

Charakterisierung von Endometrioseherden mit Hilfe von immunhistochemischen Markern

Inaugural – Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin
der Justus Liebig Universität Gießen.

Kerstin Just
Geboren in Linnich
Ausgabeort Gießen
Erscheinungsjahr 2011

Aus dem Zentrum für
Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. H.-R. Tinneberg

Gutachter: Fr. Prof. Dr. C. Pfarrer

Gutachter: Prof. Dr. S. Gattenlöhner

Tag der Disputation: 26.09.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Erklärung.....	III
Abkürzungen.....	IV
1 Einleitung und Literaturübersicht.....	1
1.1 Endometriose.....	1
1.2 Stammzellen.....	9
1.3 Stammzellmarker.....	12
1.3.1 CD 34.....	12
1.3.2 CD 133.....	13
1.3.3 C-kit (CD 117).....	13
1.4 Andere Stammzellmarker.....	14
1.5 Stammzellerkrankungen.....	15
1.6 Proliferationsmarker.....	16
1.6.1 Ki 67.....	16
1.7 Ziel der Arbeit.....	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Material.....	18
2.2 Pathologiebefunde.....	19
2.3 Methoden.....	28
2.3.1 Gewebeprozessierung.....	28
2.4 Indirekte Immunhistochemie nach der ABC-Methode.....	30
2.5 Indirekte Immunhistochemie nach der APAAP-Methode.....	31
2.6 Verwendete Antikörper.....	33
2.6.1 Zytoskelett.....	33
2.6.2 Hämatopoetische Stammzellmarker.....	33
2.7 Weiteres Prozedere.....	35
3 Ergebnisse.....	36
3.1 Aktinfärbung.....	36
3.2 Zytokeratin.....	37
3.3 CD 34.....	38
3.4 C-kit (CD 117).....	39

3.5	Ki 67.....	40
3.6	CD 133	41
4	Diskussion	48
4.1	Bewertung des Materials	48
	Kritische Betrachtung der Methode	49
4.2	Betrachtung der Ergebnisse.....	51
4.3	Überprüfung der Theorien.....	56
4.4	Schlussfolgerungen	58
4.5	Ausblick	59
5	Zusammenfassung.....	60
6	Abstract	61
	Literaturverzeichnis.....	62
	Anhang	75
	Geräte	75
	Lösungen	75
	Danksagungen	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Mögliche Lokalisationen von Endometrioseherden	2
Abbildung 2:	Pluripotente Stammzellen	10
Abbildung 3:	Einblutung um einen Endometrioseherd.....	38
Abbildung 4:	Zystenpräparate	42
Abbildung 5:	Endometrioseherde in Dickdarmpräparaten.....	43
Abbildung 6:	Vaginale Präparate	44
Abbildung 7:	Ovarpräparate	45
Abbildung 8:	Tubenpräparate.....	46
Abbildung 9:	Peritoneale Präparate.....	47
Abbildung 10:	Repräsentative Ansicht des Douglas-Raumes während der OP.....	48

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.“

Gießen, den 13.04.2011

Abkürzungen

a	Jahre
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
Ca.	circa
d. h.	das heißt
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
g	Gramm
HSZ	hämatopoetische Stammzellen
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IVF	In vitro Fertilisation
kDa	Kilodalton
Nr.	Nummer
min.	Minuten
p. c.	post conceptionem
sec	Sekunden

1 Einleitung und Literaturübersicht

1.1 Endometriose

Die Endometriose ist eine der häufigsten Frauenkrankheiten; 8 bis 12 Prozent aller Frauen im gebärfähigen Alter sind davon betroffen. Der Erkrankungsgipfel liegt ca. beim 27. Lebensjahr (Ebert et al. 2005). Dabei treten gebärmutterschleimhautähnliche Wucherungen außerhalb des Cavum uteri auf. Bei der histologischen Untersuchung sind sowohl Drüsen der Gebärmutterschleimhaut zu finden, als auch zellreiches Grundgewebe (endometriales bzw. zytozogenes Stroma), das die Drüsen umgibt (Becherer und Schindler 2002). Die Endometrioseherde unterliegen ähnlichen zyklischen Veränderungen wie das eutopische Endometrium (Becker et al. 2004). Sie unterscheiden sich jedoch in vielen einfachen und fundamentalen Punkten von eutopischem Endometrium. Diese beinhalten die Abstammung, enzymatische Aktivität, Protein Expression und histologische und morphologische Charakteristika der Zellen. Daher lässt sich die Endometriose nicht einfach als disloziertes Endometrium bezeichnen (D'Hooghe et al. 2004). Interessanterweise unterscheidet sich sogar das eutopische Endometrium von Endometriosepatientinnen von dem gesunder Frauen (Koninckx et al. 1999a).

Klassischerweise wird die Endometriose in Deutschland nach ihrer Lokalisation in Endometriosis genitalis interna, Endometriosis genitalis externa und Endometriosis extragenitalis eingeteilt (Renner et al. 2006).

Endometriosis genitalis interna: Ein Synonym hierfür ist der Ausdruck Adenomyosis uteri. Bei dieser Lokalisation ist das Myometrium betroffen.

Endometriosis genitalis externa: Hier sind die inneren weiblichen Geschlechtsorgane im kleinen Becken, d. h. Tube, Ovarien und Beckenperitoneum befallen.

Endometriosis extragenitalis: In diesem Fall kann die Erkrankung Appendix, Darm, Blase, Scheide, aber auch seltenere Lokalisationen wie Lunge, Leber, Pankreas, ZNS oder Lymphknoten befallen (Renner et al. 2006).

Es gibt jedoch noch weitere Möglichkeiten der Stadieneinteilung, beispielsweise nach der American Society of Reproductive Medicine. Hier erfolgt die Einteilung anhand eines Punktesystems in 4 Stadien:

Stadium I	minimal:	1-5 Punkte
Stadium II	mild:	6-15 Punkte
Stadium III	moderat:	16-40 Punkte
Stadium IV	schwer:	>40 Punkte

Die Gesellschaft gibt vorgefertigte Bögen heraus, in die die Untersucher ihre Befunde und Therapieempfehlungen eintragen können. Beurteilt werden Anzahl, Größe und Lokalisation der Endometrioseherde sowie Plaques, Adhäsionen und Begleiterkrankungen. (www.asrm.com).

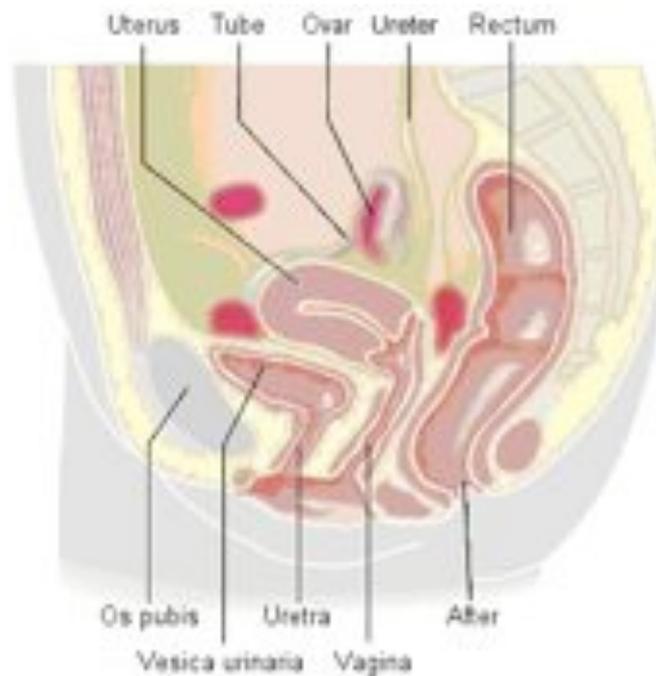


Abbildung 1: Mögliche Lokalisationen von Endometrioseherden¹

¹ Abbildung nach Institut für Frauengesundheit Baden-Württemberg
(www.institut-frauengesundheit.org/fuer-fachkreise/forschung-studien.html)

Die Größe und Ausdehnung der Endometrioseherde korreliert nicht mit dem klinischen Beschwerdebild. So gibt es Frauen mit einem minimalen organischen Befund und heftigsten Beschwerden sowie umgekehrt auch Frauen mit diffuser makroskopischer Ausbreitung der Endometriose und wenig bis überhaupt keiner Beschwerdesymptomatik (Renner et al. 2006). Daher ist jede Form der Endometriose behandlungsbedürftig, die zu einer subjektiven oder objektiven Beeinträchtigung der Frauen führt (Becherer und Schindler 2002).

Chronisch rezidivierende Unterbauchbeschwerden stellen zusammen mit Dysmenorrhoe und Dyspareunie die klassische Trias der durch Endometriose bedingten Beschwerden dar. Wenn Endometrioseherde der Harnblase oder dem Enddarm aufliegen oder in diese hineinwachsen, kann es zu Dysurie und Dysdefäkation kommen. Unabhängig davon führt Endometriose oft zu Sterilität (Becherer und Schindler 2002).

So konnte bei 30-50% der Frauen mit Sterilitätsproblemen histologisch eine Endometriose nachgewiesen werden. Als Ursache hierfür kommen Adhäsionen mit konsekutivem Tubenverschluss bzw. Tubenmotilitätsstörungen in Betracht. Es scheinen jedoch weitere Faktoren für die Sterilität von Endometriosepatientinnen verantwortlich zu sein, da auch Frauen mit makroskopisch unauffälliger Tubenfunktion betroffen und die Schwangerschaftsraten bei IVF/ICSI in diesem Kollektiv schlechter sind (Renner et al. 2006).

Obwohl die Endometriose keine maligne Erkrankung ist, lassen sich doch einige Charakteristika eines malignen Phänotyps erkennen. Multifokalität, intravasale Nachweisbarkeit und Fernabsiedlungen sind klinisch bekannt. Eine Assoziation zwischen dem Auftreten von Endometriose und endometrioidem bzw. klarzelligem Ovarialkarzinom wird beschrieben. Pro-inflammatorische und pro-angiogene Faktoren sind sowohl beim Tumorwachstum als auch in Endometrioseherden nachweisbar (Becker et al. 2004).

Das Therapiemanagement ist von der individuellen Lebenssituation und dem Alter der Patientin abhängig, wobei die Fragen nach einem bestehenden Kinderwunsch oder endometriosebedingten Schmerzen im Vordergrund stehen.

Das Therapiespektrum umfasst neben der chirurgischen Sanierung medikamentös-endokrine Therapieansätze, Kinderwunsch-Behandlung, schmerztherapeutische Optionen, Kombinationstherapien und komplementäre Behandlungsmaßnahmen (Thode et al. 2006). Goldstandard ist die Laparoskopie, die der Diagnostik und der Therapie dient (Ebert et al. 2005). Auf derartige Weise operativ entferntes Gewebe wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Medikamente gegen Endometriose sollten der Entwicklung der Erkrankung vorbeugen, die schon existierende Krankheit und verwandte Läsionen heilen, den Menstruationszyklus nicht beeinflussen, keine negativen Auswirkungen auf Konzeption und Schwangerschaft haben und keine oder nur wenige unerwünschte Wirkungen haben. Ein solches Medikament gibt es allerdings bisher nicht. Basierend auf neuen Erkenntnissen zur Pathogenese der Endometriose zeigte sich, dass Entzündungen des Beckens, gesteigerte Makrophagen-Aktivität, Angiogenese des Beckens und Invasion der extrazellulären Matrix, assoziiert mit Endometriose, potentielle Angriffspunkte für die Endometriose-therapie sind (D'Hooghe et al. 2004).

Hervorzuheben ist hier die Angiogenese, die eine besonders wichtige Rolle bei der Entstehung der Endometriose zu spielen scheint. Die Hemmung der Angiogenese könnte in Zukunft einen neuen, vielversprechenden Therapieansatz darstellen, indem Angiogeneseinhibitoren als wirksame Ergänzungen bestehender Therapieschemata eingesetzt werden (Becker et al. 2004).

Die Einzelheiten der genauen Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung sind noch zu untersuchen. Eine wichtige Rolle scheint die Entzündungsreaktion des Peritoneums in der Umgebung von Endometrioseläsionen zu spielen (Hastings et al. 2003).

Diverse Studien haben belegt, dass die Spiegel verschiedener Zytokine in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen erhöht sind (Harada et al. 2001). Diese Zytokine könnten die Aktivität von Leukozyten in der Peritonealflüssigkeit regulieren. Es ist jedoch auch denkbar, dass sie direkt auf das ektopes Endometrium wirken, wo sie möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese und Pathophysiologie der Endometriose spielen (Harada et al. 2001). Bedenkt man die Vielfalt der sekretorischen Produkte der Peritonealflüssigkeit, sind sowohl hemmende wie auch fördernde Einflüsse auf oberflächliche Endometriose denkbar, da sich die interindividuellen Spiegel der Patientinnen stark unterscheiden können (Koninckx et al. 1999a). Nichtsdestotrotz wurden eine Reihe von Studien durchgeführt, um die Hypothese zu stützen, dass Zytokine, Wachstumsfaktoren und Angiogenesefaktoren die Entwicklung einer Endometriose fördern. Es zeigte sich, dass ein direkter Kausalzusammenhang bisher nicht bewiesen werden konnte, obwohl beeinflussende Effekte dieser Substanzen bekannt sind (Koninckx et al. 1999b). Wichtiger ist die Beobachtung, dass die Ausdehnung der peritonealen Endometriose umgekehrt proportional zur entzündlichen Makrophagen-Antwort ist. Dies lässt vermuten, dass der Effekt der Peritonealflüssigkeit auf Wachstum und Entwicklung einer Endometriose eher ein hemmender als ein fördernder ist (Koninckx et al. 1999b). Tiefe Endometrioseherde müssen

im Gegensatz dazu durch Blutbestandteile beeinflusst werden, da sie keinen Kontakt zur Peritonealflüssigkeit haben und ovariale Endometriose von Konzentrationen innerhalb des Ovars beeinflusst wird (Koninckx et al. 1999a).

Es wird angenommen, dass Wachstum und Entwicklung der Endometriose unvermeidlich sind, wenn die Erkrankung einmal begonnen hat. Außerdem scheint Endometriose eine fortschreitende Erkrankung zu sein, obwohl sie sich bei verschiedenen Frauen unterschiedlich schnell entwickelt. So fokussierte sich die Forschung auf die Pathophysiologie des Beginns der Erkrankung, nämlich die kleinen und frühen Läsionen. Diese können durch zwei verschiedene Theorien erklärt werden, Transplantation und Metaplasie, die immer noch aktuell sind und von zahlreichen Daten gestützt werden (Koninckx et al. 1999a).

Grundgedanke der **Transplantationstheorie** ist die Beobachtung, dass es bei der Periodenblutung nicht nur zu einer Blutung aus der Scheide nach außen, sondern auch zu einer Blutung über die Eileiter in den Bauchraum hinein, der sogenannten retrograden Menstruation, kommt. Die retrograde Menstruation mit nachfolgender Transplantation basaler Zellen scheint ein wesentlicher ätiologischer Faktor zu sein. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um dislozierte Fragmente der Basalschicht des Endometriums mit Stammzellcharakter (paramesonephritisches embryonales Organogeneseprogramm), wobei die „Endometrioseherde“ als die Komponenten des primordialen Uterus (endometriales Epithel, Stroma und peristromale Muskelzellen) verstanden werden (Thode et al. 2006). Zusätzlich kann eine Verschleppung von Schleimhautpartikeln auch über die Blutbahn erfolgen. Diese Theorie wurde schon 1927 durch die Beobachtungen von J. A. Sampson etabliert.

Die Beteiligung von Stammzellen wurde mittels einer Reihe von verschiedenen Stammzellmarkern überprüft. Im adulten Endometrium fand sich eine Population hämatopoetischer Vorläuferzellen, die sich während des gesamten Menstruationszyklus nicht verändert. Diese Zellen unterscheiden sich signifikant von ihren zirkulierenden Gegenstücken aus dem Knochenmark. Interessanterweise unterschieden sich auch die hämatopoetischen Stammzellen, die im Endometrium von unfruchtbaren Frauen gefunden werden, von denen der normalen Kontrollen (Lynch et al. 2007).

Es ist bekannt, dass auch das eutope Endometrium von Endometriosepatientinnen physiologische Unterschiede zu normalem Endometrium aufweist. In ihrer Studie belegten Johnson et al. (2005), dass das eutope Endometrium dieser Patientinnen einen signifikanten Zuwachs im Zellüberleben sowie veränderte DNA-Fragmentation und veränderte Expression von Faktoren für Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose zeigt (Johnson et al.

2005). Es stellt sich jedoch die Frage, ob die beobachteten Unterschiede zwischen dem ektopen und eutopen Endometrium echte Unterschiede in der Gewebebeschaffenheit widerspiegeln, oder ob sie nicht vielmehr das Resultat der veränderten hormonalen Umgebung sind (Koninckx et al. 1999b).

Außerdem gilt die Annahme, dass es in der Bauchhöhle zu einer sterilen Entzündung kommt und es gibt deutliche Hinweise, dass immunologische Faktoren und Angiogenese eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Endometriose spielen (Gazvani und Templeton 2002).

Die Endometriose weist sowohl Charakteristika einer chronischen Entzündung als auch eines Wundheilungsprozesses auf (Groothuis et al. 2005).

Nach der Implantation wird das Wachstum der Endometrioseherde von Steroiden, Wachstumsfaktoren und angiogenetischen Faktoren aus der Peritonealflüssigkeit gefördert, da die Entwicklung von ektopem Endometrium darüber hinaus die Versorgung mit Blutgefäßen erfordert (Gazvani und Templeton 2002). Normales Gewebewachstum, wie in der Embryonalentwicklung, Wundheilung, Ovarialfunktion und des Menstrualzyklus, ist abhängig von der Bildung neuer Gefäße zur Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie zum Abtransport der Stoffwechselabbauprodukte (Groothuis et al. 2005). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Implantation von Endometriumgewebe eine adäquate Angiogenese nach sich ziehen muss (Groothuis et al. 2005). Angiostatische Therapie konnte die Anzahl der Endometrioseherde begrenzen (Nap et al. 2004). Während der letzten Jahre konnten mehrere Angiogenesefaktoren identifiziert werden, die an der Entstehung von Endometriose beteiligt sind. Diese beinhalten vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF) and platelet-derived growth factor (PDGF) (Laschke et al. 2005). Die kombinierte Hemmung dieser drei Faktoren unterdrückt den Prozess der Angiogenese und Vaskularisierung von ektopem endometrialem Gewebe zuverlässig (Laschke et al. 2005).

Der von R. Meyer 1919 entwickelten **Metaplasietheorie** liegt die Tatsache zugrunde, dass Endometrium und Bauchfell entwicklungsgeschichtlich dem gleichen embryonalen Gewebe, dem Mesoderm (genauer dem Coelomepithel), entstammen. Infolge chronischer Reize können sich Zellen des Bauchfells in Endometriosezellen umwandeln und somit einen Endometrioseherd ausbilden. Bei dieser Theorie wird also von einer Neubildung von Endometrioseherden aus Zellen des Bauchfells außerhalb der Gebärmutter ausgegangen (Becherer und Schindler 2002). Sie wurde notwendig, da die Transplantationstheorie nicht alle Lokalisationen und Manifestationen der Endometriose erklären kann, wie Endometriose beim Mann oder Endometriose bei Frauen ohne retrograde Menstruation, die man vereinzelt

bei Laparoskopien während der Menstruation gefunden hat. (Koninckx et al. 1999a). Bei Männern, die auf Grund eines Prostatakarzinoms mit hohen Östrogendosen behandelt wurden, konnte in Einzelfällen eine Endometriose nachgewiesen werden (Quakernak et al. 2003).

Nach chirurgischer Entfernung von Endometrioseherden tritt die Erkrankung bei 30 bis 50% der Patientinnen in 3-5 Jahren wieder auf. Erstaunlicherweise erkranken auch etwa 10% aller Frauen erneut, denen sowohl Uterus wie auch beide Eierstöcke entfernt wurden (Banu et al. 2009). Dies spricht auch gegen die Transplantationstheorie, da hier gar keine Menstruation - auch keine retrograde- mehr stattfindet.

Die Metaplasie ist ein riesiger Umbruch in der Gewebedifferenzierung und so gut wie immer mit chronischer Zerstörung und Regenerationsprozessen assoziiert. Es ist anzunehmen, dass der Umbruch schon auf Ebene der Stammzellen passiert und nicht bei den differenzierten Zellen (Alison et al. 2002).

Eine weitere von Bischoff und Simpson (2004) untersuchte Komponente zur Ätiopathogenese der Endometriose ist die genetische. Die Autoren berichten von Häufigkeiten von 5-7% für das erneute Auftreten einer Endometriose unter Verwandten ersten Grades. Familiäre und epidemiologische Studien lassen für die Endometriose auf eine polygenetische/multifaktorielle Vererbung schließen. Die genaue Anzahl und Lokalisation der betroffenen Gene bleibt noch zu klären (Bischoff und Simpson 2004). Auch D'Hooghe et al. berichten 2004 von zunehmenden Beweisen, dass Endometriose als eine komplexe genetische Disposition mit multiplen Genen vererbt wird, die untereinander und mit der Umwelt interagieren und so den Phänotyp der Erkrankung produzieren.

Ein weiterer wichtiger Ansatz die Pathogenese von Endometriose betreffend ist der fördernde Einfluss von oxidativem Stress. In einer Studie konnte belegt werden, dass oxidativer Stress eine Rolle in der Entstehung von Endometriose spielt (Portz et al. 1991). Hier wurde gezeigt, dass die Injektion der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase und Katalase in die Peritonealhöhle die Ausbildung von Adhäsionen bei Endometrioseherden im Kaninchenmodell verhindern kann (Portz et al. 1991). Erythrozyten, apoptotisches endometriales Gewebe und Zellrückstände, die durch menstrualen Reflux in die Bauchhöhle transportiert wurden, und Makrophagen wurden als potentielle Auslöser für oxidativen Stress angeschuldigt (Langendonck et al. 2002). Exzessive Produktion von reaktivem Sauerstoff könnte ebenso durch das Vorhandensein von Umweltgiften und Schwermetallen ausgelöst werden, die das Gleichgewicht von Pro- und Antioxidantien stören (Langendonck et al. 2002). Es wäre nun interessant herauszufinden, ob antioxidative Medikation bei

Endometriosepatientinnen einen effektiven Therapieansatz darstellt (Langendonck et al. 2002).

