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

DISSERTATION

Endometriose und Lymphangiogenese

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Susanne Keichel

aus Magdeburg

Gutachter/in:

1. PD Dr. med. S. Mechsner

- 2. Prof. Dr. med. Dr. phil. Dr. h.c. A. D. Ebert
- 3. Prof. Dr. med. U. Ulrich

Datum der Promotion: 24.02.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	9
1 Einleitung	11
1.1 Endometriose	11
1.1.1 Definition und Epidemiologie der Endometriose	11
1.1.2 Symptomatik der Endometriose	11
1.1.3 Formen der Endometriose	12
1.1.4 Klassifikation der Endometriose	12
1.1.5 Diagnostik und Therapie der Endometriose	13
1.1.6 Ätiologie der Endometriose	14
1.1.7 Verlauf und Besonderheiten der Endometriose	16
1.2 Lymphgefäßsystem	17
1.2.1 Anatomie und Funktion des Lymphgefäßsystems	17
1.2.2 Lymphgefäßendothelmarker	18
1.2.3 Lymphangiogenese	20
1.2.4 Bedeutung des Lymphgefäßsystems im Rahmen von Erkrankungen	22
1.3 Stand der Forschung und Ableitung der Fragestellung	24
2 Material und Methoden	27
2.1 Beschreibung des Patientenkollektivs	27
2.2 Gewebeproben	28
2.3 Immunhistochemische Färbung	29
2.3.1 Herstellung von Gewebeschnitten	29
2.3.2 Entparaffinierung und Antigendemaskierung	
2.3.3 Peroxidaseblock und Absättigung unspezifischer Bindungen	
2.3.4 Immunhistochemische Färbung	
2.4 Auswertung	31
2.5 Statistik	
2.6 Arbeitsmaterialien	32
2.6.1 Puffer	
2.6.2 Geräte	
2.6.3 Reagenzien, gebrauchsfertige Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	34
3 Ergebnisse	
3.1 Vorkommen und Verteilung D2-40 positiver Lymphgefäße in Endometriosegewebe	36
3.2 Vergleich der Dichte D2-40 positiver Lymphgefäße in Endometriosegewebe und Endometriose-freier	n Gewebe 38
3.3 Vorkommen LYVE-1 positiver Lymphgefäße und ihre Dichte in Endometriosegewebe und Endometrio Gewebe	ose-freiem 40

3.4 Vorkommen Prox-1 positiver Lymphgefäße und ihre Dichte in Endometriosegewebe und Endometriose-freiem Gewebe	12
3.5 Vergleich der Dichte D2-40, LYVE-1 und Prox-1 positiver Lymphgefäße in Endometriosegewebe 4	14
3.5.1 Vergleich der Dichte D2-40, LYVE-1 und Prox-1 positiver Lymphgefäße in rectovaginalem	14
3.5.2 Vergleich der Dichte D2-40, LYVE-1 und Prox-1 positiver Lymphgefäße in peritonealem Endometriosegewebe	16
3.6 Expression von VEGF-C und VEGF-D in Endometriosegewebe 4	1 6
3.6.1 Expression von VEGF-C und VEGF-D in rectovaginalem Endometriosegewebe	16
3.6.2 Expression von VEGF-C und VEGF-D in peritonealem Endometriosegewebe 4	18
3.6.3 Vorkommen VEGF-C und VEGF-D positiver Makrophagen in Endometriosegewebe 4	9
3.7 Vergleich der Lymphgefäßdichte in Abhängigkeit von der VEGF-C und VEGF-D Expression in Endometriosegewebe	50
3.7.1 Vergleich der Dichte D2-40 positiver Lymphgefäße in Abhängigkeit von der VEGF-C/ VEGF-D Expression in Endometriosegewebe	50
3.7.2 Vergleich der Dichte LYVE-1 positiver Lymphgefäße in Abhängigkeit von der VEGF-C/ VEGF-D Expression in Endometriosegewebe	51
3.7.3 Vergleich der Dichte Prox-1 positiver Lymphgefäße in Abhängigkeit von der VEGF-C/ VEGF-D Expression in Endometriosegewebe	53
3.8 Einfluss hormoneller Therapie auf Lymphgefäßdichte sowie Expression von VEGF-C und VEGF-D	54
3.8.1 Vergleich der Lymphgefäßdichte von Endometriosegewebe in Abhängigkeit von hormoneller Therapie	54
3.8.2 Einfluss von hormoneller Therapie auf die Expression von VEGF-C und VEGF-D	6
3.8.2.1 Einfluss von hormoneller Therapie auf die Expression von VEGF-C und VEGF-D bei rectovaginaler Endometriose	56
3.8.2.2 Einfluss von hormoneller Therapie auf die Expression von VEGF-C und VEGF-D bei peritonealer Endometriose	57
3.9 Vergleich der Lymphgefäßdichte in Abhängigkeit von der klinischen Größe der primären rectovaginalen Endometrioseherde	58
3.10 Vergleich der Lymphgefäßdichte peritonealer Endometriose in Abhängigkeit vom rASRM-Stadium	30
4 Diskussion	1
4.1 Vorkommen von Lymphgefäßen in Endometriosegewebe6	32
4.2 Lymphgefäßdichte in Endometriosegewebe6	33
4.3 Expression Lymphangiogenese-spezifischer Wachstumsfaktoren6	6
4.4 Korrelation klinischer Aspekte mit Lymphgefäßdichte und Expression von Wachstumsfaktoren 6	39
4.5 Ausblick	'3
5 Zusammenfassung7	4
6 Literaturverzeichnis	6

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Ang	Angiopoetin
CD	Cluster of Differentiation
EM	Endometriose
FGF	Fibroblast Growth Factor
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HT	hormonelle Therapie
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
IRS	Immuno Reactive Score
LV	Lymphgefäß
LVD	Lymphgefäßdichte
LYVE-1	Lymphatic Vessel Endothelial Receptor 1
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
рЕМ	peritoneale Endometriose
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
Prox-1	Prospero-related Homeobox 1
rv EM	rectovaginale Endometriose
SLP 76	SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Lokalisation von Lymphgefäßendothelmarkern (aus Van der Auwera et al. 2006).

Abb. 1.2: Lymphangiogenese im Rahmen der Embryonalentwicklung (aus Alitalo et al. 2005).

Abb. 1.3: A: Pelviner Lymphknoten mit Endometrioseherd und disseminierten endometriotischen Zellen in subkapsulärem Sinus, superficialem Kortex und Trabekeln (aus Mechsner et al. 2008). **B:** D2-40 positive Lymphgefäßen in einem rectosigmoiden Endometrioseherd (aus Noël et al. 2008). **C:** VEGF-C positive Drüsen- und Stromazellen eines Endometriomes (aus Takehara et al. 2004).

Abb. 3.1: Übersicht eines den Darm infiltrierenden Endometrioseherdes. Dieser setzt sich aus mehreren Einzeldrüsen zusammen, welche Submucosa, Muscularis propria und Mesocolon infiltrieren (Vergrößerung 20-fach).

Abb. 3.2: A: D2-40 positive Lymphgefäße einer rectovaginalen Endometriosedrüse die von der Muscularis propria des Darmes umgeben ist. Die Mehrzahl der Lymphgefäße (Pfeile) befindet sich saumartig am Rand des Endometriosestromas in der Nähe zum Übergang zur Muscularis propria (Vergrößerung 100-fach). **B:** D2-40 positive Lymphgefäße (Pfeile) in peritonealer Endometriosedrüse (Vergrößerung 200-fach).

Abb. 3.3: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) D2-40 positiver Lymphgefäße (LV) rectovaginaler Endometriosedrüsen (EM) mit entsprechendem Endometriose-freien Gewebe des Darmes und der Vagina in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe der Drüsen, sowie Vergleich peritonealer Endometriose-drüsen (p EM) mit Endometriose-freiem Peritoneum. (--- p < 0,0001).

Abb. 3.4: A: Immunhistochemischer Nachweis LYVE-1 positiver Lymphgefäße (Pfeile) in rectovaginaler Endometriosedrüse (Vergrößerung 100-fach). **B:** Immunhistochemischer Nachweis LYVE-1 positiver Lymphgefäße (Pfeile) in peritonealer Endometriosedrüse (Vergrößerung 200-fach).

Abb. 3.5: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) LYVE-1 positiver Lymphgefäße (LV) rectovaginaler Endometriosedrüsen (EM) mit entsprechendem EM-freien Kontrollgewebe, sowie Vergleich peritonealer EM-Drüsen mit EM-freiem Kontrollgewebe. (--- p<0,0001, -- p<0,001).

Abb. 3.6: A: Immunhistochemischer Nachweis Prox-1 positiver Lymphgefäße in rectovaginaler Endometriosedrüse. Pfeile zeigen auf positive Zellkerne von Lymphendothelzellen. Die ebenfalls reaktiven EM-Epithelzellen sind mit einem Stern gekennzeichnet (Vergrößerung 400-fach). **B:** Immunhistochemischer Nachweis Prox-1 positiver Lymphgefäße (Pfeile) in peritonealer Endometriosedrüse (Vergrößerung 200-fach).

Abb. 3.7: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) Prox-1 positiver Lymphgefäße (LV) von rectovaginalen Endometriosedrüsen (EM) mit EM-freiem Kontrollgewebe, sowie Vergleich von peritonealen EM-Drüsen mit EM-freiem Kontrollgewebe. (*** p < 0,0001, ** p < 0,001)

Abb. 3.8: Lymphgefäßdichte (LVD) in rectovaginalen Endometriosedrüsen. Gegenüberstellung der LVD für die verwendeten Lymphgefäßendothelmarker D2-40, LYVE-1 und Prox-1. Der Vergleich erfolgte in Abhängigkeit von der durch die rectovaginale Endometriosedrüse infiltrierten Schicht. (--- p < 0,0001, + p < 0,001, + p < 0,005, n.s. p > 0,05).

