

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

DISSERTATION

Histologisch nachweisbare mikroskopische
Endometrioseläsionen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mira Helene Luhmann

aus Berlin

Datum der Promotion: 04.06.2021

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	2
II.	Abbildungsverzeichnis	5
III.	Tabellenverzeichnis	6
IV.	Abkürzungsverzeichnis	7
V.	Abstract – Deutsche Fassung	9
VI.	Abstract – Englische Fassung	11
1.	Einleitung	13
1.1.	Definition und Epidemiologie der Endometriose	13
1.2.	Symptomatik	14
1.3.	Diagnostik	14
1.4.	Formen und Klassifikation	14
1.5.	Therapie	16
1.6.	Ätiologie und Pathogenese	17
1.7.	Estrogen und Estrogenrezeptor	18
1.8.	Progesteronrezeptor	20
1.9.	Peritoneum und Peritonealflüssigkeit	21
1.10.	Verteilung der peritonealen Endometriose	23
1.11.	Okkulte mikroskopische Endometriose	23
1.12.	Zielsetzung der Arbeit	24
2.	Material und Methoden	25
2.1.	Material	25
2.1.1.	Geräte	25
2.1.2.	Verbrauchsmaterialien	26
2.1.3.	Lösungen und Chemikalien	27

2.1.4. Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen	28
2.1.5. Software	29
2.2. Methoden	29
2.2.1. Auswahl des Patientenkollektivs	29
2.2.2. Kategorisierung der Patientinnen	30
2.2.3. Immunhistochemische Färbungen	30
2.2.3.1. Anfertigung von Gewebeschnitten	30
2.2.3.2. Entparaffinierung der Gewebeschnitte	32
2.2.3.3. Antigendemaskierung	32
2.2.3.4. Immunhistochemische Färbungen gegen Estrogen-Rezeptor alpha, Progesteronrezeptor sowie gegen Cluster of Differentiation 10, Cytokeratin und Anti Smooth Muscle Actin	32
2.2.3.5. Mikroskopische Auswertung	34
2.3. Statistische Auswertung	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1. Immunhistochemische Charakterisierung peritonealer Endometrioseläsionen ...	35
3.2. Bestimmung der Hormonrezeptorverteilung in Drüsenzellen	38
3.3. Vorkommen von Cluster of Differentiation 10 positiven Immunzellen im Peritoneum	40
3.4. Vorkommen und Verteilung von Gefäßen im Peritoneum	44
4. Diskussion	46
4.1. Zusammenfassung bisheriger Forschungsergebnisse	46
4.2. Bedeutung der okkulten mikroskopischen Endometriose	50
4.3. Verteilung der okkulten mikroskopischen Endometrioseläsionen.....	51
4.4. Vergleich des Peritoneums von Frauen mit und ohne Endometriose	52
4.4.1. Vorkommen von Immunzellen.....	52
4.4.2. Anzahl der Gefäße	53
5. Zusammenfassung	54

6. Literaturverzeichnis	55
7. Anhang	61
7.1. Eidesstattliche Versicherung	61
7.2. Lebenslauf.....	63
7.3. Danksagung	64

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bildliche Darstellung endometrialen Gewebes und einer typischen peritonealen Endometriose (pEM)-Läsion	13
Abbildung 2: Bildliche Darstellung typischer schwarzer peritonealer Endometriose (pEM)-Läsionen im kleinen Becken	16
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Estrogen-Bildung.....	19
Abbildung 4: Bildliche Darstellung der Fließrichtungen der Peritonealflüssigkeit (PF)...	22
Abbildung 5: Bildliche Darstellung der okkulten mikroskopischen Endometriose (OME)-Läsion der Probe 03	38
Abbildung 6: Bildliche Darstellung von Drüsenzellen der okkulten mikroskopischen Endometriose (OME)-Läsionen in Estrogen alpha (ERa)- und Progesteron (PR)-Färbung	39
Abbildung 7: Bildliche Darstellung Cluster of Differentiation (CD)10 positiver Lymphozyten und Granulozyten in der linken parakolischen Rinne einer Patientin mit Endometriose (EM).....	40
Abbildung 8: Graphische Darstellung des Vergleichs der Gefäßanzahl pro mm ² bei Frauen ohne (0) und mit (1) Endometriose (EM)	45

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	25
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 3: Verwendete Lösungen und Chemikalien	27
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen.....	28
Tabelle 5: Verwendete Software.....	29
Tabelle 6: Kategorisierung der Patientinnen.....	30
Tabelle 7: Gewebestücke der Vergleichsgruppen	31
Tabelle 8: Eigenschaften der verwendeten Antikörper (AK)	33
Tabelle 9: Zusammenfassung der histologisch nachweisbaren Zellen der okkulten mikroskopischen Endometriose (OME)-Läsionen.....	35
Tabelle 10: Anteil von okkulter mikroskopischer Endometriose (OME) betroffener Patientinnen mit und ohne Endometriose (EM)	36
Tabelle 11: Charakterisierung der Patientinnen mit okkulter mikroskopischer Endometriose (OME).....	37
Tabelle 12: Anteil von Patientinnen mit Immunzellen im Peritonealgewebe	41
Tabelle 13: Verteilung der Immunzellen	41
Tabelle 14: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Immunzellen im Gewebe und Adenomyose (AM) als Vorerkrankung.....	42
Tabelle 15: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Immunzellen im Gewebe und Sterilität als Vorerkrankung.....	42
Tabelle 16: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Immunzellen im Gewebe und Uterus myomatosus (UM) als Vorerkrankung.....	43
Tabelle 17: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Immunzellen im Gewebe und Hashimoto als Vorerkrankung	43
Tabelle 18: Zusammenfassung der Ergebnisse der Studien zur okkulten mikroskopischen Endometriose (OME).....	49

IV. Abkürzungsverzeichnis

AM	Adenomyosis uteri
AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASMA	Anti Smooth Muscle Actin
bds.	beidseitig
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD10	Cluster of Differentiation 10
cm	Zentimeter
GnRHa	Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonisten
EM	Endometriose
ER, ERs	Estrogenrezeptor, Estrogenrezeptoren
ERa	Estrogenrezeptor alpha
ERb	Estrogenrezeptor beta
g	Gramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
OC	orale Kontrazeptiva
PF	Peritonealflüssigkeit
PR, PRs	Progesteronrezeptor, Progesteronrezeptoren
RT	Raumtemperatur

SMCs	Smooth muscle cells (glatte Muskelzellen)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
UM	Uterus myomatosus

V. Abstract – Deutsche Fassung

Einleitung: Okkulte mikroskopische Endometriose wurde zum ersten Mal 1986 von Murphy et al beschreiben. Seitdem wurde trotz weiterer Untersuchungen zum Thema kaum etwas zur genaueren klinischen Bedeutung der okkulten mikroskopischen Endometriose entdeckt. So könnte sie einerseits ein physiologisches Phänomen sein, welches sowohl bei Frauen mit, als auch bei Frauen ohne Endometriose auftritt. Andererseits könnte sie eine Vorstufe manifester Endometrioseläsionen sein und könnte somit Sampsons Theorie der retrograden Menstruation unterstützen. Um dies herauszufinden, wurde makroskopisch unauffälliges Gewebe aus den parakolischen Rinnen von Frauen mit und ohne Endometriose untersucht und miteinander verglichen.

Methodik: Für die Studie wurden 64 Frauen mit und 22 Frauen ohne Endometriose ausgewählt, denen operativ Peritoneum aus den parakolischen Rinnen entnommen wurden, welches anschließend fixiert und in Paraffin eingebettet wurden. Es folgten immunhistochemische Färbungen zur Identifizierung der Endometrioseläsionen mit Antikörpern des Estrogenrezeptors alpha, des Progesteronrezeptors, Cytokeratin, Cluster of Differentiation 10 (Stromazellmarker) und Anti Smooth Muscle Actin.

Ergebnisse: Insgesamt wurden bei fünf der 86 Patientinnen (5,81%) dieser Studie okkulte mikroskopische Endometrioseläsionen gefunden. Eine dieser Läsionen fand sich bei einer Frau ohne makroskopisch sichtbare Endometriose. Dies macht 4,5% der Kontrollgruppe aus. In der Gruppe der Frauen mit Endometriose wurden bei vier Frauen okkulte mikroskopische Endometrioseläsionen gefunden, was wiederum 6,3% der Kohorte ausmacht. Vier der gefundenen Läsionen befanden sich in der rechten parakolischen Rinne. Die stärkste nachweisbare Antikörperbindung der Drüsen-beziehungsweise Stromazellen erfolgte durch den Progesteronrezeptor, wohingegen nur vereinzelte Zellen mit Estrogenrezeptor alpha-Affinität nachgewiesen werden konnten. Neben den okkulte mikroskopische Endometrioseläsionen wurden bei 12 Patientinnen mit Endometriose (18,8% der Endometriosekohorte) Immunzellen im peritonealen Gewebe gefunden, diese waren jedoch in keinem Fall sichtbar mit einer okkulten mikroskopischen Endometrioseläsion assoziiert. Dahingegen gab es keine entzündlichen Veränderungen in der Kontrollgruppe.

Schlussfolgerung: Da sich die Auftretenshäufigkeit von okkulten mikroskopischen Endometriose bei Frauen mit und ohne Endometriose nicht signifikant unterscheidet, ist

es wahrscheinlich, dass okkulte mikroskopische Endometriose ein physiologisches Geschehen ist, bei welchem sich endometriale Zellen im Peritoneum ansiedeln, dann aber durch das körpereigene Immunsystem wieder abgebaut werden. Auch die gefundene Hormonrezeptorverteilung spricht dafür. Da vier der okkulten mikroskopischen Endometrioseläsionen in der rechten parakolischen Rinne waren, lässt sich vermuten, dass die Ansiedlung dieser durch die Peritonealflüssigkeit beeinflusst wird. Bezüglich der gefundenen entzündlichen Zellen im peritonealen Gewebe der Frauen mit Endometriose stellt sich die Frage, ob diese der Grund für oder eine Auswirkung der Erkrankung sind.

VI. Abstract – Englische Fassung

Introduction: Occult microscopically endometriosis was firstly described by Murphy et al (1986). Since then no conclusion about the clinical significance of it was found. Firstly, occult microscopically endometriosis could be a physiological phenomenon, which occurs in women with and without endometriosis. Secondly, it could also be an early stage of real endometriotic lesions and would thus perhaps support Sampson's theory about retrograde menstruation. To find out more about the clinical significance of occult microscopically endometriosis, macroscopically normal tissue from the paracolic gutters from women with and without endometriosis was examined and compared to each other.

Methods: For this study, tissues from the left and/or right paracolic gutter from 64 women with and 22 women without endometriosis had been surgically removed. Afterwards the tissues had been fixed and embedded in paraffin and finally immunohistochemically stained with antibodies of an estrogen receptor alpha, a progesterone receptor, cytokeratin, cluster of differentiation 10 and anti smooth muscle actin.

Results: Occult microscopically endometriotic lesions were found in five of the 86 patients (5,81%). One of these lesions was found in a woman without endometriosis which is 4,5% of the control group. The other four lesions were found in women with endometriosis which is 6,3% of the cohort. Four of the lesions were located in the right paracolic gutter. The progesterone receptor did the strongest antibody binding of the glandular and stromal cells whereas there were only a few cells that had shown an antibody binding with the estrogen receptor alpha. Besides this, there were also immune cells found in the tissue of 12 women with endometriosis (18,8% of this cohort) but in none of the control group. These findings did not correlate with the occult microscopically endometriotic lesions.

Conclusion: As there was no significant difference in the frequency of occurrence of occult microscopically endometriosis in women with and without endometriosis, it could be a physiological process, in which endometrial cells settle in the peritoneal cavity and later get removed by the endogenous immune system. The distribution of the hormonal receptors would support this statement. Furthermore, the distribution of the occult microscopically endometriotic lesions suggests that the peritoneal fluid affects the settlement of these lesions, as four of them were found in the right paracolic gutter.

Regarding the inflammatory cells in the peritoneal tissue of women with endometriosis, the question arises whether these are the reason for or an effect of the disease.

1. Einleitung

1.1. Definition und Epidemiologie der Endometriose

Endometriose (EM) ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen und betrifft wahrscheinlich ca. 10% der Frauen im reproduktionsfähigen Alter [1, 2]. In seltenen Fällen kann sie jedoch auch bei jungen Frauen vor der Menarche [3] sowie bei postmenopausalen Frauen auftreten [4, 5]. Sie ist definiert als die Präsenz von endometrialen Drüsenzellen und/oder Stromazellen außerhalb der Uterushöhle (siehe Abbildung 1), wobei häufig auch Smooth Muscle Cells (SMCs) ein Bestandteil von EM-Läsionen sind [6-8]. Prädilektionsstellen der EM sind der Douglas Raum, die Ligamenti sacrouterina, das Blasenperitoneum und die Ovarien sowie die Fossae ovaricae [6, 9].

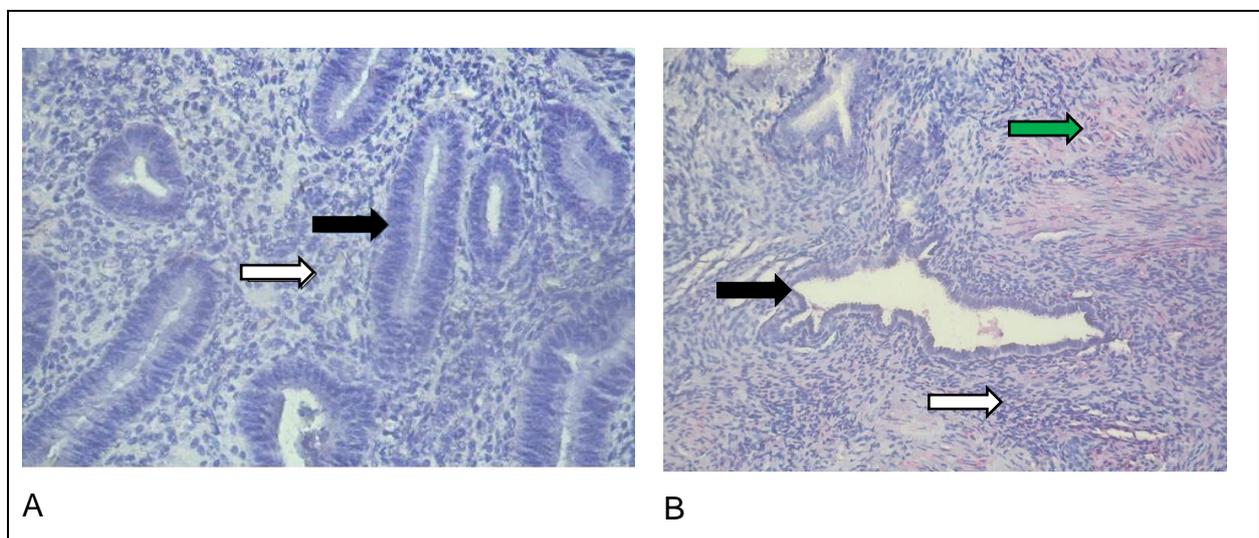


Abbildung 1: Bildliche Darstellung endometrialen Gewebes und einer typischen peritonealen Endometriose (pEM)-Läsion; A: Bildliche Darstellung endometrialer Drüsen- (schwarzer Pfeil) und Stromazellen (weißer Pfeil), Hämatoxylin Eosin-Färbung, 200-fache Vergrößerung; © Mira Helene Luhmann; B: Bildliche Darstellung einer typischen peritonealen Endometriose (pEM)-Läsion mit Drüsen- (schwarzer Pfeil) und Stromazellen (weißer Pfeil) sowie Smooth Muscle Cells (SMCs) (grüner Pfeil), Anti Smooth Muscle Actin (ASMA)-Färbung, 100-fache Vergrößerung; © Sabrina Pommer

1.2.Symptomatik

Die EM ist klinisch eine sehr heterogene Erkrankung und kann sich durch verschiedenste Symptomatik äußern. Dabei treten am häufigsten Dysmenorrhoe, zyklische und/oder azyklische Schmerzen im Beckenbereich sowie Subfertilität bis Infertilität auf. Damit ist es nicht verwunderlich, dass die Inzidenz von EM bei Patientinnen mit Infertilität mit bis zu 50% deutlich erhöht ist [6]. Je nach befallener Struktur können die Patientinnen auch unter zyklischer Diarrhoe und Dysurie leiden [10-12]. Die Schwere der Symptomatik korreliert dabei nicht mit der Ausbreitung der Erkrankung [13]. Häufig ist es sogar so, dass Patientinnen mit minimaler EM starke Beschwerden haben können, wohingegen Patientinnen mit milder bis schwerer Ausprägung nur dezente Symptome spüren. In seltenen Fällen (2%) kann die EM auch völlig asymptomatisch verlaufen [10].