Insgesamt scheint das Zusammenwirken von endokrinen, immunologischen und mechanisch-anatomischen Faktoren und die genetische Disposition zu Metaplasie, Implantation und Entstehung von Endometrioseherden zu führen (Ebert et al. 2005).

1.2 Stammzellen

Stammzellen werden als Zellen definiert, die die Fähigkeit haben, durch Selbsterneuerung fortzubestehen und sich durch Differenzierung in andere adulte Gewebe umzuwandeln (Foster et al. 2002).

Sie sind für die korrekte Entwicklung und Hämostase von adulten Organismen essentiell und darüber hinaus sind sie wahrscheinlich zukünftig von therapeutischer Wichtigkeit (Gonzalez-Reyes 2003).

Stammzellpopulationen verschiedener Gewebearten bieten diverse Möglichkeiten der Geweberegeneration, der zellbasierten Transplantationstherapien und eventuell der klinisch effektiven Gentherapien (Bonnet 2002). Zur Zeit ist es schon möglich einzelne Zellarten wie Osteozyten oder Chondrozyten aus Stammzellen herzustellen (Produkte dieser Art sind bereits auf dem Markt). Allerdings ist man von der Herstellung komplexer Organe noch weit entfernt (Alison et al. 2002).

Eine Hürde der Stammzellforschung liegt in der Verfügbarkeit der Zellen. Im menschlichen Knochenmark findet sich beispielsweise nur eine Stammzelle auf 100.000 Zellen (Bishop et al. 2002).

Am Beginn der Individualentwicklung stehen Stammzellen, deren weitere Entwicklung einem definierten Programm folgt. Die befruchtete Eizelle, die Zygote, hat das höchste Potential. Man bezeichnet ihre Blastomeren als omnipotent, denn aus ihr entwickeln sich alle Zellen des menschlichen Körpers sowie die Plazenta. Durch mitotische Zellteilung wird 12-36 Stunden post conceptionem (p. c.) das Zweizellstadium erreicht. Es folgen weitere mitotische Zellteilungen, und nach 60-72 Stunden ist dann die aus 32 Zellen bestehende Morula entstanden. Etwa am 4. Tag p. c. kommt es durch Zellumlagerungen nach außen zur Bildung eines inneren flüssigkeitsgefüllten Hohlraums, wodurch sich aus der Morula die Blastozyste entwickelt. Es kommt zu ersten Differenzierungen in eine äußere Trophoblastschicht und den im Inneren wandständig liegenden, knotenförmigen Embryoblasten (Pfleiderer et al. 2002). Die Zellen des Embryoblasten sind pluripotent, sie können alle Körperzellen, aber nicht die Plazenta ausbilden. Die meisten adulten Gewebe, mit Ausnahme des Herzens, enthalten multipotente Stammzellen, die in der Lage sind, sich in dessen verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Stammzellen des ZNS können sich z. B. in Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten differenzieren. Auf der untersten Stufe der Potenz stehen unipotente Stammzellen

wie die epidermalen Stammzellen in der Basalschicht der Haut, die sich nur noch in Keratinozyten differenzieren können (Alison et al. 2002).

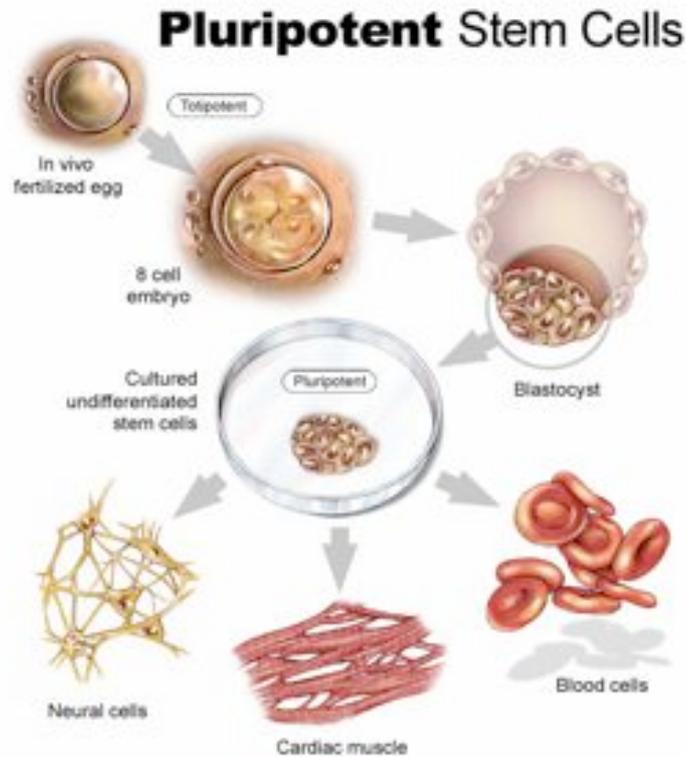


Abbildung 2: Pluripotente Stammzellen²

Jede Zellart hat eine eigene sogenannte Nische, die den Stammzellen einen gewissen Schutz bietet. Stammzellen sind eine sich selbst erneuernde Population. Geht man davon aus, dass aus einer Stammzelle bei der Zellteilung eine neue Stammzelle und eine spezialisierte Zelle entstehen, müsste die Population konstant bleiben. Tatsächlich schwankt ihre Anzahl aber ständig. An der gesamten Zellzahl ist der Anteil der Stammzellen äußerst gering. Die Stammzellen erfüllen im Gewebe keine spezifische Funktion, sie wird erst von den Zellen erfüllt, die aus ihnen hervorgehen. Stammzellen entwickeln sich langsamer, aber korrekter als ausdifferenzierte Zellen, es treten weniger häufig DNA- Fehler auf (Alison et al. 2002).

Stammzellen und ihre Tochterzellen müssen ständig über ihr Schicksal entscheiden, sie können proliferieren, Stammzellen bleiben oder sich in ausdifferenzierte Zellen weiterentwickeln. Es bleibt nun die Frage, wie diese Entwicklung in vivo gesteuert wird. Anscheinend bestimmen die Interaktion von Zellen mit ihrer Mikroumgebung, ihren

² Abbildung entnommen von www.stemcellresearchfoundation.org

Nachbarn, der Basalmembran und dem Milieu von umgebenden Wachstumsfaktoren und anderen Liganden, das Schicksal der Zelle (Janes et al. 2002).

Am besten charakterisiert und erforscht sind die hämatopoetischen Stammzellen (HSZ). Bei diesen lässt die Forschung wichtige Therapiemöglichkeiten erkennen. HSZ sind multipotent und weisen eine hohe proliferative Kapazität auf. Sie haben die Fähigkeit zur balancierten Selbsterneuerung und Differenzierung. Eine Stammzelle kann 8 – 10 ausdifferenzierte Zellen produzieren. HSZ sind sehr selten, es findet sich nur eine Zelle auf 10.000 bis 100.000 Blutzellen. Sie haben wahrscheinlich sogar die Fähigkeit sich in blutfremde Zellen zu differenzieren (Bonnet 2002).

Diese Vermutung äußern auch Forbes et al. (2002), die beobachteten, dass sich HSZ, die aus ihrer natürlichen Nische in eine andere versetzt wurden, in diverse Gewebe differenzieren können. Die Arbeitsgruppe hat eine Differenzierung von HSZ in Herz- und Skelettmuskelzellen, Endothelien, verschiedene Epithelien inklusive neuronaler Zellen, Pneumozyten und Hepatozyten nachgewiesen.

Während der Embryonalentwicklung wandern blutbildende Stammzellen von der fetalen Leber über die Blutzirkulation zurück ins Knochenmark (= homing). So wird dieses Gewebe erneut mit einer hohen Anzahl von unreifen und reifenden Blutzellen aller Zelllinien bevölkert (Lapidot und Petit 2002).

1.3 Stammzellmarker

Jeder Mensch hat ein eigenes Stammzellreservoir, zum Beispiel in der Leber und im Knochenmark. Diese Stammzellen haben anscheinend ein höheres Potential als bisher angenommen. Sie sind immer noch in der Lage, sich auch in andere Gewebetypen zu differenzieren. Für den Einsatz in der Forschung ist die Identifikation und Gewinnung solcher Stammzellen von höchstem Interesse. Das Problem ist aber bislang die Verfügbarkeit von geeigneten Markern, die für einen bestimmten Zelltyp höchst spezifisch sein müssten. Leider haben die bisher verfügbaren Marker noch nicht diese hohe Spezifität (Bishop et al. 2002).

Die Identifikation von einigen Stammzellmarkern hat es Forschern jedoch schon ermöglicht, diese Zellen zu isolieren und zu studieren (Janes et al. 2002). Eine klassische Isolationsmethode für Stammzellen ist die Verwendung von magnetischen Mikroperlen, die mit anti-CD133 oder anti-CD34 umhüllt sind (Hristov et al. 2003). Stammzellen unterscheiden sich im Expressionsmuster verschiedener Marker, das zwischen den verschiedenen Zelllinien variiert. Bisher ist allerdings noch unklar, ob bestimmte Expressionsmuster auf spezifische Potenzen hinweisen (Bonnet 2002).

1.3.1 CD 34

CD 34 wurde ursprünglich im Rahmen eines Projekts zur Entwicklung von Antikörpern entdeckt, die menschliche Knochenmarkszellen, nicht aber adulte Blutzellen markieren sollten. Die Beschreibung der Zelloberfläche mit der Expression des Oberflächenantigens CD 34 wurde schnell ein wichtiger Faktor für die Aufzählung, Isolation und Manipulation von humanen hämatopoetischen Stammzellen, da CD 34 mit der fortschreitenden Reifung der Zelle in seiner Expression nach unten reguliert wird (Bonnet 2002). Die normale Funktion von CD 34 in der Hämatopoese ist jedoch trotz dieser intensiven Forschung immer noch rätselhaft (Bonnet 2002).

Obwohl alle hämatopoetischen Stammzellen CD 34 exprimieren, sind nicht alle CD 34-positiven Zellen HSZ, denn CD 34 ist auch ein endotheliales Antigen (Lynch et al. 2007).

CD 34-positive Zellen haben das Potential gezeigt Kolonien in langdauernden In-vitro-Kulturen zu formen und erlauben die Differenzierung in Blutzelllinien bei immunsupprimierten Mäusen (Engelhardt et al. 2002).

1.3.2 CD 133

Das Oberflächenantigen CD 133 (ursprünglicher Name AC 133) ist ein signifikanter Marker für hämatopoetische Stammzellen (Bonnet 2002). CD 133 ist ein früher Marker für hämatopoetische Stammzellen. Es handelt sich um ein transmembran gelegenes Polypeptid mit einer Größe von 120kD, das von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird. Diese können aus menschlichem Knochenmark, fetaler Leber und peripherem Blut isoliert werden (Yin et al. 1997). Im peripheren Blut von Erwachsenen finden sich reifere endotheliale Vorläuferzellen, die CD 133 verloren haben, aber positiv für CD34 sind (Hristov et al. 2003). CD 133 ist auf der Oberfläche von Nabelschnur-Epithelzellen nicht nachweisbar (Yin et al. 1997). So scheint es, dass der Verlust von CD 133 die Transformation von zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen in reifere Endothelzellen reflektiert (Hristov et al. 2003).

1.3.3 C-kit (CD 117)

C-kit, ein transmembranes Glykoprotein von 145kD, ist das Produkt des c-kit Gens, welches das normale zelluläre Homolog des viralen Onkogens v-kit ist (Heissig et al. 2002).

Während der Entwicklung durchlaufen HSZ eine Migration durch die verschiedenen Kompartimente des Körpers. Es wird jedoch vermutet, dass es beim Erwachsenen einen Homing-Mechanismus gibt, der bewirkt, dass ein geringer Anteil der zirkulierenden HSZ innerhalb eines Tages ins Knochenmark zurückkehrt (Poulsom et al. 2002). Dort werden, nach durchgemachter Myelosuppression, Reparaturprozesse in Gang gesetzt (Heissig et al. 2003). In den Prozess von Migration und Homing sind verschiedene Faktoren involviert. Der Ligand für den Stammzellfaktor C-kit spielt hier eine große Rolle, da er die Adhäsion von HSZ an Stromazellen stimuliert (Poulsom et al. 2002).

Der Stammzellfaktor, der dort bindet, triggert Homodimerisation und intermolekulare Tyrosin- Phosphorylierung, die die Signaltransduktion initiiert. Der Rezeptor und sein Ligand sind essentiell für die Reifung von hämatopoetischen und primordialen Stammzellen und Melanozyten während der Embryonalentwicklung. Verschiedene Zellfunktionen werden von CD 117-abhängigen Signalen inklusive Zellüberleben, Proliferation, Adhäsion, Differenzierung und funktioneller Reifung von hämatopoetischen Zellen beeinflusst.

1.4 Andere Stammzellmarker

Aus den verfügbaren Daten geht hervor, dass nicht jede hämatopoetische Stammzelle das gleiche Expressionsmuster von Stammzellmarkern aufweist (Guo et al. 2003). Deshalb wurden in letzter Zeit weitere Marker bewertet (Guo et al. 2003). Hierzu gehören beispielsweise oct 3/4 , CD 38, Sca-1 und CD 33 (Vorläufer myeloider Zellen). CD45 ist ein Marker für das hämatopoetische System (Goodell 2002), der andauernde Differenzierung anzeigt (Lynch et al. 2007). Wenn hämatopoetische Stammzellen reifen und mit der Differenzierung beginnen, geht der Marker CD 34 fortschreitend verloren. Gleichzeitig erhöht sich die Menge an exprimiertem CD 45- und CD 38-Antigen (Lynch et al. 2007).

Die Marker CD 56 und CD 7 betreffen ebenfalls das hämatopoetische System und belegen das Vorhandensein von lymphatischen Vorläuferzellen. CD 56 ist zum Beispiel ein Oberflächenantigen auf natürlichen Killerzellen (Lynch et al. 2007).

1.5 Stammzellerkrankungen

Bei der sehr schmerzhaften und hartnäckig wiederkehrenden Endometriose mehren sich die Hinweise, dass diese Erkrankung im Grunde eine Stammzellerkrankung sein könnte. Leider kommt es trotz bestmöglicher Therapie auch heute noch bei bis zu einem Drittel der Patientinnen zu einem Rezidiv der Erkrankung. Die zugrunde liegenden Mechanismen waren bis vor kurzem völlig unbekannt. Inzwischen glauben Experten, diesem Geheimnis zumindest zum Teil auf die Spur gekommen zu sein: Das Wiederaufflammen scheint über Stammzellen zu verlaufen, die durch die konventionelle Behandlung nicht beseitigt werden – und die die Erkrankung steuern dürften. (Prof. Ludwig Kiesel, Münster, Vorstandsvorsitzender des DVR, auf dem DVR Kongress in Bonn 2007; DVR = Dachverband Reproduktionsbiologie und –medizin).

1.6 Proliferationsmarker

1.6.1 Ki 67

Über die Struktur, Lokalisation und Regulation von Ki 67 ist schon Vieles bekannt. Es ist ein großes Protein von ca. 395 kDa, kodiert durch fast 30.000 Basenpaare des menschlichen Genoms (Brown und Gatter 2002).

Ki 67 besteht aus verschiedenen Epitopen. Eines davon ist MIB 1 (Brown und Gatter 2002), wobei MIB 1 für Molecular Immunology Borstel 1 steht. Der hier in dieser Studie verwandte Antikörper richtet sich gegen MIB 1.

Das Antigen wird während aller aktiven Phasen des Zellzyklus‘ (G₁-, S-, G₂- und M-Phase) präferentiell exprimiert, fehlt jedoch in ruhenden Zellen (G₀-Phase). Während der Interphase kann das Antigen ausschließlich innerhalb des Nukleus‘ nachgewiesen werden, wohingegen bei der Mitose der überwiegende Teil des Proteins auf die Oberfläche der Chromosomen umgelagert wird. Das Antigen wird schnell abgebaut, sobald die Zelle in den nicht-proliferativen Zustand übergeht, und auch während DNA-Reparaturprozessen scheint keine Expression von Ki 67 stattzufinden (Produktinformation der Firma DakoCytomation Hamburg).

Über die Funktion, die Ki 67 im Zellzyklus erfüllt, ist nur sehr wenig bekannt; wir wissen aber, dass es entscheidend für die Zellproliferation ist (Brown und Gatter 2002).

Der Nachweis des Proteins Ki 67 hat prognostischen Wert für viele Arten von malignen Tumoren, da die im Tumor vorhandene Anzahl proliferierender Zellen mit dem Outcome der Patienten korreliert (Brown und Gatter 2002). Außerdem ist eine gute Korrelation zwischen Ki 67 und der Mitoserate in humanem Endometrium belegt (Johnson et al. 2005).

1.7 Ziel der Arbeit

Da die Endometriose immer noch eine Erkrankung ist, die viele Frage offen lässt, soll in der vorgelegten Arbeit die Transplantationstheorie überprüft werden. Wie bereits 2003 von Starzinski-Powitz et al. postuliert, besagt diese Theorie, dass in den Zellen von Endometrioseherden auch Zellen mit Stammzellcharakter bzw. -plastizität (d. h. Zellen, die noch Differenzierungspotential besitzen) vorhanden sind. Hierfür sollen Endometrioseherde verschiedener Lokalisation mittels Stammzellmarkern für hämatopoetische Stammzellen immunhistochemisch charakterisiert werden. Die Identifikation von Zellen und bestimmten Zelltypen erfolgt über die spezifische Lokalisation von zytoskeletalen Filamenten mit immunhistochemischen Färbungen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In der Studie wurde das Endometriosegewebe von 42 Patientinnen im Alter zwischen 23 und 48 Jahren untersucht, die im Zeitraum vom 12.1.2004 bis 5.9.2005 operiert wurden. Die Operationen fanden in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Gießen statt. Das Gewebe wurde unmittelbar nach der Entnahme in 4%iges gepuffertes Formalin, dann in PBS- Puffer und zum Schluss in 70%igen Alkohol gegeben. Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet und vom Institut für Pathologie der Universitätsklinik Gießen nach Standardfärbung untersucht. Die Befunde sind im Folgenden aufgeführt. Die Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Präparate und Lokalisationen. Die Paraffinblöcke wurden dankenswerterweise von der Pathologie zur weiteren Forschung zur Verfügung gestellt.

Die Verwendung von bereits gewonnenem Gewebe wurde von der Ethikkommission (Prof. Dr. Dr. h. c. Federlin) genehmigt.

2.2 Pathologiebefunde

Diese Aufstellung zeigt die Befunde aus dem pathologischen Institut des Klinikums der Justus Liebig Universität, die dankenswerterweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Die Proben wurden bereits in der Pathologie durch Nummern gekennzeichnet, damit die Identität der Patientinnen gewahrt bleibt. So konnten die Präparate unabhängig von der Kenntnis der Anamnese der Patientinnen untersucht werden.

0400864 1.3 und 2.5

Es handelt sich histologisch um eine Endometriose der Sigma-/Rektumwand mit multiplen, intermural gelegenen Endometrioseherden, zum Teil mit frischen Blutungen (1.3) und einer frischen Endometriosezyste (2.5)

0405555 1. und 2.

Es handelt sich um eine Endometriose im Bereich von Mesothelzysten mit perifokalen Fibrosierungen (1.), ferner um weitere Anteile einer Endometriose mit älteren Blutungsresiduen aus dem Bereich des Harnblasendachs (2.). In dem vorliegenden Material kein Hinweis auf eine florid-eitrige Entzündung (nach klinischen Angaben V. a. Pyosalpinx links), kein Anhalt für Spezifität und Malignität.

0406655 1. und 2.

Es handelt sich histologisch um eine größere Endometriosezyste (1.) mit reichlich Hämosiderin im Randbereich und fokal deutlich sichtbarem zytogenem Stroma. Weitere klein-zystische Endometrioseherde (2.) offenbar im Bereich der rechten Tube.

0407747 1.2

Es handelt sich histologisch um ein Endometriosis externa im Bereich des hinteren Scheidengewölbes mit mehreren Endometriosezysten sowie ausgedehnten perifokalen Vernarbungen (1.1 und 1.2).

0407749 2.

Es handelt sich histologisch um eine Endometriose mit kleinen Endometriosezysten und perifokalen Vernarbungen im Bereich der Uterusvorderwand (1.), um eine recht ausgeprägte Endometriosis externa mit perifokalen Vernarbungen und leichtgradiger chronisch

unspezifischer Entzündung im Bereich des linken Douglasraumes (2.), um eine Endometriosis externa mit ebenfalls kleinen Endometriosezysten und leichtgradiger chronischer entzündlicher Irritation im Bereich der Fossa ovarica extra (3.) sowie um regressiv veränderte hämorrhagische Bindegewebsanteile mit Verkalkungen und spärlichem zytogenem Stroma, vereinbar mit Endometriosis externa im Bereich des rechten Ovars (4.).

0408566

Endometriose des hinteren Vaginalgewölbes.

0408797

Es handelt sich histologisch um eine größere Endometriosezyste des linken Ovars, in deren Umgebung Hämosiderineinlagerungen sowie weiterhin in Randbereichen ovarielles Stromagewebe und insbesondere Primordialfollikel nachweisbar waren.

0410370 2.1 und 2.2

Beide Präparate zeigen Endometriose der linken Tube.

0411174 1.

Es handelt sich histologisch um eine peritoneale Zyste sowie um eine herdförmige Endometriose im Bereich des Fundus uteri (1.) sowie um eine linksseitige Tube mit kleineren Paratubarzysten und um miterfasstes ovarielles Rindenstroma unter Einschluss eines Corpus albicans (2).

0414048 3.7, 3.8, 3.9 und 4

Es handelt sich um einen Uterus adenomyosis mit glandulärer epidermisierte Portioektomie mit florider Salpingitis rechts und subseröser Tubenendometriose rechts mit einer angrenzenden serösen Zyste (3.7) mit einer weiteren zystischen Endometriose (3.8) und weiteren Endometrioseherden (3.9) sowie einer Endometriose im Bereich der Spazio-Recto-Sigmoidale (4.).