Abb. 3.9: Lymphgefäßdichte (LVD) in peritonealen Endometriosedrüsen. Gegenüberstellung der LVD für die verwendeten Lymphgefäßendothelmarker D2-40, LYVE-1 und Prox-1 (++ p<0,001, + p<0,05).

Abb. 3.10: Expression der Lymphangiogenese spezifischen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D in Epithel- und Stromazellen rectovaginaler Endometriose. Quantifizierung der Expressionsstärke durch Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung.

Abb. 3.11: Expression von VEGF-C (**A**) und VEGF-D (**B**) in rectovaginaler Endometriosedrüse, lokalisiert an der Grenze zwischen Muscularis propria und Mesocolon (Vergrößerung 100-fach). In beiden Abbildungen zeigen die Epithelzellen (Pfeil) eine hohe Intensität und die Stromazellen (Stern) eine moderate Intensität der immunhistochemischen Färbung.

Abb. 3.12: Expression der Lymphangiogenese spezifischen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D in Epithel- und Stromazellen peritonealer Endometriose. Quantifizierung der Expressionsstärke durch Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung.

Abb. 3.13: Expression von VEGF-C (**A**) und VEGF-D (**B**) in peritonealen Endometriosedrüse (Vergrößerung 100-fach). In beiden Abbildungen zeigen die Epithelzellen (Pfeil) eine hohe Intensität und die Stromazellen (Stern) eine moderate Intensität der immunhistochemischen Färbung.

Abb. 3.14: Vorkommen VEGF-C (**A**) und VEGF-D (**B**) positiver Makrophagen (Pfeile) im EM-Stroma einer peritonealen Endometriosedrüse.

Abb. 3.15: Lymphgefäßdichte (LVD) für D2-40, LYVE-1 und Prox-1 positive Lymphgefäße (LV). Vergleich der LVD von Endometriosedrüsen mit moderater (2) und hoher (3) Intensität der Immun-histochemie (IRS) der Endometrioseepithelzellen bei Verwendung von Antikörpern gegen VEGF-C und VEGF-D (+ p < 0,05).

Abb. 3.16: Lymphgefäßdichte (LVD) rectovaginaler Endometriosedrüsen (rv EM) und peritonealer Endometriosedrüsen (pEM) für die verschiedenen Lymphgefäßendothelmarker D2-40, LYVE-1 sowie

Prox-1. Vergleich der EM-Drüsen von Patientinnen mit präoperativer und ohne präoperative hormonelle Therapie (HT) (+ p < 0,05).

Abb. 3.17: Expression von VEGF-C und VEGF-D in Epithelzellen rectovaginaler Endometriosedrüsen. Quantifizierung der Expressionsstärke durch Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung. Vergleich der Drüsen von Patientinnen mit präoperativer und ohne präoperative hormonelle Therapie (HT).

Abb. 3.18: Expression von VEGF-C und VEGF-D in Epithelzellen peritonealer Endometriosedrüsen. Quantifizierung der Expressionsstärke durch Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung. Vergleich der Drüsen von Patientinnen mit präoperativer und ohne präoperative hormonelle Therapie (HT).

Abb. 3.19: Lymphgefäßdichte (LVD) in rectovaginalen Endometriosedrüsen (rv EM). Vergleich der LVD für D2-40, LYVE-1 und Prox-1 positive Lymphgefäße (LV) in Abhängigkeit von der primären klinischen Herdgröße (Größe 1: <1 cm; Größe 2: 1-2 cm; Größe 3: 2-3 cm; Größe 4:>3 cm).

Abb. 3.20: Lymphgefäßdichte (LVD) peritonealer Endometriosedrüsen (p EM) in Abhängigkeit vom rASRM-Stadium der Patientinnen. Vergleich der LVD für die verschiedenen Lymphgefäßendothelmarker D2-40, LYVE-1 und Prox-1.

Tabellenverzeichnis

 Tabelle 2.1: Klinische Daten des Patientenkollektivs.

 Tabelle 2.2:
 Klinische Herdgröße und Infiltrationstiefe der rectovaginalen EM-Herde.

Tabelle 2.3: Verwendete Primärantikörper.

Tabelle 3.1: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) D2-40 positiver Gefäße in rectovaginalen Endometriosedrüsen (rv EM) sowie peritonealen Endometriosedrüsen (p EM) mit Endometriose-freiem Gewebe; mit p-Werten.

Tabelle 3.1: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) D2-40 positiver Gefäße in rectovaginalen Endometriosedrüsen (rv EM) sowie peritonealen Endometriosedrüsen (p EM) mit Endometriose-freiem Gewebe; mit p-Werten.

Tabelle 3.2: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) LYVE-1 positiver Gefäße in rectovaginalen Endometriosedrüsen (rv EM) sowie peritonealen Endometriosedrüsen (p EM) mit Endemetriose-freiem Gewebe; mit p-Werten.

Tabelle 3.3: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) Prox-1 positiver Gefäße in rectovaginalen Endometriosedrüsen (rv EM) sowie peritonealen Endometriosedrüsen (p EM) mit Endemetriose-freiem Gewebe; mit p-Werten.

Tabelle 3.4: Lymphgefäßdichte (LVD) für D2-40 in Abhängigkeit von VEGF-C und VEGF-D Expression. Quantifizierung der Expressionsstärke durch Intensität der immunhistochemischen Färbung (IRS: 2 = moderat, 3 = hoch). Vergleiche rectovaginaler Endometriosedrüsen (rv EM), peritonealer Endometriosedrüsen (p EM) sowie rv EM und p EM gemeinsam (rv + p EM), mit p-Werten.

Tabelle 3.5: Lymphgefäßdichte (LVD) für LYVE-1 in Abhängigkeit von VEGF-C und VEGF-D Expression. Quantifizierung der Expressionsstärke durch Intensität der immunhistochemischen Färbung (IRS: 2 = moderat, 3 = hoch). Vergleiche rectovaginaler Endometriosedrüsen (rv EM), peritonealer Endometriosedrüsen (p EM) sowie rv EM und p EM gemeinsam (rv + p EM), mit p-Werten.

Tabelle 3.6: Lymphgefäßdichte (LVD) für Prox-1 in Abhängigkeit von VEGF-C und VEGF-D Expression. Quantifizierung der Expressionsstärke durch Intensität der immunhistochemischen Färbung (IRS: 2 = moderat, 3 = hoch). Vergleiche rectovaginaler Endometriosedrüsen (rv EM), peritonealer Endometriosedrüsen (p EM) sowie rv EM und p EM gemeinsam (rv + p EM), mit p-Werten. **Tabelle 3.7:** Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) rectovaginaler (rv EM) und peritonealer (p EM) Endometriosedrüsen von Patientinnen mit präoperativer und ohne präoperative hormonelle Therapie (HT) für die verschiedenen Lymphgefäßendothelmarker: D2-40, LYVE-1 und Prox-1; mit p-Werten.

Tabelle 3.8: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) rectovaginaler Endometriosedrüsen mit unterschiedlicher klinischer Primärherdgröße für die verschiedenen Lymphgefäßendothelmarker: D2-40, LYVE-1 und Prox-1; mit p-Werten (Größe 1: <1 cm, Größe 2: 1-2 cm, Größe 3: 2-3 cm, Größe 4: >3 cm).

Tabelle 3.9: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) peritonealer Endometriosedrüsen von Patientinnen mit unterschiedlichen Endometriose-Stadien entsprechend der revidierten Klassifikation der American Society of Reproductive Medicine (rASRM) für die verschiedenen Lymphgefäßendothelmarker: D2-40, LYVE-1 und Prox-1; mit p-Werten.

1 Einleitung

1.1 Endometriose

1.1.1 Definition und Epidemiologie der Endometriose

Endometriose (EM) ist eine östrogenabhängige Erkrankung, bei der der Gebärmutterschleimhaut ähnliches Gewebe außerhalb der Gebärmutterhöhle vorkommt. Bei der EM handelt es sich um ein chronisch verlaufendes benignes Krankheitsgeschehen, welches jedoch Gemeinsamkeiten mit malignen Erkrankungen aufweist (Thomas and Campbell 2000). So können ein invasives destruierendes Wachstum, Neoangiogenese und lokale sowie entfernte metastatische Absiedlungen beobachtet werden (Gaetje et al. 1995; Swiersz 2002; Taylor et al. 2002; Mechsner et al. 2008; Mechsner et al. 2009).

Eine exakte Aussage zur Prävalenz von EM kann nicht getroffen werden, denn eine sichere Diagnose wird nur durch operative Methoden gestellt. Anhand von Schätzungen geht man davon aus, dass mindestens 5 % bis 10 % aller Frauen im reproduktiven Alter von EM betroffen sind (Giudice and Kao 2004; Bulun 2009).

1.1.2 Symptomatik der Endometriose

Schmerzen und Infertilität sind die Leitsymptome dieser Erkrankung. Etwa 50 % der Betroffenen scheinen jedoch beschwerdefrei zu sein (Vercellini 1997; D'Hooghe et al. 2003).

Die vorkommenden Schmerzen sind dabei sehr vielfältig ausgeprägt. Die meisten Patientinnen leiden unter schwerer *Dysmenorrhoe*, welche nicht selten von vegetativen Symptomen, wie Übelkeit und Kreislaufbeschwerden, begleitet ist. Des Weiteren leiden viele Frauen unter *Dyspareunie*, welche ein Hinweis auf das Vorhandensein von EM-Läsionen an Rectum, Septum rectovaginale oder den Sacrouterinligamenten ist. Sind EM-Infiltrate am Darm vorhanden, können *Dyschezie* oder andere Darmsymptome, wie Blähungen, Darmblutungen oder Spasmen auftreten. EM-Herde oder Adhäsionen im Bereich der Blase oder am entsprechenden sakralen Nervenplexus können sich in Form *Dysurie* darstellen. Aber auch Rücken- und Gliederschmerzen können im Rahmen eines endometriotischen Krankheitsgeschehens auftreten. Eindeutige Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß der Beschwerden, der Lokalisation, der Aktivität der Herde und dem EM-Stadium konnten bisher nicht bewiesen werden (Parazzini 1999).

