abb. 25). Umgeben von verdichtetem zytogenem Stroma liegt homogen gefärbtes einschichtig hochprismatisches Drüsenepithel vor, welches im lateralen Bildabschnitt sehr dilatiert ist. Das histologische Färbemuster ist bei CK18, CK19 und MUC-1 nahezu identisch und die Marker sind in diesem Areal zu 100% sensitiv. Durch die Schnittebene ist die Drüsenkonfiguration bei CK18 leicht abweichend jedoch ohne Einschränkung beurteilbar. Darüber hinaus zeigt sich im MUC-1 Präparat ein luminaler Sekretionsprozess (Abb. 25, Pfeil), welcher bei den Cytokeratinen nicht angefärbt ist.

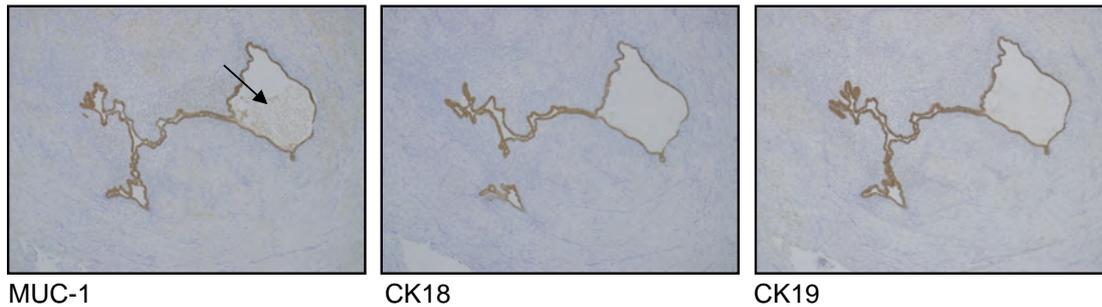


Abb. 25: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in einer tief infiltrierenden Endometriose des linken Lig. sacrouterinums. Das Präparat zeigt zytogenes Stroma und Blutungsresiduen. Weitere Endometrioseherde auch im Ovar und im Rektosigmoid. Vergrößerung x4,2, Pfeil: luminaler Sekretionsprozess

In Tab. 8 sind abschließend die Ergebnisse der Färbungen mit allen drei Markern in dieser Gruppe aufgelistet.

Tab. 8: Auswertung der gefärbten Präparate von tief infiltrierender Endometriose

Marker	Färbung	Endometriose, Drüsen	Endometriose, keine Drüsen
MUC-1	Färbung	17	0
	Keine Färbung	0	0
CK18	Färbung	17	0
	Keine Färbung	0	0
CK19	Färbung	17	0
	Keine Färbung	0	0

4.3 Analyse von Patientinnen mit ovarieller Endometriose

Die Endometriosis genitalis externa des Ovars wurde als eigenständige Lokalisation immunhistochemisch ebenfalls mit den Markern CK18, CK19 und MUC-1 analysiert. Auch hier zeigt die Histologie der Absiedlungen die bereits beschriebenen Charakteristika und Färbemuster. Die Proteine sind auch für endometriotische Foci im ovariellen Gewebe äußerst sensitiv, obwohl es sich hier vorwiegend um Zystenverbände handelt. Auch deren etwas flacheres Oberflächenepithel wird durchgängig erfasst und die endometriotischen Foci sind umgeben von zyto-genen Verdichtungen. Das Schema in Abb. 26 gibt einen Überblick über das ausgewertete Patientenkollektiv dieser Entität.

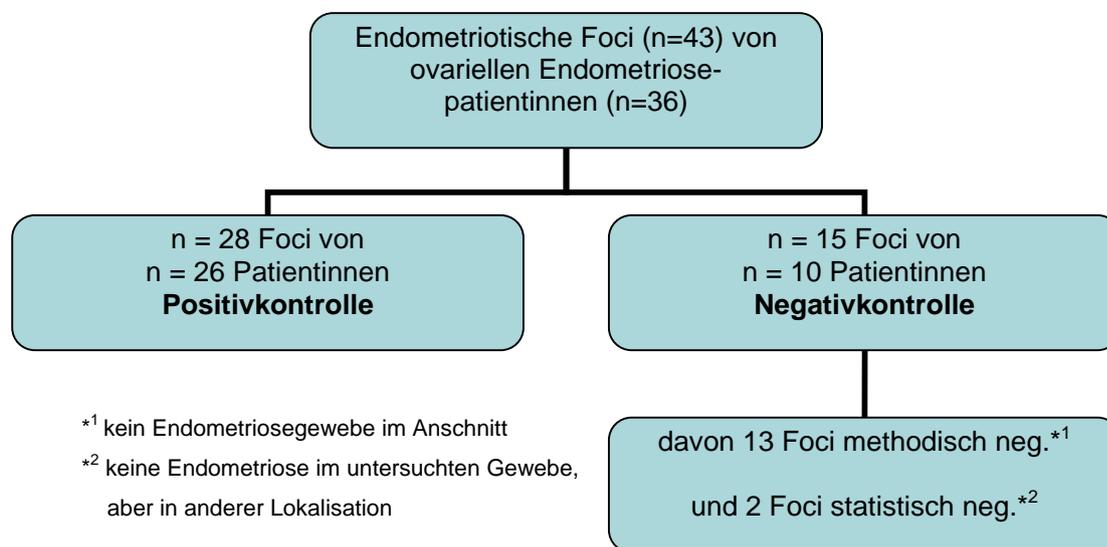


Abb. 26: Aufteilung des Patientenkollektivs der ovariellen Endometriose

Die immunhistochemischen Ergebnisse werden im Folgenden exemplarisch dargestellt.

In Abb. 27 ist ein Präparat aus dem linken Ovar dargestellt. Es zeigt sich in allen drei Markeranalysen ein durchgängig gefärbtes Epithel der Endometriosezystenanteile. Das einschichtig hochprismatische Epithel des abgebildeten Focus zeigt bei MUC-1 eine luminale Betonung, und ist in allen drei Darstellungen besonders von dichtem zyto-genem Stroma umgeben. Das teilweise tangential angeschnittene einschichtige Zystenepithel wird ebenfalls von den drei Markern vollständig erfasst und erscheint anteilig etwas flacher. Die Zysten stellen sich deutlich großlumiger dar. Das

Lokalisationsprofil weicht insgesamt nicht von den bereits beschriebenen Charakteristika der anderen Entitäten ab und zeigt auch bei der ovariellen Endometriose ein einheitlich homogenes Färbemuster.

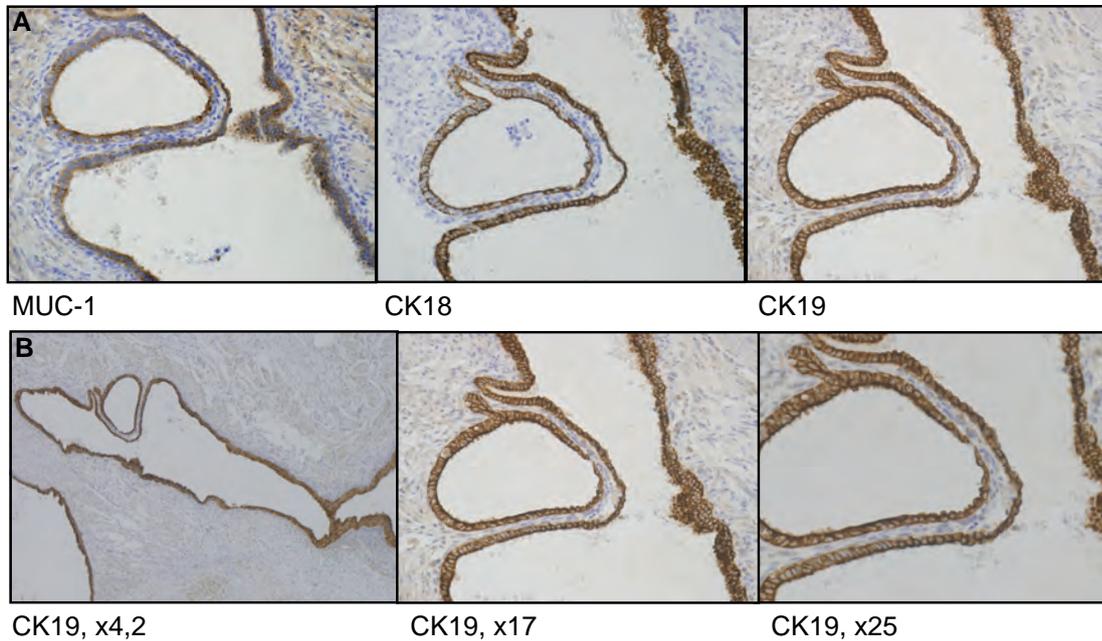


Abb. 27: **A** Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in einer zystisch deformierten Endometriose-manifestation im Bereich der linken Adnexe. Das Präparat zeigt einen Ausschnitt aus einem Tubenquerschnitt mit im Gesamtpräparat fibrosierend verbackenen Tuben- und Ovaranteilen. Vergrößerung x17
B Übersicht (Vergrößerung x4,2) und Detailaufnahmen der ovariellen Endometriose (Vergrößerung x17 und x25) mit CK19

Die in Abb. 28 dargestellte Ovarialzyste ist in den Bildausschnitten deutlich durch die Marker hervorgehoben. Die Übersichtsbilder zeigen in allen drei Präparaten eine „sägeblattartig“ konfigurierte Drüsen- und Zystenstruktur. In der späten sekretorischen Phase weist die Funktionalis des physiologischen Endometriums genau solche Drüsenkonfigurationen auf. Dies lässt mutmaßen, dass auch abgesiedelte Endometrioseareale hormonellen Einflüssen unterliegen.

Die Epithelien der Abb. 28 sind einschichtig, teilweise tangential angeschnitten und durchgängig von MUC-1, CK18 und CK19 erfasst. Bei MUC-1 liegt erneut eine luminal Betonung vor. Das Färbemuster von CK18 ist im direkten Vergleich mit den anderen Markern schwächer und qualitativ etwas unterlegen. Dieses Phänomen wurde bereits bei den peritonealen Endometrioseläsionen beobachtet und zeigt,

dass die Färbungen unabhängig von den verschiedenen Entitäten ein identisches Muster aufweisen.

Das umliegende zytogene Stroma ist überall deutlich verdichtet. Die Biopsie ist nicht vollständig erhalten, sodass im medialen Bildrand einige Strukturen nicht angefärbt werden konnten.

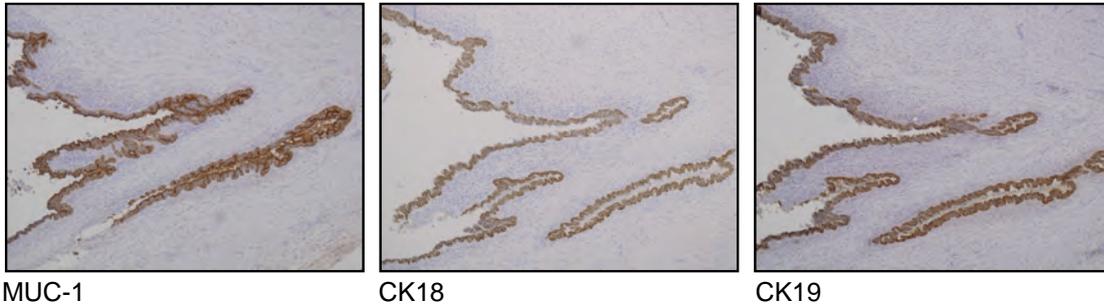


Abb. 28: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in einer Ovarialzyste des linken Ovars. Es zeigen sich Anteile einer Endometriosezyste mit Stroma und Blutungsresiduen. Weitere Endometrioseherde auch im Sigma, im Rektum und im Lig. sacrouterinum. Vergrößerung x4,2

Die in Abb. 29 dargestellte immunhistochemische Färbung demonstriert die Anteile einer Endometriosezyste im rechten Ovar. Alle Marker zeigen ein durchweg positives Färbemuster des ein- und mehrschichtig hochprismatischen Zystenepithels. MUC-1 und CK19 sind in ihrer Färbecharakteristik sehr gut vergleichbar, wohingegen CK18 durch einzelne schwach dargestellte Areale etwas abweicht. Die dargestellte Zystenstruktur gleicht sowohl bezüglich ihrer Histologie, als auch ihres Lokalisationsprofils der Färbung der Ovarialzyste aus Abb. 28. Damit zeigt sich erneut ein einheitliches Muster, sowohl innerhalb der Entitäten, als auch im direkten Vergleich der Gruppen. In allen Darstellungen zeigt sich verdichtetes zytogenes Stroma in der unmittelbaren Zystenumgebung.

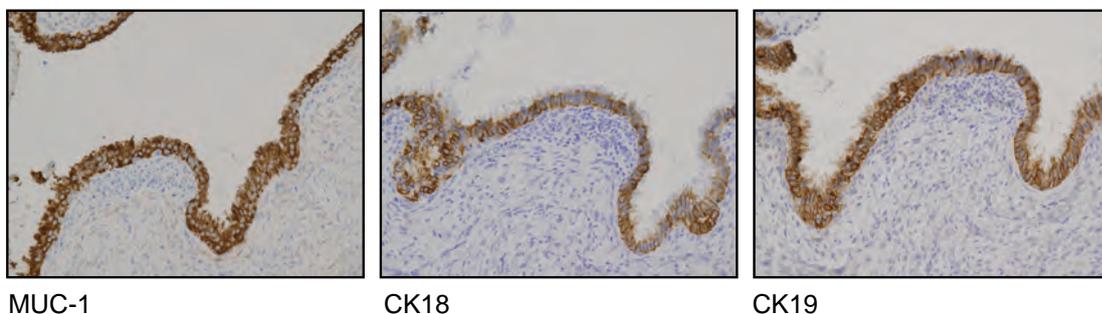


Abb. 29: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in Anteilen einer Ovarialzyste aus dem rechten Ovar. Eine Endometriosezyste mit

endometriotischer Schleimhaut ist dargestellt, sowie Stroma und Blutungsresiduen. Weitere Endometriosefoci auch im Douglas-Raum. Vergrößerung x17

Das in Abb. 30 dargestellte Übersichtsbild zeigt Ovaranteile einer multifocal betroffenen Endometriosepatientin. Hier werden die Ausmaße von Endometriosezysten im direkten Vergleich zu einigen Drüsenherden deutlich. In allen drei Markeranalysen sind sowohl die Zysten- als auch die Drüsenepithelien durchgängig gefärbt und eingebettet in verdichtetes zytogenes Stroma. Im Zystenlumen zeigen sich Blutungsresiduen und Sekret, welches bei MUC-1 angefärbt ist (Abb. 30, Pfeil). Die Drüsenherde liegen gruppiert im lateralen Bildrand (Abb. 30, Kästen) und zeigen die identischen histologischen Charakteristika wie die bereits beschriebenen Endometrioseherde anderer Lokalisationen.