0417454 1.

Es handelt sich um eine ovarielle Endometriosezyste ohne klinische Angabe zur Seitenlokalisation des betroffenen Ovars (1.).

0422458 1.4

Im Ovar der Gegenseite (?) Nachweis mehrere kleinerer Endometrioseherde sowie einer größeren Endometriosezyste.

0422618 2.1

Es handelt sich um ein Hysterektomiepräparat mit regulärer Portio- /Cervixschleimhaut (2.1 und 2.2), mehreren Retentionszysten (sogenannten Ovular Nabothi) im Cervixbereich sowie proliferierendem Corpusendometrium (2.3) bei klinisch rezidivierenden (vaginalen) Blutungen sowie HTX. Das Material von der Fossa ovarica (1.) zeigt ausgedehnte Endometrioseherde.

0425517 2.

Es handelt sich um eine Endometriosezyste aus dem Bereich des linksseitigen Ovars.

0428382 1.

Es handelt sich histologisch um proliferiertes Corpusendometrium ohne Sekretionszeichen in der Strickkürrettage, weiterhin um eine Endometriose mit frischen Hämorrhagien (2.) und um eine weitere zystische Endometriose unter dem klinischen Bild einer Hydatide.

0428996 3.

Es handelt sich um eine zystische Endometriose des rechten Ovars sowie um Anteile einer Endometriose im Bereich des Beckenperitoneums (3.).

0429282 2.

Es handelt sich um eine leichte submuköse Fibrose im Bereich des hinteren Scheidengewölbes bei unauffälligem Plattenepithel, weiterhin um eine Endometriose der Tubenwand (2.).

0429391 2.

Es handelt sich um eine Endometriose an der Rektumvorderwand (1.), weiterhin um Endometrioseherde im Bereich des Spatium recto vaginale (2.).

0430976 3.2, 3.3, 4 und 5.

Es handelt sich um eine Endometriosezyste aus dem Bereich des rechten Ovars mit ausgedehnten frischen Einblutungen aus dem Bereich eines aufgebrochenen Gelbkörpers und mehrerer eingefasster Follikelzysten in Nachbarschaft zu der leichtgradig lichtungsaufgeweiteten rechten Adnexe (3.), ferner um eine insgesamt ausgedehnte und ausgeprägte Endometriosis externa im Bereich von rechtsseitiger Beckenwand (2.) der rechten Fossa ovarica (4.), diskret im Bereich des rechtsseitigen Sakrouterinbandes (5.), im Bereich des Douglas (7.) und sehr ausgedehnt im Bereich des vaginalen Wandgewebes (6.8).

0431029 2.3

Es handelt sich um plumpe zottige Strukturen vom Typ der Tubenfimbrien mit einer floriden, teilweise abszedierenden Salpingitis, außerdem liegt ein Sigmaresektat mit multiplen intramuskulären Endometrioseherden (2.3), ein Divertikel, leicht reaktiv entzündlich veränderte Lymphknoten und unauffällige Absetzungsränder oral und aboral vor.

0432712 1.2, 1.3 und 1.4

Es handelt sich um eine eingeblutete Gelbkörperzyste, ferner um eine zum Teil zystische Endometriose im Bereich von Ovar und äußerer verwachsener Tubenstrukturen unter Einschluss einer Saktosalpinx und Endometriose auch im Bereich der Tubenschleimhaut linksseitig.

0433019 2.4

Es handelt sich um eine regelrechte Tube mit einzelnen Paratubarzysten, weiterhin um ein linkes Ovar mit mehreren Endometriosezysten, die Einblutungen und eine resorptive Entzündung aufweisen, des Weiteren auch mit zwei Follikelzysten, jedoch ohne Hinweise für ein Zystadenom und um eine Endometriose im Bereich des Douglas'schen Raumes (2.).

0435314 1.1

Es handelt sich um multiple mikrozystisch umgestaltete Endometrioseherde der muskulären Vaginalwand, welche nach seitlich bds., kranial und kaudal knapp im Gesunden entfernt zu sein scheinen (1.1 – 1.5), weiterhin liegen auch Residuen oder Ausläufer von Endometrioseherden mit regressiven Veränderungen (Verkalkung) im Bereich der Zervixhinterwand vor (2.).

0435315 1.

Es handelt sich um Endometrioseherde in der Tunica muscularis der Darmwand (1.), und weiterhin um Anteile von Uterusleiomyomen (2.).

0435377 4.

Es handelt sich um regelrechtes Plattenepithel der Portio und unauffällige Zervixschleimhaut (1.), weiterhin um schwach proliferiertes Corpusendometrium ohne Sekretionszeichen (2.) und um eine fibröse Leiste des Peritoneums mit fokaler peritonealer Deckzellproliferation, jedoch ohne Anzeichen einer floriden Entzündung und ohne Atypien (3.), und um eine Endometriosezyste des rechten Ovars mit Blutungsresten (4.).

0435505

Es handelt sich um eine Endometriosezyste des rechten Ovars bei sonst altersgemäßem Ovarialbefund.

0445343 2. und 3.

Es handelt sich histologisch um Fettbindegewebsmaterial mit glatten Muskelfaserbündeln (1.) vom Ligamentum rotundum und hier eingefasst randlich einzeln dissoziierten Drüsenschlauchstrukturen, im Gesamtkontext als Endometrioseherde zu deuten, weiteres Fettbindegewebsmaterial mit zahlreichen kleinlumigen einreihigen Drüsenschläuchen und hier in der Umgebung deutlich erkennbarem zytothemem Stroma, luminal pigmentspeichernde Histiozyten, entsprechend ausgedehnten Endometriosen im Blasendachbereich (2.), schließlich Tuben- und Ovaranteile (3.), letztere mit größeren und kleineren Follikelzysten, einzelnen Endometrioseherden sowie einer etwas größeren Endometriosezyste.

0447516 1.

Es handelt sich um Endometrioseinseln aus dem Bereich des linksseitigen Interuterinsegmentes (1.), im Bereich älterer, in fraglicher Resorption stehender Blutungszonen des Douglas (2.) sowie ferner den beidseitigen Ovarien (3., 4.), gleichzeitig offenbar in Kombination mit einem teils serös, teils muzinös differenzierten Zystadenom (4.). Insgesamt jedoch kein Hinweis auf zelluläre Atypien, kein Anhalt für Malignität.

0504737 1., 3. und 4.

Es handelt sich um eine Endometriose des rechtsseitigen sakrouterinen Ligaments (1.), des linksseitigen sakrouterinen Ligaments (3) sowie im Bereich des rechtsseitigen Douglasraumes (4) und der Umschlagsfalte (5).

0505657 1., 2. und 3.

Es handelt sich um peritoneale Mesothelzysten aus dem Bereich des Fundus uteri (1.), um eine ausgeprägte tiefe Endometriose im Bereich der Rektumwandung mit Ausdehnung von tiefer Submucosa bis hin zur aufgebrochenen Serosa (2.), um eine knotige Adenomyosis (3.), um eine Hydrosalpinx mit serosalen tubaren Verwachsungszonen rechtsseitig (4.) und schließlich um eine eingeblutete Gelbkörperzyste des linksseitigen Ovars (5.)

Eine Leiomyose liegt in (3.) nicht vor, so dass unter der Voraussetzung einer uterinen Entnahmelokalisation auch von einer Endometriosis interna auszugehen ist.

0508848

Es handelt sich um eine größere Endometriosezyste aus dem Bereich des linksseitigen Ovars.

0510447 1.

Es handelt sich histologisch um Fettbindegewebsmaterial (1.), klinisch von der linken Fossa ovarica mit zahlreichen endometrialen Drüsenschläuchen und hier umgebend reichlich zytogenes Stroma, entsprechend damit Endometrioseherden. Ferner ein größeres und ein kleineres, submuköses Leiomyom (2. und 3.).

0512718 1.5

Es handelt sich um ein Hysterektomiepräparat mit unauffälliger Portio-/Cervixschleimhaut (1.1 und 1.2), einem Corpusendometrium in mittlerer Proliferation, ferner das rechte Ovar (1.4) mit einzelnen Corpora albicantia und einer etwas größeren Inklusionszyste. Der mikroskopisch beschriebene solide Herd im ovariellen Stroma (1.4) bedarf noch der weiteren immunhistochemischen Abklärung. Schließlich periovariell Weichgewebe (1.5) mit Nachweis mehrerer Endometrioseherde.

0513521 3., 4. und 6.

Es handelt sich um Zervixsekret mit spärlichen Zellen regulärer Zervixschleimhaut (1.), des Weiteren um polypoid hyperplastisches Corpusendometrium vom Typ der glandulären Hyperplasie mit abortiver sekretorischer Transformation und Rückbildungszeichen (2. und 7.), außerdem finden sich Endometrioseherde des rechten Ovars (3.) und des linken Ovars (4.) sowie im Bereich der linken Tubenwand (6.)

Zusätzlich findet sich eine in Resorption stehende hämorrhagische Zyste des linken Ovars, die wahrscheinlich in erster Linie auf eine ältere Corpus luteum Zyste mit beginnender narbiger Umwandlung zurückzuführen ist (5.).

0513428 1.3, 1.4 und 1.5

Es handelt sich um ein 9cm langes Rektumresektat mit einer ausgeprägten Endometriose äußere Wandabschnitte, die bis in die Schleimhaut reicht (1.3 – 1.5), weiterhin um regelrechte entzündungsfreie Absetzungsränder.

0517146 1.

Es handelt sich um eine Endometriose, die nach klinischen Angaben offensichtlich im Douglas'schen Raum liegt (1.), des Weiteren um unauffälliges Gewebe des Bandapparates.

0518491 2. und 8.

Es handelt sich um Anteile einer Granulosa Luteinzyste des rechten Ovars (1.) sowie um eine Endometriosis genitilis externa im Bereich der linken Tube (2.), der rechten Beckenwand (3.), der A. iliaca externa (4.), im Bereich des Infundibulums (5.), im Bereich des linken Ovars (6.) sowie Sakrouterin links (8.).

Weiterhin handelt es sich um gering fibrosiertes Bindegewebe ohne Nachweis einer Endometriose aus dem Bereich des linksseitigen Ureters (7.).

0518599 1.6, 1.7 und 2.

Es handelt sich um ein Hysterektomiepräparat mit unauffälligem mehrschichtigem Plattenepithel der Ektozervix sowie einzelnen eingelagerten Retentionszysten (sog. Ovula Nabothii), um regelhafte Zervixschleimhaut sowie um eine eingelagerte benigne noduläre, bislang nicht eindeutig zu klassifizierende Proliferation, um gering unregelmäßig proliferiertes Endometrium des Corpus sowie um eine herdförmige Adenomyosis uteri, um eine regelhafte Tube, um mehrere Endometriosezysten des Ovars (1.6) sowie um eine Endometriosis genitalis externa im Bereich der Mesosalpinx (1.7) sowie periuterin links (2.)

0523103 2.3, 3.1 und 3.2

Es handelt sich um ein linksseitiges Ovar mit multiplen nicht-luteinisierten Follikelzysten sowie einer anhängenden, altersentsprechend regelrechten linksseitigen Tube, weiterhin um eine regelrechte Cervix uteri mit einer von regelrechtem dysplasiefreiem Plattenepithel überkleideten Portio, ferner um eine Endometriose im Bereich angrenzender myometrialer Wandabschnitte (2.3) sowie um eine Endometriose (3.1 und 3.2).

0525392 7.

Es handelt sich um proliferiertes Corpusendometrium in früher sekretorischer Transformation entsprechend dem Beginn der 3. Zykluswoche, des Weiteren um ein kleines seröses Zystadenom des rechten Ovars und um ovariell-epitheliales Stroma mit Einschluss mehrerer Primärfollikel und einzelner Follikelzysten sowie einzelner Corpora albicantia, ferner um multiple Endometriosen im Bereich der Blasenumschlagsfalte, der rechten Beckenwand und der Bauchdecke sowie des Zwerchfells (4.-7.).

0526279 1.

Es handelt sich um Endometrioseherde aus dem Bereich der Sigmavorderwand (1) sowie der Rektumvorderwand (2.).

0532302

Es handelt sich eine Endometriose, klinisch hinteres Scheidengewölbe.

Tabelle 1: Liste der Proben

Nummer	Beschreibung	Alter der Pat. bei OP in a	OP Datum
0400864	1.3 Rektumwand, .5 frische Endometriosezyste	39	12.01.2004
0405555	1. Zyste; 2. E. Blasendach	34	11.02.2004
0406655	1. Endometriosezyste, 2. rechte Tube	36	19.02.2004
0407747	1.2 Zyste hinteres Scheidengewölbe	38	26.02.2004
0407749	2. E. Douglas	40	26.02.2004
0408566	Endometriose hinteres Vaginal Gewölbe	29	03.03.2004
0408797	Endometriosezyste linkes Ovar	33	04.03.2004
0410370	2.1 und 2.2 Endometriose linke Tube	44	16.03.2004
0411174	1. E. fundus uteri	31	22.03.2004
0414048	3.7 Zyste, 3.8 Zyste, 3.9 und 4 Peritoneum	43	08.04.2004
0417454	1. Endometriosezyste	30	06.05.2004
0422458	1.4 Endometriosezyste	48	15.06.2004
0422618	2.1 Endometrioseherd Fossa ovarica	35	16.06.2004
0425517	2. Endometriosezyste linkes Ovar	31	06.07.2004
0428382	1. Endometriosezyste	23	28.07.2004
0428996	3. E. Becken	36	03.08.2004
0429282	2. Endometriose der Tubenwand	29	04.08.2004
0429391	2. spatium recto vaginale	31	05.08.2004
0430976	3.2 und 3.3 Zyste, 4 und 5 peritoneale Endometriose	37	19.08.2004
0431029	2.3 intramuskuläre Endometriose Sigma	42	19.08.2004
0432712	1.2, 1.3 und 1.4 Endometriose Tube	40	02.09.2004
0433019	2.4 Endometriose Douglas Raum	40	06.09.2004
0435314	1.1 Endometriose Vaginalwand,	25	23.09.2004
0435315	1. Endometriose in muskulärer Darmwand	43	23.09.2004
0435377	4. Endometriosezyste re. Ovar	43	23.09.2004
0435505	Endometriosezyste re. Ovar	35	24.09.2004
0445343	2. Blasendach, 3. Zyste und Tubenanteile	41	07.12.2004
0447516	1. Interuterinsegment	40	22.12.2004
0504737	1., 3. und 4. peritoneale Endometrioseherde	32	08.02.2005
0505657	1. peritoneale Endometriose Fundus uteri, 2, Endometriose Rektumwand und 3. Adenomyosis	37	15.02.2005
0508848	Endometriose li Ovar	33	09.03.2005
0510447	1. Endometriose Fossa ovarica	37	13.08.2005
0512718	1.5 Endometriose periovariell	40	08.04.2005
0513521	3. Endometriose re. Ovar, 4. li. Ovar und 6. li. Tubenwand	36	14.04.2005
0513428	1.3, 1.4 und 1.5 Endometriose äußere Abschnitte der Rektumwand	40	14.04.2005
0517146	1. Endometriose Douglas Raum	40	11.05.2005
0518491	2. linke Tube; 8. Sacrouterinligament	30	23.05.2005
0518599	1.6 Endometriosezyste re. Ovar, 1.7 und 2 peritoneale Endometriose	42	23.05.2005
0523103	2.3 Endometriose Myometrium, 3.1 und 3.2 peritoneale Endometriose	30	24.06.2005
0525392	7. peritoneale Endometriose	28	11.07.2005
0526279	1. Endometriose Sigmavorderwand	32	18.07.2005
0532302	Endometriose hinteres Scheidengewölbe	30	05.09.2005

2.3 Methoden

2.3.1 Gewebeprozessierung

Alle verwendeten Lösungen und ihre Rezepturen finden sich im Anhang. Unabhängig von der angewandten Methode mussten die Schnitte zunächst vom Paraffin befreit werden. Dies erfolgte durch Entparaffinierung in Xylol mit anschließender Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe, so dass der Antikörper an das Antigen im Gewebe binden konnte. Damit der Antikörper das jeweilige Antigen / Epitop im Gewebe identifizieren kann, waren noch weitere Vorbehandlungen notwendig, da während der Fixierung in Formalin und der anschließenden Paraffineinbettung des Gewebes Aldehydvernetzungen entstehen, die eine Bindung des Antikörpers verhindern können. Dadurch kann sich die dreidimensionale Struktur eines Proteins verändern und so für den Antikörper nicht mehr erkennbar sein. Man spricht hier von „Maskierung“ des Antigens. Bevor der Primärantikörper aufgetragen wird, erfolgt die Vorbehandlung zur Demaskierung im Anschluss an das Entparaffinieren. Deshalb wurden in dieser Studie die Proben in Citratpuffer, nur der CD 34-Antikörper in EDTA gekocht. Um unspezifische Bindungen durch Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb eines Gewebes zu verhindern, wurde das Gewebe mit BSA (Bovine Serum Albumin = Rinderserumalbumin) blockiert. Immunglobuline könnten sonst durch die hydrophobe Bindung ebenfalls unspezifisch an Membranen oder Fettgewebe gebunden werden (Noll und Schaub-Kuhnen 2000).

Trotz der Fixierung und Einbettung des Untersuchungsmaterials wird die endogene Enzymaktivität im Gewebe nicht völlig zerstört. Daher sind für die immunhistochemischen Nachweise Blockierungen der endogenen Enzyme notwendig, um deren Mitreaktion und in der Folge falsch-positive Ergebnisse zu verhindern. Das Chromogen einer Methode wird nicht nur vom Enzym des Detektionssystems umgesetzt, sondern auch von endogenen Enzymen des Gewebes. Diese Problematik betrifft sowohl die Enzyme Peroxidase und alkalische Phosphatase als auch das Vitamin Biotin (Noll und Schaub-Kuhnen 2000).

Das Enzym Peroxidase für die Konjugation eines Komplexes wird aus der Wurzel des Meerrettichs gewonnen und hat ein Molekulargewicht von 40 kDa. Endogene Peroxidase findet sich hauptsächlich in Granulozyten, Mastzellen und Erythrozyten, weniger in Dünndarmgewebe und in Nervenzellen.

Zu einer Farbreaktion kommt es, indem das Enzym Peroxidase mit dem Substratpuffer H_2O_2 , als Katalysator und dem jeweiligen Chromogen ein farbiges Endprodukt bildet, das in organischen Lösungsmitteln sowohl löslich als auch unlöslich sein kann. Die Substrat-

Chromogen-Reaktion kann nicht unterscheiden, ob die Peroxidase im Gewebe lokalisiert ist oder ob sie nachträglich zugegeben wurde (ABC-System mit Peroxidase).

Das einfachste Mittel zur Eliminierung der endogenen Peroxidase ist eine Inkubation des Präparates mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

Alkalische Phosphatase für die Konjugation eines Komplexes wird aus Kälberdarm gewonnen und hat ein Molekulargewicht von 140 kDa (Noll und Schaub-Kuhnen 2000).

Die endogene alkalische Phosphatase findet man verstärkt in Dünndarmepithel, Knochengewebe, Nierentubuli, Leber, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen, Epithelien der Harnblase und in Trophoblasten der Plazenta. Durch Hitzedemaskierung wird die endogene alkalische Phosphatase vollständig zerstört.

Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten eines immunhistochemischen Prozesses werden die Schnitte in verschiedenen Pufferlösungen „gewaschen“, das heißt, man wäscht ungebundene bzw. unspezifisch gebundene Antikörper vom Schnitt herunter, um eine nachfolgende spezifische Antikörperbindung zu gewährleisten. Hier wurde zumeist die phosphatgepufferte Kochsalzlösung PBS eingesetzt. Da diese jedoch Phosphat enthält und sich daher nicht für die APAAP-Methode eignet, wurde dort Tris-HCl angewandt. Um eine Hintergrundfärbung möglichst zu verhindern wurde dem Blockpuffer das Detergenz Triton X 100 beigelegt. Außerdem bewirkt Triton X eine Permeabilisierung und damit Verbesserung des Eindringens des Antikörpers.

Nach der Vorbehandlung wurde der Primärantikörper in der entsprechenden Konzentration und für die entsprechende Inkubationszeit auf das Gewebe gegeben. In dieser Studie wurden die Primärantikörper jeweils über Nacht bei $7^\circ C$ inkubiert.

Nach einem weiteren Spülvorgang wurde der Sekundärantikörper zugegeben, der eine Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem Komplex bildet.

2.4 Indirekte Immunhistochemie nach der ABC-Methode

(= Avidin Biotin Complex Methode)

Das Prinzip der indirekten Immunhistochemie beruht auf der spezifischen Erkennung von Antigenen durch Antikörper und der anschließenden Verstärkung des Signals durch weitere Brückenantikörper, um diese schließlich mittelbar durch eine Farbreaktion sichtbar zu machen. Wichtig ist, dass die Stelle des Zielproteins, die vom Antikörper erkannt werden soll (das Antigen), nicht durch die Formalinfixierung zerstört oder maskiert wird. Aber selbst wenn das Antigen maskiert wird, kann man es durch eine geeignete Vorbehandlung demaskieren und wieder nachweisbar machen (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Die Antigen-Demaskierung erfolgt je nach Antikörper mit unterschiedlichen Methoden. In dieser Arbeit wurden Citratpuffer und EDTA eingesetzt.

Bei der ABC-Methode wird die ausgesprochen starke Bindung zwischen Biotin und Streptavidin ausgenutzt. Biotin ist ein kleines, wasserlösliches Molekül, das dem Vitamin B entspricht. Streptavidin ist ein kleines, aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gewonnenes Glykoprotein, das vier Bindungsstellen für Biotin besitzt, von denen aber nur drei besetzt werden können. Aus einem biotinylierten Enzym (Meerrettich-Peroxidase oder alkalische Phosphatase) und Streptavidin werden große, dreidimensionale Komplexe (ABC-Komplexe) gebildet, die über freie Bindungsstellen das Streptavidin an Biotin-Gruppen des Sekundärantikörpers binden können (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). So werden pro gebundenem Primärantikörper viele Enzymmoleküle am Schnitt gekoppelt. Verstärkt wird die Färbereaktion durch die Benutzung eines Sekundärantikörpers, an den der Farbstoff in großer Menge bindet.