Infertilität ist ein weiterer Aspekt, der das Leben und die Lebensplanung von Frauen mit EM nachhaltig beeinträchtigt. Man geht davon aus, dass ein großer Teil, die Angaben reichen hier von 30 % bis 70 %, der Patientinnen mit nicht erfülltem Kinderwunsch von EM betroffen ist (Inoue et al. 1992; Missmer and Cramer 2003; Pritts and Taylor 2003).

1.1.3 Formen der Endometriose

Die Einteilung der EM erfolgt klassischerweise entsprechend ihrer Lokalisation (Albrecht 1955). Dabei unterscheidet man die *Endometriosis genitalis interna*, auch *Adenomyosis uteri* genannt. Bei dieser Form sind EM-Läsionen im Myometrium nachweisbar. Sind Ovarien, Tuben, Vagina, Sakrouterinligamente oder der Douglasraum von EM betroffen, spricht man von *Endometriosis genitalis externa*. Die Form der *Endometriosis extragenitalis* schließt den Befall von Organen außerhalb des kleinen Beckens, wie Blase, Uretern, Darm, Lunge, Nabel und andere ein (Ebert 2002). Die rectovaginale EM stellt hierbei eine Sonderform dar.

1.1.4 Klassifikation der Endometriose

Derzeit existiert noch kein einheitliches System zur Klassifikation der EM. International am weitesten verbreitet ist die *rASRM-Klassifikation* der American Society for Reproductive Medicine. Dabei erfolgt eine intraoperative Bewertung des Ausmaßes der Endometriosis genitalis externa mit Hilfe eines Punktesystems. Die Läsionen an Ovarien, Tuben und Peritoneum werden entsprechend ihrer Oberflächenausdehnung und Infiltrationstiefe berücksichtigt. Zudem gehen das Ausmaß von netzartigen und dichten Adhäsionen, sowie die Obliteration des Douglasraumes in die Bewertung ein. Anhand der Summe der vergebenen Punkte erfolgt die Einteilung in ein minimales Stadium I, ein mildes Stadium II, ein moderates Stadium III und ein fortgeschrittenes Stadium IV. Diese Klassifikation geht nicht auf das Vorkommen weiterer EM-Manifestationen wie extragenitaler und tief infiltrierender EM ein (ASRM 1997).

Für die Beurteilung der tief infiltrierenden EM wurde die *ENZIAN-Klassifikation* entwickelt (Tuttlies et al. 2005). Sie orientiert sich mit ihrer Systematik an der onkologischen TNM-Klassifikation. Ausschlaggebend für die Einteilung in die vier Stadien (E1 bis E4) ist das Ausmaß der Infiltrationstiefe der EM-Läsionen. Es erfolgt eine zusätzliche Einteilung in Untergruppen für den Befall von: a) Douglasraum und Vagina, b) Sakrouterin- und Cardinalligamente und c) Rectum und Rectosigmoid. Ergänzende Stadien werden bei Adenomyosis uteri (FA), Infiltration der Blase (FB), der

Ureteren (FU) und von aboral des Sigmoids gelegenen Abschnitten des Darmes (FI) vergeben (Tuttlies et al. 2005).

1.1.5 Diagnostik und Therapie der Endometriose

Die Laparoskopie mit der Entnahme einer Probeexzision von atypisch konfiguriertem Gewebe und die anschließende histologische Befundung stellen den Goldstandard der EM-Diagnostik dar (Spaczynski and Duleba 2003; Schweppe 2005; Ulrich and Keckstein 2005). Klinisch sollten ein therapieresistenter Unterbauchschmerz, Dysmenorrhoe, Dyspareunie und zyklische Darmbeschwerden den Verdacht auf EM lenken (Schweppe 2005). Weitere apparative Untersuchungsmethoden, wie Sonografie und MRT, können die Diagnostik zum Ausmaß des Befalls verschiedener Organe ergänzen (Chapron et al. 1998; Bazot et al. 2004; Ulrich and Keckstein 2005).

Etwa 40 % aller Frauen mit EM benötigen eine Therapie. Da sich EM klinisch sehr unterschiedlich präsentiert, ist es notwendig, jeder Patientin eine individuell gestaltete Behandlung zukommen zu lassen. Berücksichtigung sollten dabei das Alter, bestehender Kinderwunsch, die Symptomatik und bisherige Therapieversuche finden. Die großen Säulen, auf welche sich die EM-Therapie stützt, sind die chirurgische Intervention und die medikamentöse Therapie.

Das Ziel der chirurgischen Therapie ist die komplette Entfernung aller EM-Herde und die Rekonstruktion der durch EM entstandenen Organschäden, um das Krankheitsgeschehen zu sanieren, Schmerzen zu reduzieren und die Fertilität zu erhalten (Schweppe 2005). Während kleine Läsionen meist eradiziert und entstandene Defekte primär verschlossen werden können, so muss bei tief infiltrierender EM des Darmes nicht selten eine Resektion des betroffenen Darmsegments erfolgen (Ebert 2002; Schweppe 2005).

Positive Auswirkungen auf den postoperativen Krankheitsverlauf zeigt eine anschließende hormonelle Behandlung. Diese kann eine Senkung der Rezidivrate und eine Verlängerung des schmerzfreien Intervalls bewirken (ACOG 2000; Gambone et al. 2002). Die hormonelle Therapie nutzt die Östrogenabhängigkeit dieser Erkrankung. Daher werden Medikamente verwendet, die auf verschiedenen Ebenen in den Sexualhormonstoffwechsel (Hypothalamus, Hypophyse, Nebenniere, Ovar) eingreifen. Der dadurch erzeugte Östrogenentzug soll eine Atrophie und Regression der EM-Herde bewirken. Es kommen *Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga* (GnRH-Analoga)

sowie *kombinierte orale Kontrazeptiva* zum Einsatz (Olive and Pritts 2001; Ebert 2002; Schweppe 2005; Halis et al. 2006).

Eine symptomatische Behandlung der EM-assoziierten Schmerzen kann mit *nichtsteroidalen Antiphlogistika* erfolgen. Bei unzureichender Analgesie können Koanalgetika wie *trizyklische Antidepressiva* und *Antikonvulsiva* ergänzend eingesetzt werden (Olive and Pritts 2001; Schweppe 2005; Halis et al. 2006).

1.1.6 Ätiologie der Endometriose

Zahlreiche Theorien sind bemüht den Pathomechanismus der EM zu erklären. Bisher kann jedoch keines dieser Konzepte alle Phänomene bezüglich der Entstehung und der Progression dieser Erkrankung integrieren. Die Pathologie der EM scheint vielmehr eine komplexe Interaktion der in den verschiedenen Theorien beschriebenen Faktoren zu sein.

Diejenige mit der weitest gehenden Akzeptanz ist die *Transplantationstheorie* von Sampson. Sie besagt, dass vitale Endometriumzellen im Zuge retrograder Menstruation über die Tuben in die freie Bauchhöhle gelangen, dort anwachsen und EM-Läsionen bilden (Sampson 1927). Dabei ist jedoch unklar, weshalb bei der Mehrzahl von Frauen eine rückwärtsgerichtete Menstruation beobachtet werden kann, aber nur bei einem geringen Anteil eine EM entsteht (Bulun 2009).

Warum EM auch außerhalb der im kleinen Becken gelegenen Organe (z.B. Bauchnabel) und selten auch bei Männern beobachtet werden kann, könnte mit Hilfe der *Metaplasie-Theorie* von Meyer erklärt werden (Suginami 1991). Darin wird postuliert, dass sich EM-Zellen unter dem Einfluss von Hormonen, Wachstumsfaktoren, Entzündungs- und mechanischen Reizen aus undifferenzierten Zölomepithelzellen entwickeln (Meyer 1919).

Koninckx weist darauf hin, dass die zuvor genannten Theorien nur den Mechanismus der Initiation der EM beschreiben. Sie können allerdings weder die verschiedenen klinischen Manifestationen erklären, noch darlegen, warum einige Frauen erkranken und andere nicht. Daher entwickelte er die *Endometriotic Disease Theory*. Darin wird der Pathomechanismus der EM als das komplexe Einwirken mehrerer Faktoren beschrieben: das Mikromilieu (Peritonealflüssigkeit, Blutstrom), welches durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und andere Bestandteile Wachstum und Progression beeinflusst (Koninckx et al. 1998); die veränderte Immunabwehr mit einer reduzierten zellulären Immunität; die veränderten zellulären Eigenschaften von EM-Zellen und

eutopen Endometriumzellen bei Patientinnen mit EM sowie das Vorhandensein genetischer Veränderungen (Koninckx et al. 1999).

Das jüngst entwickelte Modell zur Entstehung der EM ist das *"Tissue Injury and Repair Concept (TIAR)"* von Leyendecker und Kollegen. Sie beschreiben darin, dass die bei EM-Patientinnen beobachtete Hyperperistaltik des Uterus zu Mikrotraumen an der Übergangszone zwischen Endometrium und Myometrium führt. Im Rahmen der anschließenden Gewebereparation findet lokal durch Hochregulation der Aromatase eine vermehrte Östrogenproduktion statt. Dadurch wird die bereits gesteigerte Peristaltik des Uterus aufrechterhalten und die Autotraumatisierung des Uterus im Sinne eines Circulus vitosus gefördert. Die Hyperperistaltik führt zu einer Dislokation von Zellen der Basalis des Endometriums in die Uteruswand sowie die Peritonealhöhle und so zur Entstehung von Adenomyose sowie EM (Leyendecker et al. 2009).