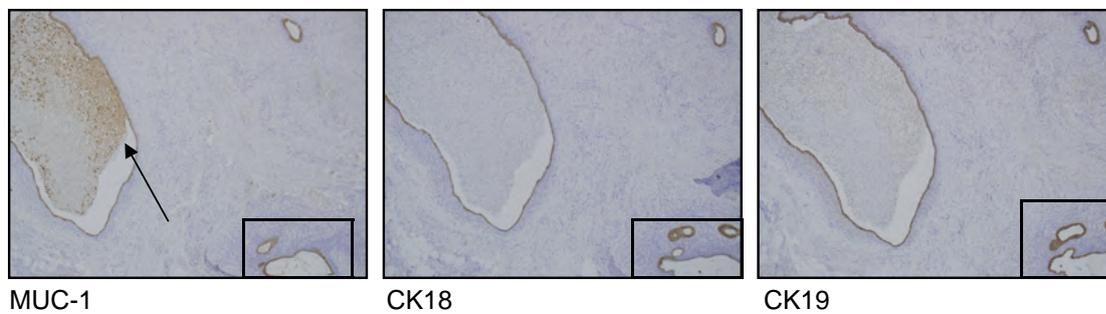


Abb. 30: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in einer Endometriose des linken Ovars. Es zeigen sich Anteile einer Endometriose und Blutungsresiduen. Weitere Endometriosen auch in der Blasenumschlagsfalte, im Spatium rektovaginale und im Lig. sacrouterinum. Vergrößerung x4,2, Pfeil: Blutungsresiduen und Sekret, Kästen: Drüsenherde

Da die getesteten Marker nicht ausschließlich für die Epithelien von Endometrioseläsionen sensitiv sind, ist deren Abgrenzung zu physiologischem Gewebe manchmal schwierig. Der in Abb. 31 dargestellte Adnexausschnitt veranschaulicht diese Problematik. Der vom Pathologen gesicherte Endometrioseherd inmitten eines Tubenanschnittes ist hier erst bei genauerer Betrachtung festzustellen. Die dargestellten Foci (Abb. 31, Kästen) sind durchgängig gefärbt und das einschichtige Drüsenepithel weist bei MUC-1 und CK19 eine luminale Betonung auf. Das herdförmig umgebende zytogene Stroma ist verdichtet und die Drüsenmorphologie lässt sich von den deutlich verzweigteren Tubenepithelien abgrenzen. Um diese Ergebnisse weiter zu untermauern, wurde histologischer Beurteilung zusätzlich eine Färbung mit dem integralen

Membranprotein CD10 durchgeführt. Dieser Marker wird als Standard zur Darstellung von hämatopoetischen Neoplasien, stromalem Endometrium und stromaler Endometriose, sowie bei Neoplasien des Endometriums angewendet. Es zeigen sich deutliche Anreicherungen in den Bereichen der betroffenen Endometrioseareale (Abb. 31, Pfeile), die dadurch als gesichert gewertet werden können.

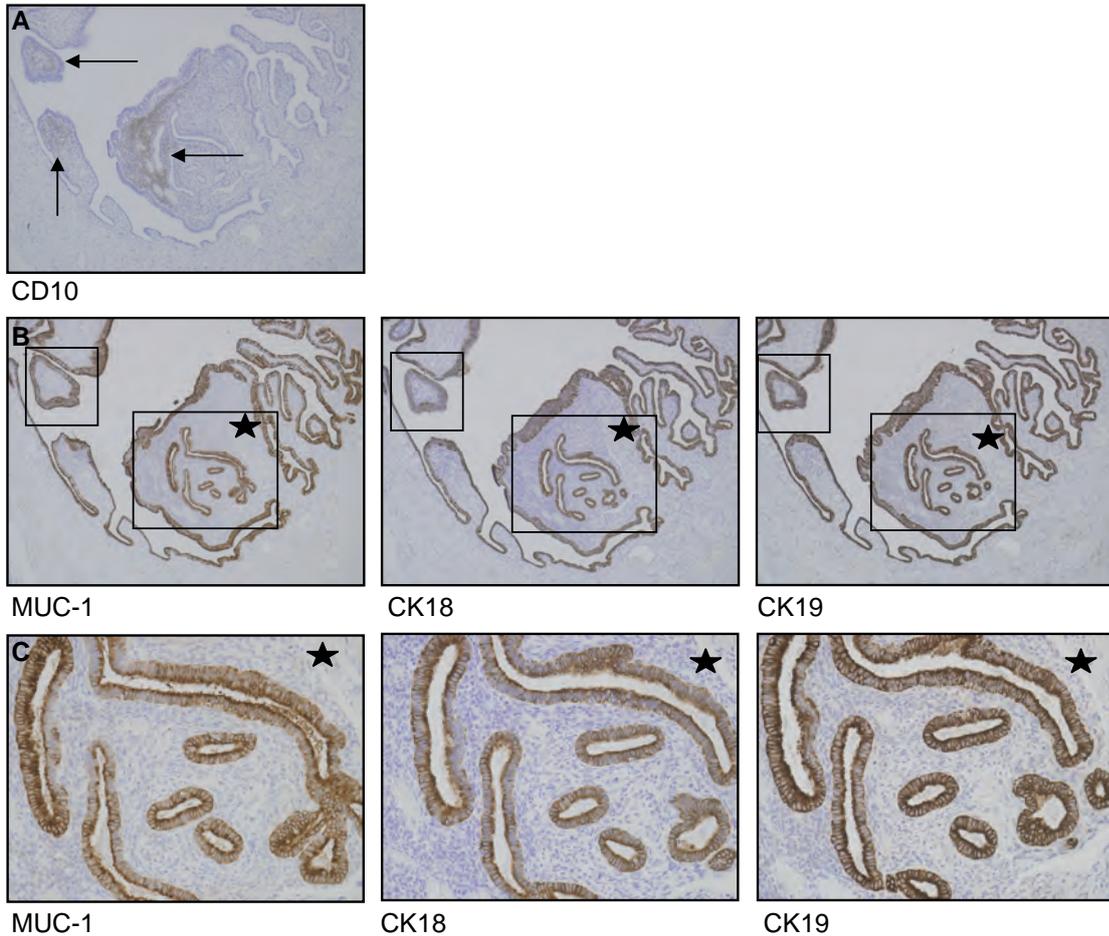


Abb. 31: A CD10 B Gesamtfärbung MUC-1, CK18/19 C Detailaufnahme Endometrioseherd MUC-1, CK18/19

Immunohistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in einem Endometrioseherd aus dem Bereich der linken Adnexe. Im Präparat findet sich laut pathologischem Befund Tubengewebe mit Zeichen einer venösen Zirkulationsstörung und einem Areal mit endometroider Schleimhautdifferenzierung (gesicherter Herd). Vergrößerung x4,2, Pfeile: CD10-positive Endometrioseareale, Kästen: Endometriostische Foci in der Markeranalyse, Sterne: Bildausschnitt Vergrößerung Endometrioseherd

In Tab. 9 sind abschließend die Ergebnisse der Färbungen mit allen drei Markern und die statistisch erhobenen Parameter dieser Gruppe aufgelistet.

Tab. 9: Auswertung und statistische Kriterien der gefärbten Präparate aus dem Ovar

Marker	Färbung	Endometriose,	Endometriose,	SEN SPE PPV NPV*			
		Drüsen	keine Drüsen				
MUC-1	Färbung	28	0	1	1	1	1
	Keine Färbung	0	15				
CK18	Färbung	28	0	1	1	1	1
	Keine Färbung	0	15				
CK19	Färbung	28	0	1	1	1	1
	Keine Färbung	0	15				

* SEN= Sensitivität; SPE= Spezifität; PPV= positiver Vorhersagewert; NPV= negativer Vorhersagewert

4.4 Markerspezifität

Das bereits geschilderte Ergebnis der zusätzlichen Färbung physiologischer Gewebestrukturen und damit die jeweilige Spezifität der analysierten immunhistochemischen Marker wird im Folgenden erläutert.

Die Tabelle 10 gibt einen Überblick über die detektierten Lokalisationen, welche außer den bereits beschriebenen endometriotischen Läsionen ebenfalls von den Markern erfasst wurden. Die Gewebe konnten wiederholt dargestellt werden und ließen sich immer vom pathologischen Gewebe der Endometriose klar abgrenzen.

Tab. 10: Gewebe-Spezifität der drei verwendeten Marker

Gewebe	MUC-1	CK18	CK19
peritoneales Mesothel	-	✓	✓
Endosalpingiose	✓	✓	✓
Tubenepithel	✓	✓	✓
Ovariell			
Oberflächenepithel	-	✓	✓
Primärfollikel	-	✓	✓
Corpus luteum Zysten	-	✓	✓
Perineurium	✓	-	-

Das Färbemuster von CK18, CK19 und MUC-1 des Tubenepithels (Abb. 31) ähnelt sehr dem der endometriotischen Drüsen. Lediglich das histologische Gesamtbild und die Konfiguration der Epithelästelung lassen auf ein anderes Grundgewebe schließen. Die Färbung ist bei allen drei Markern durchgängig und basal-luminal betont.

Der Aspekt der peritonealen Mesothelfärbung von CK18 und CK19 im Gegensatz zum MUC-1-negativen ovariellen Oberflächenepithel wurde bereits im Abschnitt „Peritoneale Endometriose“ (Abb. 17) dargestellt und zeigt einen der wenigen deutlichen Unterschiede der getesteten Marker auf.

Bezüglich der Spezifität der Marker zeigte sich nebenbefundlich in einigen MUC-1 Färbungen der Peritonealpräparate, vor allem aus dem Bereich der Blase, eine Anreicherung im Perineurium von Nervenzellen (Abb. 32). Diese liegen z.T. in Gruppen eingebettet in Binde- und Fettgewebe vor.

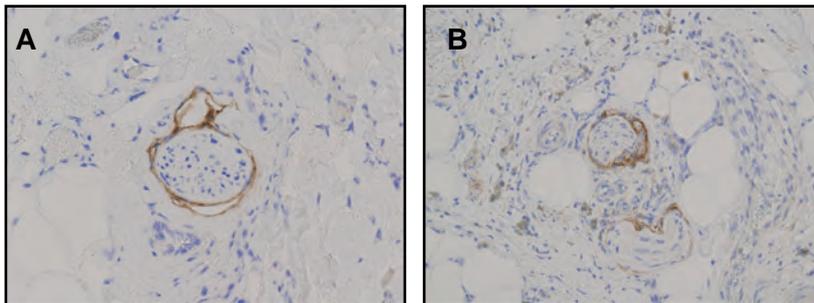


Abb. 32: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1 im Perineurium. Bild A zeigt angefärbtes Perineurium aus dem Bereich des Lig. sacrouterinum. Vergrößerung x25. Bild B zeigt angefärbtes Perineurium aus dem rechten Peritoneum. Vergrößerung x17

Weiterhin fanden sich in den Proben der Adnexe häufig angefärbte Follikel verschiedener Stadien. Ihr charakteristisches einschichtiges, kubisch- bis hochprismatische Follikelepithel ist bei den Cytokeratinen positiv gefärbt, in den MUC-1 Präparaten findet sich keine MUC-1 Lokalisation (Abb. 33).

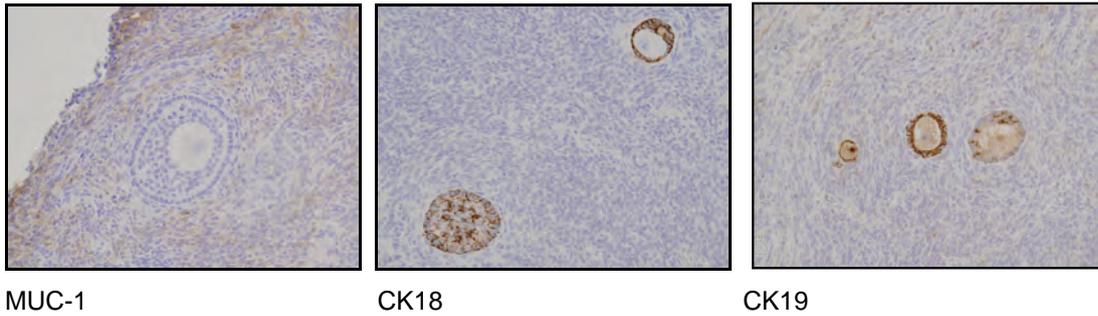


Abb. 33: Immunhistochemischer Nachweis von CK18 und CK19 in Follikeln aus einer Ovarialzyste des rechten Ovars. Vergrößerung x17

Die zusätzlich erfassten Corpus-luteum-Zysten im Ovar waren ebenfalls lediglich bei den Cytokeratinen positiv. Diese durch Einblutungen entstehenden vergrößerten Gelbkörperzysten sind mit MUC-1 nicht darstellbar, jedoch mit CK18 und CK19 (Abb. 34). Die Zysten sind histologisch nicht mit Endometriosezysten zu verwechseln, da ihr Epithel deutlich flacher und von klassischem Drüsenepithel klar abgrenzbar ist. Demnach stellte die Färbung der Corpus-luteum-Zysten für die Detektion der Endometriosefoci keine Einschränkung dar.

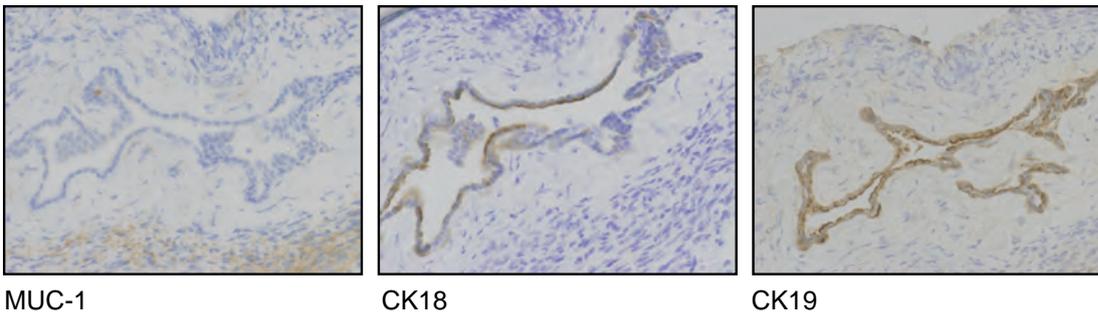
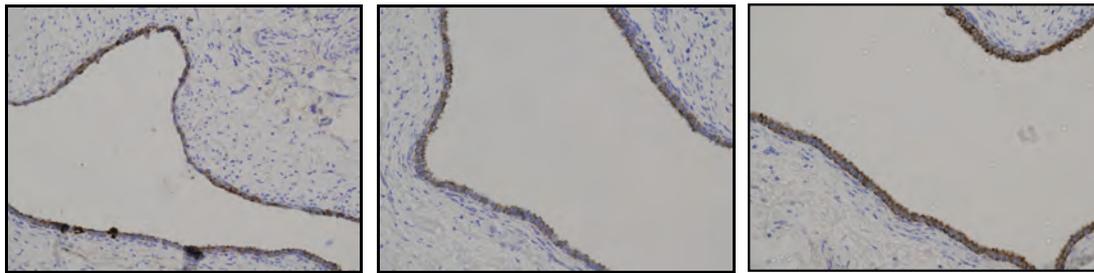


Abb. 34: Immunhistochemischer Nachweis von CK18 und CK19 in einer luteinisierten Follikelzyste aus dem rechten Ovar. Vergrößerung x25

Als Sonderfall gilt die Endosalpingiose, welche zystische Absiedlungen tubaren Epithels darstellt und als „Low-malignant-Potency-Tumor“ eingestuft wird. Diese Zystenform wird von allen drei Markern erfasst (Abb. 35) und lediglich das flache Zystenepithel und kaum verdichtetes zytogenes Stroma weisen auf eine von Endometriose abweichende Gewebestruktur hin.