Die Farbreaktion, welche die Enzymmoleküle darstellt, wird mit löslichen Substraten durchgeführt, die durch das Enzym in einen unlöslichen Farbstoff überführt werden. Der Farbstoff fällt dann sofort aus und färbt auf diese Weise das Antigen an Ort und Stelle, z. B. im Zytoplasma, an der Zelloberfläche oder im Kern. Die Intensität der Farbreaktion ist dabei in groben Abstufungen mit der Menge des Antigens proportional (Noll und Schaub-Kuhnen 2000).

Die Färbungen sind in den Inkubationsschritten (d. h. von der Blockierung bis zur Farbreaktion) automatisierbar. Hierdurch wird ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit der Färbungen erreicht.

2.5 Indirekte Immunhistochemie nach der APAAP³-Methode

Bei der APAAP-Methode werden Komplexe aus alkalischer Phosphatase und Antikörpern gegen alkalische Phosphatase gebildet. Der Primärantikörper bindet zunächst das im Gewebe liegende Antigen, woraufhin ein entsprechender Brückenantikörper eingesetzt wird, damit der APAAP-Komplex anschließend binden kann. Der APAAP-Komplex besteht aus monoklonalen Maus-IgG-Antikörpern gegen alkalische Phosphatase, die spezifisch mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert sind (Noll und Schaub-Kuhnen 2000).

Tabelle 2: Arbeitsprotokoll der ABC-Methode

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit	Bedingungen
Entparaffinieren	Xylol Xylol	15 Min. 2 x 5 Min.	50°C Inkubator Raumtemperatur
Entwässern	Absteigende Alkoholreihe : absoluter Alkohol, 96%, 80%, 70%,	Jeweils 5 Min.	Unter Abzug
Entwässern	Aqua dest.	5 Min.	Rüttler
Spülen	PBS	5 Min.	Rüttler
Epitop freilegen	Citratpuffer o. Ä.	20 Min.	Kochen o. Ä.
Spülen	PBS	3 x 5 Min.	Rüttler
Blockieren	0,3% H ₂ O ₂ in eiskaltem Methanol	30 Min.	Unter Abzug mischen, auf Rüttler mit Deckel
Spülen	PBS	2 x 5 Min.	Rüttler
Permeabilisieren	PBS / BSA/ Triton X	5 Min.	Rüttler
Proteinblock	5% Pferdeserum in Blockpuffer	30 Min.	Feuchtekammer
Inkubieren	Primärantikörper	Je nach Antikörper	Feuchtekammer
Spülen	PBS	3 x 5 Min.	Rüttler
Inkubieren	1:100	30 – 45 Min.	Feuchtekammer Raumtemperatur
Spülen	PBS	3 x 5 Min.	Rüttler
Inkubieren	ABC Elite Kit (Vectostatin)	30 – 45 Min.	Feuchtekammer
Spülen	PBS	3 x 5 Min.	Rüttler
Detektieren	AEC (Peroxidase Substrat Kit)	5 – 30 Min.	Unter Mikroskop kontrastieren
Spülen	Aqua dest.	3 x 5 Min.	Rüttler
Gegenfärben	Hämatoxylin	10 sec. maximal	Abzug
Wässern	Fließendes Leitungswasser	8 – 10 Min.	
Eindeckeln	Glyceringelatine		

³ alkalische Phosphatase anti alkalische Phosphatase-Methode

Tabelle 3: Arbeitsprotokoll der APAAP-Methode

Schritt	Reagenz	Zeit	Bedingungen
Entparaffinieren	Xylol Xylol	15 Min 2 x 5 Min	50°C Inkubator Abzug, Raumtemperatur
Entwässern	Absoluter Alkohol 96% Alkohol 80% Alkohol 70% Alkohol	Jeweils 5 Min	Abzug
Entwässern	Aqua dest.	5 Min.	Rüttler
Spülen	Tris-HCl Puffer	5 Min.	Rüttler
Epitop freilegen	EDTA oder ähnliches	15 Min.	Kochplatte
Spülen	Tris-HCl Puffer	3 x 5 Min	Rüttler
Blockieren	20% Essigsäure 4°C	15 - 20 Min	Abzug
Spülen	Tris-HCl Puffer	3 x 5 Min	Rüttler
Proteinblock	5% BSA Blockpuff.	30 – 60 Min	Rüttler
Inkubieren	Primärantikörper in Blockpuffer	Je nach Antikörper	Feuchtekammer
Spülen	Tris-HCl Puffer	3 x 5 Min	Rüttler
Inkubieren	Sekundärantikörper in Tris-HCl 1:50	30 – 60 Min	Feuchtekammer
Spülen	Tris-HCl	3 x 5 Min	Rüttler
Inkubieren	APAAP in Tris-HCl 1:100	30 – 60 Min	Feuchtekammer
Spülen	Tris-HCl	3 x 5 Min	Rüttler
Detektieren	Fuchsin	5 – 45 Min kontrollieren mit Mikroskop	Feuchtekammer, Abzug
Spülen	Aqua dest.	3 x 5 Min	Rüttler
Eindeckeln	Glyceringelatine		

2.6 Verwendete Antikörper

2.6.1 Zytoskelett

Aktin

Verwendet wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper, anti-humane glatte Muskulatur, der Firma DakoCytomation, Hamburg Code-Nr. M 0851.

Er ist bestimmt zur Benutzung in der Immunhistochemie, bindet glatte Muskelzellen, Myofibroblasten und myoepitheliale Zellen, und ist nützlich bei der Identifikation von Leiomyomen, Leiomyosarkomen und pleiomorphen Adenomen.

Färbemethode: ABC

Zytokeratin

Es handelt sich um einen polyklonalen Kaninchen Anti-Rind Antikörper der Firma DakoCytomation, Hamburg Code-Nr. Z0622. Er bindet der bovinen Flotzmaul-Epidermis entstammende Keratinuntereinheiten mit 58, 56 und 52 kDa. Zytokeratine sind Intermediärfilamente und gehören zu den Proteinen des Zytoskeletts. Sie sind wichtig für die Entwicklung und Differenzierung von Epithelzellen.

Färbemethode ABC

2.6.2 Hämatopoetische Stammzellmarker

CD 34

Hier wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen CD34 (QBEnd/10) der Firma Biozol Eiching benutzt.

Er reagiert mit dem einsträngigen Glykoprotein CD34 (110 kDa). Dieses Antigen wird selektiv von menschlichen lymphoiden und hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert. Der Antikörper reagiert ebenfalls mit vaskulären Endothelzellen in normalem Gewebe und in benignen und malignen Proliferationen. Zur Forschung auf dem Gebiet von Stammzellen (haematopoetisch, mesenchymal und endothelial).

Färbemethode APAAP

Vorbehandlung EDTA-Puffer

C-kit (CD 117)

Dies ist ein polyklonaler Antikörper gegen CD 117 der Firma Acris, Hiddenhausen (Katalognr.: SP6350P). Der im Kaninchen hergestellte Antikörper kann in den Verdünnungsstufen 1:100 bis 1:400 an Paraffinschnitten benutzt werden. Hier wurde er in der Verdünnung 1:200 angewandt. CD 117 ist ein Tyrosin Kinase Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 145 kDa.

Färbemethode ABC

Ki 67

Verwendet wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen Ki 67, Klon MIB-1, DakoCytomation Hamburg. Der Antikörper ist für den immunhistochemischen Gebrauch an formalinfixierten, paraffineingebetteten Proben bestimmt. Er hat sich als wertvoll für den Nachweis von Ki 67 in gesunden und neoplastischen Zellen erwiesen, z. B. bei Weichteilsarkomen, Adenokarzinom der Prostata und Mammakarzinom. Von dem nukleären Protein Ki 67 wurden zwei Isoformen mit 345 und 395 kDa identifiziert.

Färbemethode: ABC

CD 133

Dies ist ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper vom Typ IgG gegen CD 133 der Firma Abcam, Cambridge, UK (Nummer ab16518). Der Antikörper eignet sich zum Gebrauch in der Immunhistochemie, für ELISA und Westernblot. Er reagiert mit humanem und Mausgewebe.

Färbemethode ABC

2.7 Weiteres Prozedere

Nach der Färbung wurden die Proben ohne Kenntnis der Lokalisation mit Hilfe eines Mikroskops qualitativ beurteilt und zur Dokumentation digitale Bilder erstellt.

Immunhistochemische Färbungen eignen sich per se nicht gut für eine Quantifizierung, da aufgrund des Verstärkungseffektes nicht sichergestellt ist, dass alle möglichen Bindungsstellen durch Chromogenmoleküle besetzt sind.

3 Ergebnisse

Die zytoskeletalen Filamente wurden zunächst dargestellt, um eine Übersicht über die im Präparat vorhandenen Gewebetypen zu erhalten bzw. diese zu identifizieren.

3.1 Aktinfärbung

Der verwendete Antikörper gegen smooth muscle actin färbte die glatten Muskelzellen an, die so von anderen Zellen abgegrenzt werden konnten. So ließen sich zum Beispiel in den Darmschnitten die Lamina muscularis mucosae und die eigentliche Tunica muscularis von anderen Gewebetypen unterscheiden. Auch färbte sich die Muskelschicht der Gefäßwände, wobei es gelang kleine Gefäße wie Arteriolen zu identifizieren.

Die Endometrioseproben weisen alle, selbst im Fettgewebe und Peritoneum, eine sehr hohe Gefäßdichte auf. Endometriosezysten zeigen in ihrer Wand Aktin und sind innen mit einem Epithel ausgekleidet, dessen Zellen und Zellkerne sehr unregelmäßig geformt sind (Abb. 3A). Die Zellen sind flach bis kubisch, gelegentlich auch zylindrisch, und haben einen großen Kern und wenig Zytoplasma. Die Zystenpräparate erscheinen stellenweise unorganisiert und zerrissen. In anderen Lokalisationen wie der Vagina sieht die Endometriose aus wie in das physiologische Gewebe eingebettete Drüsenschläuche, die in ihrem Epithel dem Endometrium ähneln (Abb. 5A). Hier steht das Epithel dicht mit kubischen bis zylindrischen Zellen, die ebenfalls einen großen Kern und wenig Zytoplasma aufweisen. In der direkten Nachbarschaft findet sich lockeres Bindegewebe, Muskulatur folgt erst weiter peripher. In allen Präparaten, unabhängig von der Lokalisation, findet sich relativ viel Hämosiderin als dunkle Ablagerung. Auch lymphatische Zellen als Zeichen von entzündlicher Aktivität sind häufig in der direkten Umgebung der Drüsenschläuche zu finden. Im Drüseninneren erkennt man wolkig erscheinende Einschlüsse und Erythrozyten. In manchen Präparaten zeigen sich gelbe Einschlüsse, die eine Hämosiderin-bedingte Hintergrundfärbung nach vorausgegangener Einblutung darstellen. In diesen Gebieten kommen auch die lymphatischen Zellen gehäuft vor. In den Negativkontrollen zeigt sich keine Färbung der glatten Muskelzellen.

3.2 Zytokeratin

Zytokeratin findet sich im Zytoplasma von Epithelzellen, so zum Beispiel in den Darmabschnitten im Epithel, das die Krypten auskleidet (Abb. 4B). Auch das Drüsenepithel der Endometrioseherde weist Zytokeratin auf. Durchweg positiv ist das mehrschichtig unverhornte Plattenepithel der Vagina, wo sich bis in die oberste Zellschicht Zytokeratin findet (Abb. 5B). In den Peritoneum-Proben kann das peritoneale Plattenepithel gut vom Epithel der Endometrioseläsionen unterschieden werden, da es eher kubisch bis zylindrisch wirkt (Abb. 8B). Auch hier ist die Form der Kerne der Epithelzellen auffällig, die oval bis spindelförmig und unregelmäßig geformt und. Stellenweise scheint das Drüsenepithel mehrreihig, ähnlich dem Urothel. Im Gegensatz zur Aktinfärbung ist das Endothel positiv gefärbt, wohingegen die Gefäßwand eine blaue Gegenfärbung aufweist. In den Zystenpräparaten ist das Zytoplasma des Epithels wie auch einige Zellen in der Zystenwand positiv (Abb. 3B). Das Epithel des Ovars erscheint ebenfalls positiv für Zytokeratin (Abb. 6B). Tubenepithel weist ebenso Zytokeratin auf (Abb. 7B). Gelegentlich erscheinen Zellen im Bindegewebe positiv, die sich eher dem lockeren Bindegewebe als einem Epithel zuordnen lassen. Auch hier sind alle durchgeführten Negativkontrollen negativ.

3.3 CD 34

Das Antigen CD 34 findet sich in den Endothelzellen und in der Umgebung von großen und kleinen Blutgefäßen. Es ist im Zytoplasma der positiven Zellen lokalisiert, dagegen werden die Zellkerne nicht von der Färbung erfasst. Bei den Endometrioseläsionen ist CD 34 subepithelial im Zytoplasma der umgebenden Bindegewebszellen auffindbar, während die eigentlichen Drüsenepithelien das Antigen nicht aufweisen. Gut sichtbar ist dies in den untersuchten Darmabschnitten (Abb. 4C). Auch der Inhalt der Blutgefäße sowie der Drüsen weist CD 34 auf. Erkennbar ist dies zum Beispiel in den Läsionen innerhalb des Vaginalepithels (Abb. 5C). Die Endometriosezysten sind vor allem subepithelial sehr gut durchblutet, hier zeigt sich eine sehr hohe Kapillardichte (Abb. 3C). Im gut durchbluteten Fettgewebe weisen die Endothelzellen der Kapillaren CD 34 auf. Das Bindegewebe ist in weiten Strecken positiv, was besonders in der Umgebung des Ovars (Abb. 6C) und der Tube (Abb. 7C) auffällt. Insgesamt scheint CD 34 in den untersuchten Proben in sehr hohem Maße vertreten. Die Negativkontrollen zeigten keine Färbung.

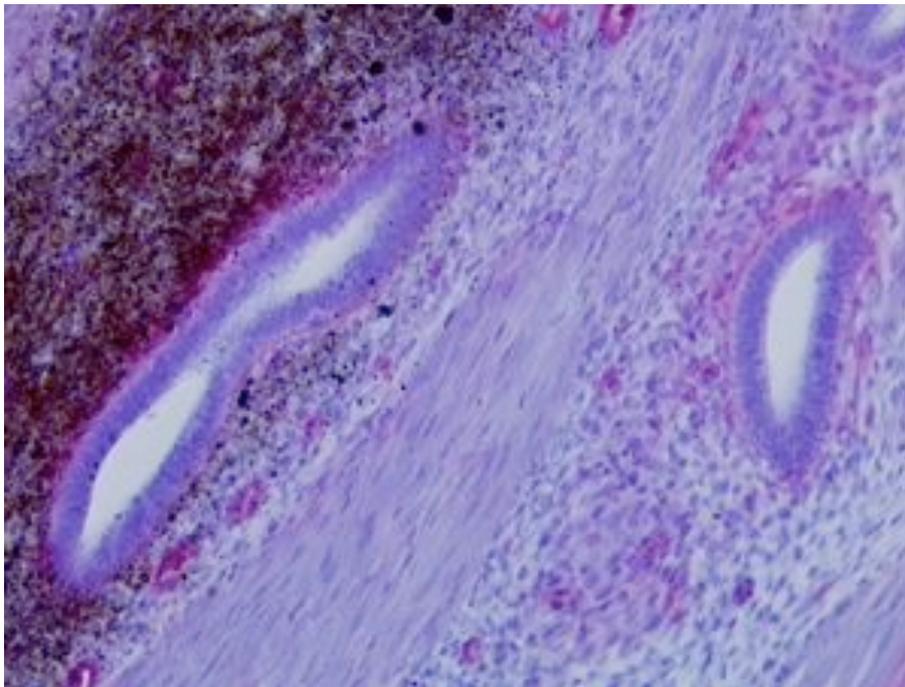


Abbildung 3: Einblutung um einen Endometrioseherd

3.4 C-kit (CD 117)

Der Proliferationsmarker C-kit findet sich im Zytoplasma der Zellen in den Krypten der nicht befallenen Darmabschnitte (Abb. 4E). In Blutgefäßen sind das Endothel und der Gefäßinhalt positiv für C-kit. In den Endometrioseherden färbt sich das Zytoplasma der basalen Drüsenzellen sowie in manchen Schnitten die Lamina propria, der diese Drüsenzellen aufsitzen. Auch das apikale Drüsensekret ist positiv für CD 117. Viele positive Zellen finden sich in Abschnitten mit lockerem Bindegewebe. Zellen zwischen Muskelzellen ist stellenweise positiv, während die Muskelzellen selber kein C-kit aufweisen. Auch das Fettgewebe lässt diesen Marker völlig fehlen. Insbesondere dort, wo viele Granulozyten angetroffen werden, also eine entzündliche Aktivität vorherrscht, sind viele Zellen positiv für C-kit. Das Innere der Endometriosezysten ist ebenfalls positiv, während die enthaltenen Erythrozyten negativ sind (Abb. 3E). Das Färbemuster ähnelt insgesamt dem des Zytokeratins. Zum Beispiel findet sich C-kit in der Basalzellschicht und dem Stratum spinosum des mehrschichtig unverhornten Plattenepithels der Vagina, wohingegen sich die Färbung nach außen hin meist fortschreitend verliert (Abb. 5E). In einigen weiter oben gelegenen Abschnitten des Vaginalepithels zeigt sich eine Reaktion. Die Negativkontrollen sind auch hier eindeutig negativ.

3.5 Ki 67

Ki 67 färbt vereinzelte Kerne von Drüsenepithelzellen der Endometrioseläsionen sowie seltener Kerne von Zellen in deren Umgebung (Abb. 4F). Das Stroma, das um die Endometrioseherde herum zu finden ist, ist dichter als üblicherweise. Immer färben sich die Kerne von Zellen, die sich in einer Proliferationsphase befinden. Darüber hinaus findet sich das Antigen im mehrschichtig unverhornten Plattenepithel der Vagina in der über dem Stratum basale liegenden Zellreihe des Stratum spinosum. Erstaunlicherweise ist es im Stratum basale selbst nicht anzutreffen (Abb. 5F), was aber auch schnittbedingt durch die großen Präparate sein könnte. In Gebieten mit vielen lymphatischen Zellen sind auch solche mit für Ki 67 positivem Zellkern vorhanden. Insgesamt scheint dieses Antigen eher wenig in den untersuchten Geweben vorhanden zu sein. In manchen Gefäßen findet sich Ki 67 in der Gefäßwand, aber auch hier im Zytoplasma und nicht im Zellkern. In den bereits zuvor beschriebenen Abschnitten mit gelber Farbe zeigen sich ebenfalls positive Zellkerne. Die gelben Bezirke entsprechen älteren Einblutungen, die gelbe Farbe ist Hämosiderin. Bei den Zystenpräparaten findet sich Ki 67 in den Epithelzellen, die die Zysten auskleiden (Abb 3F). In den für jeden Versuchsteil parallel durchgeführten Negativkontrollen wurden keine Kerne angefärbt.

3.6 CD 133

Das Zelloberflächenantigen CD 133 ist in Membranen lokalisiert. Deshalb ergibt sich durch die Färbung mit dem gegen dieses Antigen gerichteten Antikörper ein „membranöses“ Färbungsbild. CD 133 findet sich in geringem Maße an der Kernmembran von lymphatischen Zellen des Darmes und der Kryptenzellen (Abb. 4D). In den Drüsenzellen der Endometrioseläsionen zeigt sich ein leicht gefärbtes Zytoplasma. CD 133 scheint in wesentlich geringerem Maße vorhanden zu sein als beispielsweise CD 34. Das Antigen taucht in den Kernen und im Zytoplasma der Wand großer Gefäße auf. Hier sind die Kerne der glatten Muskelzellen und der Endothelien positiv gefärbt. Auch bei kleinen Gefäßen steht CD 133 immer in Assoziation zum Gefäß. Bei Endometriosezysten erscheint CD 133 im Zytoplasma der Epithelzellen, die das Zysteninnere auskleiden. Auch im Zysteninhalt weisen vereinzelte Zellen CD 133 auf (Abb. 3D). Vereinzelt sind auch positive Zellen im Bindegewebe von peritonealen Proben nachweisbar. Im mehrschichtig unverhornten Plattenepithel der Vagina findet sich CD 133 in dem der Lamina propria aufsitzenden Stratum basale und bis in die nächsten 3-5 darüber liegenden Zellschichten des Stratum spinosum (Abb. 5D). Die durchgeführten Negativkontrollen sind auch hier durchweg negativ. Als Positivkontrolle wurde humanes Plazentagewebe verwendet, da schon belegt ist, dass sich CD 133 hier an Zellen von Trophoblast, Zytotrophoblast und Synzytiotrophoblast findet (Pöttgens et al. 2001)..