Die Vertreter der *immunologischen Theorie* versuchen zu erklären, warum ektope Endometriumzellen bei Frauen mit EM außerhalb des Uterus anwachsen können und nicht vom Immunsystem beseitigt werden. Sie sehen die Ursache in einem Defekt der humoralen und zellulären Immunabwehr, welcher die Persistenz und Progression von EM-Zellen beeinflusst (Lebovic et al. 2001). In der Peritonealflüssigkeit von Patientinnen mit EM sind sowohl eine veränderte Anzahl und Aktivität von Immunzellen (Halme et al. 1983; Olive et al. 1985; Hill and Anderson 1989; Oosterlynck et al. 1991), als auch eine Dysregulation des Zytokinstoffwechsel nachweisbar (Fakih et al. 1987; Mori et al. 1991; Rier et al. 1994). Über die Induktion von Angiogenese mittels der Ausschüttung von VEGF, einem Wachstumsfaktor für Gefäßendothel, durch EM-Zellen und assoziierte Makrophagen wird die Persistenz der EM zusätzlich begünstigt (McLaren et al. 1996; Donnez et al. 1998).

Mehrere Autoren konnten bereits Endometriumzellen in Lymphgefäßen nachweisen und vermuten, dass das *Lymphgefäßsystem als Weg zur Verbreitung von Endometriumzellen* fungiert und so zur Entstehung der EM beiträgt (Halban 1924; Sampson 1927; Javert 1949; Ueki 1991). Dabei könnte diese These möglicherweise nicht nur erklären, warum EM an Organen außerhalb der Bauchhöhle auftritt, sondern könnte auch ein Hinweis auf die Bedeutung von Lymphgefäßen im Rahmen der EM sein. Dazu passt der Nachweis von Lymphgefäßen und EM-Zellen in Lymphgefäßen tief infiltrierender EM (Noël et al. 2008). Bei dieser Studie handelt es sich um die bisher einzige Studie zum Nachweis von Lymphgefäßen in EM-Gewebe. Bis auf die Beobachtungen der zuvor genannten Studie gibt es keine Untersuchungen zur Bedeutung von Lymphge-

fäßen im Rahmen der EM. Daher wird es die Aufgabe der vorliegenden Arbeit sein, diesen Aspekt näher zu untersuchen.

1.1.7 Verlauf und Besonderheiten der Endometriose

Ein großes Problem bei der Therapie der EM stellt der chronische Charakter mit einer hohen Rezidivneigung dar. So treten nach fünf Jahren bei bis zu 50 % der operierten Frauen Rezidive auf (Guo 2009). Circa 27 % der betroffenen Frauen müssen sich nach vier Jahren und 51 % nach zehn Jahren erneut einer operativen Intervention aussetzen (Weir et al. 2005; Cheong et al. 2008).

Eine weitere Problematik im Rahmen der EM ist das erhöhte Risiko für maligne Erkrankungen von EM-Patientinnen. Es wird eine Häufigkeit von bis zu 1 % einer malignen Transformation der EM angegeben (Van Gorp et al. 2004). Den größten Anteil machen dabei mit 80 % die Ovarialcarcinome aus, mit einer Häufung klarzelliger und endometrioder Typen (Vercellini et al. 1993; Brinton et al. 1997; Borgfeldt and Andolf 2004; Melin et al. 2006). In 20 % der Fälle handelt es sich um extragonadale Manifestationen (Ulrich et al. 2003). Dabei steigt das Risiko für einen malignen Prozess mit der Länge der Erkrankungsdauer (Brinton et al. 1997), mit zunehmendem Alter (Kobayashi, 2007) und bei Durchführung einer Hormonersatztherapie (Zanetta et al. 2000). EM Patientinnen erkranken zudem zeitlich früher als EM-freie Patientinnen (Borgfeldt and Andolf 2004). Des Weiteren scheinen Frauen mit EM im Vergleich zu Kontrollen häufiger am Mammacarcinom (Brinton et al. 1997; Ness et al. 2002) und Non-Hodgkin-Lymphomen (Olson et al. 2002; Melin et al. 2006) zu erkranken. Auch für die tief infiltrierende EM sind maligne Veränderungen von EM beschrieben. Zanetta et al. zeigten, dass an den für die tief infiltrierende EM typischen Lokalisationen (Douglas-Raum, Darm, Vagina) eine maligne Transformation der EM stattfand (Zanetta et al. 2000). Weitere Fälle zur Entstehung eines Endometriumcarcinoms aus EM-Läsionen des Rectosigmoids sind dokumentiert (Brooks and Wheeler 1977; Berger et al. 2001; Ulrich et al. 2005).

Auch wenn die maligne Transformation der EM eher ein seltenes Phänomen ist, hat tief infiltrierende EM einige Gemeinsamkeiten mit malignen Wachstumsformen. So zeigt die rectovaginale EM eine Infiltration und Destruktion von angrenzenden Organen, sowie an Metastasen erinnernde Absiedlungen beispielsweise in Lymphknoten. Mehrere Studien konnten zeigen, dass bei tief infiltrierender rectovaginaler EM sowohl in sich zufällig im OP-Resektat befindlichen, als auch in gezielt mit Hilfe einer Sentinelmar-

kierung entnommenen Lymphknoten in 26,3 % bis 42,3 % der Fälle EM-Läsionen nachweisbar waren (Abrao et al. 2006; Mechsner et al. 2008; Noël et al. 2008; Mechsner et al. 2009). Zusätzlich zeigten die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass in den zufällig entnommenen Lymphknoten und Senitnellymphknoten bei 70,8 % bis 83,3 % der Patientinnen Östrogen- und Progesteronrezeptor positive Zellen in den Lymphknoten vorhanden waren (Mechsner et al. 2008; Mechsner et al. 2009). Da bei der Mehrzahl der EM-Zellen eine Expression dieser Rezeptoren beobachtet werden kann (Fujishita et al. 1997) und in Kontrolllymphknoten von EM-freien Patientinnen keinerlei positive Zellen nachweisbar waren, spricht dies für deren endometriotische Herkunft. Diese Zellen waren häufig subkapsulär, im Randsinus und oder in den Trabekeln lokalisiert. Diese Strukturen sind die ersten Stationen, welche die Lymphe aus den afferenten Lymphgefäßen passiert. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass EM-Zellen auf lymphatischem Weg in die Lymphknoten gelangen. Passend zu dieser Annahme konnten Lymphgefäßen in rectosigmoiden EM-Herden von Patientinnen mit einer Lymphknotenentnahme nachgewiesen werden (Noël et al. 2008). Bisher ist völlig unklar, welche Rolle das Lymphgefäßsystem bei der EM-Erkrankung spielt und welche Bedeutung die EM-Läsionen oder EM-Zellen in Lymphknoten für den Verlauf der EM haben.

1.2 Lymphgefäßsystem

1.2.1 Anatomie und Funktion des Lymphgefäßsystems

Das Lymphgefäßsystem durchsetzt außer dem Gehirn, dem Knochenmark und der Retina nahezu alle vaskularisierten Organe (Oliver 2004; Alitalo et al. 2005). Seine Hauptaufgabe ist es, interstitielle Flüssigkeit zu drainieren und dem Blutkreislauf zu zuführen. Die Aufnahme der interstitiellen Flüssigkeit erfolgt über blind endende Lymphkapillare. Diese bestehen aus einer einfachen dachziegelartig angeordneten Endothelzellschicht, welche im Gegenteil zu den Kapillaren des Blutgefäßsystems keine oder eine nur gering ausgeprägte Basalmembran besitzen (Alitalo et al. 2005; Maby-El Hajjami and Petrova 2008). Die Endothelzellen weisen diskontinuierliche Zellverbindungen auf und werden durch Verankerung in der extrazellulären Matrix offen gehalten (Baluk et al. 2007; Danussi et al. 2008; Maby-El Hajjami and Petrova 2008). Dieser Bau ermöglicht den Lymphkapillaren die Aufnahme großer Moleküle: Fette in

Form von Chylomikronen, Proteine, Antigene und Immunzellen. Im Anschluss an die Lymphkapillare gelangt die Lymphflüssigkeit in Präkollektoren und Kollektoren, in ihrem Aufbau den Venen ähnelnde Sammelgefäße. Der Lymphfluss findet zum einen propulsiv durch kontrahierende Elemente (Lymphangione) zwischen den Lymphgefäßklappen statt, zum anderen wird er angetrieben durch die Kontraktion der Skelettmuskulatur und den Puls benachbarter arterieller Gefäße (Alitalo et al. 2005). Auf diese Weise wird die Lymphe mehreren hintereinander geschalteten Lymphknoten zugeführt. Dort werden die aufgenommenen Antigene den Immunzellen präsentiert. Die Erkennung von Fremd-Antigenen kann somit eine Immunantwort einleiten, bevor diese das Blutgefäßsystem erreicht haben. Dies verdeutlicht eine weitere wichtige Aufgabe des Lymphgefäßsystems bei der Immunabwehr. Nach der Lymphknotenpassage gelangt die Lymphe über Lymphstämme in die großen Lymphgänge. Über den Ductus thoracicus und den rechten Ductus lymphaticus wird die Lymphe dem venösen System zugeführt (Foster 1996; Swartz 2001; Jeltsch et al. 2003; Tammela and Alitalo 2010). Auf diese Weise wird die Flüssigkeitshomöostase durch Rückführung des Plasmaextravasates aus dem Interstitium in das Blutgefäßsystem gesichert und die über den Gastrointestinaltrakt aufgenommenen Fette sowie fettgebundenen Vitamine werden dem Stoffwechsel zugeführt.