MUC-1

CK18

CK19

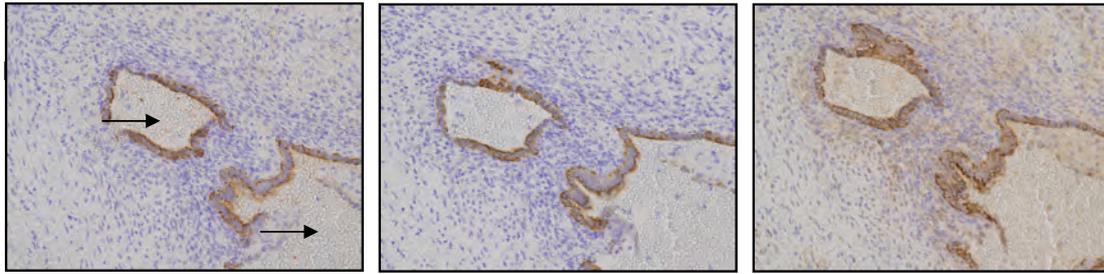
Abb. 35: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in einer Endosalpingiose aus dem Lig. sacrouterinum. Im Präparat zeigen sich zusätzliche Endometrioseherde und Verkalkungen. Vergrößerung x17

4.5 Multifocaler Befall bei Endometriose

Um die Komplexität und den Schweregrad der Erkrankung Endometriose zu erfassen, wird im Folgenden besonders eine Patientin mit multifocalem Befall vorgestellt. Alle entnommenen Biopsien wurden pathologisch untersucht und immunhistochemisch mit den Markern MUC-1, CK18 und CK19 analysiert. Die 37-jährige Patientin litt an einem sehr ausgedehnten peritonealen Befall im Bereich des Blasendaches (Abb. 36), im paraurethralen Bereich (Abb. 37), in der Beckenwand (Abb. 38) und in den Ligg. sacrouterina (Abb. 39). Die Endometriosezellen der Ligg. sacrouterina und der paraurethrale Befall sind darüber hinaus zusätzlich tief infiltrierend. Dieser multifocale Befall spricht dafür, dass diese Patientin eine besondere Prädisposition für die Erkrankung Endometriose hat.

Alle dargestellten Drüsenkonfigurationen werden von den Markern identisch in ihrem Färbemustern erkannt und zeigen die charakteristischen histologischen Merkmale:

Der Endometrioseherd im Peritoneum des linken Blasendaches zeigt stark dilatierte Drüsen mit Einblutungen in die Lumina (Abb. 36, Pfeile). Alle angefärbten Strukturen sind von verdichtetem zytogenem Stroma umgeben und das Färbemuster ist bei MUC-1 und CK18 basal-luminal betont. Die Darstellung von CK19 ist im Gesamtbild methodisch leicht überfärbt, jedoch trotzdem auswertbar. Des Weiteren sind die einschichtig hochprismatischen Drüsenepithelien bei allen drei Markern durchgängig erfasst, jedoch in den unteren Bildausschnitten z.T. nicht vollständig erhalten.



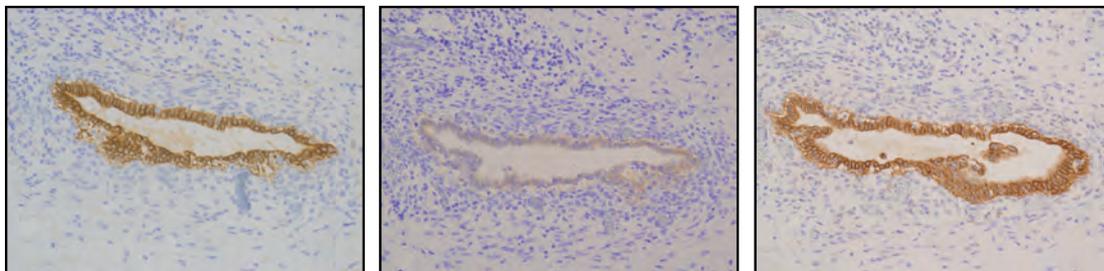
MUC-1

CK18

CK19

Abb. 36: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in Endometrioseinseln aus dem Bereich des linken Blasendaches mit zytothemem Stroma. Weitere Endometrioseherde finden sich auch im rechten Blasendach, im paraurethralen Bereich rechts, im Lig. sacrouterinum rechts/links und in der linken Beckenwand. Vergrößerung x17, Pfeile: luminale Einblutungen

Die in Abb. 37 dargestellte paraurethrale tief infiltrierende Endometriose ist im Färbemuster bei MUC-1 und CK19 fast identisch. Es zeigt sich eine komplette Anreicherung der z.T. mehrschichtigen Drüsenepithelien, welche in allen drei Darstellungen von verdichtetem zytothemem Stroma umgeben sind. Die CK18 Färbung ist hier äußerst schwach, aber dennoch als positiv zu bewerten.



MUC-1

CK18

CK19

Abb. 37: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in einer tief infiltrierenden Endometriose paraurethral rechts. Es zeigen sich Endometrioseinseln mit zytothemem Stroma. Weitere Endometriosefoci finden sich bei dieser Patientin auch im Blasendach rechts/links, im Lig. sacrouterinum rechts/links und in der linken Beckenwand. Vergrößerung x17

Ein weiterer Endometriosefocus lag im Bereich der linken Beckenwand (Abb. 38) und zeigt ähnliche Muster wie der paraurethrale Befall (Abb. 37). Hier ist erneut die endometriotische Drüse bei MUC-1 und CK19 eindeutig positiv und durchgängig

erfasst, wohingegen die CK18 Färbung lediglich grenzwertig positiv ist. Die Einbettung in zytogenes Stroma liegt bei allen drei Darstellungen vor.

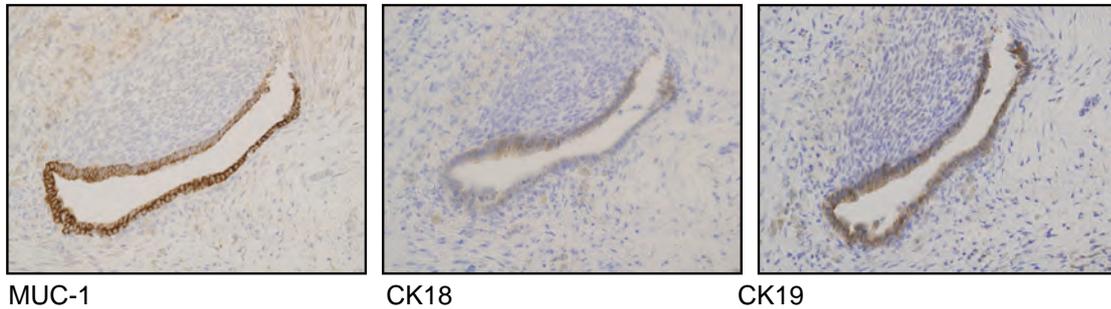
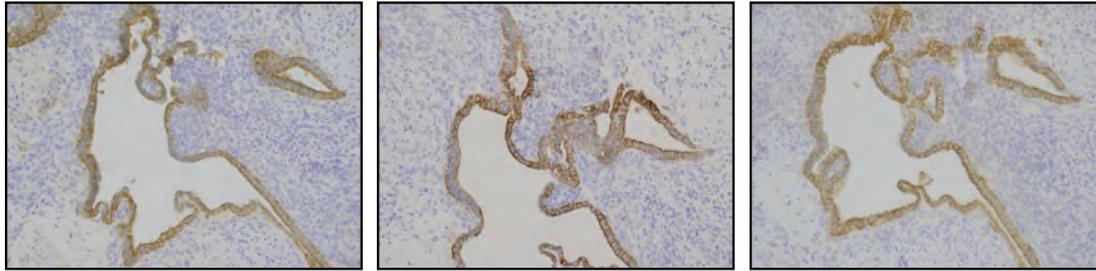


Abb. 38: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in Endometrioseinseln mit zytogenem Stroma aus der linken Beckenwand. Weitere Endometrioseläsionen auch im Blasendach rechts/links, im Lig. sacrouterinum rechts/links und im paraurethralen Bereich rechts. Vergrößerung x17

Das hier wieder aufgetretene Phänomen der schwächeren Färbung mit CK18 veranschaulicht, dass die Sensitivität dieses Cytokeratins im direkten Vergleich mit den Epithelialmarkern MUC-1 und CK19 etwas geringer ist. Die abgeschwächtere Expression von CK18 konnte jedoch in allen Lokalisationen nachgewiesen werden und ist trotz ihres Färbeprofiles statistisch auswertbar und signifikant.

Der tief infiltrierende Endometrioseherd der Parametrien ist in der folgenden Abb. 39 besonders eindrucksvoll dargestellt. Die Drüsenmorphologie ist deutlich dilatiert, zystisch vergrößert und die Konformation der Drüse ist stark verzweigt. Alle drei Marker erscheinen hier qualitativ gleichwertig und das einschichtig hochprismatische Drüsenepithel ist komplett und homogen angefärbt. Durch die Färbung an Serienschnitten ist das Drüsenmuster nicht ganz identisch, jedoch ist die Schnittebene nachvollziehbar und die Bildausschnitte sind gut miteinander vergleichbar. Die Ko-Migration von zytogenem Stroma ist in allen Präparaten dargestellt und das Stroma ist in der unmittelbaren Drüsenumgebung verdichtet.



MUC-1

CK18

CK19

Abb. 39: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1, CK18 und CK19 in Endometrioseinseln des linken Lig. sacrouterinum mit zytogenem Stroma. Weitere Endometrioseherde finden sich auch im Blasendach rechts/links, im rechten Lig. sacrouterinum, im paraurethralen Bereich rechts und in der linken Beckenwand. Vergrößerung x17

4.6 Detailaufnahmen und Färbecharakteristika der Marker

Um die einzelnen Färbemuster der analysierten Marker im Detail zu charakterisieren, werden im Folgenden einzelne Endometrioseherde vergrößert dargestellt und abschließend verglichen.

Das Transmembranprotein Mucin-1 ist in allen untersuchten Entitäten hoch sensitiv und in seinem Färbemuster äußerst homogen. Die dargestellten Färbungen aus den Lokalisationen des Uterus, des Peritoneums und des Ovars, sowie die Herde von tief infiltrierender Endometriose, sind alle durchgängig und in ihrer Intensität vergleichbar. Darüber hinaus findet sich in den mikroskopischen Betrachtungen der Gesamtgewebe keine Form von Hintergrundfärbung, sodass das histologische Bild als übersichtlich und eindeutig eingestuft werden kann. Die Spezifität von MUC-1 wurde bereits im Kapitel 4.4 erläutert und stellt zur Analyse der Endometriosefoci keine Einschränkung dar.

In Abb. 40 ist das Färbemuster von MUC-1 vor allem in der hohen Vergrößerung sehr eindrucklich. Das einschichtig hochprismatische Drüsenepithel ist gleichmäßig und komplett gefärbt. Es lässt sich eine basal-luminale Betonung und Verdickung erkennen. Darüber hinaus sind die bereits beschriebenen Sekretionsprozesse in das Drüsenlumen deutlich zu erkennen (Abb. 40, Pfeile). Die periglandulär verdichtete stromale Umgebung schließt sich nahtlos an die Drüse an. Die Färbungen mit MUC-1 eignen sich hervorragend sowohl zur Detektion endometrialer Drüsenverbände als auch für endometriotische Läsionen. Dieser Marker erwies sich in der Analyse als besonders geeignet, da er qualitativ hochwertig und zu 100% sensitiv ist. Den

Cytokeratinen ist er dabei im direkten Vergleich durch sein Färbemuster und die außerordentlich zuverlässige Darstellung in allen Entitäten überlegen.



Abb. 40: Immunhistochemischer Nachweis von MUC-1 in einer tief infiltrierenden Endometriose aus der rechten Fossa ovarica. Das Gewebe liegt in vernarbtem Weichgewebe mit Gefäß- und Nervenquerschnitten. Weitere Endometrioseläsionen auch im Ovar und in der Blasenumschlagsfalte. Vergrößerung A x17, B x40, C Bildausschnittsvergrößerung aus B, Pfeile: Sekretionsmechanismus

Der Epithelialmarker Cytokeratin 18 zeigte für fast alle Gewebeproben ein einheitliches Färbemuster. Die beschriebenen Defizite beziehen sich dabei immer lediglich auf die Färbeintensität, nicht auf die grundsätzliche Erkennung von Endometrioseherden. Die Markerspezifität wurde bereits in Kapitel 4.4 erläutert und schränkt die Beurteilung der Foci nicht ein. Auch hier zeigten sich in der Gesamtbegutachtung der Präparate kaum Hintergrundfärbung oder Artefakte.

Das für CK-18 charakteristische Färbemuster ist im Detail betrachtet insgesamt etwas feiner als das vom MUC-1 und zeigt lediglich eine luminaler Betonung jedoch keine angefärbte Verdickung des Drüsenepithels. Die Färbungen sind durchgängig und homogen, lediglich in Ausnahmefällen zeigt sich eine unterbrochene Anreicherung des Drüsenepithels (Abb. 37, 38). Dies könnte an der Fixierung der Gewebe, dem Gewebezustand, oder der methodischen Färbedauer liegen.

Im Vergleich zu MUC-1 lassen sich bei CK18 keine Sekretionsprozesse darstellen. Das periglandulär verdichtete Stroma schließt sich unmittelbar an die Drüse an. Der Marker CK18 erwies sich vor allem im direkten Vergleich zu CK19 als sinnvoll, um die Struktur der verschiedenen Cytokeratine und deren Unterschiede besser darzustellen. In vielen Färbungen war CK18 jedoch qualitativ nahezu gleichwertig und erwies sich für die Klassifikation und die Analyse der Präparate als hilfreich. Lediglich im direkten Vergleich war der Marker CK18 durch sein schwächeres Anfärbungsmuster den Markern MUC-1 und CK19 untergeordnet.

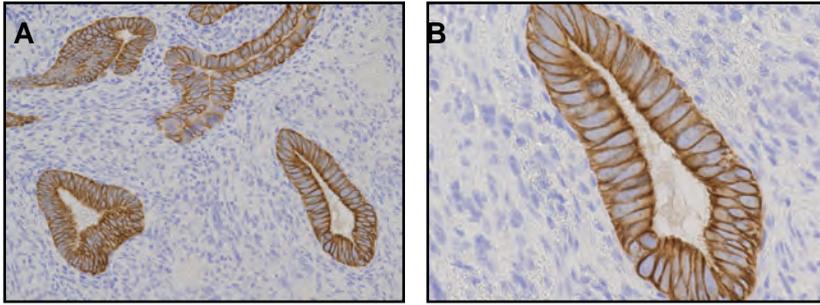


Abb. 41: Immunhistochemischer Nachweis von CK18 in einer tief infiltrierenden Endometriose aus der rechten Fossa ovarica. Das Gewebe liegt in vernarbtem Weichgewebe mit Gefäß- und Nervenquerschnitten. Weitere Endometrioseherde auch im Ovar und in der Blasenumschlagsfalte. Vergrößerung A x17, B x40

Das Strukturprotein Cytokeratin 19 zeigte in allen bearbeiteten Präparaten ein äußerst einheitliches und hoch sensitives Färbemuster. Bei den bearbeiteten Endometriose Lokalisationen fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung und der Intensität des Markers.