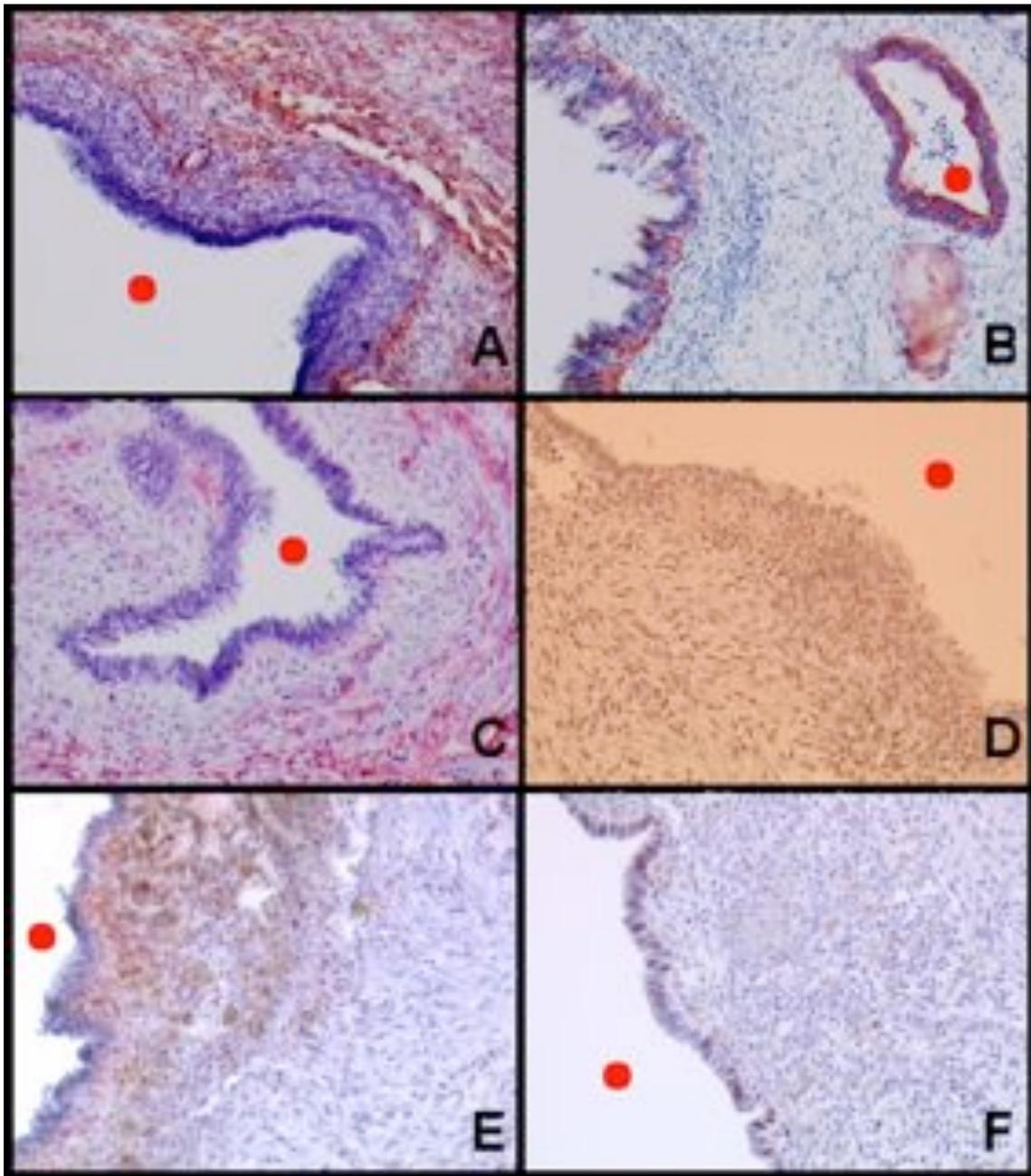


Abbildung 4: Zystenpräparate

Die Präparate zeigen Schokoladenzysten am Ovar, die generell gut vaskularisiert sind. Die Lumina von Endometrioseherden sind jeweils mit einem Punkt gekennzeichnet. A: Aktin positiv sind glatte Muskelzellen von Gefäßwänden, aber auch das Bindegewebe der Endometrioseherde. B: Das Zytoplasma von Epithelzellen ist Zytokeratin positiv gefärbt. C: CD 34 reagierte mit dem Zytoplasma von zahlreich im subepithelialen Bindegewebe enthaltenen Endothelzellen. D: CD 133 färbte das Zytoplasma der Epithelzellen. E: Eine CD 117 Immunreaktion war insbesondere im subepithelialen Bindegewebe zu beobachten. F: Ki 67 fand sich vorwiegend in den Zellkernen der Epithelzellen. (Originalvergrößerung A-F 200x)

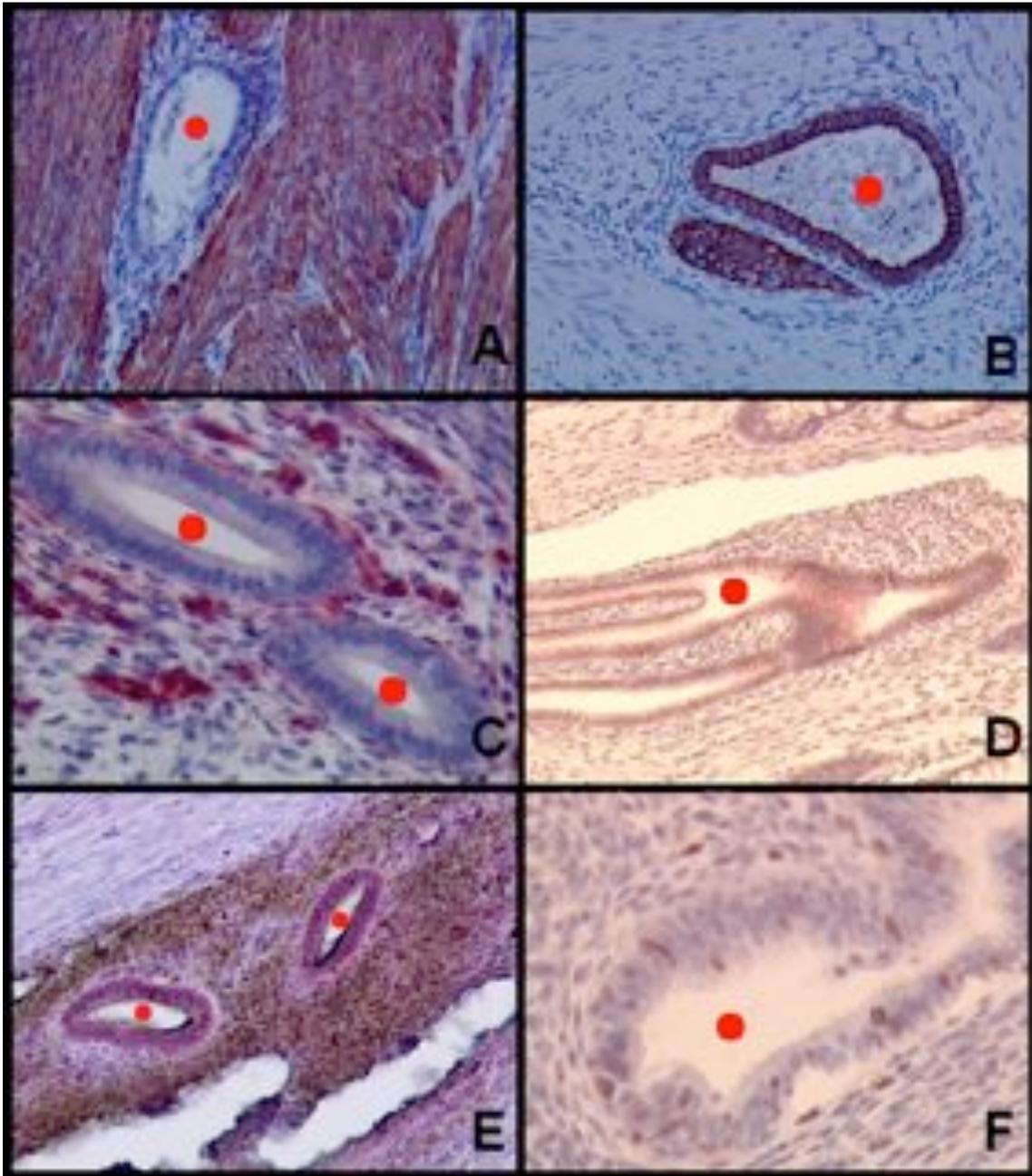


Abbildung 5: Endometrioseherde in Dickdarmpräparaten

Endometrioseherde mit deutlich erkennbaren Drüsenschläuchen (Punkte). A: Drüsenanschnitt, der von Aktin-positiven glatten Muskelzellen des Rektums umgeben ist. B: Die Epithelzellen des Endometrioseherdes sind Zytokeratin-positiv. C: Darmabschnitt mit zwei Drüsenschläuchen eines Endometrioseherdes, deren umgebendes Bindegewebe, besonders die Blutgefäße, CD 34 aufweisen. D: Endometrioseherd mit CD 133-positiv gefärbtem Zytoplasma der Drüsenepithelien. E: Drüsenanschnitte eines Endometrioseherdes, mit CD 117-immunreaktiven Bindegewebszellen und Hämatin-Granula (braun). F: Endometrioseherd mit Ki 67-positiv gefärbten Zellkernen des Drüsenepithels und des dichten umgebenden Bindegewebes. (Originalvergrößerung A, C-F 200x; B 100x)

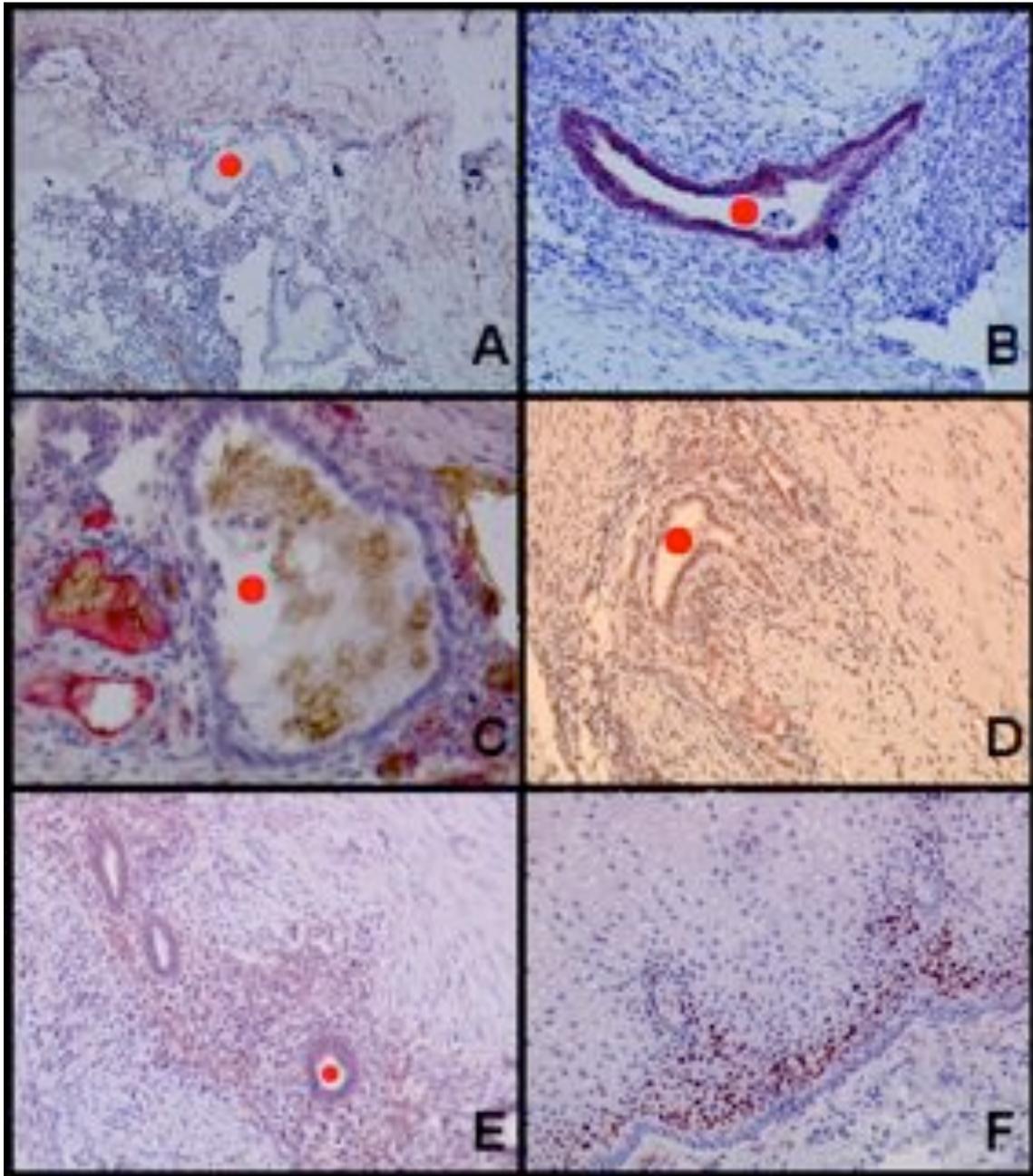


Abbildung 6: Vaginale Präparate

Es finden sich in die Vaginalschleimhaut eingestreute Endometrioseherde mit DrüsenSchläuchen (Punkte). A: Die glatte Muskulatur der Gefäße ist Aktin positiv. B: Die Epithelzellen der DrüsenSchläuche weisen Zytokeratin auf. C: Die Blutgefäße der Endometrioseherde sind CD 34 positiv. D: Analog zu den anderen Lokalisationen findet sich auch hier CD 133 im Zytoplasma der Epithelzellen des Endometrioseherdes. E: Die Drüsenepithelien und die umgebenden Bindegewebszellen zeigen eine CD117 Immunreaktion. F: Der Proliferationsmarker Ki 67 findet sich sowohl in den Zellkernen der Endometrioseherde (nicht dargestellt), als auch in denen der basalen Schichten des Vaginalepithels. (Originalvergrößerung A-F 200x).

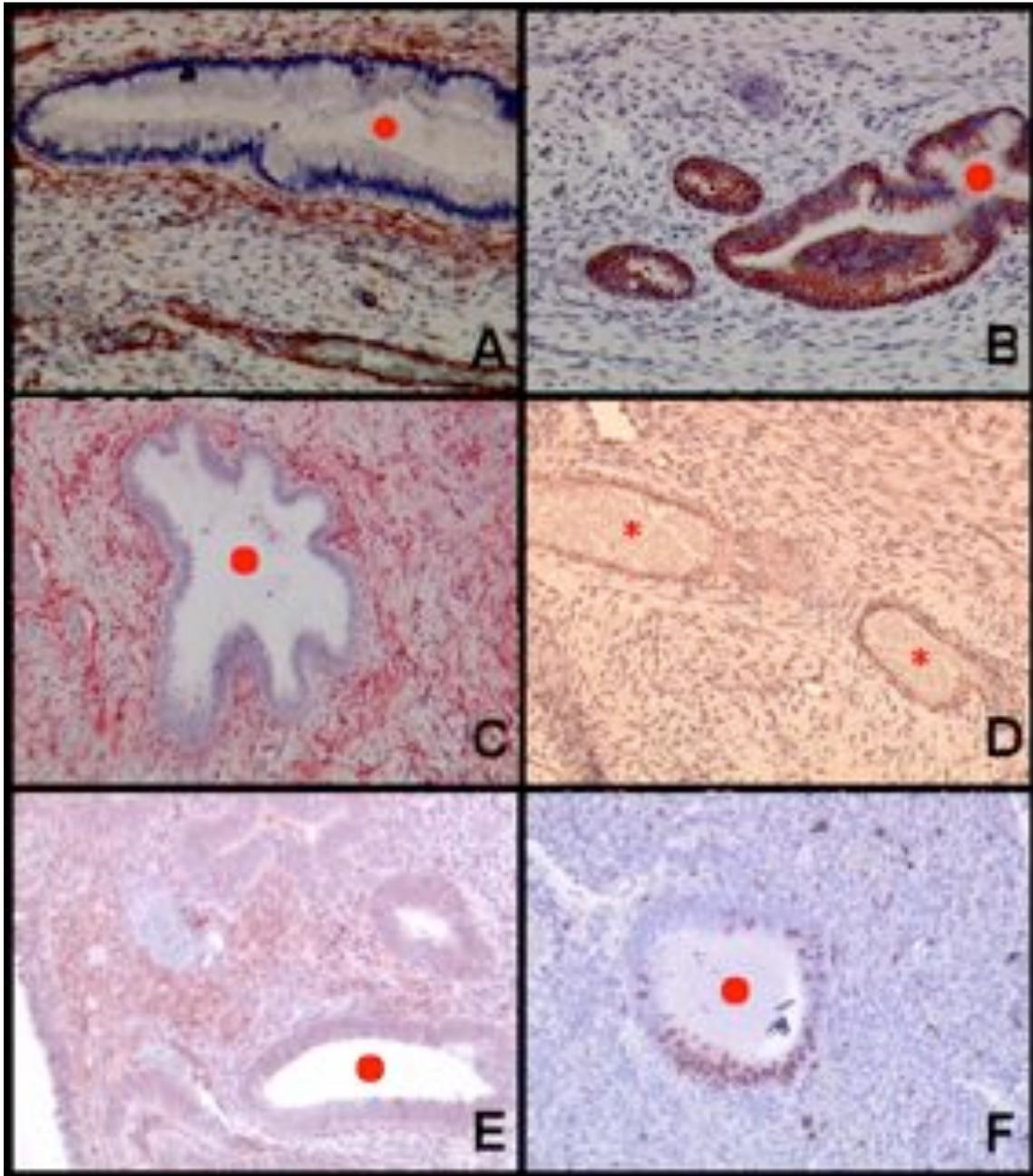


Abbildung 7: Ovarpräparate

In den Ovarpräparaten markieren die roten Punkte jeweils das Lumen der Drüsenschläuche eines Endometrioseherdes. A: Da im Ovar nur in den Blutgefäßen glatte Muskulatur zu finden ist, fand sich in diesen Schnitten nur dort Aktin. B: Die Epithelzellen sind deutlich Zytokeratin positiv. C: Wie in allen Präparaten weisen das Bindegewebe und die darin enthaltenen Blutgefäße CD 34 auf. D: Die Sternchen markieren zwei Blutgefäße in der Umgebung von Endometrioseherden, deren Wände positiv für CD 133 sind. E: CD 117 lässt sich teils in Epithelzellen, teils im die Drüsen umgebenden Bindegewebe nachweisen. F: Die Kerne der proliferierenden Drüsenepithelzellen zeigen eine Färbung für Ki 67. (Originalvergrößerung A-D und F 200x, E 400x).

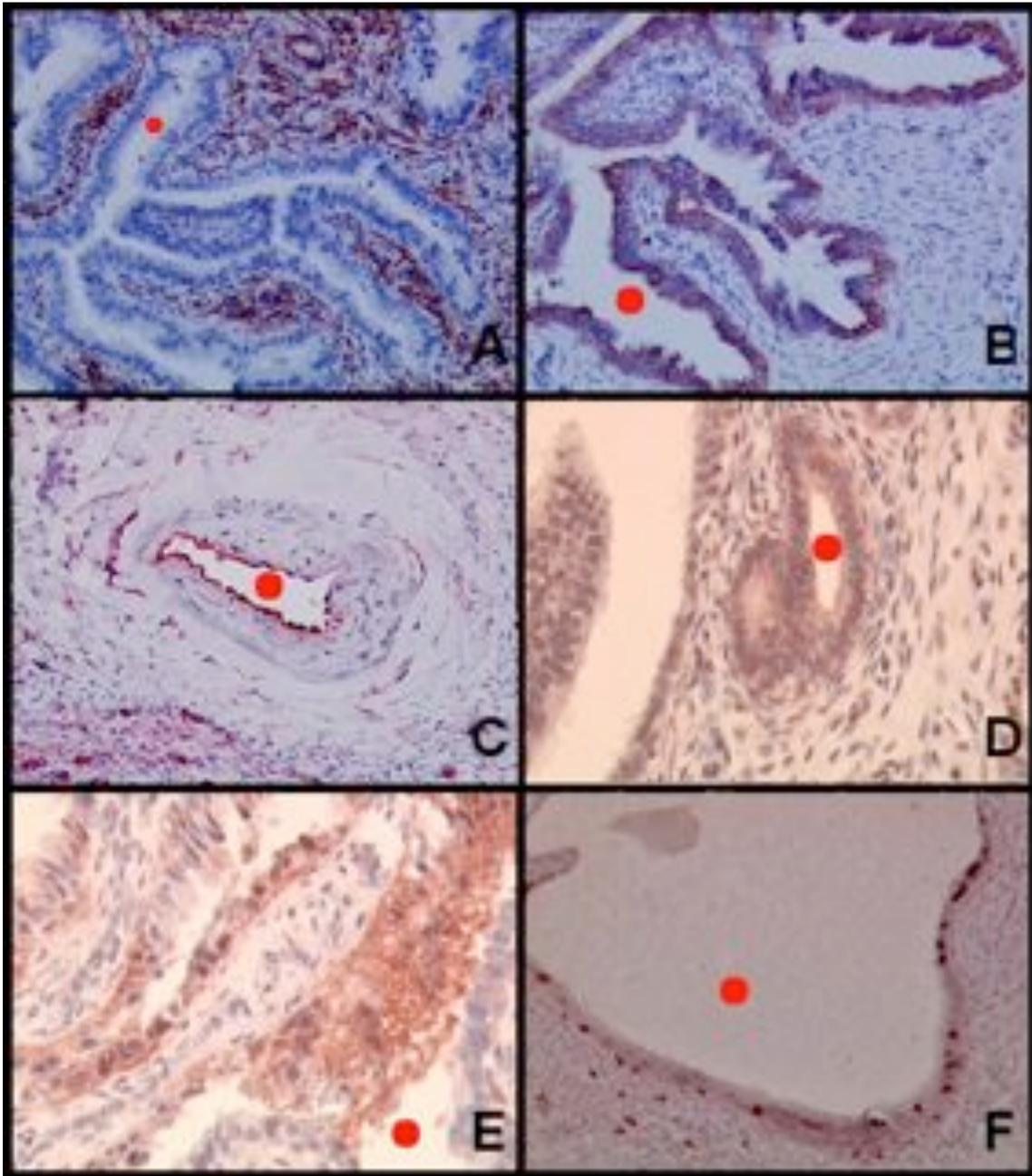


Abbildung 8: Tubenpräparate

Die Abbildungen zeigen Endometrioseherde im Bereich der Tuba uterina, deren Drüsenschläuche mit einem Punkt markiert sind. A: Das dichte Netz von Blutgefäßen zeigt eine deutliche Immunreaktion für Aktin. B: Dagegen werden die Epithelzellen durch die Zytokeratinfärbung hervorgehoben. C: Das einen Drüsenschlauch eines Endometrioseherdes umgebende Bindegewebe ist CD 34 positiv. D: Das Epithel der Drüsenschläuche zeigt eine CD 133 Immunreaktion. E: Das Zytoplasma der Epithelzellen ist positiv für CD 117. F: Ki 67 positive Zellkerne finden sich in Epithelzellen und subepithelialen Bindegewebezellen eines Endometrioseherdes. (Originalvergrößerung A-C und F 200x; D und E 400x)