1.3. Diagnostik

Durch die Heterogenität der EM dauert es im Schnitt 6 bis 11 Jahre vom Erstauftreten der Symptome bis zur endgültigen Diagnose [6, 14-16]. Abhängig vom Auftreten der EM sind verschiedene invasive und nicht-invasive Verfahren nützlich um die Erkrankung nachzuweisen. Für Adenomyose (AM) und Schokoladenzysten eignet sich zur diagnostischen Abklärung ein transvaginaler Ultraschall [17]. Dahingegen ist für die Diagnose der tief infiltrierenden EM (DIE) eine Bildgebung mittels MRT wegweisend [3, 18]. Jedoch kommen je nach Lokalisation der DIE auch transvaginale und transrektale Sonographie zum Einsatz [19, 20]. Zur Diagnostik der peritonealen Endometriose (pEM) hingegen ist bis heute eine Laparoskopie der Goldstandard, jedoch werden selbst dabei nicht alle Läsionen gesehen und die Entdeckungswahrscheinlichkeit hängt stark vom Untersucher ab [12, 18, 21]. Vor allem kleine EM-Läsionen können dabei leicht übersehen werden.

1.4. Formen und Klassifikation

Eine erste grobe Klassifikation der EM erfolgte nach Acosta et al (1973) anhand derer die Ausbreitung der Erkrankung in Endometriosis genitalis interna (entspricht AM, betrifft das

Myometrium des Uterus), Endometriosis genitalis externa (oberflächlich der inneren Genitale im kleinen Becken, Peritoneum), Endometriosis extragenitalis (Lokalisationen außerhalb des kleinen Beckens wie Vagina, rektovaginal, Parametrien, Douglasraum) eingeteilt werden kann [3, 22].

Danach wurde die klinische Einteilung nach der American Society for Reproductive Medicine (rASRM) im Jahr 1996 entwickelt. Diese beschreibt die Endometriosis genitalis externa nach Lokalisation, Erscheinungsbild, Größe und Tiefe der Läsion und Adhäsionen, und ist somit deutlich genauer [6]. Ergänzend dazu wurde 2010 der endometriosis fertility index (EFI) zur zusätzlichen Einschätzung von Fertilität und Sterilität entwickelt. Jedoch korreliert die rASRM Klassifikation nicht mit der Beschwerdeintensität, noch werden retroperitoneale Läsionen von DIE berücksichtigt. Aus diesem Grund wurde 2005 der ENZIAN Score zur Beschreibung tief infiltrierender und retroperitonealer Läsionen geschaffen. Durch die hier entstehenden genauen morphologischen Beschreibungen der Läsionen ist heute eine bessere Operationsplanung bei der Exzision von DIE möglich [22, 23].

Letztendlich können die Läsionen auch nach ihrem morphologischen Bild klassifiziert werden. Typische Läsionen werden als „powder burn“- oder „gunshot“- Läsionen bezeichnet, welche sich als schwarze, dunkelbraune oder bläuliche Läsionen, Knoten oder Zysten darstellen (siehe Abbildung 2). Atypische Vorkommen hingegen präsentieren sich als rote Läsionen oder klare bis seröse Vesikel [24].

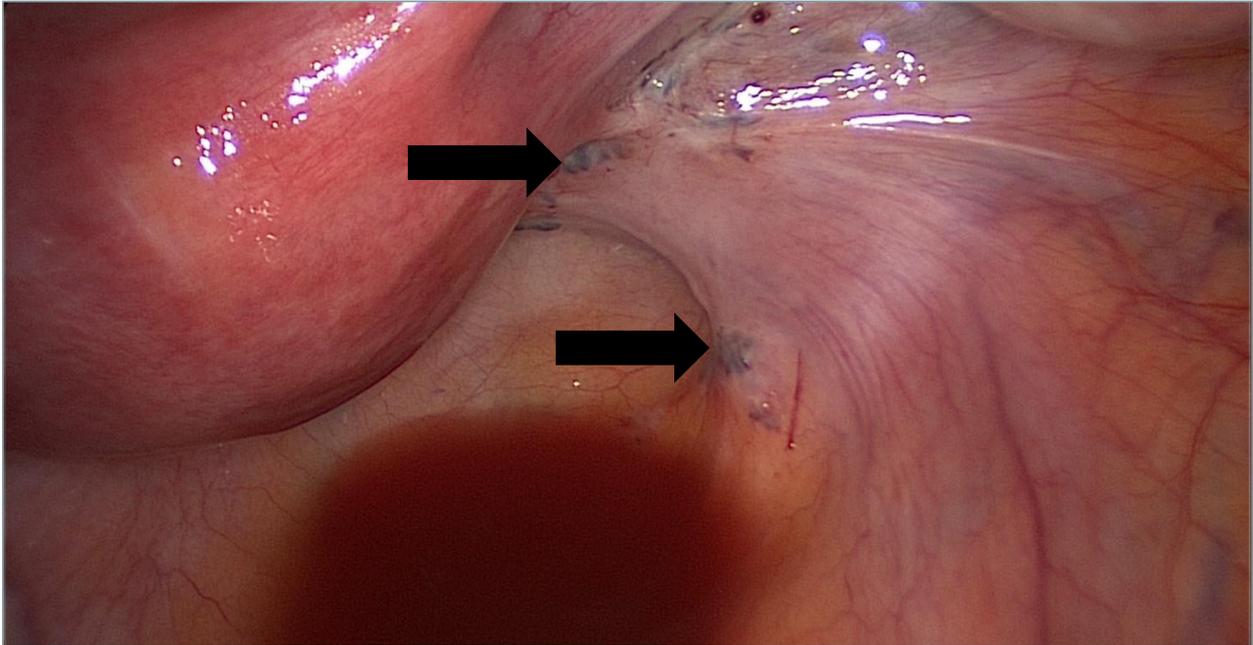


Abbildung 2: Bildliche Darstellung typischer schwarzer peritonealer Endometriose (pEM)-Läsionen im kleinen Becken; © Prof. Dr. Sylvia Mechsner

Dabei scheinen die Läsionen einen Alterungsprozess durchzumachen [25]. In roten Läsionen wurden gleiche Aktivitätslevel wie in eutopischem Endometrium gefunden. Diese werden im Verlauf vermutlich schwarz und heilen dann durch Fibrosierung ab, so dass weiße Plaques zurück bleiben [26, 27].

1.5. Therapie

Da die Pathogenese der EM bis heute nicht vollständig geklärt ist, stützt sich die Therapie vor allem auf Symptomreduktion und Verbesserung der Lebensqualität der Patientinnen. Durch den chronischen Verlauf bedarf es einer dauerhaften Behandlung [28]. Als first-line Therapie wird eine Kombination von oralen Kontrazeptiva (OC) und nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) empfohlen [13, 29, 30]. Für den Fall, dass diese Therapie keine ausreichende Linderung der Symptome erbringt, sollte eine diagnostische und therapeutische Laparoskopie erfolgen, um mögliche Läsionen zu entfernen. Wenn auch nach operativer Resektion von EM-Läsionen weiterhin chronische Beschwerden bestehen, kann man auf eine Therapie mit Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonisten (GnRHa) umsteigen. GnRHa sind sehr erfolgreich in der Behandlung von EM-bezogenen

Schmerzen [31]. Sie wirken sowohl über die Hypophysen-Ovarien-Achse als auch direkt am Endometrium und schaffen somit einen hypoestrogenen Status [18, 29]. Jedoch bringen sie auch viele Nebenwirkungen wie Nachtschweiß, vaginale Trockenheit, verminderte Knochendichte, verminderte Libido und Kopfschmerzen mit sich [6, 28]. Nach Beendigung der medikamentösen Therapie kommt es dann bei bis zu 70% der Patientinnen zum Rezidiv [28, 32]. Daher ist eine weitere Therapieoption die laparoskopische Exzision der EM-Läsionen. Diese bewirkt unter anderem häufig eine Besserung der Sub-/Infertilität der Patientinnen [33-35]. Allerdings kommt es auch hier bei 40-50% der Patientinnen zur Wiederkehr der Erkrankung nach fünf Jahren [36]. Durch eine postoperative medikamentöse Behandlung mit OC oder GnRHa kann sowohl die Rezidivrate reduziert, als auch das rezidiv-freie Intervall verlängert werden, eine Heilung der Erkrankung bringt sie jedoch nicht [32].

1.6. Ätiologie und Pathogenese

Zurzeit gibt es mehrere Theorien, die versuchen die Pathogenese der EM zu erklären. Die derzeit am weitesten akzeptierte Theorie ist die der retrograden Menstruation von Sampson [37]. Sie besagt, dass eutope Zellen des Endometriums während der Menstruation durch die Tuben in die Peritonealhöhle gelangen und sich an das Peritoneum anheften sowie durch Invasion einwachsen [38]. Die hierfür notwendigen Voraussetzungen sind das Überleben der endometrialen Zellen, das Umgehen des Immunsystems sowie die Fähigkeit dieser Zellen zur Adhäsion und Invasion [39]. Für diese Theorie spricht, dass EM nur in menstruierenden Spezies auftritt, die Inzidenz bei Frauen mit Abflussstörung erhöht ist und die meisten Läsionen im unteren Becken anzufinden sind [40, 41]. Allerdings kann sie nicht erklären, dass EM vereinzelt auch bei Männern vorkommt [42-44]. Außerdem stellt sich die Frage, warum retrograde Menstruation bei 90% aller Frauen auftritt, EM hingegen nur bei 10% [16].

Die zweite weit verbreitete Auffassung ist die Metaplasietheorie. Laut dieser Theorie kann sich coelomisches Epithel, welches sich unter anderem im Peritoneum und in der Pleura befindet, durch Metaplasie in endometriale Zellen umwandeln [45]. Auslöser für diesen Prozess könnten Hormone, Infektionen oder Umwelteinflüsse sein. Diese Theorie könnte das Auftreten von EM in Mädchen vor der Menarche sowie in Männern erklären, ist bis heute jedoch rein theoretisch [37].

Eine weitere häufig diskutierte Theorie ist die Theorie der lympho-vaskulären Metastasierung. Nach diesem Ansatz können endometriale Zellen durch Lymph- und Blutgefäße aus der Uterushöhle an ektope Stellen gelangen und sich dort ansiedeln. Diese Vorstellung könnte auch EM-Läsionen außerhalb der Peritonealhöhle, wie der Lunge, dem Gehirn und Lymphknoten erklären, nicht jedoch das Auftreten der EM in präpubertierenden Mädchen sowie in Männern [37]. In einer Studie von Mechsner et al wurden 2008 EM-Läsionen in Sentinel-Lymphknoten bei Patienten mit DIE nachgewiesen [46].

Insgesamt kann man sagen, dass keine dieser Theorien die Pathogenese der EM vollständig erklären kann und eine Kombination verschiedener Theorien möglich ist sowie dass noch viel Forschungsbedarf besteht.

Im Gegensatz dazu gibt es klar definierte Faktoren, die das Risiko für die Entwicklung einer EM erhöhen. Diese sind eine Menarche vor dem 12. Lebensjahr und ein kurzer Zyklus mit einer Dauer von weniger als 28 Tagen. Auch Alkohol und Nikotin sowie das Absetzen von OC scheinen sich positiv auf die Entstehung von EM auszuwirken [47]. Weiterhin scheint es eine familiäre Disposition zu geben, wobei das Risiko von erstgradig Verwandten von Patientinnen mit EM 3- bis 9-fach erhöht ist [48, 49].

Insgesamt ist die EM eine progrediente Erkrankung und obwohl sie ähnliche Eigenschaften von Malignität aufweist wie zelluläre Proliferation, Invasion und Neoangiogenese, ist sie eine benigne Erkrankung und nur in seltenen Fällen (ca. 1%) findet eine maligne Transformation statt [24, 50].

1.7. Estrogen und Estrogenrezeptor

Bei der EM handelt es sich um eine Estrogen-abhängige Erkrankung. Estrogen ist ein wichtiges Steroidhormon, welches zum Großteil in den Granulosazellen der Ovarien, in geringeren Maßen aber auch in der Nebennierenrinde und im Fettgewebe durch enzymatische Umwandlung von Androgenen gebildet wird. Das entscheidende Hormon dabei ist die Aromatase (siehe Abbildung 3) [51].

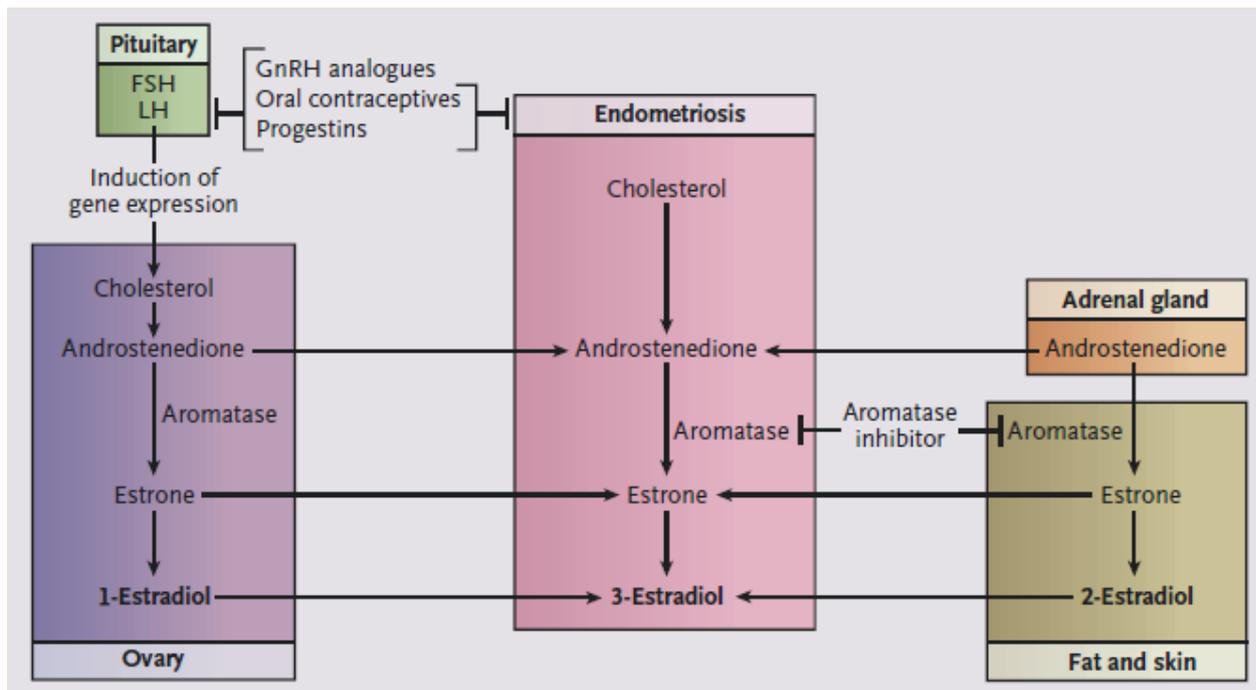


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Estrogen-Bildung
 Reproduziert mit Genehmigung aus Bulun, S.E., Endometriosis. N Engl J Med, 2009. 360(3): p. 268-79., Copyright Massachusetts Medical Society

In normalem Endometrium wird Estrogen nicht lokal produziert, da es keine Aromatase gibt. Weiterhin wird hochpotentes 17-Estradiol durch das Progesteron-abhängige Enzym 17-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD17B) in das weniger aktive Estron umgewandelt [40]. Diese beiden Effekte resultieren in einer geringen lokalen Estrogen-Konzentration.

Es gibt zwei Formen des Estrogenrezeptors (ER): den ER alpha (ERα) und den ER beta (ERβ). Beide sind nukleäre, Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren [52]. Im gesunden Endometrium wird vorrangig der ERα exprimiert [51]. Bindet Estrogen an einen ER, bilden sie einen Komplex, binden an die DNA und fungieren als Transkriptionsfaktor.

Im Uterus führt dies zur Proliferation des Endometriums sowie zu einer erhöhten Kontraktilität des Myometriums.