CK 19 färbte die Drüsenepithelien homogen und durchgängig an. Dabei lässt sich meist eine verstärkte luminale Betonung beobachten (Abb. 42). Darüber hinaus bewies sich der Marker vor allem bei den Präparaten der ovariellen Endometrioseläsionen.

Die Spezifität von CK19 wurde bereits in Kapitel 4.4 erläutert. Erneut schließt sich das periglanduläre Stroma direkt an die basale Epithelzellschicht an. Der bei den MUC-1 Färbungen beschriebene Sekretionsprozess lässt sich bei CK19 nicht beobachten. Weiterhin weist der Marker in seltenen Fällen eine leichte stromale Hintergrundfärbung auf, welche aber auch auf methodische Färbezeiten und den Fixierungszustand der Schnitte zurückgeführt werden könnte.

Insgesamt ist der Epithelialmarker Cytokeratin 19 in seinem Färbemuster sehr gut mit der Charakteristik des Markers MUC-1 zu vergleichen. In der Überzahl der gefärbten Präparate sind die beiden Marker qualitativ gleichwertig und in ihrem morphologischen Erscheinungsbild nahezu identisch. Für die analytische Auswertung und die Klassifizierung der jeweiligen Endometrioseherde war CK19 besonders wichtig und aufschlussreich.

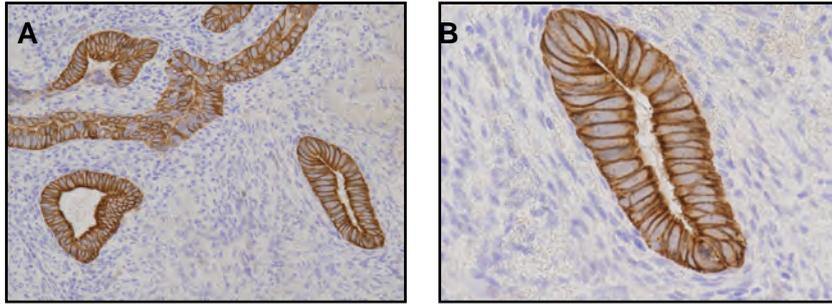


Abb. 42: Immunhistochemischer Nachweis von CK19 in einer tief infiltrierenden Endometriose aus der rechten Fossa ovarica. Das Gewebe liegt in vernarbtem Weichgewebe mit Gefäß- und Nervenquerschnitten. Weitere Endometriose auch im Ovar und in der Blasenumschlagsfalte. Vergrößerung A x17, B x40

Bis auf die dargestellten zusätzlichen Spezifitäten waren alle drei Marker in den jeweiligen Negativkontrollen nicht zu finden. Diese Präparate beinhalteten keine Drüsen und entstammten von Patientinnen mit und ohne Endometriose.

Insgesamt wurde das Ziel der experimentellen Analyse, nämlich die Erfassung und Abgrenzung des gynäkologischen Krankheitsbildes der Endometriose in verschiedenen eutopen Geweben, hinreichend bearbeitet. Die gewebespezifischen Färbemuster konnten durch die dargestellten Ergebnisse bewertet und dokumentiert werden. Besonders Marker, die sowohl in den Epithelien der endometrialen als auch endometriotischen Drüsen lokalisiert sind, wurden daher zur Beurteilung der Gemeinsamkeiten und Unterschiede der ektopen versus eutopen Drüsen herangezogen.

Die Markeranalyse mit MUC-1, CK18 und CK19 zeigt in allen endometriotischen Foci und allen Entitäten identische Färbemuster und die Expression der drei Marker war zu 100% positiv und damit hoch sensitiv (Tab. 7-10). Sowohl die Spezifität, als auch der positive und negative Vorhersagewert lagen bei einem Wert von 1. Diese Auswertung resultierte aus der Tatsache, dass die detektierten Drüsen bei allen Endometriosepatientinnen immer voll erfasst wurden und es keine falsch-positiven Ergebnisse gab. Es handelte sich um ein Patientenkollektiv erkrankter Frauen, da die Analyse der Daten immer gemeinsam durch die histologische Einteilung und auf der Grundlage der pathologischen Gutachten erfolgte.

Auf der Basis dieser Datengrundlage gilt es letztlich die Behauptung zu diskutieren, ob es sich bei ovarieller, peritonealer und tief infiltrierender Endometriose um einen monoklonalen Gewebeansprung aus dem Endometrium handelt (Kapitel 5.2). Diese Schlussfolgerung wird in der Diskussion ausführlich dargestellt und interpretiert.

5. Diskussion

Durch die vergleichende Analyse der getesteten Biomarker in physiologischem Endometrium und in ovariellen, peritonealen und tief infiltrierenden Endometriosemanifestationen sollte die Frage nach einem möglichen gemeinsamen Ursprung dieser Gewebe überprüft werden. Die Vorgehensweise entsprach einer genauen Gegenüberstellung der Marker CK18, CK19 und MUC-1 in Serienschritten von eutopen endometrialen und ektopen endometriotischen Drüsen. Dabei wurde die Hypothese eines möglichen monoklonalen Ursprungs der Endometriose im Sinne der Transplantationstheorie (Sampson, 1927) erörtert.

5.1 Markeranalyse

5.1.1 Cytokeratine

Cytokeratine gehören als Hauptkomponenten des Zytoskeletts zur Gruppe der Intermediärfilamente (Typ I und II). Bisher sind 20 Subtypen identifiziert, welche sich anhand ihrer chemischen Ladungseigenschaften in zwei Gruppen unterteilen lassen: saure Typ A Cytokeratine (CK9-20) und neutral-basische Typ B Cytokeratine (CK1-8). Des Weiteren unterscheidet man noch entsprechend des Molekulargewichtes hoch- von niedermolekularen Cytokeratinen. Im Zellverband sind sie vor allem an der mechanischen Stabilisierung beteiligt (Chu und Weiss, 2002).

Cytokeratine sind zytoplasmatisch lokalisiert und kommen sowohl in einfachen (CK7, CK18, CK19 und CK20), als auch in komplexen Epithelzellverbänden (CK5, CK6, CK10, CK14 und CK15) vor. Dieses Phänomen lässt sich auch in Epithelien mit maligner Entartung und bei Neoplasien beobachten, sodass die Expression dieser Proteine und deren Muster als weitestgehend konstant anzusehen sind (Chu und Weiss, 2002).

Somit wurde in der vorliegenden Arbeit ermittelt, ob und in wie weit das spezifische Verteilungsmuster der Cytokeratine zusammen mit der histologischen Charakterisierung zur Erkennung und Abgrenzung von physiologischem Endometrium und endometriotischen Läsionen beitragen könnte.

5.1.1.1 Cytokeratin 18 und 19

Die Lokalisation des niedermolekularen Typ A Cytokeratins 18 erfolgt in der Regel zusammen mit dem neutral-basischen Cytokeratin 8. Beide zeigen sich in einfachen Epithelien, Flimmerepithelien und ductalen Epithelien. Darüber hinaus wurden sie jedoch wesentlich seltener auch in glatten Muskelzellen und transformierten Fibroblasten entdeckt (Bader et al., 1988). Mit diesem weiten Spektrum eignen sie sich als Marker für Epithelzellkarzinome, Mesotheliome und Übergangsepithelkarzinome. Ein negatives Expressionsmuster zeigen sie hingegen für Basalzellkarzinome, Myoepitheliome und Plattenepithelkarzinome (Chu und Weiss, 2002).

Das niedermolekulare Typ A Cytokeratin 19 kommt vornehmlich in normalen Epithelzellen vor, auch in Drüsenepithelien und eingeschränkt ebenfalls in mehrschichtigem Epithel (Bártek et al., 1986). Es ist als einziges Cytokeratin nicht mit einem basischen Cytokeratin assoziiert und ist in seinem Expressionsmuster bereits in ovariellen Mesothelzellen (Kruitwagen et al., 1991), peritonealen Mesothelzellen (Bártek et al., 1986; Kruitwagen et al., 1991) und Epithelzellen der Tube (Bártek et al., 1986) nachgewiesen.

Für die Suche nach einem sensitiven Marker zur Darstellung des Endometriums als Ursprungsgewebe für mögliche peritoneale Absiedlungen war ausschlaggebend, dass endometriale Drüsen im zyklischen Uterusgewebe mit CK19 bereits hoch signifikant dargestellt werden konnten (Stewart et al., 2011).

Auch Kruitwagen et al. (1991) beschrieben bereits deutlich positive Markerprofile von Cytokeratinen (CK5, CK7, CK8, CK14, CK18 und CK19) in endometrialen Epithelzellen, ovariellen- sowie peritonealen Endometriosefoci und in ovariellen Mesothelzellen. Der Probenumfang war jedoch gering (n=10) und die einzelnen Endometrioseherde wurden nicht nach ihrer Lokalisation unterschieden. Kruitwagen et al. (1991) postulierten endometrische und endometriotische Epithelzellen als identisch und deuteten an, dass sich diese wahrscheinlich von mesothelialen Zellen abgrenzen ließen. Jedoch konnte wegen des kleinen Patientenkollektivs die Metaplasietheorie als Erklärungsansatz nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Das Expressionsmuster der Cytokeratine wird häufig in der Pathologie für die immunhistochemische Darstellung von Tumoren und Metastasen unklaren Ursprungs diagnostisch genutzt (Moll et al., 2008). Mithilfe dieser Marker können unterschiedliche Gewebe weitestgehend klassifiziert und typisiert werden.

Basierend auf dieser Datengrundlage wurden in der vorliegenden Arbeit unterschiedlich lokalisierte Läsionen peritonealer, ovarieller und tief infiltrierender

Endometriosen systematisch und vergleichend mithilfe von Cytokeratinen analysiert, charakterisiert und zusammen mit der histologischen Beurteilung eingeordnet.

5.1.2 Mucine

Mucine gehören zur Gruppe der makromolekularen Transmembranproteine und sind stark glykosyliert. Durch die kovalent gebundenen Polysaccharide haben sie einen anionischen Charakter und viele Hydroxylgruppen, sodass die Proteine eine hohe Wasserbindungskapazität aufweisen. Im Gewebeverband dienen sie vor allem auf Schleimhäuten als Schutz vor physikalischen, chemischen und mechanischen Reizen (Hattrup und Gendler, 2008). Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle für die Viskosität des Speichels. Mucine lassen sich anhand ihrer Position zur Zelloberfläche in zwei Untergruppen aufteilen: gelbildende sezernierte Mucine, welche ausschließlich extrazellulär vorkommen, und Zelloberflächenproteine (transmembranär und membranbindend). Außerdem besitzen alle Mucine Minisatelliten-DNA (VNTR=variable number of tandem repeats), deren Sequenz reich an Serin und Threonin ist. Damit sind sie in der Lage N-Acetylgalactosamin zu binden (Hattrup und Gendler, 2008).

5.1.2.1 Mucin-1

Die Mucine MUC-1, MUC-4 und MUC-16 sind in der Literatur am besten charakterisiert und zeigen spezifische Expressionsmuster. Das hydrophile Glykoprotein MUC-1 gehört zur Gruppe der Transmembranproteine und ist das kleinste unter ihnen (Brayman et al., 2004). Mucin-1 besitzt im Gegensatz zu den anderen Mucinen eine besonders lange extrazelluläre Domäne von über 200nm (Abb.1). Das Protein liegt in vielen epithelialen Zellverbänden vor und gilt als Marker für apikale Lokalisationen und Differenzierungsprozesse (Abb. 43, Brayman et al., 2004). Physiologisch wird MUC-1 im gesamten männlichen und weiblichen Urogenitaltrakt exprimiert, außer im Ovar (Brayman et al., 2004).

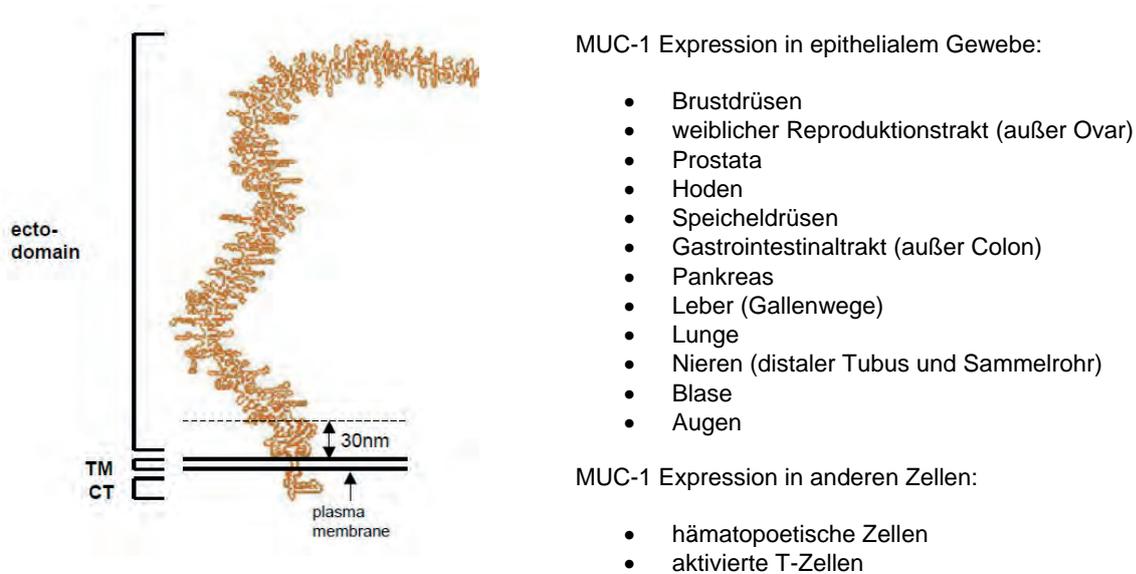


Abb. 43: Proteinstruktur und physiologisches Expressionsmuster von MUC-1 (modifiziert nach Brayman et al., 2004).

Im Bezug auf den weiblichen Genitaltrakt wurde MUC-1 im Oberflächenepithel von endometrialen Zellen des Uterus gefunden, vor allem bei Drüsen im proliferativen Stadium. Bei Drüsen im sekretorischen Stadium wurden ebenfalls intrazelluläre Anreicherungen von MUC-1 beobachtet (Hey et al., 1994; 1995). Im Uterus hat MUC-1 eine besondere Schutzfunktion, indem eine Barriere zwischen dem Cavum uteri und dem Endometrium aufgebaut wird. Damit hat MUC-1 eine besondere Bedeutung bei der Implantation der Blastozyste in der Frühschwangerschaft, da die antiadhäsiven Eigenschaften von MUC-1 überwunden werden müssen (Meseguer et al., 2001; Hattrup und Gendler, 2008). Auch im Tubenepithel und in Anteilen ovarieller Endometriose konnte MUC-1 bereits nachgewiesen werden (Budiu et al., 2009) und ergänzt die Lokalisationen von Brayman et al. (2004), die das Ovar nicht analysierten. Die Beobachtung, dass MUC-1 ebenfalls in den Oberflächenepithelien des Peritoneums und des Ovars zu finden sei, wurde von Drapkin et al. (2004) bestätigt, welche den Marker jedoch lediglich zum Vergleich von Oberflächenstrukturen benignen und malignen ovariellen Gewebes nutzten. Auch im hämatopoetischen System und in aktivierten T-Zellen konnte das Glykoprotein MUC-1 bereits identifiziert werden (Brayman et al., 2004). Darüber hinaus wurden die antiadhäsiven Eigenschaften von MUC-1 und die Überexpression des Proteins in Tumorzellen beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass sich MUC-1 in physiologischen Zellen lediglich an der apikalen Membran findet, in Tumorzellen

jedoch sowohl in der Plasmamembran, als auch im Zytoplasma lokalisiert ist. Damit gilt MUC-1 in der Onkologie, besonders beim Mamma-Ca, als Marker für Proliferation und Metastasierung (Yuan et al., 2007; Hatstrup und Gendler, 2008). Aufgrund der genannten Literatur wurde in der vorliegenden Arbeit MUC-1 als Marker zur Klassifikation und Analyse von endometriotischen Foci aus dem Uterus, dem Peritoneum, dem Ovar und von tief infiltrierender Endometriose ausgewählt.