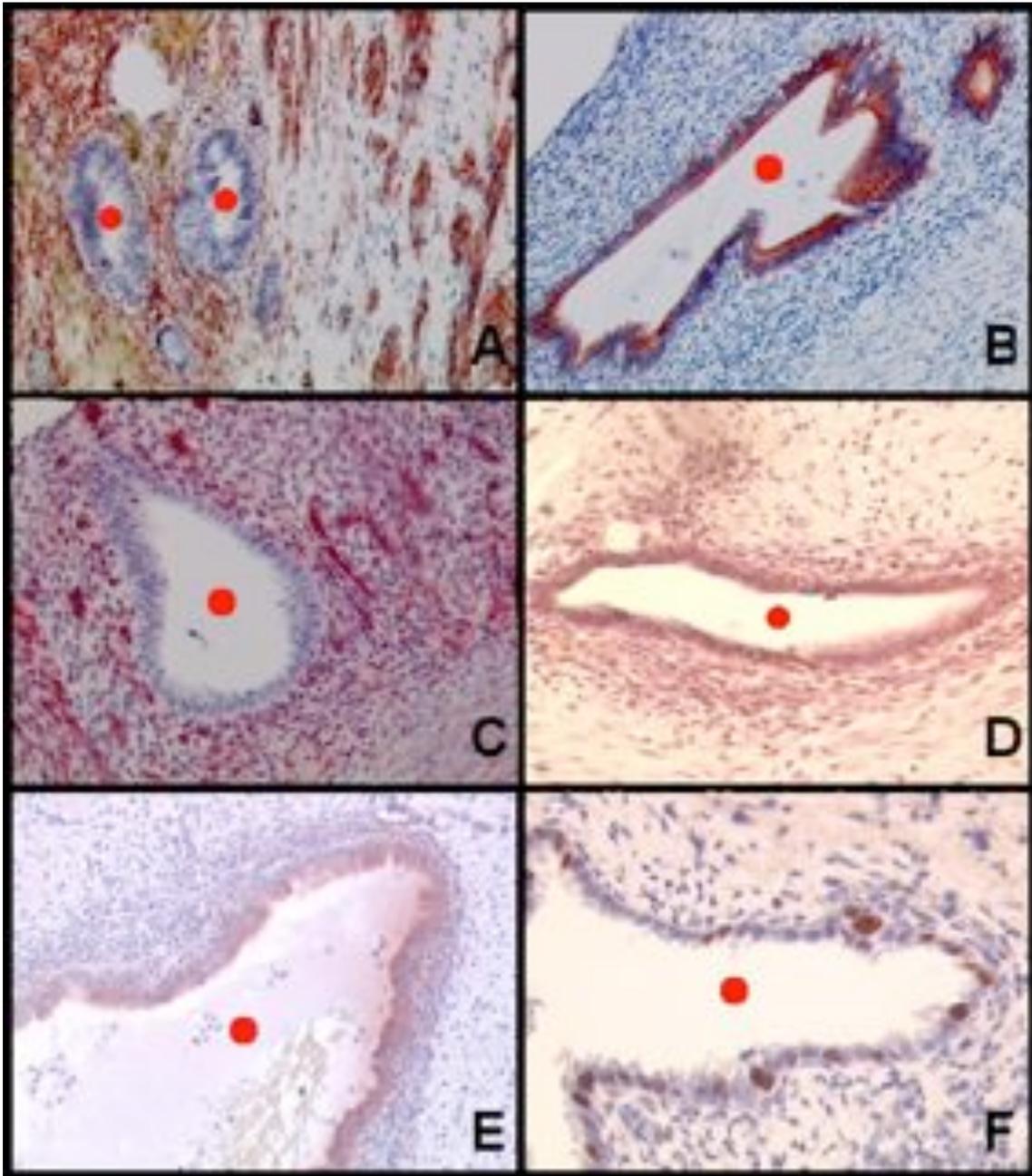


Abbildung 9: Peritoneale Präparate

Endometrioseherde im Bereich des Peritoneums. Die Punkte markieren jeweils das Lumen von Drüsenschläuchen eines Endometrioseherdes. A: Positiv für Aktin sind die Gefäßwände (rechts) und das dichte die Drüsen umgebende Bindegewebe (links). B: Die Epithelzellen des Endometrioseherdes zeigen eine klare Immunreaktivität für Zytokeratin. C: Das peritoneale Bindegewebe um den Endometrioseherd, hier insbesondere die Blutgefäße, weisen CD 34 auf. D: Die Epithelzellen und das direkt benachbarte Bindegewebe weisen eine CD 133 Immunreaktion auf. E: Hier sind das Zytoplasma der Epithelzellen der Endometrioseläsion ist positiv für CD 117. F: Die Kerne der proliferierenden Epithelzellen der Endometrioseläsion sind Ki 67 positiv. (Originalvergrößerung A-E 200x, F 400x)

4 Diskussion

4.1 Bewertung des Materials

Die Zystenpräparate wirken meist zerrissen und unorganisiert, was auf die Entnahmetechnik im Operationssaal zurückgeführt werden kann. Die Ausschälung der Zyste sollte möglichst schonend und ohne Ruptur erfolgen. Häufig reißen die Zysten dennoch auf (Ebert et al. 2005). Bei den zumeist laparoskopisch durchgeführten Endometriose-Operationen werden die Zysten durch ein Rohr, einen sogenannten Trokar, entfernt. Dabei werden sie stark zusammengedrückt wobei das Gewebe fast zwangsläufig Schäden erleidet, die die Beurteilung unter dem Mikroskop erschweren.

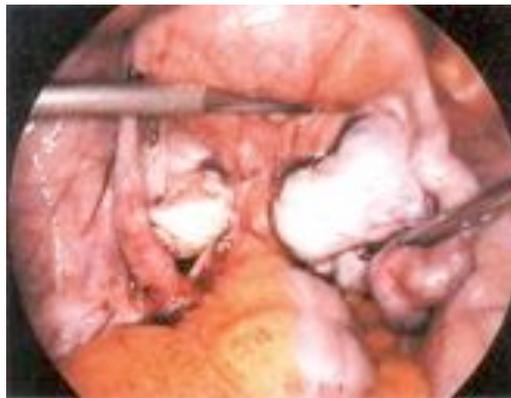


Abbildung 10: Repräsentative Ansicht des Douglas-Raumes während der OP⁴

Leider konnte bei den untersuchten Proben die Zyklusphase der Patientinnen nicht mehr nachvollzogen werden. Auch konnte anhand der Paraffinblöcke keine Aussage mehr darüber getroffen werden, ob die peritonealen Herde einer roten, schwarzen oder weißen Läsion entstammen. Dies machte einen Vergleich mit Daten aus der Literatur teilweise schwierig.

⁴ Quelle: www.frauenarzt-lannach.at

Kritische Betrachtung der Methode

Die Methode der Immunhistochemie erlaubt einen qualitativen, nicht jedoch einen quantitativen Nachweis der eingesetzten Antikörper. Eine relative Beurteilung der Quantität der eingesetzten Antikörper ist jedoch durchaus legitim (Paavilainen et al. 2010). Die Gewebe können histologisch gut beschrieben und bewertet werden.

Allerdings entstand bei Einblutungen ins Gewebe mehrfach eine Hintergrundreaktion, die als falsch-positive Färbung aufgrund von mangelhafter Blockierung durch einen Überschuss an teils abgebauten, teils nicht abgebauten Blutbestandteilen zu deuten ist. Solche Hintergrundfärbungen entstanden auch in der Studie von Paavilainen et al. (2010), die den Einfluss von verschiedenen Fixationsmedien auf die Morphologie und die Darstellbarkeit von Geweben und Zellen durch Antikörper untersuchten. Die Autoren interpretierten diese Färbemuster als artifiziell und rieten zur Vorsicht bei der Interpretation (Paavilainen et al. 2010).

Dagegen würde Western blot (engl. *Immunoblot*) einen quantitativen Proteinnachweis erlauben. Es bezeichnet die Übertragung (engl. *Blotting*) von Proteinen, die anschließend über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden können, auf eine Trägermembran. Die Übertragung kann auf unterschiedliche Weise durchgeführt werden: mittels Diffusion, Kapillarwirkung oder Elektrophorese. Im Bereich der Proteinbiochemie dient der Western Blot zum Nachweis von bestimmten Proteinen und Protein-Veränderungen, z. B. Phosphorylierung. Es kann auch eine semiquantitative Analyse durchgeführt werden. Im Bereich der Medizin dient das Western Blotting dem Nachweis diagnostisch interessanter Proteine, so zum Beispiel von Antikörpern im Serum, die für das Vorliegen bestimmter Infektionskrankheiten typisch sein können. Mittels des Western Blots kann man Teststreifen herstellen, um z.B. Antikörper gegen bestimmte Viren im Serum nachzuweisen. Er hilft außerdem in der medizinischen Forschung bei der Suche nach krankheitsrelevanten Proteinen, z.B. dem BSE-Erreger oder HIV. Allerdings wäre es hierfür notwendig natives Material zu gewinnen, das heißt, dieses müsste direkt nach der Entnahme bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren werden. Weiterhin erlaubt der Western blot keine Aussage zur Lokalisation der Proteine in bestimmten Zelltypen.

Mit Real-Time-PCR ist eine Quantifizierung der mRNA möglich. Die Real-Time-quantitative-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von

Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden (daher der Name „Real Time“). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR, die wenige Zyklen in einem Lauf dauert, ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Diese Methode unterscheidet sich somit von anderen PCR-Methoden, die erst nach Ablauf der PCR eine semiquantitative Auswertung meist unter Einbeziehung einer gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Fragmente vornehmen. Dieser mRNA-Nachweis bzw. die Quantifizierung unterliegt den gleichen Einschränkungen wie der Western blot, da auch hier mit Gewebehomogenaten gearbeitet wird, die eine Zuordnung zu bestimmten Zellen nicht erlauben.

Diese beiden Methoden waren mit dem vorhandenen Material nicht durchführbar, da die in dieser Arbeit untersuchten Proben bereits in Paraffin eingebettet waren. Darüber hinaus wurden die Proben zunächst zur Diagnosesicherung im Institut für Pathologie untersucht und somit stand nur noch eine begrenzte Materialmenge zur Verfügung.

Zur immunhistochemischen Färbung der einzelnen Präparate mit den verschiedenen Antikörpern waren verschiedene Protokolle notwendig. Diese ergaben sich zum einen aus den Produktinformationen der jeweiligen Antikörper, zum anderen aber auch aus der Literaturrecherche. Paavilainen et al. (2010) sahen in ihrer vergleichenden Analyse auch keinen wesentlichen Einfluss der Fixation auf die Proteinklasse, das subzelluläre Kompartiment der Proteinexpression oder die Abhängigkeit der Antikörper vom Grad der immunhistochemischen Färbemuster. Aldehydbasierte Fixierlösungen scheinen eine höhere Färbeintensität zu bewirken als aldehydfreie Lösungen (Paavilainen et al. 2010). Im Gegensatz dazu ist die Kryokonservierung eine nicht-chemische Methode der Fixierung, in der die Proteine noch weniger verändert werden (Paavilainen et al. 2010), wohingegen die Gewebemorphologie meist wesentlich schlechter erhalten ist.

4.2 Betrachtung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden im Gegensatz zu den in der Literatur zu findenden Studien Endometrioseherde aus den verschiedenen typischen Lokalisationen untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass Endometrioseherde einen hohen Anteil an Aktin und eine hohe Gefäßdichte aufweisen. Auch die Arbeitsgruppe Anaf et al. (2000) charakterisiert peritoneale Endometrioseherde mit Hilfe des hier verwandten Antikörpers gegen smooth muscle Aktin. Das Protokoll für die immunhistochemische Färbung folgte ebenfalls der ABC-Methode. Zusätzlich wurden die Endometrioseherde mit normalem Peritoneum verglichen. Der Anteil an smooth muscle Aktin ist deutlich höher als in nicht betroffenen Arealen (Anaf et al. 2000). Diese Komponente glatter Muskelzellen bei Endometriose könnte aus der totipotenten Kapazität des Müllerschen Ganges resultieren, sich nicht nur in endometriale Drüsen, sondern auch in glatte Muskelzellen zu differenzieren (Anaf et al. 2000).

Weiterhin ist die Endometriose durch das Vorhandensein von Drüsenschläuchen charakterisiert. Diese bestehen aus zylindrischen und abgeflachten Epithelzellen, die von zahlreichen Stromazellen umgeben sind. Variationen der Wachstumsmuster der Endometrioseläsionen werden Epithel-Stroma Interaktionen zugeschrieben (Banu et al. 2009). Die Stromazellen entsprechen hier zellreichem Bindegewebe, dem sogenannten spinözellulären Bindegewebe, das auch das Grundgewebe des Uterus ist (Welsch 2006).

Die schon oben beschriebene hohe Gefäßdichte von Endometrioseherden aller Lokalisationen wurde von Inan et al. (2003) ebenfalls mit Hilfe der indirekten Immunhistochemie an ovarieller und peritonealer Endometriose und dem CD34-Antikörper nachgewiesen. Das Protokoll ähnelte dem hier verwandten Protokoll, folgte jedoch der ABC-Methode. Die Gefäße um die Endometrioseherde wurden mit Hilfe des CD34-Antikörpers sichtbar gemacht und von drei unabhängigen Untersuchern gezählt (Inan et al. 2003).

Besonders in Schokoladenzysten finden sich viele positive Endothelien, was wiederum für eine hohe Gefäßdichte spricht. Infolgedessen macht die chirurgische Abtragung dieser Zysten ein hohes Maß an Blutstillung erforderlich (Pleiderer et al. 2001).

Im Gegensatz zur Zellproliferation, die vorwiegend in Epithelien beobachtet wurde, waren in der vorliegenden Arbeit CD 34-positive Zellen eindeutig den Gefäßen und insbesondere den Endothelien zuzuordnen, während Epithelien durchgehend negativ waren.

Dies bestätigen auch die Befunde von Lynch et al. (2007), die ebenfalls CD 34 in Endothelien lokalisierten. Wenn hämatopoetische Stammzellen reifen und sich zu differenzieren beginnen,

geht CD 34 verloren (Lynch et al. 2007). Obwohl alle hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen CD 34 exprimieren, sind nicht alle CD 34-positiven Zellen hämatopoetische Stammzellen. Da CD 34 auch ein endotheliales Antigen ist (Krause et al. 1996), sind die in unserer Arbeit positiven Zellen vermutlich sowohl Stammzellen wie auch Endothelzellen.

Die oben beschriebene hohe Gefäßdichte lässt Parallelen zu Tumorwachstum vermuten. So wird Angiogenese in verschiedenen Publikationen (Donnez et al. 2002 und McLaren 2000) als wichtiger Faktor der Pathogenese von Endometriose beschrieben. So wurde Vascular endothelial growth factor in roten Läsionen peritonealer Endometriose und in Prostatatumoren nachgewiesen (Matsuzaki et al. 2001b). Diese Befunde ließen diese Arbeitsgruppe schlussfolgern, dass antiangiogenetische Präparate eine Therapieoption für beide Krankheitsbilder sein könnten.

Ebenfalls sehr ausgeprägt finden sich in der Umgebung der Endometrioseherde lymphozytäre Infiltrationen. Die Entzündungsreaktion wird auch schon als wichtiger Entstehungsfaktor der Endometriose beschrieben. So spielen peritoneale Monozyten und natürliche Killerzellen eine wichtige Rolle für die Endometriose. Die Implantation von endometrialem Gewebe im Inneren der Peritonealhöhle könnte das Ergebnis eines Defektes in der Aktivität der natürlichen Killerzellen sein (Melchiar und Freedman 2002).

Der „invasive Charakter“ der untersuchten Endometrioseherde zeigte sich insbesondere in einer deutlich höheren proliferativen Aktivität der dicht gelagerten Fibroblasten/zyten des umgebenden Bindegewebes im Vergleich zu dem nichtbetroffenen Bindegewebe.

Ki 67 war erstaunlicherweise im Stratum basale des mehrschichtig unverhornten Plattenepithels der Vagina nicht anzutreffen, obwohl diesem Teil des Stratum germinativum eine hohe Proliferationsrate zugeschrieben wird (Welsch 2006). Im auch dem Stratum germinativum zugehörigen Stratum spinosum hingegen sind zahlreiche proliferierende Zellen vorhanden. Diese unerwartete Beobachtung könnte auf einen erhöhten Grad an Dysplasie zurückzuführen sein. In Zervix und Uterus korrelierte nämlich die Zahl der Ki-67 positiven parabasalen Epithelzellen mit dem Grad der Dysplasie (Ohta et al. 2010). Ein ähnliches Phänomen wurde auch in oralen epithelialen Dysplasien beobachtet (Takeda et al. 2006). Hier vermuteten die Autoren, dass asymmetrische Zellteilungen der epithelialen Stammzellen im Stratum basale zur vorübergehenden Anwesenheit von sich teilenden Zellen in den parabasalen Schichten der Mundschleimhaut führen.

Matsuzaki et al. (2001a) zeigten, dass Ki 67 in roten peritonealen, das heißt aktiven Endometrioseläsionen in etwa gleichem Maße exprimiert wird wie in eutopem Endometrium in der Proliferationsphase. In schwarzen und weißen Läsionen waren kaum proliferierende Endothelien zu finden (Matsuzaki et al. 2001b). Da sich in der vorliegenden Studie jedoch in hohem Maße proliferierende Endothelien fanden ist zu vermuten, dass es sich bei den meisten untersuchten Läsionen um die rote Form handelt. In der gleichen Studie konnte auch gezeigt werden, dass die Expression von Ki 67 im Gegensatz zu eutopem Endometrium bei Endometrioseläsionen keinen zyklischen Veränderungen unterliegt (Matsuzaki et al. 2001a). Vielmehr wurde die These gestützt, dass rote und schwarze Endometrioseherde unterschiedliche Stadien von peritonealer Endometriose darstellen. Die Arbeitsgruppe untersuchte auch das Vorhandensein des Cyclooxygenasehemmers p27 in eutopem Endometrium und Endometriose. So wurde gezeigt, dass p27 mit dem Verschwinden von Ki 67 in weniger aktiven schwarzen Herden regulativ zunimmt. Diese Ergebnisse stützt auch die Arbeit von Banu et al. (2008), die eine vermehrte Expression von Ki 67 in Endometrioseherden zeigen konnten. Da auch COX-2 in Endometriosegewebe vermehrt auftritt (Banu et al. 2008), ist also zu vermuten, dass die Proliferation zumindest teilweise über den Prostaglandinsyntheseweg reguliert wird. COX-2 ließ sich am häufigsten in ektopem Endometrium, weniger häufig in eutopem Endometrium von Frauen mit Endometriose und am seltensten im Endometrium von Frauen ohne Endometriose nachweisen (Banu et al. 2008). Die erhöhte Expression des COX-2 Proteins bei der Endometriose lässt auf seine wichtige Rolle in der Pathophysiologie und Pathogenese dieser Erkrankung schließen (Banu et al. 2008). Leider wurde die therapeutische Nutzung von COX-2 Hemmern beim Menschen aufgehoben, da unerwünschte kardio-vaskuläre Nebenwirkungen auftraten (Cha und DuBois 2007).

In einer Studie am chicken embryo chorioallantoic membrane (CAM) Modell konnten durch endometriale Fragmente aus Menstruationsblut Endometrioseläsionen erzeugt werden (Nap et al. 2003). Auch hier wurde die proliferative Aktivität mit Hilfe von Ki 67 untersucht. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen und auch zu den Erwartungen der Autoren wurde der Marker nur sehr wenig in den Zellen der erzeugten Endometrioseläsionen exprimiert und war 72h nach deren Erzeugung ganz verschwunden (Nap et al. 2003). Ein Grund hierfür könnte in der Abwesenheit eines hormonellen Zyklus im CAM Modell liegen, das Modell also die in vivo Verhältnisse nicht widerspiegelt.

Der frühe Stammzellmarker C-kit (CD 117) fand sich in der vorgelegten Arbeit in der Nachbarschaft von Endometrioseherden auffallend häufig. Die positiven Zellen waren insbesondere den Endothelzellpopulationen, aber auch anderen Stromazellen zuzuordnen. Dies lässt darauf schließen, dass es sich um frühe Stadien hämatopoetischer Stammzellen handelt (Lynch et al. 2007).

In anderen Arbeiten fand sich C-kit nur in einem kleinen Anteil von endometrialen HSC verglichen mit HSC, die dem Blut entstammen. Dies lässt vermuten, dass die endometrialen HSC reifer sind als diejenigen, die im Blut zirkulieren (Lynch et al. 2007). CD 117, ein Plasmamembran gebundenes Protein, ist vor allem entlang der Zellmembran lokalisiert, wird aber auch manchmal im Zytoplasma exprimiert (Cho et al. 2004). Es wurde gezeigt, dass CD 117 entlang der Zellmembran von endometrialen Stromazellen und im Zytoplasma von endometrialen Drüsenzellen exprimiert wird (Cho et al. 2004). Auch in der vorgelegten Arbeit fand sich CD 117 im Zytoplasma, hier in dem der Drüsenschläuche von Endometrioseherden.

Die hier verwendeten Marker CD 117, CD34 und Ki67 fanden auch in der Studie von Cho et al. (2004) Verwendung. Dort wurde gezeigt, dass Stammzellen im uterinen Endometrium von der Fetalperiode bis zur Postmenopause vorhanden sind. Die Zellen, die diese Marker aufwiesen, fanden sich hauptsächlich im Stroma der Basalis (Cho et al. 2004).

Darüber hinaus scheint eine gewisse Hormonabhängigkeit bei den Markern zu bestehen. So wurde vermutet, dass C-kit in Geweben mit einem hohen Östrogengehalt hochreguliert wird (Elmore et al. 2001).

Der Einfluss von Hormonen auf die Endometriose wird von verschiedenen Seiten beschrieben. So wurde die Erkrankung traditionell als östrogen-abhängig beschrieben. Osteen et al. (2005) vermuteten jedoch, dass es sich bei der Endometriose zum einen um eine östrogen-abhängige und zum anderen eine Progesteron-unabhängige Erkrankung handelt.