1.2.2 Lymphgefäßendothelmarker

Die ersten Beschreibungen von Lymphgefäßen liegen bereits mehrere hundert Jahre zurück (Aselli 1627) und deren Bedeutung bei pathologischen Vorgängen ist lange bekannt (Pullinger and Florey 1937). Marker zu ihrer Identifikation und der Diskriminierung von Blutgefäßen stehen jedoch erst seit wenigen Jahren zur Verfügung (Abb. 1.1). Als besonders geeignete Marker zur Identifikation von Lymphgefäßendothelzellen haben sich Antikörper gegen Podoplanin und LYVE-1 etabliert.

Bei *Podoplanin* handelt es sich um ein transmembranöses Glykoprotein, welches nur von Lymphgefäß- und nicht Blutgefäßendothel exprimiert wird (Breiteneder-Geleff et al. 1999; Schacht et al. 2005). Dabei scheint Podoplanin jedoch nur auf Lymphkapillaren und nicht auf größeren Lymphgefäßen vorzukommen (Stacker et al. 2002). Auch auf Osteoblasten, Alveolarzellen und Podozyten kann dieses Molekül nachgewiesen werden (Sleeman et al. 2001; Van der Auwera et al. 2006). Zur Funktion von Podoplanin ist noch wenig bekannt. Diskutiert wird eine Beteiligung an der Auslösung intrazellulärer Signalkaskaden (Breiteneder-Geleff et al. 1997). Dadurch eingeleitete

Veränderungen am Zytoskelett könnten so Formgebung und Motilität der Lymphgefäßendothelzellen beeinflussen (Sleeman et al. 2001; Schacht et al. 2003). Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass Mäuse mit einem Knockout des Podoplaningens ein kongenitales Lymphödem und eine Lymphgefäßdilatation aufweisen (Schacht et al. 2003). Schacht et al. konnten zeigen, dass D2-40, ein bereits bekannter Lymphgefäßmarker (Kahn et al. 2002) als spezifischer Antikörper zur Detektion von Podoplanin geeignet ist (Schacht et al. 2005).

Der Lymphgefäß Hyaluronan Rezeptor-1 (LYVE-1) ist ebenfalls ein transmembranöses Glykoprotein. Er gehört zur Link-Protein-Superfamilie, einer Gruppe Hyaluronanbindender Proteine (Banerji et al. 1999). Hyaluronan ist wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix und spielt eine bedeutende Rolle bei der Migration und Differenzierung von Zellen. Lymphgefäße stellen den wichtigsten Transportweg für Hyaluronan dar (Sleeman et al. 2001). LYVE-1 wird besonders von Lymphgefäßendothelzellen aber auch Endothelzellen der Milzsinus und Synzytiotrophoblasten der Plazenta exprimiert (Banerji et al. 1999). Man vermutet, dass LYVE-1 zum einen als Hyaluronan-Transporter und somit zur Aufnahme von Hyaluronan in die Lymphendothelzellen oder zum Transport in das Gefäßlumen dient. Zum anderen könnte LYVE-1 Bedeutung bei der Hyaluronan-vermittelten Adhäsion von Zellen, insbesondere von Immunzellen an Endothelzellen und somit deren Migration zukommen (Banerji et al. 1999; Jackson 2004). Interessanterweise zeigen LYVE-1 Knockout-Mäuse keinerlei strukturelle Veränderungen des Lymphgefäßsystems (Gale et al. 2007).

Einen weiteren hoch spezifischen Lymphgefäßendothelmarker stellt der Transkriptionsfaktor *Prox-1 (Prospero-Related Homeobox-1)* dar (Wilting et al. 2002). Er ist der wichtigste Regulator in der Entwicklung des Lymphgefäßsystems, da er die Expression von Lymphgefäßendothel-spezifischen Molekülen (VEGFR-3, Podoplanin, LYVE-1) induziert und die Expression Blutgefäßendothel-spezifischer Moleküle unterdrückt (Hong et al. 2002; Petrova et al. 2002). Ein Knockout des Prox-1-Gens hat zur Folge, dass die Entwicklung des Lymphgefäßsystems unterbleibt (Wigle and Oliver 1999). Die Expression von Prox-1 kann ebenfalls in nicht endothelialen Zellen der Linse, der Leber, des Herzens, der Pankreas und des zentralen Nervensystems beobachtet werden (Stacker et al. 2002).

Weitere weniger gebräuchliche Marker zur Identifikation von Lymphgefäßendothel stehen zur Verfügung, so beispielsweise der Rezeptor *VEGFR-3*, eine auch als Flt4 bekannte, die Lymphangiogenese stimulierende Tyrosinkinase. Seine Liganden sind die

lymphgefäßspezifischen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D (Van der Auwera et al. 2006; Baluk and McDonald 2008). Dieser ist allerdings auch auf tumorassozierten Blutgefäßen nachweisbar (Valtola et al. 1999). Ebenso als Marker genutzt werden *Desmoplakin*, als Bestandteil von Endothelzellverbindungen, und der β -Chemokin-Rezeptor D6, welcher Chemokine bindet ohne Signalkaskadenaktivierung auszulösen (Van der Auwera et al. 2006; Baluk and McDonald 2008).



Abb. 1.1: Lokalisation von Lymphgefäßendothelmarkern (aus Van der Auwera et al. 2006).

1.2.3 Lymphangiogenese

Im Zuge der Embryonalentwicklung bildet sich das Lymphgefäßsystem kurz nach der Entstehung des Blutgefäßsystems parallel zu diesem aus (Oliver 2004). Die ersten Theorien zur Entstehung von Lymphgefäßen wurden am Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelt. Die am meisten akzeptierte Theorie ist die *Zentrifugaltheorie* von F.R. Sabin. Darin postuliert sie, dass sogenannte primäre Lymphsäcke aus den großen Embryonalvenen, den Kardinalvenen, ausknospen. Aus den Lymphsäcken sprossen Zellen in die Peripherie und formen Lymphgefäße, welche sich so über die verschiedenen Gewebe und Organe des Embryos ausbreiten. Mit der *Zentripetaltheorie* wurde kurze Zeit später von G.S. Huntington und C.F.W. McClure eine weitere Theorie veröffentlicht. Darin beschreiben sie, dass sich die primären Lymphsäcke im Mesenchym unabhängig von den Venen entwickeln. Die daraus zentripetal aussprossenden Lymphgefäße sollen somit erst sekundär Anschluss an das venöse System gewinnen.

Seit dem Ende des 20. Jahrhunderts konnten, dank neuester technischer und molekularbiologischer Methoden, auch auf molekularer Ebene zunehmend Erkenntnisse zum Verständnis der Lymphangiogenese im Embryo gewonnen werden. Mit Hilfe dieser entwickelten G. Oliver und Kollegen das Vier-Stadien-Modell (Abb. 1.2) der Embryonalentwicklung des Lymphgefäßsystems bei Wirbeltieren (Oliver and Detmar 2002; Oliver and Harvey 2002; Wigle et al. 2002; Oliver 2004). Dieses stützt die These des venösen Ursprungs des Lymphgefäßsystems von Sabin.

Erstes Stadium: Ein bisher unbekanntes Signal leitet das Lymphangiogeneseprogramm ein. Endothelzellen der anterioren Kardinalvenen antworten auf dieses Signal mit der Expression von LYVE-1.

Zweites Stadium: Ein Teil der LYVE-1 positiven Zellen zeigt durch die Expression von Prox-1 die Neigung, den lymphatischen Phänotyp anzunehmen. Zeitgleich knospen die ersten, noch nicht Lymphgefäß-typischen, Zellen aus den Kardinalvenen.

Drittes Stadium: Die Spezifikation des Endothels durch die Expression weiterer Lymphgefäßmarker, wie VEGFR-3, Podoplanin, Neuroplilin-2 und die sekundären lymphoiden Chemokine schreitet voran. Die Blutgefäß-typischen Marker, wie CD34 und Laminin, verschwinden allmählich von den Endothelzellen. Als erstes morphologisches Zeichen für den Beginn der Lymphangiogenese sprossen unreife Lymphgefäßendothelzellen aus den Kardinalvenen aus. Zeitgleich kann die Ausbildung der ersten primären Lymphsäcke beobachtet werden. In unmittelbarer Umgebung schütten mesenchymale Zellen den Wachstumsfaktor VEGF-C aus (Kukk et al. 1996). Durch Bindung an VEGFR-3 wird die Migration und Proliferation der noch unreifen Lymphendothelzellen gefördert (Kukk et al. 1996; Jussila and Alitalo 2002). VEGF-D, ein weiterer Ligand des VEGFR-3 der eine große strukturelle Ähnlichkeit mit VEGF-C aufweist, stimuliert ebenfalls die Lymphangiogenese. Dieser scheint besondere Bedeutung für die Entwicklung des Lymphgefäßsystems der Lunge zu haben. An VEGF-D-defizienten Mäusen konnten, bis auf eine leicht reduzierte Dichte der Lymphgefäße der Lunge, keine weiteren Pathologien in der Embryonalentwicklung beobachtet werden (Baldwin et al. 2005). Bei VEGF-C-defizienten Mäusen hingegen unterbleibt die Ausbildung von Lymphgefäßen, was zum pränatalen Tod führt (Karkkainen et al. 2004). Dies hebt die essentielle Rolle von VEGF-C und dessen Möglichkeit der Kompensation eines Mangels an VEGF-D hervor. Durch posttranskriptionale Prozessierung von VEGF-C und VEGF-D sind diese in der Lage auch an den VEGF-Rezeptor 2, Hauptregulator der Angiogenese, zu binden (Joukov et al. 1997). Dieser wird ebenfalls auf Lymphgefäßen exprimiert und scheint in Kooperation mit VEGF-3 die Migration und Proliferation der Zellen zu fördern (Goldman et al. 2007).