5.2 Interpretation der Markerlokalisationen

Die vergleichende immunhistochemische Klassifizierung von Geweben mithilfe epithelialer Marker wird schon lange diagnostisch genutzt. Zur histologischen Charakterisierung von Neoplasien zählen vor allem die Cytokeratine zu den gängigen Epithelmarkern in der Pathologie. Wenn das Ursprungsgewebe unklar ist können diese immunhistochemischen Nachweise Aufschluss geben. Beispiele dafür sind die identischen Expressionsmuster von Epithelien des endometrialen Adenokarzinoms und endometriotischer Foci von Cytokeratin 7, 8, 18 und 19 (Kruitwagen et al., 1991; Chu und Weiss, 2002).

Sowohl die Marker Cytokeratin 18 und 19, als auch MUC-1, konnten in der vorliegenden Arbeit in allen analysierten endometrialen und endometriotischen Gewebeproben nachgewiesen werden. Wie in den Ergebnissen (Kapitel 4) dargestellt, erwiesen sich vor allem CK19 und MUC-1 als hoch sensitiv und äußerst geeignet zur Detektion von allen Endometrioseläsionen. Die Gewebepreparate zeigten dabei keine Expressionsmuster von MUC-1 in peritonealem und ovariellen Oberflächenepithel; somit konnten die Ergebnisse von Drapkin et al. (2004) bezüglich dieses Aspektes nicht bestätigt werden.

Die Beobachtung, dass alle getesteten Epithelmarker auch im physiologischen Endometrium histologisch und im Färbemuster gleich positiv sind, ließ einen gemeinsamen Ursprung der ektopen Endometrioseläsionen aus eutopem Endometrium vermuten. Durch die identische Expression der Marker in Drüsen des Endometriums und in Drüsen endometriotischer Schleimhautdifferenzierungen, konnte dieser Ansatz vergleichend überprüft werden. In der Arbeit ergaben sich keine Unterschiede zwischen dem Färbemuster von endometrialen und endometriotischen Geweben, unabhängig von der jeweiligen Lokalisation der untersuchten Endometrioseherde.

Trotz der hohen Übereinstimmung ist die sichere Abgrenzung von potentiell malignem Gewebe von benignen endometriotischen Läsionen dennoch nur im Zusammenspiel mit der genauen histologischen Evaluation zu treffen.

Die Tatsache, dass Cytokeratine und Mucine in ihren biochemischen Eigenschaften und Funktionen nicht denselben Kriterien entsprechen, stützt die Hypothese eines gemeinsamen Gewebeerbsprungs, da die Übereinstimmungen im Färbemuster nicht zufällig zu 100% identisch sein können. Eingeschränkt gilt, dass CK18/19 ebenso wie MUC-1 als epitheliale Marker hochsensitiv, aber nicht hochspezifisch sind. Trotzdem sind sie durchaus als eigenständige Marker für endometriale und endometriotische Zellcharakterisierungen zu werten.

Die große Übereinstimmung der Cytokeratinexpression in endometriotischen Foci und endometrialem Epithel wurde bereits von Matsuzaki und Darcha (2012) beschrieben und damit die Entstehung von Endometriose auf der Grundlage von endometrialen Epithelzellen in Betracht gezogen. Welche Cytokeratine zur Detektion der Endometrioseherde dafür in Frage kommen, geht aus der Publikation jedoch nicht hervor. Die vorliegende Datenerhebung bestätigte diese Vermutung und wird durch die zusätzliche Identifizierung von MUC-1 und die hochsignifikante Lokalisation in allen endometrialen und endometriotischen Foci bestärkt.

Von Dharmaraj et al. (2014) wurden im direkten immunhistochemischen Vergleich von endometrialen und endometriotischen Geweben die Gemeinsamkeiten von MUC-1 und CK18 dargestellt. Diese Datenerhebung beschränkt sich jedoch lediglich auf elf endometriale und sechs endometriotische Präparate, welche darüber hinaus nicht weiter klassifiziert und in ihrem Expressionsmuster nicht analysiert sind.

Die Charakterisierung und Identifizierung von Endometrioseherden in der vorliegenden Arbeit in den einzelnen Gruppen (peritoneal, ovariell und tief infiltrierend) mit Hilfe der ausgewählten drei Epithelialmarker war demnach sinnvoll.

Die davon abgeleitete Schlussfolgerung eines gemeinsamen, monoklonalen Ursprungs der Erkrankung Endometriose entspricht damit der von Sampson (1927) aufgestellten Implantationstheorie entgegen der von Nisolle und Donnez (1997) postulierten Unterschiede in der Pathogenese der drei Entitäten. Jedoch schließt ein gemeinsamer monoklonaler Ursprung weitere Differenzierungsprozesse an den verschiedenen Integrationsorten keinesfalls aus, sondern stellt lediglich den Ausgangspunkt dar.

Bei der kritischen Auseinandersetzung mit der Implantationstheorie drängte sich die Frage auf, warum die Erkrankung trotzdem so unterschiedliche klinische Erscheinungsbilder liefert. Zwei Antworten kommen diesbezüglich in Betracht:

Erstens könnten die klinischen Manifestationen der Erkrankung auf die jeweiligen Interaktionen der endometriotischen Läsionen mit den „Wirts-Geweben“ zurück zu führen sein, wie bereits in der „endometriotic disease theory“ beschrieben (Koninckx et al., 1999).

Zweitens sollte die stromale Umgebung nicht außer Betracht gelassen werden. Endometriotisches Stroma kann sowohl die Endometriosedrüsen umgeben, als auch isoliert vorkommen, was die Diagnose der Endometriose oft erschweren kann. Darüber hinaus zeigt die stromale Umgebung sehr unterschiedliche Ausprägungen. Manchmal ist diese nur spärlich vorhanden, wie zumeist bei der ovariellen Endometriose. In anderen Fällen finden sich periglandulär ausgeprägte Fibroseherde mit Invasionen von glatten Muskelzellen und differenzierten Arteriolen (Clement, 2007). Weiterhin schrieben Noël et al. (2010) den Hauptanteil tief infiltrierender Endometriose und deren Klinik dem fibromuskulären Stroma in der Peripherie der Herde zu, nicht den endometrialen Drüsen und deren unmittelbare stromale Umgebung an sich. Diese Beobachtungen könnten die vielfältigen klinischen Erscheinungsbilder der Endometriose erklären.

Zusammenfassend sind die angewendeten Epithelialmarker CK18, CK19 und MUC-1 für die jeweiligen Gewebe ein wichtiger Hinweis für die Gültigkeit der Transplantationstheorie und lassen auf einen gemeinsamen Ursprung mit verschiedenen Ausprägungen schließen.

5.3 Ätiologische Konsequenzen

Als Schlussfolgerung aus den dargestellten Ergebnissen und deren Interpretation gilt es, die Transplantationstheorie und die Vermutung eines monoklonalen Ursprungs der Endometriose im Kontext zu anderen Erklärungsmodellen zu sehen und sie mithilfe der gewonnenen Erkenntnisse von diesen abzugrenzen.

Um eutopes endometriales Gewebe mit ektopem endometriotischem Gewebe vergleichen zu können, muss zuerst das Endometrium als Ursprungsgewebe genau charakterisiert sein. Die Klonalität des Ursprungsgewebes ist für die Fragestellung nach Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen Endometrium und Endometrioseläsionen obligat. Für einen monoklonalen Ursprung spricht, dass bereits humane endometriale Drüsen auf ihre Klonalität untersucht wurden und diese als monoklonale Zellpopulationen von Epithelzellen identifiziert werden konnten (Tanaka et al., 2003). Zusätzlich konnte mithilfe des humanen Androgen-Rezeptor Gens (HUMARA) als polymorpher Marker der klonale Status von Epithelzellen in Endometriosezysten des Ovars untersucht werden. Das Methylierungsmuster zeigte

durchweg einen monoklonalen Ursprung der Epithelzellen und spricht für eine monoklonale Zellexpansion in endometriotischem Gewebe (Jimbo et al., 1997). Das Methylierungsmuster ist jedoch auch ein Maß für die Aktivität der transkribierten Gene. Auch Wu et al. (2003) konnten einen monoklonalen Ursprung in endometriotischen Geweben nachweisen. Zusätzlich konnten diese bei multifocalem Befall ebenfalls in jeder einzelnen Läsion die Monoklonalität der Epithelzellen darstellen. Demnach entstehen die verschiedenen Herde unabhängig voneinander und lassen sich histologisch eigenständig auswerten. Im Peritoneum hingegen vermuteten Nabeshima et al. (2003) einen multizellulären Ursprung, da die ektopen Drüsen zwar ein monoklonales Muster aufwiesen, jedoch das Methylierungsmuster innerhalb der Läsion unterschiedlich war. Somit schlossen sie individuelle Drüsen von einzelnen Progenitorzellen in die Pathogenese mit ein. Dies schließt eine Transplantation von Clustern eutopen endometrialen Gewebes jedoch nicht aus. Außerdem konnte bei den meisten Studien die Zellreinheit nach Isolation nicht evaluiert werden, oder wurde nur histologisch bestimmt.

Für einen monoklonalen Ursprung der Endometriose aus endometrialen Epithelzellen sprechen die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit und schließen sich damit dem Erklärungsansatz von John A. Sampson an. Für seine Theorie der retrograden Menstruation als Ursache für die Verbreitung der endometrialen Zellen und der Manifestation der Endometriose spricht, dass er Endometriosepatientinnen während der Menstruation, in der Schwangerschaft und in der Menopause vergleichend untersucht hat. Dabei zeigten sich die endometriotischen Foci durchgängig sowohl in ihrer Struktur, als auch in ihrer Funktion identisch zu eutopem Endometrium (Sampson, 1925). Das heißt, dass das ektopye Gewebe keine signifikante Entartung oder Transformation durchgemacht hat. Auch eine komplette Neoplasie als Ursprung der Endometriose schließt sich dadurch aus. Dies entkräftet die Argumente der später aufgestellten Metaplasie- und Stammzelltheorie.

Dass es sich bei den Gewebefragmenten der Endometriose um Verschleppungen von eutopem Endometrium handelt, wird durch zahlreiche Fallberichte von iatrogen verursachter Endometriose unterstützt.

Beispielsweise fand man Endometrioseerkrankungen nach erfolgter Amniozentese, bei der ein Stichkanal durch den Uterus zur Entnahme von Fruchtwasser zur Verschleppung von Endometrium und damit zu endometriotischen Verwachsungen der Abdominalwand führte (Kaunitz und Di Sant'Agnes, 1979). Weitere Fälle von implantiertem Endometrium als Ursache einer Endometrioseläsion, sind Herde in Narben von Kaiserschnitten (Rovito und Gittleman, 1986). Auch hier erfolgte die Verwachsung durch eine Verschleppung von physiologisch eutopem Gewebe.

Dieses Phänomen zeigte sich auch in einer Narbe nach stattgefundenener Episiotomie (Dammschnitt) im Zuge einer vaginalen Entbindung (Wittich, 1982). All diese Fallberichte unterstützen Sampsons Vermutung, dass es sich bei der Endometriose um eine Implantation und Verwachsung von eutopem Endometrium an einer unphysiologischen Stelle handelt.

Diese Hypothese konnte weiterhin durch die direkte Injektion von Endometriumzellen des Menstrualblutes in die Bauchhöhle weiter unterstützt werden (D'Hooghe et al., 1995). Hier zeigte sich eine künstliche Induktion der Endometriose durch eine verstärkte Aussaat des physiologischen Gewebes.

Da in der vorliegenden Arbeit alle Epithelialmarker sowohl für eutopes, als auch für ektopes Gewebe positiv waren, stellt sich die Frage, ob und in welcher Weise diese Zellverbände überhaupt in der Lage sind zu derartigen Verwachsungen im Peritoneum und Mesothel zu führen. Witz et al. (2001) zeigten, dass endometriales Gewebe in hohem Maße und besonders schnell an intaktes peritoneales Mesothel adhären und damit verwachsen kann. Außerdem bestätigte sich dieses Phänomen nicht nur für einzelne endometriale Epithelzellen, sondern auch gesondert für endometriales Stroma.

Dass es grundsätzlich bei fast jeder Frau zum Prozess der retrograden Menstruation kommt, konnte von Halme et al. (1984) beobachtet werden. Er untersuchte laparoskopisch perimenstruelle Frauen und fand bei 90% von ihnen Blut im Peritonealsekret. Ebenfalls bei 90% der mit Endometriose erkrankten Patientinnen konnte dieser Befund bestätigt werden. Lediglich bei 15% der Frauen mit okkludierten Tuben fand sich Menstrualblut in der Bauchhöhle. Diese Daten zeigen, dass es sich bei der retrograden Menstruation durch die Tuben um einen physiologischen Vorgang handelt und sich demnach zumeist zyklisch bedingt Endometriumzellen im Bauchraum befinden. Eine Einschränkung in der Interpretation dieser Prozentsätze besteht in der Tatsache, dass die genaue Analyse der im Blut vorhandenen endometrialen Zellen nicht genau einbezogen wurde und sich damit ein evtl. niedrigerer Wert ergeben könnte. Trotzdem könnte demnach darin einer der Hauptgründe für die Zellverschleppung von endometrialem Gewebe liegen, was jedoch andere Wege, wie z.B. eine lymphogene, oder hämatogene Metastasierung, nicht ausschließt.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgestellte Hypothese des monoklonalen Ursprungs der Endometriose wird zusätzlich durch die Tatsache gestützt, dass eine Endometrioseerkrankung häufig mit dem Auftreten einer Menorrhagie (starke und lange Menstruation) vergesellschaftet ist (Bokor et al., 2009). Es wurden höhere Konzentrationen von endometrialen Zellen im Peritonealsekret von

Endometriosepatientinnen im Vergleich zu gesunden Patientinnen gefunden. Damit ist nicht nur die Qualität, sondern auch die Quantität der „metastasierenden Endometriuszellen“ ausschlaggebend für eine Prädisposition zur Endometriose und es ergibt sich eine statistisch erhöhte „Trefferwahrscheinlichkeit“ bei diesen Frauen.

Diese bisher dargestellten Fakten wurden von Viganò et al. (2004) bereits zusammenfassend dargestellt. Er sieht die Transplantationstheorie zusätzlich darin belegt, dass Frauen mit Nulliparität ein erhöhtes Risiko für Endometriose haben, da diese konstant einer retrograden Menstruation ausgesetzt sind. Darüber hinaus sieht er die Beobachtung, dass es eine Assoziation zwischen unterbundener Menstruation (z.B. durch orale Kontrazeptiva im Dauerzyklus) und reduzierter Endometriosehäufigkeit gibt, als zusätzlich beweisend für Sampsons Theorem.