Im Gegensatz dazu gibt es bei Frauen mit EM in Läsionen hohe Aromatase-Level und sogar eine geringe Aromatase-Aktivität im eutopischen Endometrium. Dahingegen ist die HSD17B-Aktivität stark vermindert. Dies führt zu lokal erhöhten Estrogen-Spiegeln. Des Weiteren gibt es auch eine hohe Cyclooxygenase-2 (COX2) -Aktivität, welche durch

Estrogen getriggert wird, was zu hohen Prostaglandin E2-Werten führt. Prostaglandin E2 fördert wiederum ein inflammatorisches Umfeld und induziert die Expression von Aromatase [40, 53-55]. Es gibt also einen geschlossenen Kreis von positivem Feedback, welcher die Persistenz und Progression von EM-Läsionen trotz adäquater Behandlung erklären könnte.

Ein weiterer Unterschied zum gesundem Endometrium ist, dass die ER-Level in EM-Läsionen stark erhöht sind, wobei besonders der ER β signifikant häufiger vorhanden ist, was durch eine Hypomethylierung seiner Promotorregion hervorgerufen wird [51, 56]. Der Einfluss von Estrogen wirkt hier proliferatorisch und fördert eine Inflammation [56].

1.8. Progesteronrezeptor

Progesteron gehört zu den Gestagenen, ist also wie Estrogen ein Steroidhormon. Seine Produktion findet in der folliculären Phase im heranreifenden Follikel und in der Lutealphase im Corpus luteum statt. Daneben werden kleine Mengen in der Nebennierenrinde produziert.

Der molekulare Wirkmechanismus beruht auf der Bindung an eine der Isoformen des spezifischen Progesteronrezeptors (PR) PR-A oder PR-B. Beide Subtypen befinden sich im Nucleus und fungieren nach Bindung von Progesteron als Transkriptionsfaktor [52]. Die Rezeptoren sind sowohl in Epithel- und Stromazellen des Endometriums als auch in SMCs des Myometriums vorhanden [57]. Die beiden Rezeptortypen scheinen unterschiedliche Funktionen zu haben. Dabei scheint PR-B eine aktivierende Funktion auf die Progesteron Target-Gene zu haben, wohingegen PR-A als Repressor von PR-B wirkt [58, 59].

Physiologische Auswirkungen von Progesteron betreffen unter anderem den Uterus, der durch den hormonellen Einfluss auf eine mögliche Nidation vorbereitet wird. Dies beinhaltet das Wachstum des Myometriums und die Umwandlung des proliferatorischen Endometriums in sekretorisches Endometrium. Weiterhin wirkt Progesteron auf die Cervix und die Mammae und führt hier zu einer erhöhten Viskosität des Cervixschleimes und zum anderen zur gesteigerten Proliferation der Glandulae mammae.

Bei der EM sind die PRs von Bedeutung als funktionelle Gegenspieler der ERs. Sie wirken anti-inflammatorisch, inhibieren das durch Estrogen getriggerte Wachstum von EM und können es sogar rückgängig machen. Progesteron verursacht außerdem die Abnahme der ER-Synthese und stimuliert die Expression von HSD17B in Epithelzellen. Bei verminderten Progesteron-Leveln hingegen kommt es zur Gewebeinflammation [57, 60].

Allerdings wurde eine PR-Resistenz in EM-Läsionen festgestellt, wobei vor allem der PR-B erniedrigt ist [58]. Man nimmt an, dass dies verantwortlich für die erhöhten Estradiol-Spiegel bei EM ist, da durch den Mangel an PRs zu wenig HSD17B induziert wird und Estradiol somit nicht metabolisiert wird [60].

1.9. Peritoneum und Peritonealflüssigkeit

Das Peritoneum ist mit mehr als 2 m² die größte seröse Membran des menschlichen Körpers. Es gliedert sich in ein viszerales Blatt, welches die Organe als äußerste Schicht bedeckt und ein parietales Blatt, welches wiederum die Peritonealhöhle von innen auskleidet. Die peritonealen Blätter ermöglichen eine Verschiebung der Organe gegeneinander und einen Schutz der Organe vor schädlichen Einflüssen. Histologisch gesehen besteht das Peritoneum aus einschichtigem Plattenepithel, auch Mesothel genannt, welches einer Basallamina aufliegt. Darunter befindet sich lockeres Bindegewebe, das Blutgefäße, Lymphgefäße und Nerven führt. Zwischen den Mesothelzellen sind zum einen Desmosomen, die die Zellen zusammen halten und zum anderen Tight Junctions, welche den parazellulären Flüssigkeitstransport durch das Mesothel regulieren [61].

In der Peritonealhöhle existiert eine kleine Menge Peritonealflüssigkeit (PF). Sie hat ein Volumen von 5-20 ml, welches sich im Laufe des Zyklus verändert und die Reibung der peritonealen Oberflächen aneinander verringert [50]. Die PF wird hauptsächlich von ovariellm Exsudat, vom sich entwickelnden Follikel beziehungsweise (bzw.) später dem Corpus luteum und Plasmatrassudat gebildet [62, 63]. Auch bei manchen Männern konnten noch geringere Mengen an PF nachgewiesen werden [64]. Ihre Bestandteile sind unter anderem Wasser, Elektrolyte, Proteine, Leukozyten, Mesothelzellen, Makrophagen, Mastzellen und Fibroblasten [65]. Bei den meisten Frauen enthält die PF

während der Menstruation auch endometriale Zellen und Erythrozyten [66]. Bei Frauen mit EM wurden außerdem erhöhte Leukozytenzahlen sowie eine erhöhte Anzahl von aktivierten Makrophagen und deren Sekretionsprodukten wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und proangiogenetischen Faktoren in der PF nachgewiesen [50, 67]. Die PF wird im subdiaphragmatischen Raum über das Mesothelium durch das Interstitium in die lymphatischen Gefäße abgeleitet [65].

Die PF hat in der Peritonealhöhle eine klassische Verteilung. Schwerkraftbedingt befindet sie sich meist in tiefer gelegenen Lokalisationen wie dem Douglasraum. Durch negative intrakranielle Drücke bei der Inspiration und dem Einfluss der Peristaltik kommt es jedoch regelmäßig zu einem nach kranial gerichteten Fluss der PF. Dieser läuft über die parakolischen Rinnen. Dabei läuft der Großteil der PF über die rechte parakolische Rinne, da diese im Vergleich zur linken parakolischen Rinne tiefer und kontinuierlich ist. So erreicht die PF den subdiaphragmatischen Raum auf der rechten Seite und wird von dort über das inframesokolische Kompartiment zurück in die tiefer gelegenen Bereiche geleitet (siehe Abbildung 4) [68].

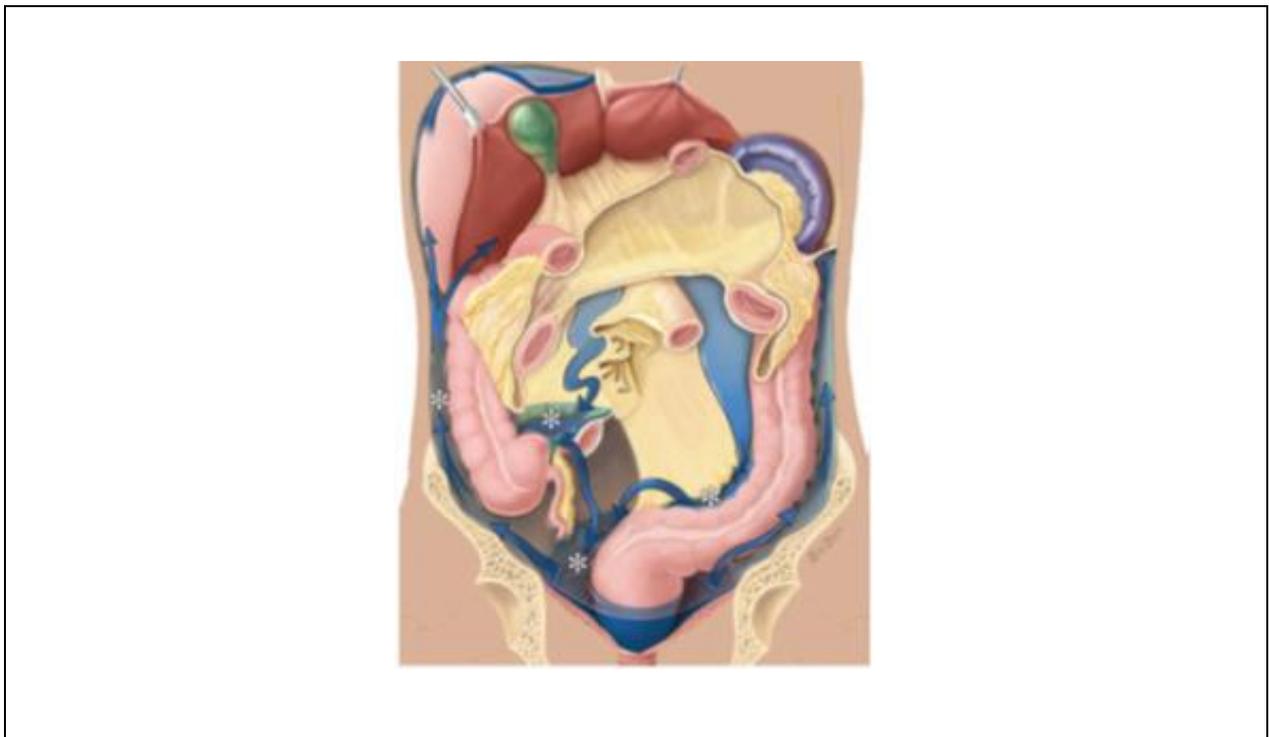


Abbildung 4: Bildliche Darstellung der Fließrichtungen der Peritonealflüssigkeit (PF) Reproduziert mit Genehmigung aus Levy, A.D., Shaw, J.C. and Sobin, L.H., Secondary tumors and tumorlike lesions of the peritoneal cavity: imaging features with pathologic correlation. Radiographics, 2009. 29(2): p. 347-73

Durch diese Zirkulation der PF in der Peritonealhöhle ergeben sich vier Stellen, an denen sie sich besonders häufig/lange befindet (in Abbildung 4 mit Sternchen gekennzeichnet): der Douglasraum, der rechte untere Quadrant an der Termination des Small bowel Mesenterium, der linke untere Quadrant am superioren Teil des Sigmoid-Mesocolons und die rechte parakolische Rinne [69]. Der relative Stillstand der PF in diesen vier Bereichen ermöglicht eine vermehrte Ansammlung von kranken Zellen oder Inflammationen an diesen Stellen [68]. Demnach könnten sich Zellen wie endometriale Drüsen- und Stomazellen der PF vor allem an diesen Stellen ins Peritoneum infiltrieren.

1.10. Verteilung der peritonealen Endometriose

Auf Grundlage der anatomischen Gegebenheiten in der Peritonealhöhle und der Annahme, dass die PF die EM begünstigt, könnte man davon ausgehen, dass sich pEM-Läsionen hauptsächlich im Douglasraum und häufiger auf der rechten Seite der Peritonealhöhle befinden. Im Becken sind pEM-Läsionen allerdings öfter auf der linken Seite zu finden und auch Endometriome sind meist links angesiedelt. Außerdem ist das Ausmaß der Beckenläsionen auf der linken Seite oft schwerer [70-73]. Das könnte daran liegen, dass der menstruelle Reflux länger im linken Hemipelvis verbleibt als im rechten, da die nahe anatomische Beziehung zwischen Sigmoid und linker Adnexe eine Barriere für den Fluss der menstruellen Zellen in der PF bildet [74]. Betrachtet man jedoch das abdominelle Peritoneum, so finden sich hier mehr pEM-Läsionen auf der rechten Seite, also vor allem in der rechten parakolischen Rinne [70, 75]. Aber auch die anderen Stellen, an denen die PF besonders lange stagniert, sind häufig von EM betroffen.

1.11. Okkulte mikroskopische Endometriose

EM hat viele verschiedene Erscheinungsformen, wie unter 1.4. beschreiben wurde. Neben den sichtbaren typischen und atypischen Läsionen gibt es jedoch auch noch „nicht sichtbare“ also „okkulte mikroskopische“ Endometriose (OME). Das Phänomen der OME wurde zum ersten Mal 1986 von Murphy et al beschreiben. Sie wurde definiert als das Auftreten von EM in makroskopisch unauffälligem Gewebe [76]. Auch wenn seitdem mehrere Studien zum Thema durchgeführt wurden, ist die klinische Bedeutung der OME

noch unklar. Einerseits könnte sie einen wichtigen Stellenwert in der Pathogenese der EM und somit Einfluss auf die Symptomatik und das klinische Outcome nach operativer und medikamentöser Therapie haben. Andererseits könnte die OME auch ein physiologisches Phänomen sein, bei dem endometriale Zellen zwar ins Peritoneum invasieren, jedoch nicht weiterwachsen und nach einer gewissen Zeit vom Immunsystem abgebaut werden.

1.12. Zielsetzung der Arbeit

Unter der Annahme, dass die Verbreitung der OME von der PF beeinflusst wird und mit dem Vorwissen über die typische Verteilung dieser in der Peritonealhöhle wurde peritoneales Gewebe aus der rechten und linken parakolischen Rinne von Frauen mit und ohne EM untersucht. Hierbei wurde Peritoneum aus makroskopisch unauffälligem Peritoneum für die Studie entnommen. Somit ergibt sich die erste Frage, ob es in makroskopisch unauffälligem Peritoneum OME gibt. Weiterhin stellt sich die Frage, ob die Annahme, dass die Verteilung der OME von der PF beeinflusst wird, stimmt und es somit zu einem Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens zwischen der rechten und linken parakolischen Rinne kommt. Um genaueres über die Eigenschaften der peritonealen Biopsien zu sagen, wurden bei allen Proben Färbungen mit Antikörpern (AK) gegen Bestandteile von Drüsenzellen, Stromazellen und Muskelzellen durchgeführt. Ein weiteres Anliegen dieses Vorgehens war es, Unterschiede zum einen in der Zusammensetzung des Peritoneums zwischen der rechten und linken parakolischen Rinne und zum anderen Unterschiede zwischen Frauen mit und ohne EM heraus zu arbeiten.