Viertes Stadium: Nachdem eine Verbreitung von Lymphgefäßen über den Embryo durch Ausknospen und Aussprossen aus den primären Lymphsäcken stattgefunden hat, folgt die Differenzierung und Reifung der Lymphgefäße. Als Marker reifer Lymphge-

fäße treten Desmoplakin und der β-Chemokin-Rezeptor D6 in Erscheinung. Gefäßreifung und -wachstum stehen in diesem Stadium unter dem Einfluss von VEGF-C und VEGF-D. Zu diesem Zeitpunkt bestehen noch zahlreiche Verbindungen zwischen den Blut- und den Lymphgefäßen. Eine Separation findet nun, vermittelt durch hämatopoetische Zellen, mit Hilfe von SLP 76 und dem entsprechenden Rezeptor SYK, statt (Abtahian et al. 2003). Nur wenige physiologische Verbindungen zwischen Blut- und Lymphgefäßsystem, wie an der Vena subclavia, in der Leber und der Niere bleiben erhalten.



Abb. 1.2: Lymphangiogenese im Rahmen der Embryonalentwicklung (aus Alitalo et al. 2005).

Dieses Modell könnte möglicherweise zum Verständnis der Vorgänge bei der Lymphangiogenese im adulten Organismus beitragen. Denn die Frage nach dem zellulären Ausgangspunkt von neuen Lymphgefäßen im Rahmen von Erkrankungen ist bis heute ungeklärt. Es wird angenommen, dass neue Lymphgefäße aus bereits bestehenden aussprossen. Aber auch zirkulierende Progenitorzellen, Lymphangioblasten, Makrophagen oder venöse Endothelzellen kommen als Ursprung für neu entstehende Lymphgefäße in Betracht (Oliver 2004; Karpanen and Alitalo 2008; Maby-El Hajjami and Petrova 2008). Die Forschung zur Lymphangiogenese im Rahmen chronisch entzündlicher und maligner Erkrankungen hat bisher zeigen können, dass der Achse von VEGF-C, VEGF-D und VEGFR-3 eine Schlüsselposition bei der Bildung neuer Lymphgefäße im adulten Organismus zukommt.

1.2.4 Bedeutung des Lymphgefäßsystems im Rahmen von Erkrankungen

Die Folgen der Metastasierung stellen die Haupttodesursache *maligner Tumoren* dar. Dabei entwickeln sich die ersten Metastasen meist in den regionalen, den Tumor drainierenden Lymphknoten. Metastasierung kann zum einen durch kontinuierliche Ausbreitung des Tumors sowie über das Blutgefäßsystem erfolgen. Beobachtungen haben gezeigt, dass das Lymphgefäßsystem jedoch den Hauptweg für die Verbreitung von Tumorzellen bildet. Dies kann sowohl über bereits bestehende, als auch über neu gebildete Lymphgefäße erfolgen (Stacker et al. 2002; Liersch and Detmar 2007). Das Zusammenwirken von VEGF-C, VEGF-D und VEGFR-3 hat eine zentrale Bedeutung für die pathologische Lymphangiogenese. Untersuchungen verschiedener Tumor-Typen haben gezeigt, dass Tumorzellen selbst VEGF-C und VEGF-D exprimieren. Beispiele hierfür sind das Mammacarcinom (Kinoshita et al. 2001), das Cervixcarcinom (Hashimoto et al. 2001), das Endometriumcarcinom (Hirai et al. 2001) und das Coloncarcinom (Akagi et al. 2000; George et al. 2001). Häufig korreliert die Expression dieser Wachstumsfaktoren positiv mit dem Einbruch des Tumors in die Lymphgefäße, mit der Lymphgefäßdichte, dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und einer schlechten Prognose der Betroffenen (Stacker et al. 2002; Alitalo et al. 2005). Diese Beobachtungen wurden auch durch tierexperimentelle Versuche gestützt. So rief eine Überexpression von VEGF-C und VEGF-D Lymphangiogenese hervor und förderte Metastasierung (Skobe et al. 2001; Stacker et al. 2001). Im Gegenteil dazu konnte eine Blockade von VEGFR-3 die Metastasierungsrate senken. Da sich bei einigen lymphogen metastasierenden Tumoren nur geringe oder keine Expression von VEGF-C und VEGF-D nachweisen lässt, müssen noch andere Faktoren in diesen Prozess involviert sein (Cao, 2005). Mit dem Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB), dem Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2), dem Hepatocyte Growth Factor (HGF), Angiopoietin 1 und 2 (Ang1/ Ang2), Insulin-like growth factor 1 und 2 (IGF-1/ IGF-2), aber auch dem VEGF-A wurden weitere Faktoren entdeckt, welche das Wachstum von Lymphgefäßen fördern (Van der Auwera et al. 2006).

Auch im Rahmen von *Entzündungsprozessen* kann eine Proliferation des Lymphgefäßsystems beobachtet werden. So konnte bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie der Psoriasis (Fiedler et al. 2008), den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Geleff et al. 2003; Pedica et al. 2008) und der chronischen Transplantatabstoßung der Niere (Kerjaschki et al. 2004) eine erhöhte Lymphgefäßdichte nachgewiesen werden. Dabei dienen die Lymphgefäße der Sicherung der Flüssigkeitshomöostase und als Weg für Zell-Debris abräumende, Antigen präsentierende Immunzellen in die Lymphknoten (Mouta and Heroult 2003). Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen sind Zytokine als wichtige Mediatoren

immunologischer Prozesse langfristig hochreguliert und tragen so zu einer Exazerbation des Entzündungsprozesses bei (Halin and Detmar 2008). Proinflammatorische Zytokine fördern wiederum die Lymphangiogenese durch Stimulation der Expression der Lymphgefäß-spezifischen Wachstumsfaktoren (Ristimaki et al. 1998) und Chemotaxis VEGF-C/ VEGF-D sezernierender Makrophagen in das entzündliche Areal (Skobe et al. 2001; Karpanen and Alitalo 2008). Für die Rheumatoide Arthritis wurde gezeigt, dass Synoviazellen VEGF-C exprimieren (Wauke et al. 2002).

1.3 Stand der Forschung und Ableitung der Fragestellung

Angiogenese ist für die Implantation und Progression der EM von zentraler Bedeutung. Erst dieser Vorgang gewährleistet die Versorgung der Läsionen mit Nährstoffen und Sauerstoff (Taylor et al. 2002; Groothuis et al. 2005; Laschke and Menger 2007). Eine Vielzahl (Laschke and Menger 2007) angiogener Wachstumsfaktoren, darunter auch VEGF-A als potentester Vertreter, konnte bei Patientinnen mit EM in den Läsionen selbst, im eutopen Endometrium und erhöhte Werte dieser in der Peritonealflüssigkeit nachgewiesen werden (Oosterlynck et al. 1993; Donnez et al. 1998; Koninckx et al. 1998; McLaren 2000). Die Konzentration von VEGF-A in der Peritonealflüssigkeit scheint positiv mit dem Schweregrad der Erkrankung zu korrelieren (Shifren et al. 1996; Bourlev et al. 2006). Dass EM gut vaskularisiert und oft von Gefäßen umgeben ist, kann man bereits makroskopisch feststellen (Nisolle et al. 1993; Laschke and Menger 2007). Immunhistochemische Analysen von EM-Läsionen haben gezeigt, dass sich Herde verschiedener Aktivität sowohl in Bezug auf die Dichte, als auch die Morphologie der Gefäße unterscheiden. So zeigen rote, aktive Herde eine höhere Gefäßdichte, größere Gefäßdurchmesser, eine höhere mitotische Aktivität und mehr unreife Gefäße, als blaue oder weiße, weniger aktive Herde (Nisolle et al. 1993; Matsuzaki et al. 1998; Matsuzaki et al. 2001; Bourlev et al. 2006). Bourlev konnte bei EM-Patientinnen ebenfalls sowohl für hoch proliferativ aktives EM-Gewebe verglichen mit gering proliferativ aktivem, als auch für eutopes Endometrium verglichen mit dem Endometrium von Frauen ohne EM eine höhere Gefäßdichte nachweisen.

Es ist erstaunlich, dass zur Identifikation der Gefäße in den genannten histologischen Studien entweder rein morphologische Kriterien oder panendotheliale Marker (von-Willebrand-Faktor, CD31 und CD34) verwendet wurden. Somit ist davon auszugehen, dass sich unter den Gefäßen nicht nur Blutgefäße, sondern auch Lymphgefäße befinden. Dieser wichtige Aspekt findet jedoch in keiner dieser Studien Erwähnung.

Diese Hypothese wird gestützt durch die bisher einzige Studie zum Nachweis von Lymphgefäßen in EM-Gewebe aus rectosigmoiden EM-Herden mit dem Antikörper D2-40 (Noël et al. 2008); (Abb. 1.4). Die Beobachtungen von EM-Läsionen und endometriotischen Zellen in Lymphknoten von Patientinnen mit EM sowie deren besondere Lokalisation in den Sinus der Lymphknoten (Mechsner et al. 2008); (Abb. 1.4.) legen nahe, dass EM-Zellen auf lymphatischem Weg in die Lymphknoten gelangen. Aufgrund dieser Beobachtung, stellt sich die Frage, welche Bedeutung das Lymphgefäßsystem für die Pathogenese der EM hat.

Kommt es im EM-Gewebe neben Angiogenese auch zu Lymphangiogenese? Exprimieren EM-Zellen und EM-assoziierte Immunzellen möglicherweise ebenfalls Lymphgefäß-spezifische Wachstumsfaktoren? Der bisher einzige Nachweis zur Expression von VEGF-C erfolgte durch Takehara et al.. Sie wiesen die Expression von VEGF-C mRNA für peritoneale, sowie ovarielle EM nach. An ovarieller EM zeigten sie mit Hilfe der Immunhistochemie, dass sowohl Epithel- als auch Stromazellen VEGF-C exprimiren (Takehara et al. 2004); (Abb.1.4).