In der vorliegenden Arbeit konnten anhand der Markeranalyse Endometriosefoci dem Endometrium als Grundgewebe zugeschrieben werden. Dass es sich bei den untersuchten Patientinnen wahrscheinlich um Frauen mit verstärkter retrograder Menstruation handelt, könnte durch deren erhöhte Uterusperistaltik erklärt werden, der besonders bei an Endometriose erkrankten Frauen den physiologischen Vorgang verstärkt (Leyendecker, 1998). Ob dies jedoch die Ursache, oder eher eine Folge der Erkrankung darstellt, bleibt fraglich. Damit unterstreicht Leyendeckers „Archimetra-Konzept“ einige Punkte von Sampsons Transplantationstheorie. Darüber hinaus untersuchte Leyendecker die Beschaffenheit des retrograd transportierten Gewebematerials. Aus experimentellen Beobachtungen schlussfolgerte er, dass es sich bei dem abgelösten Menstrualgewebe in der Bauchhöhle von Endometriosepatientinnen um eine tiefere Zellschicht handelt als bei gesunden Frauen. Hier werden laut Leyendecker (2002), zusätzlich zum normalerweise abgestoßenem Stratum functionale, auch Zellen des dem Myometrium direkt angrenzenden Stratum basale abgelöst. Ob die von Leyendecker postulierte abnorme Hyperperistaltik des Uterus und die damit verbundene Verschleppung von tiefen Schichten des Endometriums jedoch durch Autotraumatisierungen entsteht, bleibt fraglich. Die für die Kontraktion verantwortlichen Schrittmacherzellen des Myometriums liegen nämlich in der subendometrischen Junktionszone (Brosens, 1998). Bei manchen Frauen ließ sich vaginalsonographisch und über MRT-Aufnahmen eine Hyperplasie dieser Zone und eine daraus resultierende Hyperperistaltik beobachten (Brosens, 1998). Der durch die Hyperplasie resultierende erhöhte intracavitäre Druck stellt einen weiteren Ansatz für die Verschleppung tieferer Schichten des Endometriums dar.

Zusätzlich zu den dargestellten Fakten, ist die vorliegende Hypothese eines gemeinsamen Ursprungs anderen Erklärungsmodellen zur Ätiologie der Endometriose argumentativ zu bevorzugen:

Wenn man die von Meyer (1919) postulierte Metaplasietheorie auf die Endometriose anwendet, müsste das gesamte ovarielle Oberflächenepithel und zusätzlich in exakter Weise auch alle endometriotischen Drüsen eine Transformation durchlaufen haben, um mit den Epithelialmarkern CK18, CK19 und MUC-1 positiv zu sein. Dies ist für MUC-1 nicht der Fall (s. Kapitel 4) und wäre auch äußerst unwahrscheinlich, da dieses Metaplasie-Potenzial des peritonealen Zölom-Mesothels dann nicht punktuell in einzelnen Läsionen, sondern eher generalisiert auftreten würde. Darüber hinaus müssten ansonsten auch andere vom Zölom abstammende Gewebe von Endometriose befallen sein, z.B. die Pleura, das Perikard und die Mesenterien- diese Lokalisationen sind jedoch bis heute nicht bekannt.

Weiterhin wurde in der Literatur beschrieben, dass die Ovarial-Ca Marker OV-TL 3 und 10 sowohl für das Endometrium, als auch für Endometrioseläsionen negativ sind (Kruitwagen et al., 1991). Basierend auf dieser Datengrundlage ist ein Ursprung der Endometriose allein aus ovariellm Zölomepithel höchstwahrscheinlich ausgeschlossen.

Wie im Ergebnisteil bereits dargestellt (Kapitel 4), spielt das zytogene Stroma bei der Pathogenese der Endometriose eine große Rolle. In der Literatur der Induktionstheorie, welche die Metaplasietheorie mit einschließt, konnte jedoch kein Nachweis über endometriotisches Stroma gegeben werden (Levander und Normann, 1955). Da dieser für die Diagnose einer Endometriose jedoch obligat ist, stellt die Induktionstheorie ebenfalls kein fundiertes Erklärungsmodell dar.

Der Implantationstheorie nach Sampson steht außerdem noch die Embryonaltheorie (Von Recklinghausen, 1896) gegenüber, welche die Endometriose als Überreste des Müllerschen-Gangepithels darstellt. Mithilfe dieser Theorie lassen sich jedoch nicht alle Lokalisationen und die verschiedenen klinischen Manifestationen erklären.

Trotz all der dargestellten Gründe für die Gültigkeit der Transplantationstheorie bleibt die Frage bestehen, warum nicht alle retrograd menstruierenden Frauen von dieser Erkrankung betroffen sind.

Das intakte Immunsystem einer Frau ist normalerweise in der Lage, ein bestimmtes Maß an Fremdmaterial zu tolerieren und abzubauen. Nach Sampson (1927) geht man davon aus, dass die über die Tuben in die Peritonealhöhle gelangten Gewebefragmente eine lokale zelluläre und humorale Immunreaktion auslösen. Die jeweilig betroffenen Areale antworten dann mit einer Entzündungsreaktion und das Immunsystem wird hochreguliert. Damit ist der Körper in der Lage, das

Fremdgewebe zu zersetzen und über den Prozess der Phagozytose mithilfe von aktivierten peritonealen Makrophagen abzubauen. Bei der Pathogenese der Endometriose geht man jedoch davon aus, dass genau dieser Prozess nicht vollständig abläuft und somit einzelne Zellen das Peritoneum befallen und dadurch mit diesem verwachsen können. Dabei erlangen einige Zellen ihre Nährstoffe über Diffusion und andere werden apoptotisch (Gazvani und Templeton, 2002). Je nach Ausdehnung und Proliferation haben die Endometrioseherde dann das Potential zur Vaskularisation und Angiogenese (McLaren, 2000). All diese Prozesse führen letztendlich zur eigentlichen Manifestation der Endometriose, welche somit nicht bei jeder Menstruation ausgelöst, bzw. aktiviert werden muss. Per definitionem besteht jedoch bereits mit der Implantation endometrialen Gewebes an einer ektopen Lokalisation eine Endometriose.

Weiterhin lassen sich lokale Reaktionen des umliegenden Gewebes und bereits bekannte immunologische Faktoren (Gazvani und Templeton, 2002) sehr gut mit dem Konzept der Transplantationstheorie und der Hypothese eines gemeinsamen, monoklonalen Ursprungs vereinbaren, da sich diese lediglich auf die Ursache und nicht auf die lokalen Reaktionen der Gewebe bezieht.

Sampsons Erklärungsansatz beinhaltet neben der transtubalen Dissemination von Endometrium außerdem die hämatogene und lymphatische Metastasierung von endometriotischem Gewebe (Sampson, 1927). Der in dieser Arbeit begründete monoklonale Ursprung der Erkrankung schließt eine Verschleppung und Verwachsung von Endometrioseherden in andere Lokalisationen nicht aus.

Neben all diesen Argumenten für die Transplantationstheorie und die in der vorliegenden Arbeit aufgestellte Hypothese, sollten noch weitere Gegenargumente jedoch nicht außer Acht gelassen werden.

Zum einen wurde von zwei Fällen berichtet, in denen bei Männern an der Blase Endometrioseherde entfernt wurden. Es handelte sich bei beiden Patienten um einen Zustand nach einer Prostata-Ca Erkrankung und mehrjähriger Östrogen Behandlung (Pinkert et al., 1979; Schrodt et al., 1980). In diesen seltenen Fällen ist ein endometrialer Ursprung der Endometriose ausgeschlossen. Aus den Fallbeschreibungen ist jedoch ersichtlich, dass diese Vermutung lediglich auf einer histologischen Einschätzung ohne immunhistochemisch spezifischen Markernachweis gründet.

Zum anderen zeigen Studien, dass in manchen Feten ektopes Endometrium außerhalb des Cavum uteri nachgewiesen werden konnte (Signorile et al., 2012). Dies weist darauf hin, dass es in wenigen Endometriosefällen keiner retrograden Menstruation bedarf. Jedoch fanden sich in den ektopen Endometriumanteilen keine

signifikanten Unterschiede zu physiologischem Endometrium und ein gemeinsamer monoklonaler Gewebsursprung schließt eine Zellverschleppung auf anderem Wege keinesfalls aus, zumal Signorile et al. (2012) ein Proteinprofil wie im Endometrium mit den Markern ER- α und CD10 nachweisen konnten.

Zusätzlich existieren Daten über Endometriosemanifestationen bei Patienten mit kongenitalem Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom und kompletter Uterusagenesie (Mok-Lin et al., 2010). Eine Migration aus dem Uterus ist dort nicht möglich, jedoch handelt es sich bei dieser Erkrankung um eine Fehlbildung der Müller'schen Gänge und eine embryonale Zellverschleppung ist damit trotzdem möglich. In den drei Fällen in denen eine Biopsie durchgeführt wurde, konnten Uterusreste gefunden werden und bei den anderen Fällen konnte durch fehlende Biopsien eine eindeutige Agenesie nicht bewiesen werden, demnach bleibt auch in diesen Fällen eine Migration der Zellen aus Endometriumresten möglich.

Die vorliegende Arbeit schließt nicht aus, dass evtl. einige ektope endometriotische Drüsen existieren könnten, welche nicht von eutopem endometrialen Gewebe abstammen. Jedoch stellen die analysierten Marker eine Möglichkeit zur exakten Detektion dieser eventuell vorkommenden Drüsen dar und können dabei helfen sie zu identifizieren. Darüber hinaus zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass alle endometriotischen Foci von endometrialen Grundgewebe abstammen und man in der Lage ist, diese mit den dargestellten Markern zu 100% zu erfassen.

Letztendlich kann auf der Grundlage der erhobenen Daten die Implantation endometrialer Gewebefragmente als kausale Erklärung zur Pathogenese der Endometriose gesehen werden, jedoch kann die Ursache und der Mechanismus dieser Ablösung und Implantation multifaktorieller Genese sein (z.B. durch genetische Prädisposition, über retrograde Menstruation, durch erhöhte Peristaltik, Störungen des Immunsystems, oder fetale Migration).

Abschließend kann man demnach mutmaßen, dass die dargestellten CK18, CK19 und MUC-1 positiven endometrialen Zellen, ähnlich wie Tumorzellen, in die Bauchhöhle disseminieren und an die vorliegenden Gewebe adhären. Wie von Sampson (1927) bereits vermutet, können diese Herde dann invasiv in die Nachbarorgane einwachsen und zu starken Einschränkungen und Schmerzen führen. Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass sowohl bei der ovariellen Endometriose, als auch bei peritonealen und tief infiltrierenden endometriotischen Drüsen, ein gemeinsamer Ursprung von eutopen endometrialen Drüsen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit angenommen werden darf. Daher vermuten wir, dass es sich bei der Endometriose um eine Entität mit verschiedenen Abweichungen und Ausprägungen handelt.

5.4 Ausblick

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Ätiologie und die Pathogenese der Endometriose gilt es in Zukunft noch genauer zu erforschen. Dabei sollte ein Schwerpunkt sowohl auf der Erweiterung der Markeranalyse mit CK18, CK19 und MUC-1 in weiteren Lokalisationen liegen, als auch auf der Identifizierung weiterer Marker. Darüber hinaus gilt es das untersuchte Patientenkollektiv zu erweitern und zu vergrößern. Daher könnten Detailinformationen zu den jeweiligen Patientinnen, wie z.B. der Zeitpunkt der Erstmanifestation der Erkrankung, eine erfolgte Medikamenteneinnahme, eine Nikotin- und Alkoholanamnese, sowie die Abklärung einer möglichen genetischen Disposition, für die genauere Analyse von Risikofaktoren für eine Endometriose aufschlussreich sein.

Dabei sollte auf eine gute Qualität und zeitnahe Bearbeitung der Biopsien geachtet werden, um ein ausreichendes Qualitätsmanagement zu gewährleisten und methodische Fehlerquellen zu minimieren.

Des Weiteren könnte zur Verbesserung der Detektion von sehr kleinen Endometriosefoci ein weiterer Schwerpunkt auf der Identifikation spezifischer Marker für endometriotisches zytogenes Stroma liegen. Damit wäre die Möglichkeit gegeben, die Herde vollständig zu betrachten und besser in den Gesamtkontext einzuordnen. Darüber hinaus wäre somit auch eine bessere Korrelation zum klinischen Bild der Erkrankung möglich, da diese mit der Ausdehnung der Endometrioseläsionen und ihrer zellulären Umgebung in Zusammenhang stehen könnten.

Durch die vielen Erklärungsmodelle und wissenschaftlichen Arbeiten zu diesem Thema wird wohl die eindeutige Klärung der Ätiologie mit all ihren Konsequenzen noch lange für Diskussionen sorgen. Trotz allem konnte die vorliegende Arbeit einen Beitrag zu dieser Debatte leisten und die Hypothese wird sich hoffentlich in der Zukunft gegen die anderen Theorien behaupten, bestätigen und akzeptiert werden.

6. Zusammenfassung

Die Theorien zur Entstehung der Erkrankung Endometriose gelten als sehr umstritten. Obwohl die Dissemination von endometrialen Zellen während der retrograden Menstruation über die Tuben als allgemein gültige Ursache angesehen wird, werden alternative Hypothesen, wie die Zölon-Metaplasietheorie, die Stammzell- und Embryonalresttheorie diskutiert. Jedenfalls werden die peritoneale, ovarielle und tief infiltrierende Endometriose als verschiedene Entitäten betrachtet.

In der vorliegenden immunhistologischen Studie wurden 158 Proben von 115 Patientinnen analysiert (davon waren 54 peritoneale Endometriosefoci, 43 ovarielle Endometriosefoci und 17 tief infiltrierende Endometriosefoci, 28 Uteri mit zusätzlicher Endometriose- darunter 14 Fälle von Adenomyosis uteri- und 16 Uteri ohne Endometriose).

Es handelt sich um eine Studie, die 2009 von der Ethikkommission der Justus-Liebig- Universität in Gießen (Deutschland) genehmigt wurde. Alle Biopsien wurden laparoskopisch entnommen und in Fällen von tief infiltrierender Endometriose intraoperativ anhand des rAFS Scores und des ENZIAN Scores klassifiziert und ebenso mikroskopisch von einem Pathologen histologisch klassifiziert.

In Vorarbeiten wurden verschiedene Kandidatenproteine vergleichend analysiert mit dem Ziel einer besonders sensitiven Erfassung endometrialer und endometriotischer Drüsen. Nur drei Proteine, zwei strukturelle (CK18 und CK19) und ein membrangebundenes (MUC-1), zeigten eine hohe Sensitivität. Diese wurden als Marker zur Analyse von endometrialen und endometriotischen Drüsen in allen Lokalisationen angewendet, die eigentliche Suche und Abgrenzung dieser Marker war jedoch nicht Gegenstand der Arbeit.

In allen endometrialen Drüsen und in fast allen endometrialen Epithelzellen konnten alle drei Marker nachgewiesen werden, die Positivität war dabei unabhängig von den jeweiligen Menstruationsphasen der Patientinnen. Bemerkenswert war, dass die Marker auch in allen endometriotischen Läsionen von peritonealer, ovarieller und tief infiltrierender Endometriose nachweisbar waren. Darüber hinaus waren auch fast alle endometriotischen Epithelzellen für alle drei Proteine positiv.