Ziel dieser Arbeit war es, durch immunhistochemische Untersuchung von OME-Läsionen genaueres über ihre Bedeutung heraus zu finden und somit eventuell Rückschlüsse auf die Entstehung der manifesten EM ziehen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Geräte	Hersteller
Dampfgarer MultiGourmet	Braun, Deutschland
Gefrierschrank, -20 °C	Liebherr, Deutschland
Kamera Canon Power Shot G5	Canon GmbH, Deutschland
Kühlschrank, 4 °C	Liebherr, Deutschland
Lichtmikroskop Axiophot 40 CLF	Carl Zeiss AG, Deutschland
Magnetrührer RCT basic IKAMAG	IKA-Werke, Deutschland
Mikrotom HM 400 R	MICROM International GmbH, Deutschland
Mikrowelle MW800G	Continent
pH-Meter 765	Knick, Deutschland
Pipetus®	Hirschmann, Deutschland
Präzisionswaage SE1501	VWR International
Reinstwassererzeuger Milli-Q biocal A10	Millipore, USA
Research Pipetten	Eppendorf Research, Deutschland
Tissue Cool Plate COP 20	Medite Medizintechnik, Deutschland
Vortexgerät Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Wärmeschrank, 34 °C	Memmert GmbH + Co. KG, Deutschland
Wärmebad	Medax, Deutschland

Tabelle 1: Verwendete Geräte

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläser, 24 x 50 mm	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Deutschland
Einweg-Pasteurpipette	Carl Roth, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf GmbH, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2 ml	Eppendorf GmbH, Deutschland
Filterpapier Whatman Grad 703 Blotting Paper	VWR International, USA
Mikrotom-Klingen	Feather, Japan
Objektträger Super Frost Plus	R. Langenbrinck, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Company, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.1.3. Lösungen und Chemikalien

Lösungen / Chemikalien	Hersteller
Antibody Diluent with Background Reducing Components	Dako Cytomation, Dänemark
Dako Pen	Dako Cytomation, Dänemark
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol (100%, 96%, 80%, 70%)	Merck KGaA, Deutschland
Fast Red Chromogen System	BioLegend, USA
Liquid Permanent Red	Dako Cytomation, Dänemark
HCl (37%)	Carl Roth, Deutschland
Kaisers Glyceringelantine	Merck KGaA, Deutschland
Mounting Medium	Sigma-Aldrich, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Deutschland
Natriumcitrat	Carl Roth, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Deutschland
Streptavidin-AP Conjugate	Roche Diagnostics, Schweiz
Trizma® Base	Sigma-Aldrich, USA
Trizma® Hydrochloride	Sigma-Aldrich, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, USA
Xylol	Carl Roth, Deutschland
Zitronensäure (C6H8O7)	Merck KGaA, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Lösungen und Chemikalien

2.1.4. Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Tris-Puffer (pH 7,4)	68,5 g Trizma Hydrochloride 8 g Trizma Base 87,8 g Natriumchlorid mit Aqua dest. auf 800 ml aufgefüllt und Einstellung auf pH 7,4 mit HCl/NaOH bis 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt
Citratpuffer (pH 6)	18 ml Lösung A 82 ml Lösung B 900 ml Aqua dest.
Lösung A	21,01 g Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇) in 1000 ml Aqua dest. aufgelöst
Lösung B	29,41 g Natriumcitrat (C ₆ H ₅ O ₇ N ₃) in 1000 ml Aqua dest. aufgelöst
Target-Retrival-Lösung (pH 9) (Target 9)	12,1 g Trizma Base 3,7 g EDTA 5 ml Tween 20 mit 1000 ml Aqua dest. aufgefüllt

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen

2.1.5. Software

Programm	Hersteller
ImageJ	GraphPad Software, Inc., USA
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, USA
Endnote	Thomson Research Software, USA
IBM SPSS Statistics	IBM SPSS, USA

Tabelle 5: Verwendete Software

2.2. Methoden

2.2.1. Auswahl des Patientenkollektivs

Die für diese Forschungsarbeit ausgewählten Frauen waren alle Patientinnen der Gynäkologie in der Charité Universitätsmedizin Berlin. Sie wurden im Zeitraum von 2013 bis 2016 laparoskopisch operiert. Die große Mehrheit dieser Operationen diente der EM-Resektion. Weitere Gründe für eine Operation waren andere gynäkologische Beschwerden oder diagnostische Zwecke. Dabei wurde Peritoneum von makroskopisch unauffälligen Bereichen der rechten und linken parakolischen Rinne des Peritoneums entnommen. Die Diagnosesicherung erfolgte an Geweben aus EM-Läsionen durch das Institut für Pathologie. Die Proben wurden nur mit Einverständniserklärung und gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin entnommen. Ausgeschlossen wurden jene Patientinnen, die zum Zeitpunkt der Operation peri- oder postmenopausal waren sowie die Frauen, von denen das entnommene peritoneale Gewebe nicht genauer definiert wurde. Letztendlich wurden somit 64 geeignete Patientinnen mit EM ausgewählt.

Für die Kontrollgruppe wurden Patientinnen ausgewählt, welche nicht an EM oder AM erkrankt sind. Das peritoneale Gewebe wurde hier vor allem bei laparoskopischen Myomnukleationen gewonnen. Da die Anzahl der Frauen, von denen sowohl aus der rechten als auch aus der linken parakolischen Rinne Gewebe entnommen wurde, sehr gering war, wurden auch Frauen ausgewählt, bei denen nur Gewebe aus einer der Rinnen entnommen wurde oder bei denen die Seite der Entnahmestelle nicht definiert wurde. Dadurch konnte die Anzahl der Kontrollgruppe auf 22 Patientinnen gesteigert werden.

Anhand der vorliegenden Angaben in den Akten konnten die Patientinnen näher klassifiziert werden (siehe 2.2.2. Tabelle 6).

2.2.2. Kategorisierung der Patientinnen

		Mit EM n (%)	Ohne EM n (%)
Anzahl		64	22
Alter	Mittelwert	29,9 Jahre	36,4 Jahre
	Spanne	18-47	18-50
Hormoneinnahme		24 (37,5)	4 (18,18)
Zyklusphase	Menstruation	7 (10,9)	0 (0)
	Proliferation	6 (9,4)	3 (13,64)
	Sekretion	14 (21,9)	3 (13,64)
	Kein Zyklus	24 (37,5)	4 (18,18)
	Unbekannt	13 (20,3)	12 (54,54)
Vorerkrankungen	Adenomyose	43 (67,2)	0 (0)
	Uterus myomatosus	9 (14,1)	12 (54,5)
	Sterilität	10 (15,6)	1 (4,5)
	Hypothyreose	8 (12,5)	4 (18,2)

Tabelle 6: Kategorisierung der Patientinnen

2.2.3. Immunhistochemische Färbungen

2.2.3.1. Anfertigung von Gewebeschnitten

Die Gewebeproben wurden bei Operationen entnommen, in Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Zunächst wurden Paraffinblöcke von 86 Patientinnen ausgewählt (22 Patientinnen ohne EM, 64 Patientinnen mit EM). Unter der Annahme, dass die PF links- und rechtsseitig spezifisch zirkuliert, wurden bei Patientinnen mit Endometriose

Biopsien aus der linken und rechten parakolischen Rinne entnommen, bei Patientinnen ohne EM wurden nur teilweise sowohl aus der linken als auch aus der rechten parakolischen Rinne Proben entnommen. Bei neun der nicht von EM betroffenen Frauen wurde Gewebe aus beiden Seiten entnommen, bei den dreizehn anderen Frauen ohne EM nur von einer Seite (siehe Tabelle 7).

Gruppe	Anzahl	Gewebeproben
Patientinnen mit EM	64	64 Proben parakolische Rinne links 64 Proben parakolische Rinne rechts
Patientinnen ohne EM	22	9 Proben parakolische Rinne links 11 Proben parakolische Rinne rechts 12 Proben parakolische Rinne ohne Seitenangabe

Tabelle 7: Gewebestücke der Vergleichsgruppen

Die Patientinnen mit EM wurden hauptsächlich zur Resektion der Läsionen bzw. Peritonektomie operiert, die Patientinnen ohne EM hingegen vor allem zur Myom- oder Zystennukleation.

Von den Paraffinblöcken wurden mithilfe eines Mikrotoms 2 µm dicke Schnittproben angefertigt. Diese wurden mit einem Pinsel aufgenommen und in ein 37 °C warmes Wasserbad gelegt, in dem sich das Paraffin entfalten konnte. Danach wurden die Schnitte mit einem beschrifteten Objektträger aus dem Wasserbad aufgenommen. Von jedem Paraffinblock wurden 8-10 Schnitte gemacht, so dass pro Block 8-10 Objektträger resultierten. Die Objektträger wurden über Nacht in einem Wärmeschrank bei 34 °C getrocknet und anschließend in Objektträgerkästen gelagert.

2.2.3.2. Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Die Schnitte wurden durch eine Xylol-Alkohol-Reihe entparaffinisiert. Dazu wurden sie je eine Minute in Xylol I, Xylol II, Ethanol 100 % (1), Ethanol 100 % (2), Ethanol 96 %, Ethanol 80 %, Ethanol 70 % und destilliertes Wasser getaucht.

2.2.3.3. Antigendemaskierung

Anschließend wurde bei den Schnitten eine Antigendemaskierung durchgeführt. Abhängig von ihren Data-Sheets wurden sie entweder in einen mit Target-Retrieval-Solution (pH 9) oder einen mit Citratpuffer (pH 6) gefüllten Behälter mit Küvetten einsortiert und für 20 Minuten im Dampfgarer gekocht (siehe Tabelle 8). Dieser Schritt dient der Lösung der durch die Paraffinisierung entstandenen Quervernetzungen der Proteine, wodurch die Erkennung der Epitope durch AK wieder ermöglicht wird. Danach wurden sie im Behälter für 15 Minuten auf Eis gestellt um sie abzukühlen.

2.2.3.4. Immunhistochemische Färbungen gegen Estrogen-Rezeptor alpha, Progesteronrezeptor sowie gegen Cluster of Differentiation 10, Cytokeratin und Anti Smooth Muscle Actin

Als Primär-AK zur Erkennung von endometriotischen Läsionen wurden ein ERa AK, ein PR AK, ein Anti Smooth Muscle Actin (ASMA) AK, ein CD10 AK sowie ein Cytokeratin AK verwendet. Alle Primär-AK wurden zusammen mit Antibody Diluent in einer spezifischen Verdünnung angesetzt (siehe Tabelle 8). Es wurden je 75 µl AK- Mischung auf eine Probe aufgetragen. Die Proben wurden eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Tris-Puffer gewaschen und jeweils mit dem passenden Sekundär-AK behandelt. Dieser wurde mit Antibody Diluent in einer Verdünnung von 1:400 angesetzt. Es wurden je 75 µl Sekundär-AK-Mischung auf die Proben aufgetragen. Nach weiteren 60 Minuten Inkubationszeit bei RT wurde erneut mit Tris-Puffer gewaschen und danach Streptavidin-AP auf die Schnitte pipettiert. Dies wurde in einer Verdünnung von 1:1000 mit Antibody Diluent gemischt und je 75 µl der Mischung pro Präparat verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei RT wurden die

Proben für nochmals 20 Minuten bei RT mit Fast Red Chromogen System oder SIGMAFAST Fast Red inkubiert. Folgend wurden die Präparate erneut mit Tris-Puffer gewaschen und anschließend für 20 Sekunden in Hämalan getaucht. Abschließend wurden die Proben für 5 Minuten unter laufendem Aqua dest. gewaschen und danach unter einer Lampe getrocknet. Im trockenen Zustand wurden sie mit einem Mounting-Medium oder Glyceringelantine (ASMA-Färbungen) fixiert.

Bei jeder immunhistochemischen Färbung wurden Negativkontrollen zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse durch unspezifische AK-Bindung mitgefärbt. Hierzu wurde der Primär-AK weggelassen. Als Positivkontrolle in den jeweiligen Färbungen wurden Gewebeproben von gesundem Endometrium und Myometrium genutzt.

Art des AK	Name des AK	Verdünnung	Puffer	Hersteller
primär	Ms anti- Progesteron- R Dako PgR	1:50	Citratpuffer	Dako, Dänemark
primär	Ms anti-ER-alpha 1D5	1:60	Target 9	Dako, Dänemark
primär	Ms ASMA abcam 1A4	1:50	Target 9	Abcam, UK
primär	Ms anti-CD10 ab951	1:50	Target 9	Dako, Dänemark
primär	Anti-Cytokeratin MNF116 Dako	1:50	Target 9	Dako, Dänemark
sekundär	Biotin-SP-conjugated AddiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG	1:400	-	Dianova, USA

Tabelle 8: Eigenschaften der verwendeten Antikörper (AK)

2.2.3.5. Mikroskopische Auswertung

Nachdem die Schnitte fixiert waren, wurden sie in verschiedenen Vergrößerungen (25x, 200x, 400x) ausgewertet. Jeder Gewebeschnitt wurde komplett auf das Vorhandensein von Drüsen- und/oder Stromazellen sowie Muskelzellen untersucht. Zum Nachweis von Drüsenzellen wurde nach positiven Zellen in der Cytokeratin-, Progesteron- und Estrogen-Färbung gesucht. Stromazellen hingegen in der CD10-Färbung und Muskelzellen wiederum der ASMA-Färbung. Die durchschnittliche Anzahl von Gefäßen wurde durch die Hot-Spot-Methode ermittelt, bei welcher die Gefäße in drei 1 mm² großen charakteristischen Stellen des jeweiligen Gewebeschnitts gezählt wurden und davon folglich der Durchschnitt gebildet wurde.

2.3. Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS analysiert. Es lagen ausschließlich metrische Variablen in unabhängigen Stichproben vor. Alle in der Auswertung miteinander zu vergleichenden Gruppen wurden auf Normalverteilung geprüft und danach der jeweils anzuwendende statistische Test bestimmt.

Beim Vorliegen von zwei Stichproben wurde um Unterschiede zu untersuchen sowohl für normalverteilte als auch für nicht normalverteilte Stichproben der Chi-Quadrat Test für kategoriale Größen und der Mann-Whitney-Test für kontinuierliche Größen durchgeführt. Der t-Test kam aufgrund der zu geringen Fallzahl nicht zum Einsatz.

Mit einem Signifikanzniveau von 95% galten p-Werte <0,05 als signifikant.

3. Ergebnisse

3.1. Immunhistochemische Charakterisierung peritonealer Endometriose-läsionen

Die immunhistochemisch angefärbten peritonealen Gewebeschnitte wurden auf Vorhandensein von Drüsen- und/oder Stromazellen ausgewertet. Eine Läsion wurde dann als OME angesehen, wenn mindestens eine Drüsenzelle oder ein Verband von Stromazellen im Gewebe gefunden wurde. Insgesamt wurden auf Grundlage dieser Definition 5 OME-Läsionen gefunden, was 5,81% der Patientinnen ausmacht. Drei dieser Läsionen enthielten mindestens eine Drüsenzelle, wobei in den anderen beiden Läsionen Verbände von Stromazellen vorhanden waren. Es gab einen Gewebeschnitt in dem mikroskopisch sichtbar sowohl Drüsen- als auch Stromazellen zusammen angesiedelt waren, histologisch ließen sich die Stromazellen jedoch nicht mit dem CD10 AK anfärben (siehe Abbildung 5). In Tabelle 9 sind die histologisch nachweisbaren Zellen der einzelnen OME-Läsionen zusammengefasst dargestellt.

OME-Läsion	01	02	03	04	05
Drüsenzellen	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein
Stromazellen	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja
SMCs	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein
Immunzellen	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Größe in µm	88 x 30	328 x 75	310 x 312	222 x 62	337 x 140

Tabelle 9: Zusammenfassung der histologisch nachweisbaren Zellen der okkulten mikroskopischen Endometriose (OME)-Läsionen

Vier der Läsionen befanden sich in der rechten parakolischen Rinne, die fünfte jedoch in der linken. Vier der Läsionen wurden bei Patientinnen mit makroskopischer EM gefunden, die fünfte jedoch in der parakolischen Rinne einer Patientin, bei welcher bisher keine EM diagnostiziert wurde. Für die Gruppe der Patientinnen mit EM macht dies einen Anteil von 6,3% aus und für die Kontrollgruppe einen Anteil von 4,5% (siehe Tabelle 10). Somit sind die manifest an EM erkrankten Frauen in dieser Stichprobe rein rechnerisch etwas häufiger betroffen. Es wurde eine statistische Auswertung mithilfe des Chi-Quadrat Tests durchgeführt. Diese Berechnung ergab einen p-Wert von 0,768 und zeigt somit keine statistische Relevanz der Auftretenswahrscheinlichkeit von OME zwischen den beiden Patientengruppen.

			EM		Gesamt
			Nein	Ja	
OME	Nein	Anzahl	21	60	81
		%	95,5%	93,8%	94,2%
	Ja	Anzahl	1	4	5
		%	4,5%	6,3%	5,8%
Gesamt	Anzahl		22	64	86
	%		100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 10: Anteil von okkulten mikroskopischer Endometriose (OME) betroffener Patientinnen mit und ohne Endometriose (EM)

Zwei der betroffenen Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme in der proliferativen Phase ihres Zyklus, eine hatte ihre Menstruation, eine weitere hatte aufgrund von OC keinen Zyklus. Bei der letzten betroffenen Patientin wurde der Zyklusstatus nicht dokumentiert. Das Alter der Patientinnen mit OME-Läsionen betrug im Mittel 35,4 Jahre. Alle vier EM-Patientinnen mit OME-Läsionen litten zusätzlich an AM, die Patientin ohne EM und die Patientinnen mit Stromazellen in den OME-Läsionen hatten einen Uterus myomatosus (UM). In Tabelle 11 sind die Charakteristika der Frauen mit OME zusammengefasst.