Abb. 1.3: A: Pelviner Lymphknoten mit Endometrioseherd und disseminierten endometriotischen Zellen in subkapsulärem Sinus, superficialem Kortex und Trabekeln (aus Mechsner et al. 2008). B: D2-40 positive Lymphgefäßen in einem rectosigmoiden Endometrioseherd (aus Noël et al. 2008). C: VEGF-C positive Drüsen- und Stromazellen eines Endometriomes (aus Takehara et al. 2004).

Diese Beobachtungen stellen die ersten Hinweise zur Beteiligung von Lymphgefäßen an der Verbreitung von EM-Zellen dar. Der Nachweis von Lymphgefäßen in EM-Gewebe ist bisher jedoch erst an einem kleinen Kollektiv und nur mit einem einzigen Lymphgefäßendothelmarker (D2-40) erfolgt. Quantitative Aussagen zum Vorkommen von Lymphgefäßen und Beschreibungen ihrer Lokalisation stehen zum heutigen Zeitpunkt noch aus. Der Nachweis der Expression von VEGF-C wurde nur für wenige Fälle und immunhistochemisch nur für Endometriome gezeigt. Ein Nachweis der Expression von VEGF-C für tief infiltrierende Formen der EM und von VEGF-D für EM insgesamt ist ebenfalls noch ausständig.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, den folgenden Fragen nachzugehen.

Fragestellungen

- I. Sind Lymphgefäße in peritonealen und rectovaginalen EM-Drüsen mit Hilfe der Lymphgefäßendothelmarker D2-40, LYVE-1 und Prox-1 nachweisbar und wie sind diese lokalisiert?
- II. Gibt es einen Unterschied zwischen der Lymphgefäßdichte von EM-Herden und EM-freiem Kontrollgewebe sowie zwischen EM-Drüsen verschiedener Lokalisation?
- III. Gibt es Unterschiede der Lymphgefäßdichte f
 ür die verschiedenen Lymphgefäßendothelmarker D2-40, LYVE-1, Prox-1?
- IV. Exprimieren EM-Zellen die Lymphangiogenese-spezifischen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D und korreliert die Expression dieser mit der Lymphgefäßdichte?
- V. Hat eine hormonelle Therapie Einfluss auf die Lymphgefäßdichte und die Expression von VEGF-C und VEGF-D?
- VI. Korreliert die Lymphgefäßdichte mit klinischen Aspekten, wie dem Erkrankungsstadium und der klinischen Herdgröße?

2 Material und Methoden

2.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Es wurde Gewebe von 75 Patientinnen, von den im Endometriosezentrum der Charité zwischen 2002 bis 2008 aufgrund einer symptomatischen EM (Dysmenorrhoe, chronische oder rezidivierende Unterbauchschmerzen, Dyspareunie, Dyschezie, Dysurie oder Infertilität) laparoskopierten oder laparotomierten Frauen verwendet.

Die Patientinnen im Alter von 19 bis 48 Jahren (Mittelwert $33,52 \pm 0,79$ Jahre) waren zum Zeitpunkt der Operation alle prämenopausal. 55 (73 %) Frauen hatten einen regulären Menstruationszyklus, 18 (24 %) nahmen orale Kontrazeptiva ein und für 2 (3 %) war keine Information bezüglich des Menstruationszyklus vorhanden. Die Ermittlung der Zyklusphasen erfolgte rechnerisch mit Hilfe der Angaben zur letzten Menstruation und der Zyklusdauer (Tabelle 2.1).

37 (49 %) Patientinnen hatten eine peritoneale EM, 32 (43 %) Patientinnen hatten sowohl eine peritoneale als auch rectovaginale EM, 5 (7 %) Patientinnen hatten isolierte rectovaginale Herde und bei einer Patientin mit rectovaginaler EM war keine Dokumentation zusätzlicher Herde verfügbar. Für die 69 Frauen mit peritonealen EM-Herden wurde eine Einteilung in Erkrankungsstadien entsprechend der rASRM-Klassifikation vorgenommen (Tabelle 1). 15 (22 %) Frauen befanden sich im rASRM-Stadium I, 20 (29 %) im rASRM-Stadium II, 18 (26 %) im rASRM-Stadium III und 16 (23 %) im rASRM-Stadium IV. Eine zusätzliche Einteilung für Patientinnen mit rectovaginalem Befall erfolgte gemäß der ENZIAN-Klassifikation für tief infiltrierende EM (Tabelle 2.1).

Bei 20 der Patientinnen mit rectovaginaler EM zeigte sich eine Infiltration angrenzender Organe. Bei 12 (29 %) bestand eine Infiltration der aboral des Sigmoids gelegenen Darmabschnitte, bei 6 (16 %) eine Infiltration der Vagina, bei 6 (16 %) eine Infiltration der Sacrouterinligamente und bei 4 (10 %) eine Ureterinfiltration. 14 (34 %) Patientinnen hatten eine Adenomyosis uteri.

Patientinnen mit bestehenden malignen Erkrankungen wurden von der Studie ausgeschlossen.

		n	Anteil
Hormoneinnahme	.la	18	24 %
	Nein	55	73%
	Unbekannt	2	3%
Zvklus	Menstruation	2	3%
2	Proliferation	15	20 %
	Sekretion	19	25 %
	kein Zyklus	20	27 %
	Unbekannt	19	25 %
rASRM		15	20 %
	II	20	27 %
	111	18	24 %
	IV	16	21 %
	keine Einteilung möglich	5	7%
	Unbekannt	1	1 %
ENZIAN-Score	E1a	1	2%
	E1b	3	7%
	E2a	13	32 %
	E2b	3	7 %
	E2c	13	32 %
	E3b	4	10 %
	E3c	13	32 %
	E4b	1	2 %
	E4c	3	7 %
	FI	12	29 %
	FA	14	34 %
	FB	2	5%

Tabelle 2.1: Klinische Daten des Patientenkollektivs.

2.2 Gewebeproben

Es wurden peritoneale EM-Herde von 37 Frauen untersucht, dabei stammten 6 (16 %) vom Blasenperitoneum, 11 (30 %) aus dem Douglasraum, 3 (8 %) vom Beckenwandperitoneum, 11 (30 %) befanden sich am Ligamentum sacrouterinum, 3 (8 %) in der paracolischen Rinne und 3 (8 %) in der Fossa ovarica.

Für die rectovaginalen EM-Herde wurde die Infiltrationstiefe in angrenzende Organe dokumentiert. Dabei waren bei 23 (61 %) Epithel- und Stromazellen im Mesocolon, bei 27 (71 %) in der Muscularis propria, bei 14 (37 %) in der Submucosa und bei einer (3 %) in der Mucosa nachweisbar. Eine Infiltration der Vagina zeigte sich bei 6 (15,8 %) Patientinnen. Entsprechend der klinischen Herdgröße wurden die rectovaginalen EM-Herde vier Gruppen zugeordnet. 6 (16 %) zeigten eine Herdgröße weniger als 1 cm, 11

(29 %) eine Herdgröße von 1 bis 2 cm, 5 (13 %) eine Herdgröße von 2 bis 3 cm und 14 (37 %) eine Herdgröße über 3 cm. Für 2 (5 %) (Tabelle 2.2). Aufgrund der Darminfiltration musste bei 30 (78,9 %) Patientinnen eine Darmteilresektion von 20 mm bis 280 mm (Mittelwert 95,2 mm) Länge durchgeführt werden.

		n	Anteil
Herdgröße	1 (<1cm)	6	16 %
	2 (1–2cm)	11	29 %
	3 (2–3cm)	5	13 %
	4 (>3cm)	14	37 %
	Unbekannt	2	5%
Infiltrationstiefe	Mesocolon	23	61 %
	Muscularis	27	71 %
	Submucosa	14	37 %
	Mucosa	1	3%
	Vagina	6	16 %

Tabelle 2.2: Klinische Herdgröße und Infiltrationstiefe der rectovaginalen EM-Herde.

Nach der operativen Entnahme wurde das Gewebe zur histologischen Sicherung der EM an das Institut für Pathologie des Charité Universitätsklinikum Benjamin Franklin übersandt.

Aus der Gewebebank der Pathologie wurden folgendes Gewebe ausgewählt und als EM-freies Kontrollgewebe verwendet: nicht pathologisch verändertes Peritoneum (n = 11), Tumor-freie Resektionsränder von Dickdarmresektaten (n = 13) bei Coloncarcinom und nicht pathologisch veränderte Vaginae (n=10) aus Hysterektomie-Präparaten.

Für diese Studie liegt ein Ethikvotum (EA 4/038/07) vor. Die Patientinnen gaben ihr schriftliches Einverständnis.

2.3 Immunhistochemische Färbung

2.3.1 Herstellung von Gewebeschnitten

Mit Hilfe eines Mikrotoms (HM 400R, Microm GmbH, Walldorf) wurden 1 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt und auf Objektträger ("Super Frost Plus", Menzel-Gläser) gezogen. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur getrocknet und danach bei 4℃ im Kühlschrank gelagert.

2.3.2 Entparaffinierung und Antigendemaskierung

Zur optimalen Anhaftung auf dem Objektträger wurden die Schnitte für mindestens zwei bis maximal 16 Stunden bei 60°C inkubiert. Anschlie ßend erfolgte die Entparaffinierung, indem die Objektträger zweimal für fünf Minuten in ein Xylol-Bad getaucht wurden. Um das Gewebe zu rehydrieren wurden die Schnitte in eine Reihe absteigender Ethanolkonzentration eingebracht (100 % für 6 min, 96 % für 8 min, 80 % für 10 min und 70 % für 10 min). Es folgte ein Verweilen der Schnitte für 10 min in Tris-Puffer. Die Antigendemaskierung wurde durch Kochen der Schnitte in Target-Lösung (pH 9) für D2-40 oder Citratpuffer (pH 6) für VEGF-C, VEGF-D, Prox-1 und LYVE-1 bei 400 W für 15 min in der Mikrowelle durchgeführt. Danach kühlten die Schnitte für 20 min auf Eis ab.