Die Hormonabhängigkeit der Endometriose bietet zudem auch therapeutische Möglichkeiten. So bremst das Gonadotropin Releasing Hormon II die Proliferation von endometrialen Stromazellen (Morimoto et al. 2005), was wiederum GnRH-Analoga als Therapieoption attraktiv erscheinen lässt. GnRH II senkte in der erwähnten Studie auch die Expression von COX 2, die für die schon beschriebenen Entzündungsreaktionen der Endometriose mitverantwortlich ist.

Die Konzentration von GnRH II war im eutopen Endometrium von Endometriosepatientinnen auch deutlich niedriger als in dem von gesunden Probandinnen (Morimoto et al. 2005).

Es tauchen immer wieder Hinweise auf, dass auch eutopes Endometrium von Endometriosepatientinnen abweichende Eigenschaften von dem Endometrium gesunder Patientinnen aufweist. Diese Eigenschaften spielen wahrscheinlich eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie und Pathogenese der Endometriose (Sharpe-Timms 2001).

Während der Erstellung dieser Arbeit wurden auch Testfärbungen mit dem Marker Oct-4 durchgeführt, der die gewebe- und zellspezifische Transkription reguliert und ausschließlich in pluripotenten Stammzellen exprimiert wird. Oct-4 wurde bereits zyklusunabhängig in eutopem Endometrium (Bentz et al. 2010) gezeigt. Da die Konzentration von Oct-4 immer gleich blieb, schlossen die Autoren daraus, dass endometriales Oct-4 an den zyklischen Veränderungen des Endometriums nicht beteiligt ist. Da dieser Stammzellmarker in der vorgelegten Arbeit jedoch in keiner der untersuchten Lokalisation nachzuweisen war, wurde er nicht in die Beschreibung aufgenommen. Möglicherweise spielt Oct-4 bei der Endometriose keine Rolle und ist nur in eutopem Endometrium zu finden. Ein weiterer Grund für die Abwesenheit in den untersuchten Paraffinschnitten könnte in den Protokollen für die Fixierung und Einbettung liegen, die häufig zu Vernetzungen und damit Verdeckung der Antikörperbindungsstellen im Gewebe führen (Shi et al. 1997) Eine sinnvolle Alternative zu Formalin wäre möglicherweise die Fixation in Alkohol basierten Lösungen, die nicht zu solchen Quervernetzungen führen (van Essen et al. 2010).

4.3 Überprüfung der Theorien

Im Widerspruch zum Gedanken der Transplantationstheorie steht die Beobachtung, dass sich eine retrograde Menstruation zwar bei 76 bis 90% aller Frauen findet, diese jedoch nicht alle eine Endometriose entwickeln. Aus diesem Grund müssen noch weitere Faktoren hinzukommen, die die Veranlagung und spontane Entwicklung einer Endometriose beeinflussen (D'Hooghe et al. 2004). Retrograde Menstruation scheint ein physiologisches Phänomen zu sein, das bei nahezu allen Frauen mit funktionierenden Tuben zu beobachten ist. Sie ist vermutlich durch gesteigerten uterinen Tonus bei der Menstruation und zervikofundale Peristaltik bedingt, die sich während der Follikelphase verstärken (Leyendecker et al. 2004).

Da man also davon ausgehen kann, dass retrograde Menstruation ein physiologischer Prozess ist, wie kann man die Tatsache erklären, dass nicht jede Frau eine Endometriose entwickelt? Endometriose ist eine multifaktorielle Erkrankung, die mit einer generellen Entzündungsaktivität der Peritonealhöhle einhergeht. Oxidativer Stress wurde als ein entscheidender Faktor für ihre Pathogenese angenommen (Donnez et al. 2002). Darüber hinaus fanden sich in der gleichen Übersichtsarbeit Hinweise für die Bestätigung der Transplantationstheorie als Ursache für peritoneale Endometriose (Donnez et al. 2002).

Verschiedene Studien sprechen dafür, dass Zelladhäsionsmoleküle bei der Entstehung von Endometriose eine Rolle spielen. Das lösliche interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 wurde mittels ELISA in erhöhter Konzentration in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen nachgewiesen (Fukaya et al. 1999). Diese Ergebnisse verdichten die Hinweise und lassen vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen Zelladhäsionsmolekülen und der Progression von Endometriose gibt (Fukaya et al. 1999).

Leyendecker et al. belegten 2004 auch, dass sich bei 80% der Frauen mit Endometriose Fragmente von basalem Endometrium im Menstruationsblut fanden, wohingegen dieses nur bei 10% der Frauen ohne Endometriose der Fall war. Auf der Basis dieser Erkenntnisse vermuteten sie, dass eher der retrograde Transport von Anteilen der Basalis als von der Funktionalis zur Beckenendometriose führt. Sie belegten außerdem, dass uterine Hyperperistaltik eine der auffälligsten Entdeckungen in Bezug auf Endometriose ist (Leyendecker et al. 2004).

Gestützt wird diese These durch die Ergebnisse von Chan et al. (2004), die zeigen konnten, dass die Basalis von humanem Endometrium eine kleine Population von Zellen mit Stammzellcharakter enthält. Auch weitere Studien belegten, dass Stammzellen in uterinem

Endometrium von fetalen bis postmenopausalen Uteri zu finden sind. Gezeigt wurde dies durch Immunhistochemie mit C-kit, CD 34, bcl-2 und Ki 67 (Cho et al. 2004). Defrere et al. (2005) gelang es durch die Injektion von humanem Endometrium in die Peritonealhöhle von Mäusen, bei diesen eine Endometriose auszulösen.

Auch die Metaplasietheorie lässt sich schwer belegen. Sie beruht wie oben beschrieben auf der Aussage, dass sowohl Peritoneum als auch Endometriumepithel dem Entoderm entstammen. Wäre die Theorie zutreffend, würde man einen wesentlich höheren Anteil an Pleuraendometriose erwarten, da auch das Pleuraepithel seinen Ursprung im Entoderm hat. Darüber hinaus ist die Metaplasie ein Prozess, der im Alter zunimmt. Die Endometriose jedoch hat ihren Erkrankungsgipfel im 28. (je nach Quelle schwankend) Lebensjahr (<http://www.endotext.org/female/female9.htm>).

Weder die Implantations- noch die Metaplasietheorie kann erklären, warum sich tiefe und zystische Endometriose nur bei manchen Frauen ausbildet (Koninckx et al. 1999a). Aus diesem Grund forderten D'Hooghe et al. (2004), dass sich Endometrioseforschung zukünftig mit der Pathogenese dieser Erkrankung beschäftigen solle. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit versucht.

Endometriose und Adenomyose mit allen ihren Komponenten, wie glanduläres und stromales Endometrium und peristromales Muskelgewebe, täuschen die tatsächlichen zyklischen Veränderungen von basalem Endometrium vor. Aus diesem Grunde wurde vermutet, dass dislozierte Fragmente des basalen Endometriums Stammzellpotential haben. Wenn sie z. B. im Peritoneum implantiert werden, wiederholen sie ihr embryonales Wachstumsprogramm, um alle Komponenten der Archimetra zu erzeugen. Dies beinhaltet auch Muskelgewebe. Die ektopen endometrialen Läsionen können also als „Mikroarchimetras“ bezeichnet werden (Leyendecker et al. 2004).

Die Zellen im Inneren der Endometrioseherde scheinen darüber hinaus eine veränderte DNA aufzuweisen. Oxidative Schäden können zu Mutationen und insbesondere zu G-T Austausch führen. Dies ist auch in endometrialen Zellen zu beobachten. Es ist also ein Hinweis für ein hohes Maß an Mutationen. Es konnte noch nicht belegt werden, ob diese oxidativen DNA-Schäden der Auslöser oder die Folge der Endometriose darstellen. Es erscheint jedoch wahrscheinlicher, dass sie der Grund für zelluläre Dysfunktion und somit der Auslöser der Erkrankung sind (Slater et al. 2005). Auch die Rolle des Immunsystems bei der Endometriose wurde ausgiebig untersucht, und viele verschiedene Anomalien wurden erkannt (Berkanoglu und Arici 2003). Letztendlich kann bis heute keine bestehende Theorie die Pathogenese der Endometriose zufriedenstellend erklären.

4.4 Schlussfolgerungen

In Endometrioseherden befinden sich Zellen mit Stammzellcharakter. Alle verwendeten Stammzellmarker waren in allen untersuchten Präparaten zu finden. Die Färbung war durchgehend stimmig und konsistent in allen Präparaten und in allen Lokalisationen zu finden. Es wird angenommen, dass adulte Stammzellen für die hohe Regenerationsfähigkeit des menschlichen Endometriums verantwortlich sind und dass diese eine Rolle in der Entwicklung von Endometriose und Endometriumkarzinomen spielen (Götte et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe unterstützen die Theorie, dass Endometriose eine Ursache auf der Ebene der Stammzellen hat. Dazu wurde im Rahmen von immunhistochemischen Färbungen der Marker Musashi-I für adulte hämatopoetische Stammzellen benutzt (Götte et al. 2008). Dieser ist bei Säugetieren wichtig, um den Status von Stammzellen zu bestimmen. Sein Vorhandensein lässt Rückschlüsse auf Entwicklungsstatus, Differenzierung und Tumorgenese zu. Er wird selektiv in neuronalen Vorläuferzellen und neuronalen Stammzellen ausgebildet. Außerhalb des Nervensystems ist Musashi 1 ein Marker für intestinale oder frühe Stammzellen. Darüber hinaus wurde Musashi 1 in Tumorgewebe wie Gliomen und Melanomen nachgewiesen, was darauf hinweist, dass er eine Rolle bei der Tumorentwicklung spielt.

Die immunologische Identifikation von Endometrioseherden erfordert die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen starke Immunogene, die spezifisch für Endometriosezellen sind (Brosens et al. 2003). Die weitere Erforschung von Stammzellmarkern und spezifischen Proteinen von Endometriosezellen könnte zur Entwicklung eines solchen Antikörpers führen. Dies würde nicht nur die Diagnostik erleichtern, sondern auch zu einem besseren Verständnis der Pathogenese von Endometriose führen.

In der vorliegenden Studie konnte in allen Lokalisationen Gefäßreichtum rund um Endometrioseherde demonstriert werden. Dieser Befund unterstützt die Annahme, dass die Angiogenese eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Endometriose spielt (Matsuzaki et al. 2001b).

4.5 Ausblick

Endometriose ist eine sehr komplexe Erkrankung. Ähnlich wie Tumormetastasen benötigen Endometrioseläsionen Gefäßneubildungen für ihr Wachstum und ihre Ausbreitung (Inan et al. 2003). Medikamente mit einem antiangiogenetischen Wirkmechanismus könnten daher ein innovatives therapeutisches Konzept darstellen. (Inan et al. 2003).

Die endometriotic disease theory (EDT) ist ein neues Konzept, das das Fortschreiten der Endometriose als Beginn und Ausbreitung eines gutartigen Tumors versteht. In dieser Theorie sind die wichtigsten Phänomene der Endometriose nicht länger Implantation oder Metaplasie, sondern zelluläre Veränderungen, wie beispielsweise Mutationen, die das veränderte Verhalten verursachen (Koninckx et al. 1999a).

Eine weitere Therapieoption ergäbe sich, wenn undifferenzierten Stammzellen eine bestimmte zelluläre Differenzierung „aufgezwungen“ werden könnte. Auch könnte Gewebe, das Patientinnen entfernt wurde, als Grundmaterial zur Gewinnung von Stammzellen benutzt werden. In Abhängigkeit von der Potenz dieser Zellen bietet sich hier möglicherweise eine Quelle für Forschung und Entwicklung von neuem Zellmaterial.

5 Zusammenfassung

Die Endometriose ist eine der häufigsten Frauenkrankheiten; 8 bis 12 Prozent aller Frauen im gebärfähigen Alter sind davon betroffen. Dabei treten gebärmuttereschleimhaut-ähnliche Wucherungen außerhalb des Cavum uteri auf, die sich jedoch in vielen Punkten vom eutopen Endometrium unterscheiden. Es existieren zwei gegenläufige Theorien zur Pathogenese, die Metaplasie- und die Transplantationstheorie. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beschreibung von Endometrioseherden im Kontext der Transplantationstheorie. Hier war eine Ausgangsfrage, ob die Zellen von Endometrioseherden Eigenschaften von Stammzellen besitzen.

Es wurde histologisches Material von Endometrioseherden aus unterschiedlichen Lokalisationen (Ovar, Eileiter, Vagina, Rektum, Peritoneum) mit Markern für zytoskeletale Filamente und Stammzellmarkern immunhistochemisch untersucht. Arbeitsmethode war die indirekte Immunhistochemie, die einen qualitativen, nicht aber einen quantitativen Nachweis der verwendeten Marker erlaubte. Zunächst wurden die zytoskeletalen Filamente Aktin und Zytokeratin in den Gewebeschnitten lokalisiert, um die Zellpopulationen sicher zuordnen zu können. Außerdem kamen der Marker für menschliche Knochenmarkszellen CD 34, der frühe Marker für hämatopoetische Stammzellen CD133, das die Stammzelladhäsion stimulierende CD 117 und der Zellproliferationsmarker Ki 67 zum Einsatz.

Diese Stammzellmarker konnten die Zellen von Endometrioseherden anfärben. So fand sich CD34 vorwiegend im Endothel großer und kleiner Blutgefäße aber auch im Zytoplasma von Bindegewebszellen der Endometrioseherde. CD133 färbte das Epithel der Drüsenschläuche, sowie das Stratum basale des Vaginalepithels. Außerdem zeigten lymphatische Zellen des Darmes eine leichte Immunreaktion. CD 117 konnte im Zytoplasma der Epithelzellen von Endometrioseläsionen und im umgebenden Bindegewebe nachgewiesen werden. Ki 67 färbte Kerne der proliferierenden Drüsenepithelzellen, seltener Kerne von proliferierenden Bindegewebszellen in deren Umgebung. Daneben waren Zellkerne insbesondere des Stratum spinosum des Vaginalepithels immunopositiv für Ki 67.

Damit konnte gezeigt werden, dass Zellen in Endometrioseherden auch Eigenschaften von Stammzellen haben. Diese Zellen sind möglicherweise in die Pathogenese der Endometriose involviert und sollten bei der Entwicklung neuer Therapien berücksichtigt werden.

6 Abstract

Endometriosis is one of the most common female diseases, 8 to 12 percent of all women in fertile age are affected. Uterus mucosa like excrescences appear outside the actual uterus, but they differ from the eutopic Endometrium in many points. Two different theories of pathogenesis exist, the theory of metaplasia and the one of transplantation. The goal of this study was the description of endometriosis in the context of the transplantation theory. A primary question was whether or not the cells of endometriotic lesions have characteristics of stem cells.

Histologic material of endometriotic lesions of different localizations (ovary, ovarian tube, vagina, rectum and peritoneum) was examined immunohistochemically with markers for cytoskeletal filaments and stem cells. Working method was the indirect immunohistochemistry, allowing a qualitative but not a quantitative analysis of the used markers. Initially the cytoskeletal filaments actin and cytokeratin were localized in the histological slides to identify the different cell populations. In a second step CD 34, a marker for human bone marrow cells, CD133 the early marker of hematopoietic stem cells, CD 117 which stimulates cell adhesion and Ki 67 a cell proliferation marker were applied.

These stem cell markers were able to stain cells of endometriotic lesions. CD 34 was found in the endothelium of small and bigger blood vessels and in the cytoplasm of connective tissue of endometriotic lesions. CD 133 stained the epithelium of glandular tubes, as well as the stratum basale of the vaginal epithelium. Furthermore lymphatic cells of the bowel showed a slight immunoreaction. CD 117 could be localized in the cytoplasm of epithelial cells of endometriotic lesions and in the surrounding connective tissue cells. Ki 67 stained the nuclei of proliferating glandular cells, less often nuclei of surrounding connective tissue cells. Besides Ki 67 was found in nuclei of the stratum spinosum of the vagina.

This way it could be shown that cells of endometriotic lesions have characteristics of stem cells. These cells are probably involved in the pathogenesis of endometriosis and should be taken into account when developing new therapies.

Literaturverzeichnis

Abele M. C. Valente G. Kerim S. Navone R. Onesti P. Chiusa L. Resegotti L. Paletro G. **Significance of cell proliferation index in assessing histological prognostic categories in Hodgkin's disease: An immunohistochemical study with Ki67 and MIB-1 monoclonal antibodies.** Haematologica 1997, 82: 281-285

Alison M. R. Poulson R. Forbes S. Wright N. A. **An introduction to stem cells.** Journal of Pathology 2002, 197/4: 419-423

Anaf V Simon., Fayt I. Noel J.-C. **Smooth muscles are frequent components of endometriotic lesions.** Human Reproduction 2000, 15: 767-771

Banu S. K. Lee J. Speights V. O. Starzinski-Powitz A. Arosh J. A. **Cyclooxygenase-2 regulates survival, migration and invasion of human endometriotic cells through multiple mechanisms.** Endocrinology 2008: 149 (3): 1180-1189

Banu S. K. Lee J. Speights V. O. Starzinski-Powitz A. Arosh J. **Selective inhibition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 induces apoptosis of human endometriotic cells through suppression of ERK 1/2, AKT, NFkB, and β -Catenin pathways and activation of intrinsic apoptotic mechanisms.** Molecular Endocrinology 2009: 23(8): 1291-1305

Barrier B. F. Bates G. W. Leland M. M. Leach D. A. Robinson R. D. Propst A. M. **Efficacy of anti-tumor necrosis factor therapy in the treatment of spontaneous endometriosis in baboons.** Fertility and Sterility 2004, 81: 775-779

Becherer, E. Schindler, A. E. **Endometriose.** 1. Auflage 2002, Verlag W. Kohlhammer

Becker C. M. Bartley J. Mechsner S. Ebert A. D. **Angiogenese und Endometriose.** Zentralblatt Gynaekologie 2004, 126: 252-258

Bentz E.-K. Kenning M. Schneeberger C. Kolbus A. Huber J. C. Hefler L. A. Tempfer C. B. **OCT-4 expression in follicular and luteal phase endometrium: a pilot study.** Reproductive Biology and Endocrinology 2010, 8: 38-50

Berkkanoglu M. Arici A. **Immunology and endometriosis.** American Journal of Reproductive Immunology 2003, 50: 48-59

Bischoff F. und Simpson J. L. **Genetic basis of endometriosis.** Annals of the New York Acadademy of Sciences 2004, 1034: 284-299

Bishop A. E. Buttery L. Polak J. M. **Embryonic stem cells.** Journal of Pathology 2002, 197/4: 424-429

Blakeman P. J. Hilton P. Bulmer J. N. **Cellular proliferation in the female lower urinary tract with reference to oestrogen status.** British Journal of Obstetrics and Gynaecology 2001, 108: 813-816

Bonnet D. **Haematopoietic stem cells.** Journal of Pathology 2002, 197: 430-440

Brosens I. A. and Brosens J. J. **Redefining endometriosis- Is deep endometriosis a progressive disease?** Human Reproduction 2000, 15: 1-7

Brosens J. Timmerman D. Starzinski-Powitz A. Brosens I. **Noninvasive diagnosis of endometriosis: the role of imaging and markers.** Obstetric and Gynecology Clinics of North America 2003, 30: 95-114

Brown D. C. Gatter K. C. **Ki67 protein: the immaculate deception?** Histopathology 2002, 40: 2-11

Chan R. W. S. Schwab K. E. Gargett C. E. **Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells.** Biology of Reproduction 2004, 70: 1738-1750

Cho N. H. Park Y. K. Kim Y. T. Yang H. Kim S. K. **Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium.** Fertility and Sterility 2004, 81: 403-407

Crosignani P. G. Olive D. Bergqvist A. Luciano A. **Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians.** Human Reproduction Update Advance Access 2006, 12: 179-189

D'Hooghe T. Kyama C. Debrock S. Meuleman C. Mwenda J. **Future directions in endometriosis research.** Annals of the New York Academy of Sciences 2004, 1034: 316-325

Defrere S. Van Langendonck A. Gonzales Ramos R. Jouret M. Mettlen M. Donnez J. **Quantification of endometriotic lesions in a murine model by fluorimetric and morphometric analyses.** Human Reproduction Advance Access 2006, 21/3: 810-817

Donnez J. Van Langendonck A. Casanas-Roux F. Van Gossum J.-P. Pirard C. Jadoul P. Squifflet J. Smets M. **Current thinking on the pathogenesis of endometriosis.** Gynecologic and Obstetric Investigation 2002, 53 (suppl 1): 52-62

Dunselman G. A. J. Groothuis P. G. de Goeij A. Evers J. L. H. **The mesothelium, Teflon or Velcro? Mesothelium in endometriosis pathogenesis.** Human Reproduction 2001, 16/4: 605-607

Ebert A. Mechsner S. Halis G. **Endometriose – Probleme der Diagnostik und Therapie.** CME Praktische Fortbildung Gynäkologie, Geburtsmedizin und Gynäkologische Endokrinologie 2005, 3: 54-62

Engelhardt M. Lübbert M. Guo Y. **CD34+ or CD34-: which is the more primitive?** Leukemia 2002, 16: 1603-1608

Finas D. Schultze-Mosgau A. Griesinger G. Homung D. Küpker W. Felberbaum R. Diedrich K. **Rezidivierende Endometriose – ein Kofaktor der vorzeitigen Menopause?** Gynäkologische Endokrinologie 2003, 1: 115-127

Forbes S. Vig P. Poulsom R. Thomas H. Alison M. **Hepatic stem cells.** Journal of Pathology 2002, 197/4: 510-518

Foster C.S. Dodson A. Karavana V. Smith P.H. Ke Y. **Prostatic stem cells.** Journal of Pathology 2002, 197/4: 551-565

Fukaya T. Sugawara J. Yoshida H. Murakami T. Yajima A. **Intercellular adhesion Molecule-1 and hepatocyte growth factor in human endometriosis: Original investigation and a review of literature.** Gynecologic and Obstetric Investigation 1999, 47: (suppl 1) 11-17

Gazvani R. und Templeton A. **Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis.** Reproduction 2002, 123: 217-226