OME-Läsion	01	02	03	04	05
EM	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
Zyklusphase	Proliferativ	Menstruation	Keine Angabe	Proliferativ	Kein Zyklus
Hormoneinnahme	Nein	Nein	Nein	Nein	OC
Alter (Jahre)	45	38	45	36	25
Vorerkrankungen	UM	AM, sek. Sterilität	AM	AM, UM	AM
Seite	Rechts	Rechts	Rechts	Rechts	Links
Zellen in OME-Läsion	Drüsen	Drüsen	Drüsen	Stroma	Stroma

Tabelle 11: Charakterisierung der Patientinnen mit okkulten mikroskopischer Endometriose (OME)

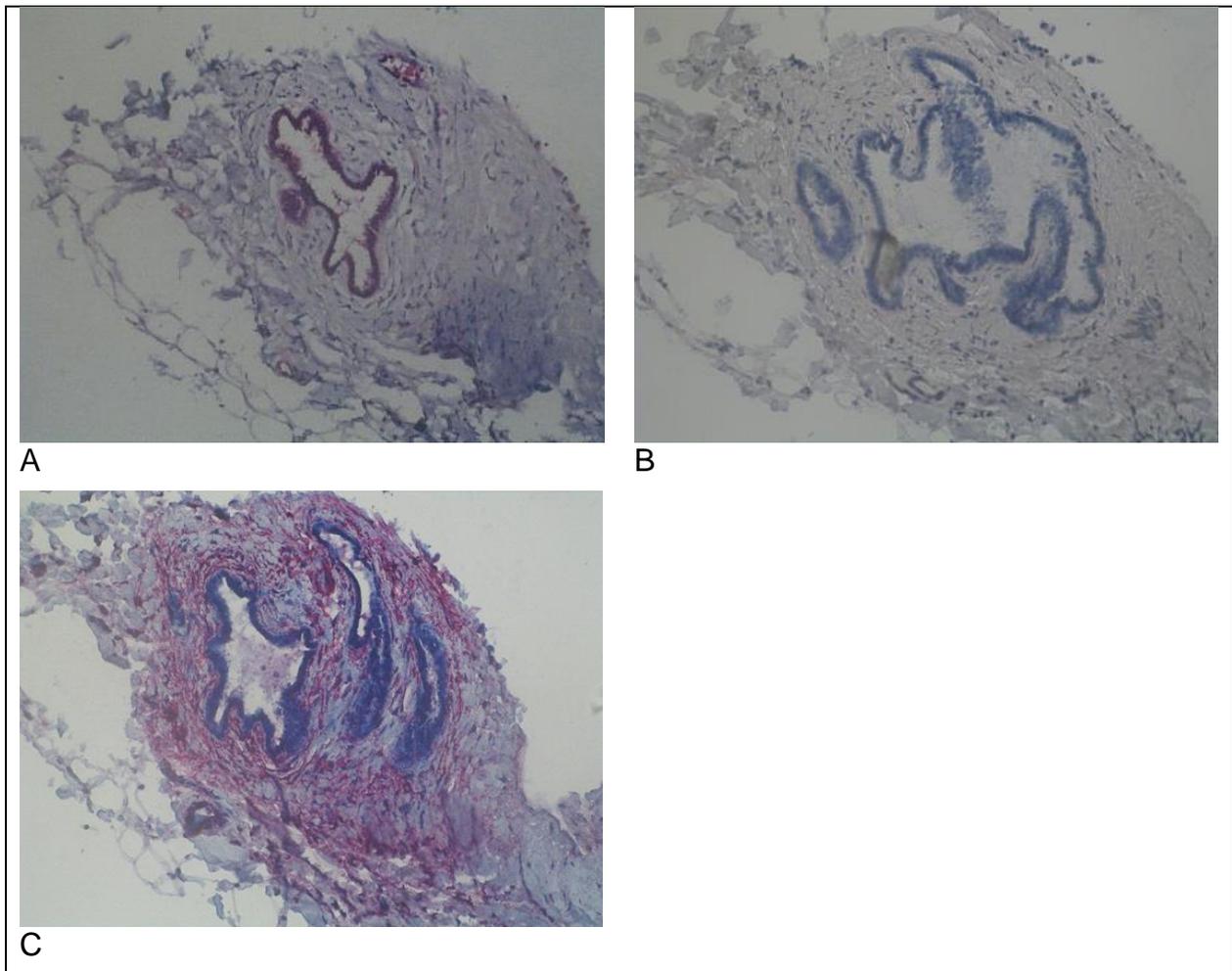


Abbildung 5: Bildliche Darstellung der okkulten mikroskopischen Endometriose (OME)-Läsion der Probe 03; (A) Cytokeratin-Färbung, (B) Cluster of Differentiation (CD)10-Färbung, (C) Anti Smooth Muscle Actin (ASMA)-Färbung; Aufnahme der Bilder in 200-facher Vergrößerung; © Mira Helene Luhmann

3.2. Bestimmung der Hormonrezeptorverteilung in Drüsenzellen

In Drüsenzellen des Endometriums wie auch in Drüsenzellen in EM-Läsionen finden sich unter anderem die Hormonrezeptoren ERa und PR. Dabei ist der ERa wichtig für Wachstum und Persistenz der Zellen und somit ein Marker für die Progression einer Läsion. Dahingegen bewirkt der PR eine Inhibition des durch ER getriggerten Wachstums und steht damit eher für die Regression einer Läsion. Um herauszufinden, ob die gefunden OME-Läsionen mit Drüsenanteilen eher progressiv oder doch eher regressiv sind, wurden die entsprechenden Schnitte mit AK gegen den ERa und den PR gefärbt. In Abbildung 6 sind diese Färbungen dargestellt.

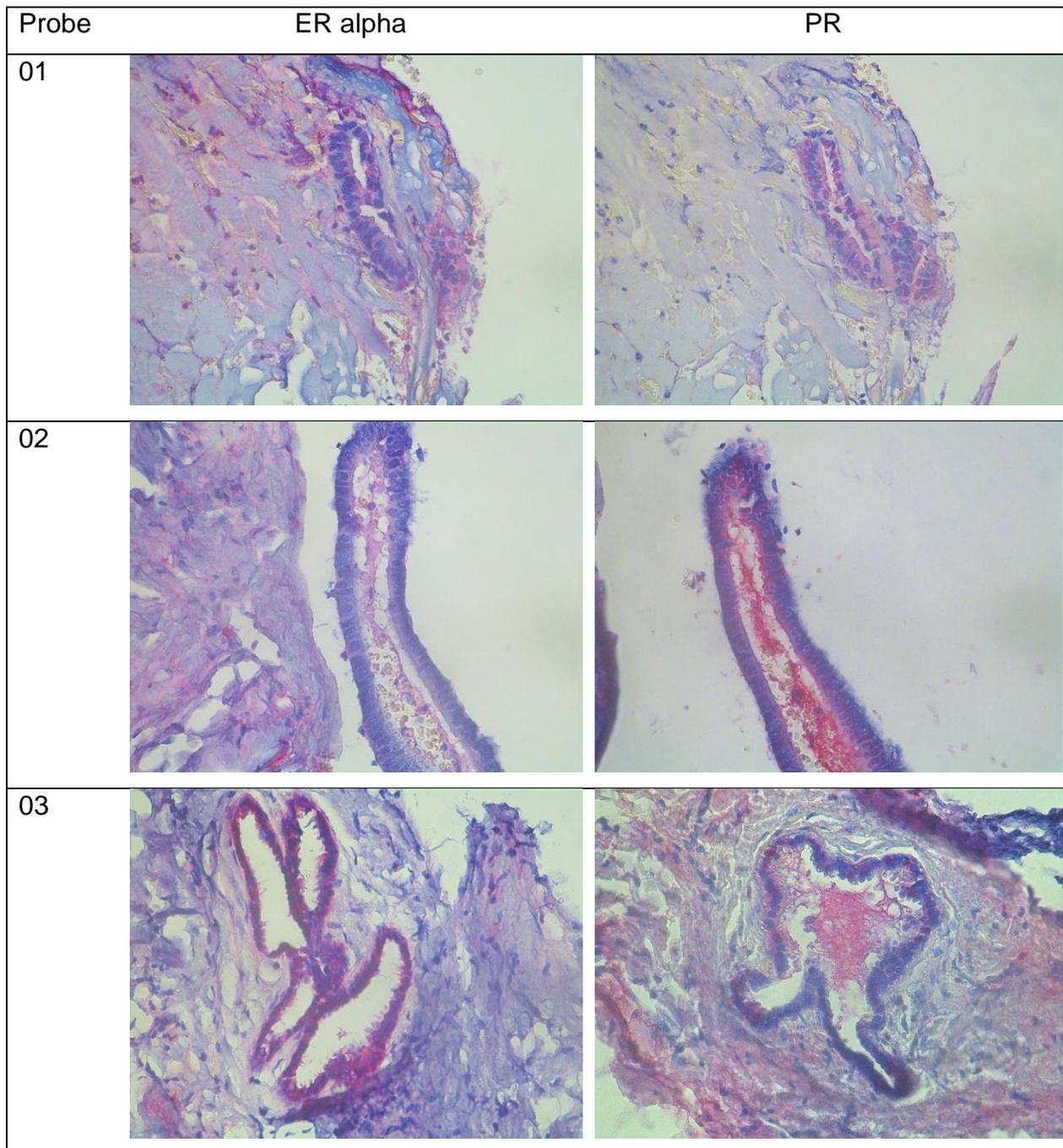


Abbildung 6: Bildliche Darstellung von Drüsenzellen der okkulten mikroskopischen Endometriose (OME)-Läsionen in Estrogen alpha (ERa)- und Progesteron (PR)-Färbung; 400-fache Vergrößerung; © Mira Helene Luhmann

Im Gegensatz zu Drüsenzellen des Endometriums ließen sich die Drüsenzellen der OME-Läsionen nur schlecht mit den Hormonrezeptor-AK anfärben. Vor allem unter dem Mikroskop kann man jedoch eine deutliche Tendenz zugunsten der PR erkennen. ERa ist hingegen in kaum einer Zelle nachzuweisen. Vergleicht man die OME-Läsionen der

Frauen mit und ohne EM bezüglich der Hormonrezeptorverteilung, lässt sich kein Unterschied feststellen.

3.3. Vorkommen von Cluster of Differentiation 10 positiven Immunzellen im Peritoneum

Zusätzlich zu den Stromazellen färbte der CD10 AK auch Immunzellen, welche sich im peritonealen Gewebe befanden. Insgesamt waren bei 12 Patientinnen Verbände von Lymphozyten und teilweise auch Granulozyten darstellbar (beispielhafte Darstellung siehe Abbildung 7). Bei einigen dieser Patientinnen waren außerdem Zeichen von Fibrose sichtbar. Alle diese Veränderungen zeigten sich ausschließlich bei Patientinnen mit EM. Es waren in der EM-Gruppe somit 18,8% der Patientinnen betroffen (siehe Tabelle 12). Der anhand eines Chi-Quadrat Tests ermittelte p-Wert von 0,029 zeigt eine statistische Relevanz dieses Ergebnisses. Keiner der Schnitte auf denen Immunzellen gefunden wurden, enthielt außerdem eine OME-Läsion.

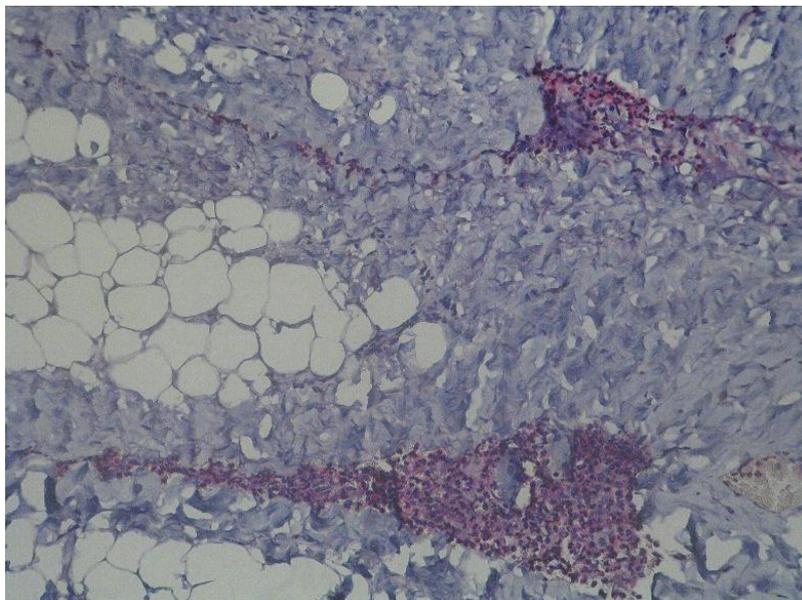


Abbildung 7: Bildliche Darstellung Cluster of Differentiation (CD)10 positiver Lymphozyten und Granulozyten in der linken parakolischen Rinne einer Patientin mit Endometriose (EM); 200-fache Vergrößerung; © Mira Helene Luhmann

		EM		Gesamt	
		Nein	Ja		
Immunezellen	Nein	Anzahl	22	52	74
		%	100,0%	81,3%	86,0%
	Ja	Anzahl	0	12	12
		%	0,0%	18,8%	14,0%
Gesamt		Anzahl	22	64	86
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 12: Anteil von Patientinnen mit Immunezellen im Peritonealgewebe

Innerhalb der EM-Gruppe wurden eine Tendenz zum häufigeren Auftreten von Immunezellen in der linken parakolischen Rinne gefunden (siehe Tabelle 13).

		EM		Gesamt		
		Nein	Ja			
Immunezellen	Nein	Anzahl	22	52	74	
		%	100,0%	81,3%	86,0%	
	Ja rechts	Anzahl	0	3	3	
		%	0,0%	4,7%	3,5%	
	Ja links	Anzahl	0	6	6	
		%	0,0%	9,4%	7,0%	
	Ja bds.	Anzahl	0	3	3	
		%	0,0%	4,7%	3,5%	
	Gesamt		Anzahl	22	64	86
			%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 13: Verteilung der Immunezellen

Fünf der Patientinnen bei denen Immunezellen im peritonealen Gewebe gefunden wurden, nahmen zum Zeitpunkt der Operation OC ein und hatten somit keinen Zyklus. Weitere fünf Patientinnen befanden sich in der sekretorischen Phase, die Zyklusphase der restlichen Frauen ist nicht bekannt.

Bezüglich der Vorerkrankungen der Frauen mit Immunzellen im Gewebe ließ sich feststellen, dass mit 83,3% mehr Frauen von AM betroffen waren als in der gesamten Kohorte der Frauen mit EM. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht relevant (Chi-Quadrat Test: $p = 0,186$) (siehe Tabelle 14).

			Immunzellen		Gesamt
			Nein	Ja	
AM	Nein	Anzahl	19	2	21
		%	36,5%	16,7%	32,8%
	Ja	Anzahl	33	10	43
		%	63,5%	83,3%	67,2%
Gesamt	Anzahl		52	12	64
	%		100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 14: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Immunzellen im Gewebe und Adenomyose (AM) als Vorerkrankung

Auch bezüglich der Sterilität in der Vorgeschichte der Frauen wurde diese häufiger bei Frauen mit entzündlichen Veränderungen im Gewebe gefunden. Jedoch ist der Unterschied auch hier statistisch nicht relevant (Chi-Quadrat Test: $p = 0,321$) (siehe Tabelle 15).

			Immunzellen		Gesamt
			Nein	Ja	
Sterilität	Nein	Anzahl	45	9	54
		%	86,5%	75,0%	84,4%
	Ja	Anzahl	7	3	10
		%	13,5%	25,0%	15,6%
Gesamt	Anzahl		52	12	64
	%		100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 15: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Immunzellen im Gewebe und Sterilität als Vorerkrankung

Im Gegensatz dazu wurden bei Frauen mit EM ohne entzündlich verändertes Gewebe im Peritoneum häufiger UM und Hashimoto in der Vorgeschichte gefunden. Die Ergebnisse sind jedoch für beide Erkrankungen nicht statistisch relevant (UM: Chi-Quadrat Test: $p = 0,527$; Hashimoto: Chi-Quadrat Test: $p = 0,628$) (Tabellen 16, 17).

			Immunezellen		Gesamt
			Nein	Ja	
UM	Nein	Anzahl	44	11	55
		%	84,6%	91,7%	85,9%
	Ja	Anzahl	8	1	9
		%	15,4%	8,3%	14,1%
Gesamt	Anzahl		52	12	64
	%		100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 16: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Immunezellen im Gewebe und Uterus myomatosus (UM) als Vorerkrankung

			Immunezellen		Gesamt
			Nein	Ja	
Hashimoto	Nein	Anzahl	51	12	63
		%	98,1%	100,0%	98,4%
	Ja	Anzahl	1	0	1
		%	1,9%	0,0%	1,6%
Gesamt	Anzahl		52	12	64
	%		100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 17: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Immunezellen im Gewebe und Hashimoto als Vorerkrankung

3.4. Vorkommen und Verteilung von Gefäßen im Peritoneum

Um heraus zu finden, ob der Prozess der Neoangiogenese im Rahmen einer entzündlichen Reaktion im Gewebe auch bei OME-Läsionen eine Rolle spielt, wurden alle Gewebestücke dieser Studie auf die Anzahl der vorhandenen Gefäße untersucht. Um dabei die Größendifferenz der Proben zu berücksichtigen, wurde die Gefäßdichte mittels der Hot-Spot-Methode ermittelt. Somit wurde die jeweilige Dichte der Gefäße pro 1 mm^2 berechnet. Nimmt man alle Frauen zusammen, so kommt man auf eine durchschnittliche Dichte von 1,69 Gefäßen pro mm^2 .