Das identische Expressions- und Färbemuster von CK18, CK19 und Muc-1 in allen endometriotischen Drüsen und allen Lokalisationen, verglichen mit den endometrialen Drüsen, lassen einen gemeinsamen Ursprung der ektopen endometriotischen Foci aus eutopem Endometrium vermuten.

Die experimentellen Daten sind vereinbar mit der bereits formulierten Transplantationstheorie nach Sampson, welcher postulierte, dass alle

endometriotischen Läsionen von der Dissemination endometrialer Zellen aus endometrialen Drüsen stammen.

Abstract

The different theories of the pathogenesis of Endometriosis are very controversial. Although dissemination of endometrial cells by retrograde menstruation is generally accepted as the main cause, alternative hypotheses such as coelomic metaplasia, stem cells or embryonic rests are also discussed. However, peritoneal, ovarian and deep infiltrating endometriosis are often regarded as distinct entities of the disease. In an immunohistochemical study, we analysed 158 specimens collected from 115 patients (54 peritoneal endometriosis specimens, 43 ovarian endometriosis specimens, 17 deep infiltrating endometriosis specimens, 28 uteri with additional endometriosis- from which 14 uteri also showed adenomyosis- and 16 uteri without endometriosis).

This study started in 2009 and has been approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the Justus-Liebig University in Giessen. All specimens were obtained by laparoscopy. The intraoperative findings were classified according to the rAFS score or ENZIAN score in cases of DIE and the histology was microscopically analysed and classified by a pathologist.

There were preliminary studies to analyse and identify several proteins. The aim was to stain as many as possible endometriotic glands. Only three proteins, two structural (K18 and K19) and one membrane associated protein (MUC1) showed a very high sensitivity and were then used to analyse the endometrial and endometriotic glands of all specimens. The detection of those three markers was not the main purpose of the research study. Positivity for K18, K19 and MUC1 was detected in all endometrial glands and in nearly all endometrial epithelial cells irrespective of the menstrual cycle. Remarkably, all proteins were detected also in all endometriotic glands of the ovary, peritoneum or deep infiltrating endometriotic lesions. Additionally, nearly all endometriotic epithelial cells also demonstrated positive staining for the three proteins.

The identical expression profile of MUC1, K18 and K19 in all ectopic endometriotic glands of all endometriotic entities examined compared to all eutopic endometrial glands suggest a common origin of the endometriotic foci from endometrial glands. Thus, we present experimental data which are consistent with the hypothesis already favoured by Sampson, who postulated that all endometriotic lesions result from dissemination of endometrial cells from endometrial glands.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	„Avidin-Biotin-Complex“
altgr.	altgriechisch
BSA	„Bovine Serum Albumin“
ca	circa
CD10	„Cluster of Differentiation“, CD-Molekül 10
CK18	Cytokeratin 18
CK19	Cytokeratin 19
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
DAB	3,3'- Diaminobenzidin
DIE	„Deep infiltrating Endometriosis“, tief infiltrierende Endometriose
DNA	„Deoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
EMA	Epitheliales Membranantigen
g	Gramm
GnRH	„Gonadotropin-Releasing-Hormon“
HRP	„Horseradish peroxidase“, Meerrettichperoxidase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICD-10	„International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems“, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IUP	Intrauterinpeessar, „Spirale“
Lig.	Ligamentum
LSAB	„Labelled (Strept-)Avidin-Biotin“
M	Molare Masse
Min.	Minuten
ml	Milliliter
mm ³	Kubikmillimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
MUC-1	Mucin-1
NPV	negativer Vorhersagewert

NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PBS	„Phosphate buffered saline“, Phosphatgepufferte Salzlösung
PPV	positiver Vorhersagewert
SEN	Sensitivität
sog.	sogenannte
SPE	Spezifität
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TIAR	„Tissue injury and repair“
µl	Mikroliter
VNTR	„variable number tandem repeats“, Minisatelliten
WHO	„World Health Organization“, Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1. Einleitung

Abbildung 1.....	1
Abbildung 2.....	3
Abbildung 3.....	4
Abbildung 4.....	10
Abbildung 5.....	14
Abbildung 6.....	14
Abbildung 7.....	18

3. Material und Methode

Abbildung 8.....	28
Tabelle 1.....	21
Tabelle 2.....	22
Tabelle 3.....	29
Tabelle 4.....	31

4. Ergebnisse

Abbildung 9.....	35
Abbildung 10.....	36
Abbildung 11.....	37
Abbildung 12.....	38
Abbildung 13.....	40
Abbildung 14.....	41
Abbildung 15.....	41
Abbildung 16.....	42
Abbildung 17.....	43
Abbildung 18.....	44
Abbildung 19.....	45
Abbildung 20.....	46
Abbildung 21.....	47
Abbildung 22.....	47
Abbildung 23.....	48
Abbildung 24.....	49
Abbildung 25.....	50
Abbildung 26.....	51

Abbildung 27.....	52
Abbildung 28.....	53
Abbildung 29.....	53
Abbildung 30.....	54
Abbildung 31.....	55
Abbildung 32.....	57
Abbildung 33.....	58
Abbildung 34.....	58
Abbildung 35.....	59
Abbildung 36.....	60
Abbildung 37.....	60
Abbildung 38.....	61
Abbildung 39.....	62
Abbildung 40.....	63
Abbildung 41.....	64
Abbildung 42.....	65
Tabelle 5.....	37
Tabelle 6.....	39
Tabelle 7.....	45
Tabelle 8.....	50
Tabelle 9.....	56
Tabelle 10.....	56

5. Diskussion

Abbildung 43.....	69
-------------------	----

9. Literaturverzeichnis

Abbas, S.; Ihle, P.; Köster, Ingrid; Schubert, I. (2012): Prevalence and incidence of diagnosed endometriosis and risk of endometriosis in patients with endometriosis-related symptoms: findings from a statutory health insurance-based cohort in Germany. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 160 (1), 79–83.

Abbott, J.; Hawe, J.; Hunter, D.; Holmes, M.; Finn, P.; Garry, R. (2004): Laparoscopic excision of endometriosis: a randomized, placebo-controlled trial. *Fertil. Steril.* 82 (4), 878–884.

ACOG Committee Opinion. Number 310, April 2005. Endometriosis in adolescents 105. *Obstet. Gynecol.* (4) (2005), 921-927.

Agarwal, A.; Allamaneni, S. S. R. (2004): Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online* 9 (3), 338–347.

Arumugam, K.; Templeton, A. A. (1992): Endometriosis and race. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 32 (2), 164–165.

Badawy, S. Z.; Cuenca, V.; Marshall, L.; Munchback, R.; Rinas, A. C.; Coble, D. A. (1984): Cellular components in peritoneal fluid in infertile patients with and without endometriosis. *Fertil. Steril.* 42 (5), 704–708.

Bader, B. L.; Jahn, L.; Franke, W. W. (1988): Low level expression of cytokeratins 8, 18 and 19 in vascular smooth muscle cells of human umbilical cord and in cultured cells derived therefrom, with an analysis of the chromosomal locus containing the cytokeratin 19 gene. *Eur. J. Cell Biol.* 47 (2), 300–319.

Balasz, J.; Creus, M.; Fábregues, F.; Carmona, F.; Ordi, J.; Martínez-Román, S.; Vanrell, J. A. (1996): Visible and non-visible endometriosis at laparoscopy in fertile and infertile women and in patients with chronic pelvic pain: a prospective study. *Hum. Reprod.* 11 (2), 387–391.

Ballard, K.; Lowton, K.; Wright, J. (2006): What's the delay? A qualitative study of women's experiences of reaching a diagnosis of endometriosis. *Fertil. Steril.* 86 (5), 1296–1301.

Ballard, K. D.; Seaman, H. E.; de Vries, C S; Wright, J. T. (2008): Can symptomatology help in the diagnosis of endometriosis? Findings from a national case-control study--Part 1. *BJOG* 115 (11), 1382–1391.

- Bártek, J.; Bártková, J.; Taylor-Papadimitriou, J.; Rejthar, A.; Kovarík, J.; Lukás, Z.; Vojtěšek, B. (1986): Differential expression of keratin 19 in normal human epithelial tissues revealed by monospecific monoclonal antibodies. *Histochem. J.* 18 (10), 565–575.
- Berkley, K. J.; Rapkin, A. J.; Papka, R. E. (2005): The pains of endometriosis. *Science* 308 (5728), 1587–1589.
- Bianek-Bodzak, A.; Szurowska, E.; Sawicki, S.; Liro, M. (2013): The importance and perspective of magnetic resonance imaging in the evaluation of endometriosis. *Biomed. Res. Int.* 2013, 436589.
- Bocker, J.; Tadmor, O. P.; Gal, M.; Diamant, Y. Z. (1994): The prevalence of adenomyosis and endometriosis in an ultra-religious Jewish population. *Asia Oceania J. Obstet. Gynaecol.* 20 (2), 125–129.
- Bokor, A.; Debrock, S.; Drijkoningen, M.; Goossens, W.; Fülöp, V.; D'Hooghe, T. (2009): Quantity and quality of retrograde menstruation: a case control study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 123.
- Borghese, B.; Santulli, P.; Streuli, I.; Lafay-Pillet, M-C; Ziegler, D. de; Chapron, C. (2014): Récidive de la douleur après chirurgie pour endométriose profonde : pourquoi ? Que faire ? *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* 43 (1), 12–18.
- Brayman, M.; Thathiah, A.; Carson, D. D. (2004): MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 4.
- Brosens, J. (1998): Myometrial zonal differentiation and uterine junctional zone hyperplasia in the non-pregnant uterus. *Hum. Reprod. Update* 4 (5), 496–502.
- Budiu, R. A.; Diaconu, I.; Chrissluis, R.; Dricu, A.; Edwards, R. P.; Vlad, A. M. (2009): A conditional mouse model for human MUC1-positive endometriosis shows the presence of anti-MUC1 antibodies and Foxp3+ regulatory T cells. *Dis. Model. Mech.* 2 (11-12), 593–603.
- Capobianco, G.; Wenger, J. M.; Marras, V.; Cosmi, E.; Ambrosini, G.; Dessole, M.; Cherchi, P. L. (2013): Immunohistochemical evaluation of epithelial antigen Ber-Ep4 and CD10: new markers for endometriosis? *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 34 (3), 254–256.
- Chu, P. G.; Weiss, L. M. (2002): Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 40 (5), 403–439.

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. *Adv. Anat. Pathol.* 14 (4), 241–260.

Crause, R. G.; Schrön, D. C. (1690): *Disputatio Inauguralis Medica De Ulceribus Uteri*. Unter Mitarbeit von G. W. Wedelius. Ienae, Jena: Literis Krebsianis.

Cron, R. S.; Gey, G. (1927): The viability of the cast-off menstrual endometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* (43), 645–647.

Deutsche, Österreichische, Schweizerische und Tschechische Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V. (2013): Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Endometriose. Hg. v. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Online verfügbar unter <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-045.html>.

Dharmaraj, N.; Chapela, P. J.; Morgado, M.; Hawkins, S. M.; Lessey, B. A.; Young, S. L.; Carson, D. D. (2014): Expression of the transmembrane mucins, MUC1, MUC4 and MUC16, in normal endometrium and in endometriosis. *Hum. Reprod.* 29 (8), 1730–1738.

D'Hooghe, T. M.; Bambra, C. S.; Raeymaekers, B. M.; Jonge, I. de; Lauweryns, J. M.; Koninckx, P. R. (1995): Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*). *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173 (1), 125–134.

Drapkin, R.; Crum, C. P.; Hecht, J. L. (2004): Expression of candidate tumor markers in ovarian carcinoma and benign ovary: evidence for a link between epithelial phenotype and neoplasia. *Hum. Pathol.* 35 (8), 1014–1021.

Eskenazi, B.; Warner, M. L. (1997): Epidemiology of endometriosis. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 24 (2), 235–258.

Evans, A.; Vollenhoven, B.; Healy, D. (1999): Modern antioestrogens and the coming revolution in women's health care. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 39 (3), 334–340.

Fanton, J. W.; Golden, J. G. (1991): Radiation-induced endometriosis in *Macaca mulatta*. *Radiat. Res.* 126 (2), 141–146.

Fassbender, A.; Vodolazkaia, A.; Saunders, P.; Lebovic, D.; Waelkens, E.; Moor, B.; D'Hooghe, T. (2013): Biomarkers of endometriosis. *Fertil. Steril.* 99 (4), 1135–1145.

Fedele, L.; Parazzini, F.; Bianchi, S.; Arcaini, L.; Candiani, G. B. (1990): Stage and localization of pelvic endometriosis and pain. *Fertil. Steril.* 53 (1), 155–158.

- Gazvani, R.; Templeton, A. (2002): Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 123 (2), 217–226.
- Gogacz, M.; Winkler, I.; Bojarska-Junak, A.; Tabarkiewicz, J.; Semczuk, A.; Rechberger, T.; Adamiak, A. (2014): T regulatory lymphocytes in patients with endometriosis. *Molecular medicine reports* 10 (2), 1072–1076.
- Götte, M.; Wolf, M.; Staebler, A.; Buchweitz, O.; Kelsch, R.; Schüring, A. N.; Kiesel, L. (2008): Increased expression of the adult stem cell marker Musashi-1 in endometriosis and endometrial carcinoma. *J. Pathol.* 215 (3), 317–329.
- Haas, D.; Shebl, O.; Shamiyeh, A.; Oppelt, P. (2013): The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 92 (1), 3–7.
- 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. *Obstet. Gynecol.* 64 (2), 151–154.
- Hattrup, C. L.; Gendler, S. J. (2008): Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 431–457.
- Hey, N. A.; Graham, R. A.; Seif, M. W.; Aplin, J. D. (1994): The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78 (2), 337–342.
- Hey, N. A.; Li, T. C.; Devine, P. L.; Graham, R. A.; Saravelos, H.; Aplin, J. D. (1995): MUC1 in secretory phase endometrium: expression in precisely dated biopsies and flushings from normal and recurrent miscarriage patients. *Hum. Reprod.* 10 (10), 2655–2662.
- Hudelist, G.; Ballard, K.; English, J.; Wright, J.; Singer, C.; Keckstein, J. (2010): Klinische Untersuchung versus Transvaginalsonografie (TVS) zur präoperativen Diagnose (TIE) der tief infiltrierenden Endometriose – eine Multicenterstudie. *Geburtsh Frauenheilk* 70 (05).
- Hudelist, G.; Fritzer, N.; Thomas, A.; Niehues, C.; Oppelt, P.; Haas, D. (2012): Diagnostic delay for endometriosis in Austria and Germany: causes and possible consequences. *Hum. Reprod.* 27 (12), 3412–3416.
- Isaacson, K. B.; Coutifaris, C.; Garcia, C. R.; Lyttle, C. R. (1989): Production and secretion of complement component 3 by endometriotic tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69 (5), 1003–1009.