Godell M. A. **Multipotential stem cells and 'side population' cells.** Cytotherapy 2002, 4/6: 507-508

Götte M. Wolf M. Staebler A. Buchweitz O. Kelsch R. Schüring A. N. Kiesel L. **Increased expression of the adult stem cell marker Musashi-I in endometriosis and endometrial carcinoma.** Journal of Pathology 2008, 215: 317-329

Gonzalez-Reyes A. **Stem cells, niches and cadherins: a view from Drosophila.** Journal of Cell Science 2003, 116: 949-54

Groothuis P. G. Nap A. W. Winterhager E. Grümmer R. **Vascular development in endometriosis.** Angiogenesis 2005, 8/2: 147-156

Guo Y. Lübbert M. Engelhardt M. **CD 34- Hematopoietic stem cells: current concepts and controversies.** Stem Cells 2003, 21: 15-20

Harada T. Iwabe T. Terakawa N. **Role of cytokines in endometriosis.** Fertility and Sterility 2001, 76: 1

Heissig B. Werb Z. Shabin R. Hattori K. **Role of c-kit/Kit ligand signaling in regulating vasculogenesis.** Thrombosis and Haemostasis 2003, 90: 570-576

Hristov M. Erl W. Weber P. C. **Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing.** Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2003, 23: 1185-1189

Inan S. Kuscu N. K. Vatansever S. Ozbilgin K. Koyuncu F. Sayhan S. **Increased vascular surface density in ovarian endometriosis.** Gynecology: Endocrinology 2003, 17: 143-150

Janes S.M. Lowell S. Hutter C. **Epidermal stem cells.** Journal of Pathology 2002, 197/4: 479-491

Johnson M. C. Torres M. Alves A. Bacallao K. Fuentes A. Vega M. Boric M. A. **Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: Expression of c-myc, TGF-beta I and bax genes.** Reproductive Biology and Endocrinology 2005, 3: 45

Koninckx P. R. Barlow D. Kennedy S. **Implantation versus infiltration (session 1): The Sampson versus the endometriotic disease theory.** Gynecologic and Obstetric Investigation: 1999a, 47: (suppl 1) 3-10

Koninckx P. R. Kennedy S. H. Barlow D. H. **Pathogenesis of endometriosis (session 2): The role of peritoneal fluid.** Gynecologic and Obstetric Investigation 1999b, 47: suppl 1: 23-33

Koutsilieris M. Akoum A. Lazure C. Frenette G. Lemay A. **N-terminal truncated forms of insulin-like growth factor binding protein-3 in the peritoneal fluid of women without laparoscopic evidence of endometriosis.** Fertility and Sterility 1995, 63: 2

Krause D.S. Fackler M. J. Civin C.I. May W.S. **CD 34: structure, biology and clinical utility.** Blood 1996, 87: 1-13

Kühnel W. **Taschenatlas der Zytologie und Histologie und mikroskopischen Anatomie.** 11. komplett überarbeitete und ergänzte Auflage, Januar 2002, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York,

Lapidot T. Petit I. **Current understanding of stem cell mobilization: The role of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells.** *Experimental Hematology* 2002, 30: 973-981

Laschke M. W. Elitzsch A. Vollmar B. Vajkoczy P. Menger M. D. **Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions.** *Human Reproduction. Advance Access* 2006, 21: 262-68

Leyendecker G. I. Herbertz M. Kunz G. Mall G. **Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium.** *Human Reproduction* 2002, 17/10: 2725-2736

Leyendecker G. Kunz G. Herbertz M.. Beil D. Huppert P. Mall G. Kissler S. Noe M. Wildt L. **Uterine peristaltic activity and the development of endometriosis.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004, 1034: 338-355

Lynch L. Golden-Mason L. Eogan M. O'Herlihy C. O'Farrelly C. **Cells with haematopoietic stem cell phenotype in adult human endometrium: relevance to infertility?** *Human Reproduction* 2007, 22: 919-926

Mahutte N. G. Arici A. **New advances in the understanding of endometriosis related infertility.** *Journal of Reproductive Immunology* 2002, 55: 73-83

Matsuzaki S. Canis M. Murakami T. Dechelotte P. Bruhat M. A. Okamura K. **Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 Kip1 in eutopic endometrium and peritoneal endometriosis.** *Fertility and Sterility* 2001, 75: 5

Matsuzaki S. Canis M. Murakami T. Dechelotte P. Bruhat M. A. Okamura K. **Immunohistochemical analysis of the role of angiogenic status in the vasculature of peritoneal endometriosis.** *Fertility and Sterility* 2001, 76: 4

McLaren J. **Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis.** *Human Reproduction update* 2000, 6: 45-55

Melichar B. und Freedman R. S. **Immunology of the peritoneal cavity: Relevance for host-tumor relation.** International Journal of Gynecological Cancer 2002, 12: 3-17

Meyer R. **Über den Stand der Frage der Adenomyositis, Adenomyome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa.** Zentralblatt Gynäkologie 1919, 36: 745-750

Moore M. A. S. **Cytokine and chemokine networks influencing stem cell proliferation, differentiation, and marrow homing.** Journal of Cellular Biochemistry 2002, Supplement 38: 29-38

Morimoto C. Osuga Y. Yano T. Takemura Y. Harada M. Hirata T. Hirota Y. Yoshino O. Koga K. Kugu K. Taketani Y. **GnRH II as a possible cytostatic regulator in the development of endometriosis.** Human Reproduction 2005, 20/11: 3212-3218

Müller A. M. Söndgen D. Strunz R. Müller K.-M. **Gliomatosis peritonei: a report of two cases and review of the literature.** European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology 2002, 100: 213-222;

Nap A. W. Groothuis P. G. Demir A. Y. Maas J. W. M. Dunselman G. A. J. de Goetj A. F. P. M. Evers J. L. H. **Tissue integrity is essential for ectopic implantation of human endometrium in the chicken chorioallantoic membrane.** Human Reproduction 2003, 18/1: 30-34

Nap A. W. Griffioen A. W. Dunselman G. A. **Antiangiogenesis therapy for endometriosis.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2004, 89(3): 1089-1095

Noll S. Schaub-Kuhnen S. **Praxis der Immunhistochemie.** Herausgegeben von Heinz Höfler und Klaus Michael Müller, 1. Auflage Oktober 2000, Urban & Fischer Verlag München

Ohta K. Ogawa I. Ono S. Masaaki T. Mizuta K. Miyauchi M. Masaaki T. Shigeishi H. Takata T. Kamata N **Histopathological evaluation including cytokeratin 13 and Ki67 in the border between Lugol-stained and –unstained areas.** Oncology Reports 2010; 24: 9-14

Oliver C. Montes M.J. Galindo J.A. Ruiz C. Olivarea E.G. **Human decidual stromal cells express α -smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts.** Human Reproduction 1999, 14 (6): 1599-1605

Paavilaninen L. Edvinsson A. Asplund A. Hober S. Kampf C. Pontén F. Wester K. **The impact of tissue fixatives on morphology and antibody-based protein profiling in tissues and cells.** Journal of Histochemistry and Cytochemistry 2010, 58(3): 237-246

Pfleiderer A. Breckwoldt M. Martius G. **Gynäkologie und Geburtshilfe.** 4. aktualisierte und korrigierte Auflage 2002, Thieme Verlag Stuttgart, Kapitel 11:163 und 205-207

Phadnis S. V. Doshi J. S. Ogunnaike O. Coady A. Padwick M. Snusi F. A. **Cervical endometriosis: a diagnostic and management dilemma.** Archives of Gynecology and Obstetrics 2005, 272: 289-293

Poncelet C. Leblanc M. Walker-Combrouze F. Soriano D. Feldmann G. Madelenat P. Scoazec J.-Y. Darai E. **Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis.** Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica 2002, 81: 195-203

Portz D.M. Elkins T.E. White R. Warren J. Adadevoh S. Randolph J. **Oxygen free radicals and pelvic adhesion formation: blocking oxygen free radical toxicity to prevent adhesion formation in an endometriosis model.** International Journal of Fertility 1991, 36: 39-42

Pötgens A. J. G. Boite M. Huppertz B. Kaufmann P. Frank H.-G. **Human trophoblast contains an intracellular protein reactive with an antibody against CD133 – A novel marker for trophoblast.** Placenta 2001, 22: 639-645

Pötgens A. J. G. Schmitz U. Kaufmann P. Frank H.-G. **Monoclonal antibody CD133-2 (AC141) against hematopoietic stem cell antigen CD133 shows crossreactivity with Cytokeratin 18.** Journal of Histochemistry and Cytochemistry 2002, 50: 1131-1134

Poulsom R. Alison M. R. Forbes S.J. Wright N.A. **Adult stem cell plasticity.** Journal of Pathology 2002, 1176

Quakernak J. Schiermeier S. Lawrenz J-U. Hatzmann W. **Endometriose versus Endometrioseerkrankung – Ein konzeptioneller Wandel.** Vortrag im Rahmen einer Fortbildungsveranstaltung der Universität Witten / Herdecke 2003

Ramey J. W. Archer D. F. **Peritoneal fluid: its relevance to the development of endometriosis.** Fertility and Sterility 1993, 60: 1

Renner S. P. Oppelt P. Binder H. Beckmann M. W. **Endometriose** GebFra-Refresher, Thieme Verlag 2006, 66: R61 - R88;

Rojas-Cartagena C. Appleyard C. B. Santiago O. I. Flores I. **Experimental intestinal endometriosis is characterized by increased levels of soluble TNFRSF1B and downregulation of Tnfrsf1a and Tnfrsf1b gene expression.** Biology of Reproduction 2005, 73: 1211-1218

Rossi P. Sette C. Dolci S. Geremia R. **Role of c-kit in mammalian spermatogenesis.** Journal of Endocrinological Investigation 2000, 23: 609-615

Sadler T. W., **Medizinische Embryologie.** 9. überarbeitete und neu gestaltete Auflage 1998, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, Kapitel 1-6: 1-120

Salven P. Mustjeki S. Alitalo R. Alitalo K. Rafii S. **VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells.** Blood 2003, 101: 1

Sampson J. A. **Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity.** American Journal of Obstetrics and Gynecology 1927; 14: 422-469

Sasson I. E. and Taylor H.S. **Stem cells and the Pathogenesis of Endometriosis.** Annals of the New York Academy of Sciences 2008, 1127: 106-115

Schindl M. Birner P. Obermair A. Kiesel L. Wenzl R. **Increased microvessel density in adenomyosis uteri.** Fertility and Sterility 2001, 75: 131-135

Scott R. B. TeLinde R. W. **External Endometriosis – The Scourge of the private patient.** Annals of Surgery 1950, 131/5: 697-719

Seli E. Arici A. **Endometriosis: interaction of immune and endocrine systems.** Seminars in Reproductive Medicine 2003, 21: 2

Sharpe-Timms K.L. **Endometrial anomalies in women with endometriosis.** Annals of the New York Academy of Science 2001, 943: 131-147

Shi S-R. Key M.E. Kalra K.L. **Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections.** Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1991, 39(6): 741-748

Shi S.-R., Cote R. J., Taylor C. R. **Antigen retrieval immunohistochemistry: Past, present and future.** The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1997, 45(3): 327-343

Singh S. K. Hawkins C. Clarke I. D. Squire J. A. Bayani J. Hide T. Henkelman R. M. Cusimano M. D. Dirks P. B. **Identification of human brain tumour initiating cells.** Nature 2004, 432: 396-401

Slater M., Quagliotto G. Cooper M. Murphy C.R. **Endometriotic cells exhibit metaplastic change and oxidative DNA damage as well as decreased function, compared to normal endometrium.** Journal of Molecular Histology 2005, 36: 257-263

Starzinski-Powitz A. Zeitvogel A. Schreiner A. Baumann R. **Endometriose, eine Stammzellerkrankung?** Zentralblatt Gynäkologie 2003; 125: 235-238

Starzinski-Powitz A. Gaetje R. Zeitvogel A. Kotzian S. Handrow-Metzmacher H. Herrmann G. Fanning E. Baumann R. **Tracing cellular and molecular mechanisms involved in endometriosis.** Human Reproduction Update 1998, 4/5: 724-729

Starzinski-Powitz A. Zeitvogel A. Schreiner A. Baumann R. **In Search of Pathogenic Mechanisms in Endometriosis: The Challenge for Molecular Cell Biology.** Current Molecular Medicine 2001, 1: 655-664

Takeda T., Sugihara K. Hirayama Y., Hirano M., Tanuma J-I., Semba I. **Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias.** Journal of Oral Pathological Medicine 2006; 35: 369–75

Takehara T. Teramura T. Onodera Y. Kishigami S. Matsumoto K. Saeki K. Fukuda K. Hosoi Y. **Potential existence of stem cells with multiple differentiation abilities to three different germ lineages in mouse neurospheres.** Stem Cells and Development 2009, 18: 1433-1440

Taylor H. S. **Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients.** Journal of the American Medical Association 2004, 292: 81-85

Teter K. P. Holloway D. C. Sandusky G. E. **Assessment of PCNA (19A2) and Ki-67 (MIB1) cell proliferation markers in formalin fixed tissues.** The Journal of Histotechnology 1995, 18: 2

Thode J. Mechsner S. Halis G. Bartley J. Schwarz J. Magalov I. Ebert A. D. **Medikamentös-endokrine Behandlungsoptionen der Endometriose.** Gynäkologie und Geburtshilfe 2/2006: 28-34

Treloar S. A. Zhao Z. Z. Armitage T. Duffy D. L. Wicks J. O'Connor D. T. Martin N. G. Montgomery G. W. **Association between polymorphisms in the progesterone receptor gene and endometriosis.** Molecular Human Reproduction 2005, 11/9: 641-647

Tsui K. Ma F. Wang D. **Development of human lymphohematopoiesis defined by CD34 and CD 81 expression.** Leukemia & Lymphoma 2002, 12: 2269-2273

Uzan C. Cortez A. Dufournet C. Fauvet R. Siffroi J.-P. Darai E. **Endometrium from women with and without endometriosis, an peritoneal, ovarian and bowel endometriosis, show different c-kit protein expression.** Journal of Reproductive Immunology 2005, 65: 55-63

Van Essen H. F., Verdaasdonk M. A. M., M Elshof S. M. ,

Alcohol based tissue fixation as an alternative for formaldehyde: influence on immunohistochemistry. Journal of Clinical Pathology 2010, 63: 1090-1094

Van Langendonck A. Casanas-Roux F. Donnez J. **Oxidative stress and peritoneal endometriosis.** Fertility and Sterility 2002, 77: 5

Vinatier D. Orazi G. Cosson M. Dufour P. **Theories of endometriosis.** European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology 2001, 96: 21-34

Visvalingam S. Jaworski R. Blumenthal N. Chan F. **Primary peritoneal mesodermal adenocarcinoma: Report of a case and review of the literature.** Gynecologic Oncology 2001, 81: 500-505

Welsch U. **Sobotta Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie.** 2. Auflage 2006; 126 und 519 Urban & Fischer Verlag, München

Wiczak H. P. Grow D. R. Adams L. A. O'Shea D. L. Reece M. T. **Pelvic adhesions contain sex steroid receptors and produce angiogenesis growth factors.** Fertility and Sterility 1998, 69: 3

Wingfield M. Macpherson A. Healy D. L. Rogers P. A. W. **Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis.** Fertility and Sterility 1995, 64/2: 340-346

Witz C. A. **Cell adhesion molecules and endometriosis.** Seminars in Reproductive Medicine 2003, 21: 2

Witz C. A. **Pathogenesis of endometriosis.** Gynecologic and Obstetric Investigation 2002; 53 (suppl 1): 52-62

Wu M.-Y. Ho H.-N. **The role of cytokines in endometriosis.** American Journal of Reproductive Immunology 2003, 49: 285-296

Yin A.H. Miraglia S. Zanjani E.D. Almeida-Porada G., Ogawa M., Leary A.G., Olweus J., Kearny J., Buck D. W. **AC 133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.** Blood 1997, 90: 5002-5012

Zeitvogel A. Baumann R. Starzinski-Powitz A. **Identification of an invasive, N-Cadherin-expressing epithelial cell type in endometriosis using a new cell culture model.** American Journal of Pathology 2001, 159: 5

Anhang

Geräte

1. **Abzug** (Firma Herman Waldner GmbH & Co, Wangen)
2. **DAKO Cytomation Pen** (Firma DakoCytomation, Hamburg)
3. **Eppendorfgefäße** (Firma Sarstedt, Nümbrecht)
4. **Feuchtekkammer** (Firma DakoCytomation, Hamburg)
5. **Kochplatte** RH digital KT/C (Firma IKA, Staufen)
6. **Kühl- und Gefrierschrank** (Firma Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe)
7. **Mikrotom** HM 400 (Firma Leica, Solms)
8. **Mikrotomklingen** N 35 (Firma Pfm, Köln)
9. **Objekträger** superfrost (Firma Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Teningen)
10. **pH Meter** Seven Easy (Firma Mettler Toledo, Giessen)
11. **Pipetten** in verschiedenen Größen (Firma Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
12. **Pipettenspitzen** (Firma Sarstedt, Nümbrecht)
13. **Rüttler** IKA-VIBRAX-VXR (Firma IKA, Staufen)
14. **Waage** PB 3002-S (Firma Mettler Toledo, Giessen)

Lösungen

Citratpuffer (Firma Merck, Darmstadt):

Lösung B (0,1 mol Natriumcitrat) wird in 270ml aqua dest gegeben und dann wird mit Lösung A (0,1 mol Zitronensäure) der pH-Wert auf 6,0 eingestellt.

PBS Puffer (Firma Merck, Darmstadt):

Aus 41g NaCl, 11g di-Natriumhydrogenphosphat. Dihydrat, 2,75g Kaliumdihydrogenphosphat über 95% p. A. und 1l aqua dest wird eine Stammlösung hergestellt; mit Hilfe von NaOH und/oder HCl wird der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Die einmolare Gebrauchslösung besteht aus 1 Teil Stammlösung und 4 Teilen Aqua dest.

ABC- Elite Kit PK 6100 Standard (Firma Vektor, Burlingame, USA):

Ansatz in Tropffläschchen, 5ml PBS + 2 Tropfen A + 2 Tropfen B

Peroxidase – Substratkit – AEC (Firma Biologo Dr. Hartmut Schultheiß, Kronhagen):

2 Komponenten, 5 Tropfen AEC auf 1500µl Substratpuffer Ch. B. AE20505 Art. Nr. AE002

Sekundärer Antikörper (Firma Vector, Burlingame, USA):

Universal Antikörper biotin anti – Maus / anti – Kaninchen made in Horse, 1:100 in PBS Lot Nr. 00415

Blockpuffer: (Firma Carl Roth, Karlsruhe)

21µl Triton X + 1g BSA + 70ml PBS,

BSA = Albumin Fraktion V Protease frei

5% Pferdeserum (Firma Vector, Burlingame, USA):

75µl Pferdeserum + 1425µl Blockpuffer

0,3% H₂O₂ (Firma Carl Roth Karlsruhe) **in eiskaltem Methanol** (Firma Merck, Darmstadt):

50ml eiskaltes Methanol + 500µl 30% Wasserstoffperoxid

Glyceringelatine: (Firma Merck, Darmstadt)

Microscopy 100g in vitro

Tris-HCl Puffer (Firma Carl Roth, Karlsruhe):

Stammlösung aus 121,1g Tris-HCl, 58,4g NaCl und 1l Aqua dest. und pH 7,4 einstellen,

Tris-HCl Gebrauchslösung: 100ml Stammlösung, 900ml Aqua dest. und 250µl Triton X

20% Essigsäure (Firma Carl Roth, Karlsruhe):

160ml Aqua dest. und 40ml Essigsäure, erst das Wasser, dann die Säure, mischen und bei 4°C im Kühlschrank lagern

Fuchsin (Firma DakoCytomation, Hamburg)

(Substrat – Chromogen System) Code Nr. K0625, 1 Tropfen Fuchsin activating agent und 1 Tropfen Fuchsin chromogen mischen und 1 Min. Inkubieren, dann mit 587µl Buffered substrat mischen; Farbstoff, speziell für Immunkomplexe mit alkalischer Phosphatase

5% Blockpuffer

5gr. BSA (Albumin Fraktion V) in 100ml Tris-HCl Gebrauchslösung

APAAP, monoklonaler Antikörper (Firma DakoCytomation, Hamburg)

Code Nr. D 0651, erzeugt in Maus, anti alkalische Phosphatase zum Gebrauch in der Immunhistochemie

EDTA (Firma Merck, Darmstadt):

1mMolar, pH 8 Nr. 1.08418.0250

Triton X – 100 (Firma Sigma, St. Louis, Missouri, USA):

Lot: 052K0024

BSA (Firma Carl Roth, Karlsruhe)

Albumin Fraktion V Protease frei

Danksagungen

Im Folgenden möchte ich mich bei einigen Personen bedanken, ohne deren Hilfe, diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre:

Zunächst Fr. Prof. Pfarrer für die unvergleichlich gute Betreuung. Sie waren immer für jede Frage ansprechbar, das ist nicht selbstverständlich und dafür danke ich von Herzen.

Dann Fr. Cornelia Hof für die geduldige Einweisung in alle Geräte und Methoden. Ohne dich wäre die Arbeit im Labor nur halb so lustig gewesen, vielen Dank.

Auch Danke an Prof. Tinneberg für die Vermittlung an Frau Prof.. Pfarrer und die Leihgabe zahlreicher Bücher.

Danke Herrn PD Dr. Franke, für das freundliche zur Verfügung stellen der Paraffinblöcke.

Danke an Prof. Schulz aus dem Institut für Pathologie und seine MTAs aus dem Immunhistochemie Labor, für die Hilfe im Umgang mit dem CD 34 Antikörper.

Danke an Sandra Schmitt für die mühevollen Korrektur von Rechtschreibung und Grammatik. Ich habe dabei viel gelernt.

Danke an meine Brüder Tim und Florian, die für jedes Computerproblem eine Lösung gefunden haben.

Danke an meine Eltern. Ihr habt immer die richtige Mischung aus Druck, Geduld und Verständnis gefunden.

Danke Tante Heike, dass du immer an mich geglaubt hast.

Danke Oma, dass du immer ein offenes Ohr für mich hast.