Vergleicht man alle Proben der Frauen mit EM mit denen der Frauen ohne EM, so haben Frauen mit EM mit 1,74 Gefäßen pro mm^2 etwas mehr als Frauen ohne EM mit 1,66 Gefäßen pro mm^2 . Dieser Unterschied ist jedoch mit einem anhand eines Mann-Whitney U Tests ermittelten p-Werts von 0,519 statistisch nicht relevant (siehe Abbildung 8).

Untersucht man die Seitendifferenz, so haben sowohl Frauen mit als auch Frauen ohne EM durchschnittlich etwas mehr Gefäße auf der linken als auf der rechten Seite. Bei Patientinnen mit EM sind es in der linken parakolischen Rinne durchschnittlich 1,8 Gefäße pro mm^2 , wohingegen es auf der rechten 1,67 Gefäße pro mm^2 sind. Bei Frauen ohne EM ist der Unterschied mit links 2,15 Gefäße pro mm^2 und rechts 1,26 Gefäße pro mm^2 noch deutlicher.

Vergleicht man die Proben der OME-Läsionen mit dem Gesamtdurchschnitt, so liegt die Dichte der Gefäße mit 1,24 pro mm^2 darunter. Im Gegensatz dazu liegen Proben mit enthaltenen Immunzellen mit einer mittleren Gefäßdichte von 2,64 pro mm^2 über dem Gesamtdurchschnitt. Aufgrund der kleinen Anzahl an Proben ist eine statistische Auswertung in diesen Fällen jedoch nicht sinnvoll.

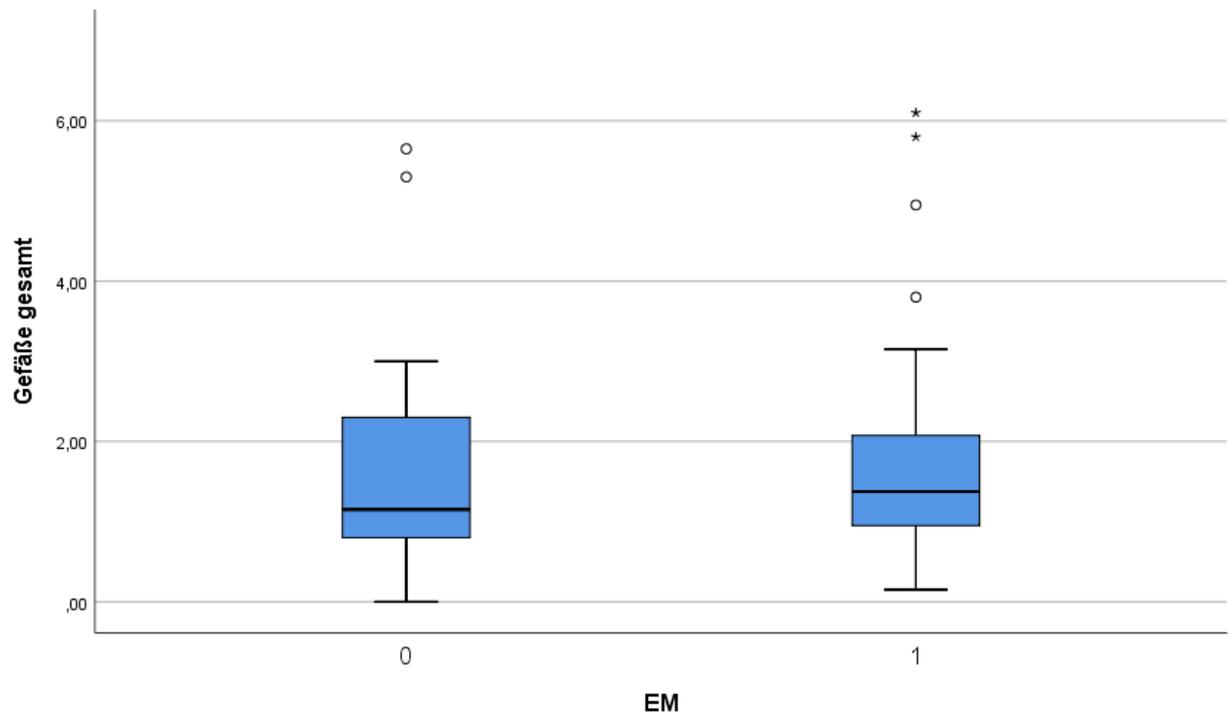


Abbildung 8: Graphische Darstellung des Vergleichs der Gefäßanzahl pro mm² bei Frauen ohne (0) und mit (1) Endometriose (EM)

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung bisheriger Forschungsergebnisse

Erstmalig wurde das Konzept der OME durch Murphy et al (1986) beschrieben. Die Gruppe um Murphy führte eine Studie mit 20 Patientinnen durch, welche alle an EM erkrankt waren. Diesen Frauen wurden 1-3 cm große Gewebestücke aus dem cul-de-sac entnommen und anschließend fixiert und bearbeitet. Das Ergebnis war ein Auftreten der OME bei 25% der Frauen [77]. Dies ist die höchste Prävalenz von OME, die je gefunden wurde [76]. Jedoch muss bedacht werden, dass der cul-de-sac eine bevorzugte Prädilektionsstelle von EM ist und man somit vor allem auch in Anbetracht der schlechteren Visualisierung und Bedingungen im OP zu der Zeit nicht ausschließen kann, dass es sich bei den im entnommenen Gewebe vorhandenen Läsionen doch auch um typische EM-Läsionen handeln könnte. Murphy selbst hatte die Theorie, dass es sich bei den Läsionen nicht um neue EM handelte, sondern um postoperativ zurückgebliebene, persistierende EM-Läsionen, welche in vorangegangenen Therapieversuchen nicht gänzlich entfernt wurden.

Die chronologisch nächste Studie zum Thema stammt von D. B. Redwine (1988), in welcher er unauffälliges Gewebe von 33 Patientinnen aus dem posterioren Beckenperitoneum untersuchte. Alle diese Frauen hatten präoperativ einen Verdacht auf EM, histologisch konnte jedoch nur bei 24 der Patientinnen (entsprechend 72,7%) die Diagnose gesichert werden. OME-Läsionen wurden im Rahmen dieser Studie bei keiner einzigen Patientin gefunden [78]. Auf Grundlage seiner Studie behauptete Redwine nun, dass es keine OME-Läsionen gäbe.

Zwei Jahre später stellte Redwine jedoch gemeinsam mit Yocom erneut eine Studie zum Thema auf (Redwine und Yocom 1990). Diesmal hatte er sein Patientinnenkollektiv auf 59 Frauen erweitert. Bei 45 dieser Patientinnen waren makroskopisch EM-Läsionen sichtbar, bei 10 weiteren gab es jedoch keinen Anhaltspunkt für EM. Die restlichen vier Patientinnen wurden aus der Studie ausgeschlossen. Somit wurden deren Befunde nicht mit im Ergebnis berücksichtigt. Es wurde Gewebe aus dem cul-de-sac, dem Ligamentum uterosacrale und dem Ligamentum latum entnommen und nach der Fixierung mit Hämalaun-Eosin angefärbt. Diesmal wurden in drei Gewebestücken Drüsenzellen gefunden. Zwei dieser Läsionen fanden sich bei Patientinnen mit EM (4,4% der Frauen

mit EM), die dritte hingegen wurde bei einer Patientin ohne EM gefunden (10% der Frauen ohne EM) [79]. Somit fand Redwine diesmal eine Bestätigung für Murphys Konzept der OME und fand diese sogar anteilig häufiger bei Patientinnen ohne makroskopische EM.

Im selben Jahr veröffentlichte eine weitere Arbeitsgruppe Ihre Ergebnisse zum Thema der OME. Die Gruppe um Nisolle et al (1990) untersuchten 118 Patientinnen, welche alle an Infertilität litten. Bei 86 Frauen konnten intraoperativ makroskopische EM-Läsionen identifiziert werden, bei den restlichen 32 war dies nicht der Fall. Allen Patientinnen wurden Biopsien aus visuell normalem Peritoneum des Ligamentum uterosacrale entnommen. Die mikroskopischen Kriterien für OME sind hier die Präsenz von Drüsen- und Stromazellen. So waren 13% der Patientinnen mit EM und 6% der Patientinnen ohne EM von OME-Läsionen betroffen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch relevant. Die Größe der hier gefundenen Läsionen belief sich auf 313 +/- 185 µm [80].

Ein Jahr später kamen die Forschungsergebnisse zur OME der Gruppe um Nezhat et al (1991) heraus. In dieser Studie gab es drei Gruppen von Patientinnen: Die erste Gruppe bestand aus 20 Patientinnen mit histologisch nachgewiesener EM, die zweite Gruppe aus 56 Patientinnen mit klinischer und/oder histologischer Diagnose EM, die dritte Gruppe war die Kontrollgruppe und bestand aus 36 Patientinnen ohne EM. Den Patientinnen aus den Gruppen 1 und 2 wurden Biopsien in 3-5 cm Entfernung von (vermeintlichen) EM-Läsionen aus unauffälligem Peritoneum entnommen. Auch den Patientinnen aus Gruppe 3 wurde Gewebe aus unauffälligem Peritoneum biopsiert. Die Gewebestücke hatten eine Größe von 0,2 bis 0,8 cm. In der ersten Gruppe wurde bei einer Patientin eine Läsion mit der Größe von 0,7 x 0,8 x 1 cm³ gefunden, welche Drüsen- und Stromazellen enthielt. In der gleichen Gruppe wurden zwei weitere reine Stromazellläsionen gefunden, welche 0,2-0,3 cm groß waren [81]. Der Anteil der betroffenen Patientinnen der Frauen der ersten Gruppe betrug somit 15%, in der zweiten Gruppe der Frauen mit EM betrug sie jedoch 0%. Auch in der Gruppe der Patientinnen ohne EM wurde kein Fall von OME gefunden.

Balash et al (1996) untersuchten wenige Jahre später 100 Frauen mit unterschiedlichen Beschwerden: 52 litten an Infertilität, 30 hatten den Wunsch nach einer tubaren Sterilisation und 18 hatten chronische Unterleibsschmerzen. Allen Patientinnen wurden Biopsien von visuell normalem Peritoneum aus dem Ligamentum sacrouterinum entnommen. Die Gewebestücke waren maximal 3-4 mm groß und wurden nach der

Entnahme sofort fixiert und später mittels Hämalaun-Eosin eingefärbt. In dieser Studie wurden bei 11% der Patientinnen mit EM und bei 6% der Patientinnen ohne EM OME-Läsionen gefunden [82].

Die neueste Studie, die sich mit dem Auftreten der OME beschäftigt, stammt von Kahn et al (2014). Diese Studie hatte mit insgesamt 213 Patientinnen das größte Kollektiv. 151 dieser Frauen waren an EM erkrankt, die anderen 62 litten an anderen gynäkologischen Beschwerden. Den Frauen wurde intraoperativ Gewebe aus verschiedenen anatomischen Lokalisationen entnommen: Douglas Raum, Uterovesikaler Raum sowie rechtes und linkes Ligamentum uterosacrale. Es wurden drei verschiedene Formen von OME-Läsionen gefunden: typische Drüsen- oder Stromazellen, endometriotische Epithelzellen umrandet von Stromazellen und epitheliale zystische Läsionen umrandet von Stroma. In beiden Gruppen war die häufigste betroffene Lokalisation der uterovesikale Raum und das linke Ligamentum sacrouterinum war etwas häufiger betroffen als das rechte. Insgesamt waren 15,2% der Frauen mit EM und 6,4% der Frauen ohne EM von OME-Läsionen betroffen. In dieser Studie wurde außerdem auch mit AK gegen den PR und ER gefärbt. Das Ergebnis ist ähnlich dem dieser Studie: Die Expression des PR war in den gefundenen OME-Läsionen höher als die des ER [83].

Insgesamt sind sich alle Autoren der vorgestellten Studien einig, dass sich das Konzept von Murphy et al (1986) über das Vorhandensein vom OME bestätigt. Dabei wurde deutlich, dass die OME in fast allen Studien häufiger bei Frauen auftrat, die ohnehin schon an EM erkrankt waren. Die Studie von Redwine und Yocom (1990), in welcher der Anteil an betroffenen Frauen ohne EM höher als der Anteil betroffener Frauen mit EM war, hatte jedoch mit nur 10 Patientinnen eine kleine Kontrollgruppe, wodurch die Aussagekraft eingeschränkt ist. Nichts desto trotz war die Differenz zur jeweils anderen Gruppe in keiner der Studien statistisch relevant. Lässt man die ersten beiden Studien zum Thema von Murphy et al (1986) und Redwine (1988) außen vor, so lässt sich sagen, dass sich die Ergebnisse, die in einem Zeitraum von fast 25 Jahren zustande kamen, sehr stark ähneln. Und mit Ausnahme von Nezhat et al (1991) waren auch jeweils Frauen ohne EM von OME betroffen (siehe Tabelle 18).

Autor/en	Jahr	Operation	Lokalisation entnommener Gewebestücke	OME Häufigkeit Patientinnen mit EM	OME Häufigkeit Patientinnen ohne EM
Murphy et al	1986	Laparotomie	Cul-de-sac	25%	-
Redwine	1988	Laparoskopie	Posteriores Beckenperitoneum	0%	0%
Redwine, Yocom	1990	Laparoskopie	Cul-de-sac, Ligamentum uterosacrale, Ligamentum latum	4,4%	10%
Nisolle et al	1990	Laparoskopie	Ligamentum unterosacrale	13%	6%
Nezhat et al	1991	Laparoskopie	Peritoneum, 3-5 cm Entfernung von EM-Läsionen	15% (Gruppe 1) bzw. 0% (Gruppe 2)	0%
Balash et al	1996	Laparoskopie	Ligamentum sacrouterinum	11%	6%
Kahn et al	2014	Laparoskopie	Douglas Raum, Uterovesikaler Raum, Ligamentum uterosacrale	15,2%	6,4%
Luhmann, Mechsner	2020	Laparoskopie	Linke und rechte parakolische Rinne	6,3%	4,5%

Tabelle 18: Zusammenfassung der Ergebnisse der Studien zur okkulten mikroskopischen Endometriose (OME)

Auch wenn die im Rahmen dieser Arbeit gefundene Häufigkeit von OME-Läsionen nicht im relevanten Maße geringer ist als bei Nisolle, Balash und Kahn, gibt es Gründe, die den Unterschied erklären könnten. Es wurden zwar mit Ausnahme der Studie von Murphy et al (1986) ebenfalls Laparoskopien durchgeführt, die Technik und Auflösung haben sich

aber auch in den letzten Jahren noch stark verbessert, so dass die Detektion von EM-Läsionen im Vergleich zu unauffälligem Peritoneum deutlich einfacher geworden ist. Im Gegensatz zu den anderen Studien werden hier außerdem Proben aus den parakolischen Rinnen untersucht. Alle anderen Studiengruppen entnahmen dahingegen Proben aus dem kleinen Becken, in welchem die Auftretenswahrscheinlichkeit von EM-Läsionen bekanntlich am höchsten ist [6]. Zwar ist auch die rechte parakolische Rinne eine Prädilektionsstelle, jedoch ist sie deutlich seltener betroffen als der Douglas Raum und die Ligamentae uterosacrales und latum, welche in den anderen Studien untersucht wurden [68, 84]. Außerdem waren die Gewebestücke in dieser Studie teilweise sehr klein (ca. 2 x 2 mm²), wohingegen zum Beispiel Murphy et al (1986) Proben mit einer Größe von 1-3 cm untersuchte [79].

4.2. Bedeutung der okkulten mikroskopischen Endometriose

Die möglichen Bedeutungen der OME sind wie folgt: Die eine Möglichkeit ist, dass die OME eine Vorstufe einer „richtigen“ EM-Läsion ist. Somit wäre sie involviert in die Entstehung und potentiell auch Persistenz und das Wiederkehren von EM nach zunächst erfolgreicher Behandlung. Nach der zweiten Möglichkeit ist sie ein physiologischer Vorgang bei dem sich Zellen des Endometriums im Peritoneum ansiedeln und später jedoch wieder durch das Immunsystem abgebaut werden. Dies würde bedeuten, dass es nicht zu Größenprogredienz der OME-Läsionen und somit nicht zur Entstehung einer „richtigen“ EM-Läsion kommt.