- Javert, C. T. (1952): The spread of benign and malignant endometrium in the lymphatic system with a note on coexisting vascular involvement. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 64 (4), 780–806.
- Jimbo, H.; Hitomi, Y.; Yoshikawa, H.; Yano, T.; Momoeda, M.; Sakamoto, A. (1997): Evidence for monoclonal expansion of epithelial cells in ovarian endometrial cysts. *Am. J. Pathol.* 150 (4), 1173–1178.
- Kaunitz, A.; Di Sant'Agnese, P. A. (1979): Needle tract endometriosis: an unusual complication of amniocentesis. *Obstet. Gynecol.* 54 (6), 753–755.
- Kennedy, S.; Mardon, H.; Barlow, D. (1995): Familial endometriosis. *J. Assist. Reprod. Genet.* 12 (1), 32–34.
- Kennedy, S. (1997): Is there a genetic basis to endometriosis? *Semin. Reprod. Endocrinol.* 15 (3), 309–318.
- Koninckx, P. R.; Braet, P.; Kennedy, S. H.; Barlow, D. H. (1994): Dioxin pollution and endometriosis in Belgium. *Hum. Reprod.* 9 (6), 1001–1002.
- Koninckx, P. R.; Barlow, D.; Kennedy, S. (1999): Implantation versus infiltration: the Sampson versus the endometriotic disease theory. *Gynecol. Obstet. Invest.* 47 Suppl 1, 3-9; discussion 9-10.
- Kruitwagen, R. F.; Poels, L. G.; Willemsen, W. N.; Jap, P. H.; de Ronde, I J; Hanselaar, T. G.; Rolland, R. (1991): Immunocytochemical markerprofile of endometriotic epithelial, endometrial epithelial, and mesothelial cells: a comparative study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 41 (3), 215–223.
- Kumar, G. L.; Rudbeck, L. (2009): Education Guide - Immunohistochemical (IHC) Staining Methods. Dako North America, Carpinteria, California (Hg.)
- Ledger, W. L. (1999): Endometriosis and infertility: an integrated approach. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 64 Suppl 1, S33-40.
- Levander, G.; Normann, P. (1955): The pathogenesis of endometriosis; an experimental study. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 34 (4), 366–398.
- Leyendecker, G. (1998): Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. *Hum. Reprod. Update* 4 (5), 752–762.
- Leyendecker, G. (2002): Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium. *Hum. Reprod.* 17 (10), 2725–2736.
- Leyendecker, G.; Wildt, L.; Mall, G. (2009): The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Arch. Gynecol. Obstet.* 280 (4), 529–538.

- Leyendecker, G., Wildt L. (2012): Neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie von Endometriose und Adenomyose: Tissue Injury and Repair (TIAR). Fortschritte in der Endometrioseforschung. Exzellenzforschung in der Medizin (3), 12–23.
- Liu, D. T.; Hitchcock, A. (1986): Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. Br. J. Obstet. Gynaecol. 93 (8), 859–862.
- Manolopoulos, K.; Tinneberg, H-R (2005): Endometriose und Infertilität. Zentralbl. Gynakol. 127 (5), 325–328.
- Matsuzaki, S.; Darcha, C. (2012): Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis. Hum. Reprod. 27 (3), 712–721.
- Mayani, A.; Barel, S.; Soback, S.; Almagor, M. (1997): Dioxin concentrations in women with endometriosis. Hum. Reprod. 12 (2), 373–375.
- McLaren, J. (2000): Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. Hum. Reprod. Update 6 (1), 45–55.
- 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. Fertil. Steril. 88 (3), 581–587.
- Mechsner, S.; Weichbrodt, M.; Riedlinger, W F J; Bartley, J.; Kaufmann, A. M.; Schneider, A.; Köhler, C. (2008): Estrogen and progesterone receptor positive endometriotic lesions and disseminated cells in pelvic sentinel lymph nodes of patients with deep infiltrating rectovaginal endometriosis: a pilot study. Hum. Reprod. 23 (10), 2202–2209.
- Meseguer, M.; Aplin, J. D.; Caballero-Campo, P.; O'Connor, J. E.; Martín, J. C.; Remohí, J. (2001): Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. Biol. Reprod. 64 (2), 590–601.
- Meyer, R. (1919): Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenomyome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. Zentralbl. Gynakol. 1919 (43), 745–750.
- Missmer, S. A.; Cramer, D. W. (2003): The epidemiology of endometriosis. Obstet. Gynecol. Clin. North Am. 30 (1), 1-19, vii.

- Missmer, S. A.; Hankinson, S. E.; Spiegelman, D.; Barbieri, R. L.; Marshall, L. M.; Hunter, D. J. (2004): Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *Am. J. Epidemiol.* 160 (8), 784–796.
- Moen, M. H. (1994): Endometriosis in monozygotic twins. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 73 (1), 59–62.
- 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. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 23 (1), e35-7.
- Moll, R.; Divo, M.; Langbein, L. (2008): The human keratins: biology and pathology. *Histochem. Cell Biol.* 129 (6), 705–733.
- Murphy, A. A.; Guzick, D. S.; Rock, J. A. (1989): Microscopic peritoneal endometriosis. *Fertil. Steril.* 51 (6), 1072–1074.
- Nabeshima, H.; Murakami, T.; Yoshinaga, K.; Sato, K.; Terada, Y.; Okamura, K. (2003): Analysis of the clonality of ectopic glands in peritoneal endometriosis using laser microdissection. *Fertil. Steril.* 80 (5), 1144–1150.
- Nap, A. W.; Groothuis, P. G.; Demir, A. Y.; Evers, J. L. H.; Dunselman, G. A. J. (2004): Pathogenesis of endometriosis. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 18 (2), 233–244.
- Nisolle, M.; Donnez, J. (1997): Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil. Steril.* 68 (4), 585–596.
- Noël, J.-C.; Chapron, C.; Bucella, D.; Buxant, F.; Peny, M.-O.; Fayt, I. (2010): Estrogen and progesterone receptors in smooth muscle component of deep infiltrating endometriosis. *Fertil. Steril.* 93 (6), 1774–1777.
- Oppelt, P.; Chavtal, R.; Haas, D.; Reichert, B.; Wagner, S.; Müller, A. (2012): Costs of in-patient treatment for endometriosis in Germany 2006: an analysis based on the G-DRG-Coding. *Gynecol. Endocrinol.* 28 (11), 903–905.
- Painter, J. N.; Nyholt, D. R.; Krause, L.; Zhao, Z. Z.; Chapman, B.; Zhang, C. (2014): Common variants in the CYP2C19 gene are associated with susceptibility to endometriosis. *Fertil. Steril.* 102 (2), 496-502.e5.

Pinkert, T. C.; Catlow, C. E.; Straus, R. (1979): Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma. *Cancer* 43 (4), 1562–1567.

Renner, S.; Oppelt, P.; Binder, H.; Beckmann, M. (2009): Endometriose. *GebFra-Refresher Thieme Verlag* 69 (11), R115.

Revised American Fertility Society classification of endometriosis: 1985 43. *Fertil. Steril.* (3) (1985), 351-352.

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. *Fundam. Appl. Toxicol.* 21 (4), 433–441.

Rogers, P. A. W.; D'Hooghe, T. M.; Fazleabas, A.; Gargett, C. E.; Giudice, L. C.; Montgomery, G. W. (2009): Priorities for endometriosis research: recommendations from an international consensus workshop. *Reprod. Sci.* 16 (4), 335–346.

Rokitansky, K. (1860): Ueber Uterusdrüsen-Neubildung in Uterus- und Ovarial-Sarcomen. [Wien: Druck von Carl Ueberreuter].

Rovito, P.; Gittleman, M. (1986): Two cases of endometrioma in cesarean scars. *Surgery* 100 (1), 118–120.

Sampson, J. A. (1921): Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary. Their importance and especially their relation to pelvic adenomas of the endometrial type ("adenomyoma" of the uterus, rectovaginal septum, sigmoid, etc.). *Arch. Surg.* 1921 (3), 245–323.

Sampson, J. A. (1925): Heterotopic or misplaced endometrial tissue. *Am. J. Obstet. Gynecol.* (10), 649–664.

Sampson, J. A. (1927): Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am. J. Pathol.* 3 (2), 93-110.43.

Schindler, A. E. (2007): Epidemiologie, Pathogenese und Diagnostik der Endometriose. *J. Fertil. Reprod.* 2007 (17 (4)), 22–27.

Schmeisser, J. O.; Krause, T.; Lober, R.; Köhler, G. (1996): Zusammenhänge zwischen Endometriose und Tubendurchgängigkeit bei Sterilitätspatientinnen insbesondere nach mikrochirurgischer Sterilitätsoperation. *Zentralbl. Gynakol.* 118 (7), 397–400.

Schrodt, G. R.; Alcorn, M. O.; Ibanez, J. (1980): Endometriosis of the male urinary system: a case report. *J. Urol.* 124 (5), 722–723.

- Schweppe, K. W. (1989): Ätiologie, Histologie und Pathophysiologie der Endometriose. Endometriose- neue Therapiemöglichkeiten durch Buserelin. A. E. Schindler and K. W. Schweppe. Berlin, de Gruyter, 3–22.
- Schweppe, K. W. (2002): Therapie der Endometriose unter Berücksichtigung der Aktivitätsgrade. Gynäkologe (3), 255–261.
- Schweppe, K. W. (2011): Endometriose - Entstehung, Diagnostik, Behandlungsmöglichkeiten und Probleme in Klinik und Praxis. J. Reproduktionsmed. Endokrinol. 2011; 8 (3), 180-194.
- Signorile, P. G.; Baldi, F.; Bussani, R.; Viceconte, R.; Bulzomi, P.; D'Armiento, M. (2012): Embryologic origin of endometriosis: analysis of 101 human female fetuses. J. Cell. Physiol. 227 (4), 1653–1656.
- Simoens, S.; Hummelshoj, L.; D'Hooghe, T. (2007): Endometriosis: cost estimates and methodological perspective. Hum. Reprod. Update 13 (4), 395–404.
- Stewart, C. J. R.; Crook, M. L.; Lacey, J.; Louwen, K. (2011): Cytokeratin 19 expression in normal endometrium and in low-grade endometrioid adenocarcinoma of the endometrium. Int. J. Gynecol. Pathol. 30 (5), 484–491.
- Szczepańska, M.; Koźlik, J.; Skrzypczak, J.; Mikołajczyk, M. (2003): Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. Fertil. Steril. 79 (6), 1288–1293.
- Tanaka, M.; Kyo, S.; Kanaya, T.; Yatabe, N.; Nakamura, M.; Maida, Y. (2003): Evidence of the monoclonal composition of human endometrial epithelial glands and mosaic pattern of clonal distribution in luminal epithelium. Am. J. Pathol. 163 (1), 295–301.
- Tuttles, F.; Keckstein, J.; Ulrich, U.; Possover, M.; Schweppe, K. W.; Wustlich, M. (2005): ENZIAN-Score, eine Klassifikation der tief infiltrierenden Endometriose. Zentralbl. Gynäkol. 127 (5), 275–281.
- Ulrich, U.; Richter, O.; Wardelmann, E.; Valter, M.; Schmutzler, R.; Sillem, M. (2003): Endometriose und Malignom. Zentralbl. Gynakol. 125 (7-8), 239–242.
- Velebil, P.; Wingo, P. A.; Xia, Z.; Wilcox, L. S.; Peterson, H. B. (1995): Rate of hospitalization for gynecologic disorders among reproductive-age women in the United States. Obstet. Gynecol. 86 (5), 764–769.
- Vercellini, P.; Viganò, P.; Somigliana, E.; Fedele, L. (2014): Endometriosis: pathogenesis and treatment. Nature reviews. Endocrinology 10 (5), 261–275.

- Viganò, P.; Parazzini, F.; Somigliana, E.; Vercellini, P. (2004): Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 18 (2), 177–200.
- Von Recklinghausen F. (1896): Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube: their origin as remnants of the wolffian body. *Wien Klin. Wochenschr.* 1896 (8), 530.
- Waller, K. G.; Shaw, R. W. (1993): Gonadotropin-releasing hormone analogues for the treatment of endometriosis: long-term follow-up. *Fertil. Steril.* 59 (3), 511–515.
- 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. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184 (7), 1407-11; discussion 1411-3.
- Wittich, A. C. (1982): Endometriosis in an episiotomy scar: review of the literature and report of case. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 82 (1), 22–23.
- Witz, C. A. (1999): Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 42 (3), 566–585.
- Witz, C. A.; Thomas, M. R.; Montoya-Rodriguez, I. A.; Nair, A. S.; Centonze, V. E.; Schenken, R. S. (2001): Short-term culture of peritoneum explants confirms attachment of endometrium to intact peritoneal mesothelium. *Fertil. Steril.* 75 (2), 385–390.
- Witz, C. A. (2002): Pathogenesis of endometriosis. *Gynecol. Obstet. Invest.* 53 Suppl 1, 52–62.
- Wu, Y.; Basir, Z.; Kajdacsy-Balla, A.; Strawn, E.; Macias, V.; Montgomery, K.; Guo, S.-W. (2003): Resolution of clonal origins for endometriotic lesions using laser capture microdissection and the human androgen receptor (HUMARA) assay. *Fertil. Steril.* 79 Suppl 1, 710–717.
- Wu, Y.; Kajdacsy-Balla, A.; Strawn, E.; Basir, Z.; Halverson, G.; Jailwala, P. (2006): Transcriptional characterizations of differences between eutopic and ectopic endometrium. *Endocrinology* 147 (1), 232–246.
- Yuan, Z.; Wong, S.; Borrelli, A.; Chung, M. A. (2007): Down-regulation of MUC1 in cancer cells inhibits cell migration by promoting E-cadherin/catenin complex formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362 (3), 740–746.

10. Anhang

Endometriose-Fragebogen

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

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„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

12. Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. rer. nat. Lutz Konrad. Sein unermüdliches Engagement für das Thema, die Möglichkeit zur Teilnahme an internationalen Kongressen und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit waren nicht selbstverständlich. Das weiß ich zu schätzen und bin sehr dankbar dafür.

Ein weiterer Dank gilt dem geschäftsführenden Direktor und Chefarzt der Frauenklinik des Universitätsklinikums Gießen Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Rudolf Tinneberg für die Möglichkeit der Realisierung meiner Doktorarbeit und die Kooperation in allen klinischen Belangen. Auch die freundliche Unterstützung und intraoperative Einschätzung von Dr. Eniko Berkes war eine große Hilfe. Ein Dank gilt auch Frau Schneider, die stets die Verknüpfung und Anlaufstelle zwischen Klinik und Labor darstellte.

Für die anatomisch-pathologischen Gutachten danke ich dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner. Besonders die kontinuierliche und fundierte histologische Einschätzung meiner Färbungen durch Dr. Matthias Frank war sehr hilfreich.

Die gesamte Arbeitsgruppe des Labors der Frauenklinik bot mir stets eine angenehme und sehr herzliche Atmosphäre. Ohne die Einarbeitung der sehr erfahrenen MTAs Cornelia Hof und Dorina Zoltan wäre ich wahrscheinlich untergegangen. Danke für Eure Mühen und allen Zuspruch. Auch meinen „Mitstreitern“ Mareike Borgers und Benjamin Lüftner muss ich danken, ihr wart oft ein Lichtblick der zahlreichen Laboralltage!

Letztendlich gilt der größte Dank meiner Familie - meinen Eltern und Geschwistern, die zu jeder Zeit hinter mir standen und deren Unterstützung ich bis heute sehr zu schätzen weiß und nicht missen möchte.

Über allem danke ich Dir, Jonas, für Deine Geduld, Deine aufmunternden Worte, jede ehrliche Einschätzung und zwei solidarische Laborsommer.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6485-3



9 783835 1964853