Auf der einen Seite wären OME-Läsionen eine mögliche Erklärung für die Tatsache, dass bei bis zu 50% der Patientinnen, die sich einer operativen EM-Resektion unterzogen haben, nach 5 Jahren ein Rezidiv an Beschwerden und „neue“ EM-Läsionen zu finden sind [36, 85]. So könnten sich die OME-Läsionen, welche während der OP nicht erkannt wurden und zurückblieben also postoperativ weiterentwickeln und das vermeintliche Rezidiv verursachen. Auch die Meinung von Kahn et al (2014), dass OME-Läsionen biologisch aktiv sind und Wachstumspotential haben, würde diese Theorie unterstützen [83].

Andererseits spricht die Tatsache, dass die Prävalenz von OME bei Frauen mit und ohne EM nahezu gleich ist eher dafür, dass OME-Läsionen keinen Einfluss auf die Entstehung

von EM haben oder nur im Zusammenhang mit weiteren Einflussfaktoren, welche noch nicht abschließend geklärt sind. Weiterhin ist auch das Überwiegen der PRs gegenüber der ERs in den gefundenen OME-Läsionen ein Indiz dafür, dass sich diese nicht zu größeren „richtigen“ EM-Läsionen entwickeln [57, 60]. Der in einigen Zellen gefundene PR steht für eine Inhibierung des durch Estrogen getriggerten Wachstums von EM und kann dieses teilweise sogar rückgängig machen [57]. Der dahingegen nur in wenigen Zellen gefundene ER wäre für eine Inflammation des Gewebes und ein Wachstum der Läsion verantwortlich [56]. Ähnliche Beobachtungen machten Kahn et al (2014) in ihren gefundenen OME-Läsionen.

4.3. Verteilung der okkulten mikroskopischen Endometrioseläsionen

Wie bereits anfänglich beschrieben sind EM-Läsionen im abdominellen Peritoneum, im Gegensatz zum kleinen Becken, häufiger auf der rechten Seite angesiedelt [70]. Dies trifft auch in unserer Studie zu. Die OME-Läsionen waren im Verhältnis von 4:1 (rechts: links) in den parakolischen Rinnen verteilt. Dieses Ergebnis kann vorerst darauf schließen lassen, dass die Entstehung der Läsionen durch den Einfluss der PF, ihrer Zusammensetzung und ihrer Fließrichtungen begründet oder zumindest gefördert wird [67-69]. So könnte man an dieser Stelle entweder die Theorie von Sampson unterstützen und sagen, dass durch retrograde Menstruation endometriale Zellen in die PF gelangen und sich im Laufe ihrer Zirkulation ans Peritoneum anheften oder annehmen, dass in der PF enthaltene Wachstums-, Angiogenese- und Entzündungsfaktoren die Entstehung von OME-Läsionen fördern [37, 50, 67]. Im Gegensatz dazu waren die entzündlich veränderten Gewebestücke häufiger auf der linken Seite zu finden. Fraglich ist dabei, ob diese immunologischen Prozesse im Zusammenhang zu ehemaligen OME-Läsionen stehen oder ob sie einen anderen Hintergrund haben. Sollten sie die Überbleibsel alter OME-Läsionen sein, so wäre die gefundene rechtsbetonte Seitendifferenz aufgehoben und sogar in das Gegenteil umgekehrt. Dies würde bedeuten, dass die Verteilung der OME-Läsionen nicht der von makroskopisch sichtbaren EM-Läsionen gleicht. Damit könnte sich auch ein völlig anderer Entstehungsmechanismus ergeben. Allerdings wurden bei keiner der OME-Läsionen Entzündungszellen gefunden, so dass der Abbau über entzündliche Prozesse nur Spekulation ist. Die gefundenen Entzündungszellen

könnten also auch einfach für ein allgemein inflammatorisch verändertes Peritoneum zum Beispiel im Rahmen von entzündlich veränderter PF stehen [86].

4.4. Vergleich des Peritoneums von Frauen mit und ohne Endometriose

4.4.1. Vorkommen von Immunzellen

Im Vergleich der vorhandenen Zellen in den parakolischen Rinnen von Frauen mit und ohne EM wurde deutlich, dass Immunzellen nur in Gewebeproben von Patientinnen mit EM zu finden waren. Dies spricht für eine besondere Situation im Gewebe von Frauen mit EM. Die Immunzellen waren jedoch nicht in Gewebeproben zu finden, in denen sich OME-Läsionen befanden. Dahingegen waren sie aber mit einer verstärkten Durchblutung des Gewebes assoziiert. Die Verbände von Immunzellen könnten ein Ausdruck der inflammatorischen Reaktion im Rahmen von EM- und OME-Läsionen sein, die durch das Immunsystem beseitigt wurden. Da sie jedoch tendenziell häufiger auf der linken Seite zu finden waren und die OME-Läsionen sowie auch normale EM-Läsionen vor allem in der rechten parakolischen Rinne angesiedelt sind, kann man davon ausgehen, dass das gesamte peritoneale Gewebe von Frauen mit EM vermehrt von Immunzellen und Entzündungsprozessen durchsetzt ist. Der Entzündungsstatus scheint also nicht abhängig vom Fluss der PF zu sein. Die Frage, ob das Peritoneum durch die EM entzündlich verändert wird oder ob das Peritoneum durch seine entzündliche Eigenschaft ein höheres Risiko für das Auftreten von EM hat, bleibt vorerst offen. Jedoch standen fünf Frauen mit entzündlich verändertem Gewebe zum Zeitpunkt der Operation unter dem Einfluss von OC. Diese Medikation kann eine Progredienz der EM-Läsionen verhindern und die Symptomatik verbessern. Jedoch ist dies nicht bei allen Patientinnen die OC einnehmen der Fall und häufig kommt es nach Absetzen der Tabletten zu schnellen Rezidiven der Beschwerden [28, 32]. Das könnte also daran liegen, dass das Peritoneum zwar weniger stark von EM-Läsionen durchsetzt ist, es jedoch weiterhin allgemein entzündlich verändert ist und somit eventuell die Neubildung oder erneutes Wachstum von zurückgegangenen Läsionen fördert.

Im Zusammenhang mit den entzündlich veränderten Bereichen von Frauen mit EM wurde ebenfalls die Häufigkeit des Auftretens von Vorerkrankungen untersucht. Besonders häufig traten dabei AM und Sterilität auf. Beide Erkrankungen sind bekanntlich mit

vermehrter entzündlicher Aktivität vergesellschaftet und somit kein überraschendes Ergebnis. AM ist ebenso wie EM eine chronisch entzündliche Erkrankung, die jedoch eigentlich durch den Befall des Uterus definiert ist [87]. Nichts desto trotz könnte sie natürlich die entzündlichen Prozesse im Rahmen einer EM noch unterstützen und zu vermehrter entzündlicher Aktivität vornehmlich im Peritoneum führen. Die vermehrte Komorbidität mit Sterilität könnte jedoch eine direkte Folge der Entzündungsprozesse sein, da Sterilität z.B. durch Chlamydien oder andere aufsteigende urogenitale Infektionen bedingt sein kann, welche dann das gesamte Peritoneum betreffen können [88, 89]. Die Ergebnisse zeigten zwar jeweils keine statistisch relevanten Unterschiede, geben jedoch eine gewisse Tendenz an.

4.4.2. Anzahl der Gefäße

Die Pathogenese von EM wird bekanntlich durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) beeinflusst [90]. Der Wachstumsfaktor führt zur verstärkten Durchblutung des von EM durchsetzten Gewebes und fördert dadurch die Progredienz der Läsionen [16]. Um zu untersuchen, ob auch OME-Läsionen mit einer verstärkten Durchblutung des Peritoneums einhergehen und ob es Unterschiede in der Gefäßdichte zwischen Frauen mit und ohne EM gibt, wurde die Gefäßdichte jedes Gewebestücks mittels der Hot-Spot-Methode ermittelt. Insgesamt gab es keinen statistisch relevanten Unterschied in der Gefäßdichte zwischen Frauen mit und ohne EM. Auch in den Gewebestücken, in denen sich OME-Läsionen befanden, konnte keine relevant vermehrte Gefäßdichte gefunden werden. Sie scheinen also nicht mit Neoangiogenese assoziiert zu sein. Im Gegenteil: diese Peritonealschnitte waren eher unterdurchschnittlich stark mit Gefäßen durchsetzt. Das könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass sich OME-Läsionen von EM-Läsionen unterscheiden und sie nicht auseinander hervorgehen. Im Gegensatz zu den Proben mit OME-Läsionen wurde in Proben mit Immunzellen jedoch eine verstärkte Durchblutung gefunden, was zu einer typischen Entzündungsreaktion passt.

5. Zusammenfassung

EM ist eine der häufigsten Erkrankungen in der Gynäkologie. Die Symptomatik ist sehr heterogen, unspezifisch und besteht vorwiegend aus Dysmenorrhoe, Schmerzen im Beckenbereich und Sub- bis Infertilität. Die Schwere der Symptomatik korreliert dabei jedoch nicht mit der Ausbreitung der Erkrankung. Diese beiden Faktoren erschweren die Diagnostik und resultieren oft darin, dass Frauen einige Jahre mit den Beschwerden leben müssen bis EM entdeckt wird. Der Goldstandard der Diagnostik ist die explorative Laparoskopie, bei welcher auch direkt interventionell eingegriffen und sichtbare Läsionen abgetragen werden können. Jedoch gibt es auch Läsionen, die aufgrund ihrer minimalen Größe während eines solchen Eingriffs nicht identifiziert werden können. Das Auftreten und die eventuelle Bedeutung dieser OME sowie Unterschiede im peritonealen Gewebe von Frauen mit und ohne EM wurde in dieser Arbeit untersucht.

Sowohl bei Frauen mit, als auch bei Frauen ohne EM wurden einige wenige Fälle von OME detektiert. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied der Auftretenshäufigkeit zwischen den beiden Kohorten. Ein wichtiger signifikanter Unterschied im peritonealen Gewebe von Frauen mit EM im Vergleich zu dem von Frauen ohne EM war das Auftreten von Immunzellen, welche nur bei Frauen mit EM gefunden wurden. Es wurden sowohl Lymphozyten als auch Granulozyten gefunden, welche jedoch in dieser Studie in keinem Fall mit einer OME-Läsion assoziiert waren. Zudem hatten diese Gewebeproben eine erhöhte durchschnittliche Gefäßanzahl, was sich gut mit einer Entzündungsreaktion vereinbaren lässt. Dieses Ergebnis war zwar nicht signifikant, es zeigt jedoch eine gewisse Tendenz.

Da OME sowohl in Gewebeproben von Frauen mit als auch in Gewebeproben von Frauen ohne EM auftritt, ist es wahrscheinlich, dass sie ein physiologisches Phänomen darstellt, bei dem sich endometriale Zellen im Peritoneum ansiedeln und anschließend vom Immunsystem beseitigt werden. Auch der Hormonrezeptorstatus mit einem Überwiegen der PR über die ER dieser Läsionen spricht für diese Theorie.

Bezüglich der Kausalität der entzündlichen Veränderungen im peritonealen Gewebe von Frauen mit EM bedarf es weiterer Forschung, um den Patientinnen bessere und langfristig erfolgreiche Therapieoptionen bieten zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. Laschke, M.W. and Menger, M.D., *The gut microbiota: a puppet master in the pathogenesis of endometriosis?* Am J Obstet Gynecol, 2016. **215**(1): p. 68 e1-4.
2. O, D.F., Roskams, T., Van den Eynde, K., Vanhie, A., Peterse, D.P., Meuleman, C., Tomassetti, C., Peeraer, K., D'Hooghe, T.M. and Fassbender, A., *The Presence of Endometrial Cells in Peritoneal Fluid of Women With and Without Endometriosis.* Reprod Sci, 2016.
3. Kruger, K., Behrendt, K., Balzer, M., Höhn, S. and Ebert, A.D., *[Relevance of MRI for endometriosis diagnosis].* Rofo, 2011. **183**(5): p. 423-31.
4. Agarwal Sharma, R., Lee, E.Y., Vardhanabhuti, V., Khong, P.L. and Ngu, S.F., *Unusual Case of Postmenopausal Diffuse Endometriosis Mimicking Metastatic Ovarian Malignancy.* Clin Nucl Med, 2016. **41**(2): p. e120-2.
5. Threadcraft, M., Fouad, L., Bruce, A., Nakhleh, R. and Dinh, T., *Endometriosis in a Postmenopausal Patient Presenting as an Erythematous Vaginal Plaque.* J Minim Invasive Gynecol, 2016.
6. Imesch, P. and Fink, D., *[Endometriosis Update 2016].* Praxis (Bern 1994), 2016. **105**(5): p. 253-7.
7. Barcena de Arellano, M.L., Gericke, J., Reichelt, U., Okuducu, A.F., Ebert, A.D., Chiantera, V., Schneider, A. and Mechsner, S., *Immunohistochemical characterization of endometriosis-associated smooth muscle cells in human peritoneal endometriotic lesions.* Hum Reprod, 2011. **26**(10): p. 2721-30.
8. Fukunaga, M., *Smooth muscle metaplasia in ovarian endometriosis.* Histopathology, 2000. **36**(4): p. 348-52.
9. *Prevalence and anatomical distribution of endometriosis in women with selected gynaecological conditions: results from a multicentric Italian study. Gruppo italiano per lo studio dell'endometriosi.* Hum Reprod, 1994. **9**(6): p. 1158-62.
10. Sinaii, N., Plumb, K., Cotton, L., Lambert, A., Kennedy, S., Zondervan, K. and Stratton, P., *Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease.* Fertil Steril, 2008. **89**(3): p. 538-45.
11. Slopian, R. and Meczekalski, B., *Aromatase inhibitors in the treatment of endometriosis.* Prz Menopauzalny, 2016. **15**(1): p. 43-7.
12. Wanyonyi, S.Z., Sequeira, E. and Mukono, S.G., *Correlation between laparoscopic and histopathologic diagnosis of endometriosis.* Int J Gynaecol Obstet, 2011. **115**(3): p. 273-6.
13. Yeung, P., Jr., Sinervo, K., Winer, W. and Albee, R.B., Jr., *Complete laparoscopic excision of endometriosis in teenagers: is postoperative hormonal suppression necessary?* Fertil Steril, 2011. **95**(6): p. 1909-12, 1912 e1.
14. Rizner, T.L., *Diagnostic potential of peritoneal fluid biomarkers of endometriosis.* Expert Rev Mol Diagn, 2015. **15**(4): p. 557-80.
15. Kavoussi, S.K., Lim, C.S., Skinner, B.D., Lebovic, D.I. and As-Sanie, S., *New paradigms in the diagnosis and management of endometriosis.* Curr Opin Obstet Gynecol, 2016. **28**(4): p. 267-76.
16. Burney, R.O. and Giudice, L.C., *Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis.* Fertil Steril, 2012. **98**(3): p. 511-9.
17. Parasar, P., Ozcan, P., and Terry, K.L., *Endometriosis: Epidemiology, Diagnosis and Clinical Management.* Curr Obstet Gynecol Rep, 2017. **6**(1): p. 34-41.

18. Practice Committee of the American Society for Reproductive, M., *Treatment of pelvic pain associated with endometriosis: a committee opinion*. Fertil Steril, 2014. **101**(4): p. 927-35.
19. Alborzi, S., Rasekhi, A., Shomali, Z., Madadi, G., Alborzi, M., Kazemi, M. and Hosseini Nohandani, A., *Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging, transvaginal, and transrectal ultrasonography in deep infiltrating endometriosis*. Medicine (Baltimore), 2018. **97**(8): p. e9536.
20. Cooperative Group of Endometriosis, C.S.o.O. and C.M.A. Gynecology, *[Guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis]*. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, 2015. **50**(3): p. 161-9.
21. Giudice, L.C. and Kao, L.C., *Endometriosis*. Lancet, 2004. **364**(9447): p. 1789-99.
22. Haas, D., Wurm, P., Shamiyeh, A., Shebl, O., Chvatal, R. and Oppelt, P., *Efficacy of the revised Enzian classification: a retrospective analysis. Does the revised Enzian classification solve the problem of duplicate classification in rASRM and Enzian?* Arch Gynecol Obstet, 2013. **287**(5): p. 941-5.
23. Tuttlies, F., Keckstein, J., Ulrich, U., Possover, M., Schweppe, K.W., Wustlich, M., Buchweitz, O., Greb, R., Kandolf, O., Mangold, R., Masetti, W., Neis, K., Rauter, G., Reeka, N., Richter, O., Schindler, A.E., Sillem, M., Terruhn, V. and Tinneberg, H.R., *[ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis]*. Zentralbl Gynakol, 2005. **127**(5): p. 275-81.
24. Agarwal, N. and Subramanian, A., *Endometriosis - morphology, clinical presentations and molecular pathology*. J Lab Physicians, 2010. **2**(1): p. 1-9.
25. Redwine, D.B., *Age-related evolution in color appearance of endometriosis*. Fertil Steril, 1987. **48**(6): p. 1062-3.
26. Nisolle, M. and Donnez, J., *Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities*. Fertil Steril, 1997. **68**(4): p. 585-96.
27. Brosens, I.A., *Is mild endometriosis a progressive disease?* Hum Reprod, 1994. **9**(12): p. 2209-11.
28. Lindsay, S.F., D.E. Luciano, and Luciano A.A., *Emerging therapy for endometriosis*. Expert Opin Emerg Drugs, 2015. **20**(3): p. 449-61.
29. Zito, G., Luppi, S., Giolo, E., Martinelli, M., Venturin, I., Di Lorenzo, G. and Ricci, G., *Medical treatments for endometriosis-associated pelvic pain*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 191967.
30. Abu Hashim, H., *Gonadotrophin-releasing hormone analogues and endometriosis: current strategies and new insights*. Gynecol Endocrinol, 2012. **28**(4): p. 314-21.
31. Nirgianakis, K., Bersinger, N.A., McKinnon, B., Kostov, P., Imboden, S. and Mueller, M.D., *Regression of the inflammatory microenvironment of the peritoneal cavity in women with endometriosis by GnRH α treatment*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013. **170**(2): p. 550-4.
32. Schweppe, K.W., *[Guidelines for the use of GnRH-analogues in the treatment of endometriosis]*. Zentralbl Gynakol, 2005. **127**(5): p. 308-13.
33. Marcoux, S., R. Maheux, and Berube, S., *Laparoscopic surgery in infertile women with minimal or mild endometriosis*. Canadian Collaborative Group on Endometriosis. N Engl J Med, 1997. **337**(4): p. 217-22.
34. Garry, R., *The endometriosis syndromes: a clinical classification in the presence of aetiological confusion and therapeutic anarchy*. Human Reproduction, 2004. **19**(4): p. 760-768.

35. Rizk, B., Fischer, A.S., Lotfy, H.A., Turki, R., Zahed, H.A., Malik, R., Holliday, C.P., Glass, A., Fishel, H., Soliman, M.Y. and Herrera, D., *Recurrence of endometriosis after hysterectomy*. Facts Views Vis Obgyn, 2014. **6**(4): p. 219-27.
36. Vlek, S.L., Lier, M.C., Ankersmit, M., Ket, J.C., Dekker, J.J., Mijatovic, V. and Tuynman, J.B., *Laparoscopic Imaging Techniques in Endometriosis Therapy: A Systematic Review*. J Minim Invasive Gynecol, 2016. **23**(6): p. 886-92.
37. Sasson, I.E. and Taylor, H.S., *Stem cells and the pathogenesis of endometriosis*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1127**: p. 106-15.
38. Vercellini, P., Viganò, P., Somigliana, E. and Fedele, L., *Endometriosis: pathogenesis and treatment*. Nat Rev Endocrinol, 2014. **10**(5): p. 261-75.
39. Nisolle, M., Alvarez, M.L., Colombo, M. and Foidart, J.M., *[Pathogenesis of endometriosis]*. Gynecol Obstet Fertil, 2007. **35**(9): p. 898-903.
40. Bulun, S.E., *Endometriosis*. N Engl J Med, 2009. **360**(3): p. 268-79.
41. Koninckx, P.R., D. Barlow, and Kennedy, S., *Implantation versus infiltration: the Sampson versus the endometriotic disease theory*. Gynecol Obstet Invest, 1999. **47 Suppl 1**: p. 3-9; discussion 9-10.
42. Jabr, F.I. and Mani, V., *An unusual cause of abdominal pain in a male patient: Endometriosis*. Avicenna J Med, 2014. **4**(4): p. 99-101.
43. Pinkert, T.C., Catlow, C.E., and Straus, R., *Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma*. Cancer, 1979. **43**(4): p. 1562-7.
44. Fukunaga, M., *Paratesticular endometriosis in a man with a prolonged hormonal therapy for prostatic carcinoma*. Pathol Res Pract, 2012. **208**(1): p. 59-61.
45. Taylor, R.N., Kane, M.A., and Sidell, N., *Pathogenesis of Endometriosis: Roles of Retinoids and Inflammatory Pathways*. Semin Reprod Med, 2015. **33**(4): p. 246-56.
46. Mechsner, S., Weichbrodt, M., Riedlinger, W.F., Bartley, J., Kaufmann, A.M., Schneider, A., and Köhler C., *Estrogen and progesterone receptor positive endometriotic lesions and disseminated cells in pelvic sentinel lymph nodes of patients with deep infiltrating rectovaginal endometriosis: a pilot study*. Hum Reprod, 2008. **23**(10): p. 2202-9.
47. Cramer, D.W. and Missmer, S.A., *The epidemiology of endometriosis*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **955**: p. 11-22; discussion 34-6, 396-406.
48. Stefansson, H., Geirsson, R.T., Steinthorsdottir, V., Jonsson, H., Manolescu, A., Kong, A., Ingadottir, G., Gulcher, J. and Stefansson, K., *Genetic factors contribute to the risk of developing endometriosis*. Hum Reprod, 2002. **17**(3): p. 555-9.
49. Parazzini, F., Esposito, G., Tozzi, L., Noli, S. and Bianchi, S., *Epidemiology of endometriosis and its comorbidities*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2016.
50. Gazvani, R. and Templeton, A., *Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis*. Reproduction, 2002. **123**(2): p. 217-26.
51. Bulun, S.E., Monsavais, D., Pavone, M.E., Dyson, M., Xue, Q., Attar, E., Tokunaga, H. and Su, E.J., *Role of estrogen receptor-beta in endometriosis*. Semin Reprod Med, 2012. **30**(1): p. 39-45.
52. Moberg, C., Bourlev, V., Ilyasova, N. and Olovsson, M., *Levels of oestrogen receptor, progesterone receptor and alphaB-crystallin in eutopic endometrium in relation to pregnancy in women with endometriosis*. Hum Fertil (Camb), 2015. **18**(1): p. 30-7.
53. Yamanaka, K., Xu, B., Suganuma, I., Kusuki, I., Mita, S., Shimizu, Y., Mizuguchi, K. and Kitawaki, J., *Dienogest inhibits aromatase and cyclooxygenase-2*

- expression and prostaglandin E(2) production in human endometriotic stromal cells in spheroid culture.* Fertil Steril, 2012. **97**(2): p. 477-82.
54. Shimizu, Y., Mita, S., Takeuchi, T., Notsu, T., Mizuguchi, K. and Kyo, S., *Dienogest, a synthetic progestin, inhibits prostaglandin E2 production and aromatase expression by human endometrial epithelial cells in a spheroid culture system.* Steroids, 2011. **76**(1-2): p. 60-7.
 55. Noble, L.S., Takayama, K., Zeitoun, K.M., Putman, J.M., Johns, D.A., Hinshelwood, M.M., Agarwal, V.R., Zhao, Y., Carr, B.R. and Bulun, S.E., *Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells.* J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(2): p. 600-6.
 56. Greene, A.D., Lang, S.A., Kendzierski, J.A., Sroga-Rios, J.M., Herzog, T.J. and Burns, K.A., *Endometriosis: where are we and where are we going?* Reproduction, 2016. **152**(3): p. R63-78.
 57. Patel, B., Elguero, S., Thakore, S., Dahoud, W., Bedaiwy, M. and Mesiano, S., *Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology.* Hum Reprod Update, 2015. **21**(2): p. 155-73.
 58. Attia, G.R., Zeitoun, K., Edwards, D., Johns, A., Carr, B.R. and Bulun, S.E., *Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis.* J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(8): p. 2897-902.
 59. Bedaiwy, M.A., Dahoud, W., Skomorovska-Prokvolit, Y., Yi, L., Liu, J.H., Falcone, T., Hurd, W.W. and Mesiano, S., *Abundance and Localization of Progesterone Receptor Isoforms in Endometrium in Women With and Without Endometriosis and in Peritoneal and Ovarian Endometriotic Implants.* Reprod Sci, 2015. **22**(9): p. 1153-61.
 60. Bulun, S.E., Cheng, Y.H., Yin, P., Imir, G., Utsunomiya, H., Attar, E., Innes, J. and Julie Kim, J., *Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol.* Mol Cell Endocrinol, 2006. **248**(1-2): p. 94-103.
 61. Slater, N.J., Raftery, A.T. and Cope, G.H., *The ultrastructure of human abdominal mesothelium.* J Anat, 1989. **167**: p. 47-56.
 62. Young, V.J., Brown, J.K., Saunders, P.T. and Horne, A.W., *The role of the peritoneum in the pathogenesis of endometriosis.* Hum Reprod Update, 2013. **19**(5): p. 558-69.
 63. Oral, E., Olive, D.L. and Arici, A., *The peritoneal environment in endometriosis.* Hum Reprod Update, 1996. **2**(5): p. 385-98.
 64. Brown, S.E. and Dubbins, P.A., *Detection of free intraperitoneal fluid in healthy young men.* J Ultrasound Med, 2012. **31**(10): p. 1527-30.
 65. Blackburn, S.C. and Stanton, M.P., *Anatomy and physiology of the peritoneum.* Semin Pediatr Surg, 2014. **23**(6): p. 326-30.
 66. Younis, J.S. and Laufer, N., *Peritoneal fluid in the pouch of Douglas: strategically located and affecting reproductive events.* Fertil Steril, 2015. **104**(4): p. 831-832.
 67. Koninckx, P.R., Kennedy, S.H. and Barlow, D.H., *Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid.* Hum Reprod Update, 1998. **4**(5): p. 741-51.
 68. Levy, A.D., Shaw, J.C. and Sobin, L.H., *Secondary tumors and tumorlike lesions of the peritoneal cavity: imaging features with pathologic correlation.* Radiographics, 2009. **29**(2): p. 347-73.
 69. Meyers, M.A., *Distribution of intra-abdominal malignant seeding: dependency on dynamics of flow of ascitic fluid.* Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med, 1973. **119**(1): p. 198-206.

70. Bricou, A., Batt, R.E. and Chapron, C., *Peritoneal fluid flow influences anatomical distribution of endometriotic lesions: why Sampson seems to be right*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008. **138**(2): p. 127-34.
71. Jenkins, S., Olive, D.L. and Haney, A.F., *Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution*. Obstet Gynecol, 1986. **67**(3): p. 335-8.
72. Parazzini, F., *Left : right side ratio of endometriotic implants in the pelvis*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2003. **111**(1): p. 65-67.
73. Al-Fozan, H. and Tulandi, T., *Left lateral predisposition of endometriosis and endometrioma*. Obstet Gynecol, 2003. **101**(1): p. 164-6.
74. Chapron, C., Chopin, N., Borghese, B., Foulot, H., Dousset, B., Vacher-Lavenu, M.C., Vieira, M., Hasan, W. and Bricou, A., *Deeply infiltrating endometriosis: pathogenetic implications of the anatomical distribution*. Hum Reprod, 2006. **21**(7): p. 1839-45.
75. Vercellini, P., Abbiati, A., Viganò, P., Somigliana, E.D., Daguati, R., Meroni, F. and Crosignani, P.G., *Asymmetry in distribution of diaphragmatic endometriotic lesions: evidence in favour of the menstrual reflux theory*. Hum Reprod, 2007. **22**(9): p. 2359-67.
76. Hopton, E.N. and Redwine, D.B., *Eyes wide shut: the illusory tale of 'occult' microscopic endometriosis*. Hum Reprod, 2014. **29**(3): p. 384-7.
77. Murphy, A.A., Green, W.R., Bobbie, D., dela Cruz, Z.C. and Rock, J.A., *Unsuspected endometriosis documented by scanning electron microscopy in visually normal peritoneum*. Fertil Steril, 1986. **46**(3): p. 522-4.
78. Redwine, D.B., *Is "microscopic" peritoneal endometriosis invisible?* Fertil Steril, 1988. **50**(4): p. 665-6.
79. Redwine, D.B. and Yocom, L.B., *A serial section study of visually normal pelvic peritoneum in patients with endometriosis*. Fertil Steril, 1990. **54**(4): p. 648-51.
80. Nisolle, M., Painsaveine, B., Bourdon, A., Berlière, M., Casanas-Roux, F. and Donnez J., *Histologic study of peritoneal endometriosis in infertile women*. Fertil Steril, 1990. **53**(6): p. 984-8.
81. Nezhat, F., Allan, C.J., Nezhat, C. and Martin, D.C., *Nonvisualized endometriosis at laparoscopy*. Int J Fertil, 1991. **36**(6): p. 340-3.
82. Balasch, J., Creus, M., Fábregues, F., Carmona, F., Ordi, J., Martínez-Román, S. and Vanrell, J.A., *Visible and non-visible endometriosis at laparoscopy in fertile and infertile women and in patients with chronic pelvic pain: a prospective study*. Hum Reprod, 1996. **11**(2): p. 387-91.
83. Khan, K.N., Fujishita, A., Kitajima, M., Hiraki, K., Nakashima, M. and Masuzaki, H., *Occult microscopic endometriosis: undetectable by laparoscopy in normal peritoneum*. Hum Reprod, 2014. **29**(3): p. 462-72.
84. Chiantera, V., Dessole, M., Petrillo, M., Lucidi, A., Frangini, S., Legge, F., Scambia, G. and Mechsner, S., *Laparoscopic En Bloc Right Diaphragmatic Peritonectomy for Diaphragmatic Endometriosis According to the Sugarbaker Technique*. J Minim Invasive Gynecol, 2016. **23**(2): p. 198-205.
85. Zhu, L., Chen, S., Che, X., Xu, P., Huang, X. and Zhang, X., *Comparisons of the efficacy and recurrence of adenomyomectomy for severe uterine diffuse adenomyosis via laparotomy versus laparoscopy: a long-term result in a single institution*. J Pain Res, 2019. **12**: p. 1917-1924.
86. Sikora, J., Mielczarek-Palacz, A. and Kondera-Anasz, Z., *Association of the Precursor of Interleukin-1beta and Peritoneal Inflammation-Role in Pathogenesis of Endometriosis*. J Clin Lab Anal, 2016. **30**(6): p. 831-837.

87. Vannuccini, S., Luisi, S., Tosti, C., Sorbi, F. and Petraglia, F., *Role of medical therapy in the management of uterine adenomyosis*. *Fertil Steril*, 2018. **109**(3): p. 398-405.
88. Soper, D.E., *Pelvic inflammatory disease*. *Obstet Gynecol*, 2010. **116**(2 Pt 1): p. 419-28.
89. Park, S.T., Lee, S.W., Kim, M.J., Kang, Y.M., Moon, H.M. and Rhim, C.C., *Clinical characteristics of genital chlamydia infection in pelvic inflammatory disease*. *BMC Womens Health*, 2017. **17**(1): p. 5.
90. Liu, S., Xin, X., Hua, T., Shi, R., Chi, S., Jin, Z. and Wang, H., *Efficacy of Anti-VEGF/VEGFR Agents on Animal Models of Endometriosis: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *PLoS One*, 2016. **11**(11): p. e0166658.

7. Anhang

7.1. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Mira Helene Luhmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Histologisch nachweisbare mikroskopische Endometrioseläsionen / Histological detectable occult microscopic endometriosis selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

7.2. Lebenslauf

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

7.3. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung und Bearbeitung meiner Promotionsarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Sylvia Mechsner für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Auch meiner Arbeitsgruppe des Endometrioselabors möchte ich hier für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken.

Meinen Eltern, Großeltern und Freunden danke ich für ihre Geduld, Ermutigungen und guten Zusprüche während der Arbeit an dieser Promotionsarbeit.