2.3.3 Peroxidaseblock und Absättigung unspezifischer Bindungen

Für die Färbung mit Antikörpern gegen VEGF-C und VEGF-D erfolgte eine Blockierung der endogenen Peroxidase mit 3 %-iger Peroxidlösung. Um für die Antikörper unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurde das Gewebe für 30 min mit fetalem Kälberserum inkubiert, welches anschließend nur von den Objektträgern abgeklopft wurde.

2.3.4 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemie erfolgte nach der Avidin-Biotin-Methode. Die Schnitte wurden mit den in Tabelle 2.3 aufgeführten Primärantikörpern in entsprechender Verdünnung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach gründlich mit Tris-Puffer gespült.

Antikörper	Klonalität	Spezies	Firma	Verdünnung
D2-40	monoklonal	Maus	DAKO	1:400
LYVE-1	polyklonal	Kaninchen	Dianova	1:50
Prox-1	polyklonal	Kaninchen	Dianova	1:50
VEGF-C	polyklonal	Kaninchen	Invitrogen	1:150
VEGF-D	monoklonal	Maus	R&D Systems	1:100

Tabelle 2.3: Verwendete Primärantikörper.

Als nächster Schritt erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern: Biotin-AP-Conjugated-Affinity-Pure-Mouse-Anti-Rabbit-IgG (Dianova, Hamburg) und Biotin-AP-Conjugated-Affinity-Pure-Rabbit-Anti-Mouse-IgG, (Dianova, Hamburg). Diese wurden 1:400 mit Antibody-Diluent verdünnt und die Schnitte damit für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anti-Maus-Antikörper wurden für die Immunhistochemie mit D2-20 und VEGF-D, und Anti-Kaninchen-Antikörper für die Immunhistochemie mit Prox-1, LYVE-1 und VEGF-C verwendet. Danach wurde wieder ein Waschschritt mit Tris-Puffer durchgeführt.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit in Antibody Diluent 1:400 verdünntem Alkalische Phosphatase (AP)-konjugiertem Streptavidin (Roche Diagnostics, Mannheim) für 40 min bei Raumtemperatur. Auch hier wurde nach Ablauf der Einwirkzeit eine gründliche Spülung mit Tris-Puffer vorgenommen.

Die Visualisierung der gebundenen Antikörper erfolgte durch eine 15 bis 20-minütige Applikation des Fuchsin Substrat-Chromogen Systems (Dako Corporation, Carpinteria, USA). Die Reaktion wurde im Anschluss mit destilliertem Wasser gestoppt. Danach erfolgte eine Kernfärbung mit Hämalau. Zuletzt wurden die sorgfältig gespülten und getrockneten Schnitte mit erwärmter Glyceringelatine (Kaisers Glycerin-gelatine, Merck KGaA, Darmstadt) und Deckgläsern (Menzel-Gläser) eingedeckelt.

Um falsch positive Ergebnisse aufgrund unspezifischer Antikörperbindung ausschließen zu können, wurden bei jedem Färbegang Schnitte mitgefärbt, bei denen der Primärantikörper durch Tris-Puffer ersetzt wurde. Als Positivkontrollen wurden Gewebeschnitte von Lymphangiom (für D2-40, Prox-1, LYVE-1) und Colon-Carcinom (VEGF-C, VEGF-D) eingesetzt.

2.4 Auswertung

Die Beurteilung der immunhistochemischen Färbung wurde mit Hilfe des Axiophot Mikroskopes (Carl Zeiss, Göttingen) bei einer 20- bis 400-fachen Vergrößerung durchgeführt. Bei der Auswertung wurden den gängigen pathologischen Kriterien für EM entsprechend nur Schnitte berücksichtigt, die endometriale Drüsen- und Stromazellen enthielten.

Zur Bestimmung der Lymphgefäßdichte (LVD) wurde die Größe der EM-Herde zunächst unter dem Mikroskop mit dem Lineal vermessen. Die D2-40-, Prox-1- sowie LYVE-1-positiven Lymphgefäße wurden ausgezählt und dabei jeder Gefäßanschnitt einzeln gewertet. Das Programm Microsoft Excel diente der Dokumentation dieser

Werte und der Berechnung der LVD (LV/mm²). Die Bestimmung der LVD der Kontrollen erfolgte nach der Hot Spot-Methode durch Aufsuchen der Areale im Schnitt mit der höchsten Zahl von Lymphgefäßen. Bei 100-facher Vergrößerung wurden dann alle im Gesichtsfeld (Fläche = 1,13 mm²) vorkommenden Lymphgefäße ausgezählt, dokumentiert und ebenfalls mit Microsoft Excel die LVD errechnet.

Bei der immunhistochemischen Färbung mit VEGF-C und VEGF-D wurde ein Score (IRS) zur Bewertung der Intensität verwendet: 0 für keine, 1 für schwache, 2 für moderate und 3 für starke Anfärbung. Die Scores wurden für Epithel- und Stromazellen getrennt vergeben.

2.5 Statistik

Die statistische Analyse und grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software Prism 4 für Windows (GraphPad Software, 2003, San Diego, USA).

In der vorliegenden Arbeit wurde die LVD von EM-Drüsen mit korresondierendem EMfreien Gewebe verglichen. Zudem wurde untesucht, ob die Expression von VEGF-C/D, eine hormonelle Therapie oder die Primärherdgröße Einfluss auf die LVD haben. Somit kamen Testverfahren zum Vergleich von Mittelwerten für unabhängige Stichproben, wie der T-Test nach Student und die multiple Varianzanalyse) zum Einsatz. An die Varianzanalyse wurde als post hoc-Test ein Dunnett's-Test angeschlossen. Um die Unabhängigkeit der hormonellen Therapie von der Expression von VEGF-C zu prüfen, kam der Chi-Quadrat-Test zur Anwendung.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit p < 0,05 kann von einem statistisch signifikanten Zusammenhang ausgegangen werden.

2.6 Arbeitsmaterialien

2.6.1 Puffer

50 mM Tris-Puffer (pH 7,4 -7,6):

34,25 g Trizma[®] HCl 4 g Trizma[®] Base 43, 9 g NaCl Auffüllen auf 5 I mit Aqua destillata

Die pH-Einstellung erfolgte mit HCl und NaOH.

10 mM Citratpuffer (pH 6,0):

Lösung A 0,1 M

Lösung B 0.1 M

21,01 g Zitronensäure in 1000 ml Aqua destillata) 29,41 g NaCitrat in 1000 ml Aqua destillata)

18 ml Lösung A und 82 ml Lösung Bad 1000 ml Aqua destillata

2.6.2 Geräte

Geräte	Hersteller
Accu Jet (Pipettierhilfe)	Brand, Wertheim
Analysenwaage Navigator TM	Ohaus, Giessen
Axiophot Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Axiovert 25 Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Bidestanlage GFL 2102	GFL, Burgwedel
Canon PowerShot G5	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Magnetrührer mit Heizplatte KMO 2 basic	Janke und Kunkel, Taufen
Magnetrührer MR 2002	Heidolph, Schwabach
Mikroliterzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Mikrotom HM 400R	MICROM International GmbH, Walldorf
pH-Meter pH 300	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Präzisionswaage 2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (Laborfuge A)	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Eppendorf Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Ehret, Emmendingen
Vortex (Genie 2)	Scientific Industries, Darmstadt
Warmwasserbad	Medax Nagel GmbH, Kiel

2.6.3 Reagenzien, gebrauchsfertige Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Reagenzien, Verbrauchsmaterial	Hersteller	
Aceton	J.T. Baker, Deventer, Holland	
Calcium Chlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Steinheim	
Dako Pen	DakoCvtomation. Glostrup. Dänemark	
Dako [®] Antibody Diluent with Background	DakoCvtomation, Glostrup, Dänemark	
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig	
Diamino-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Roth, Karlsruhe	
$(Na_2HPO_4 \times 2 H_2O)$		
Eppendorf T.I.P.S., verschiedene Grössen	Eppendorf, Hamburg	
Ethanol (70%)	Merck, Darmstadt	
Ethanol (80%)	Merck, Darmstadt	
Ethanol (96%)	Merck, Darmstadt	
Ethanol (96%) reinst	Merck, Darmstadt	
Falcon Serologische Pipetten 10ml, 25 ml	Becton Dickinson Labware, Franklin	
	Lakes, NJ USA	
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin	
Fluoromount-G	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA	
Fuchsin Substrate-Chromogen-System	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	
Isopropanol	Merck, Darmstadt	
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt	
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt	
Natriumchlorid (NaCl) min 99,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt	
Objektträger SuperFrost [®] Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig	
Parafilm	American National Can, Neenhah, WI,	
	USA	
Perhydrol 30% (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt	
Polyethylenbecher	Plano, Wetzlar	

Reaktionsgefäße Salzsäure (HCl) Sodium Orthovandanat Streptavidin-AP Coniugate Tri-Natriumcitrat-Dihydrat Trizma® Hydrochlorid (Tris-HCl) Trizma® Base Xylol Zitronensäure

Brand GmbH + Co, Wertheim Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim J.T. Baker, Deventer, Holland Merck, Darmstadt

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde EM-Gewebe von Patientinnen mit rectovaginaler (n = 38) und peritonealer (n = 37) EM auf das Vorkommen von Lymphgefäßen immunhistochemisch untersucht.

Histologisch zeigte sich, dass die primären EM-Herde zumeist aus mehreren EM-Drüsen zusammengesetzten waren. Besonders die rectovaginalen EM-Herde wiesen zahlreiche, zum Teil mehr als 30 Einzeldrüsen pro Anschnitt, auf. Eine Infiltration rectovaginaler EM war für alle Schichten des Darmes (Mesocolon, Muscularis propria, Submucosa, Mucosa) sowie der Vagina nachweisbar, wobei EM-Drüsen häufig in mehreren Schichten gleichzeitig vorkamen (Abb. 3.1). Von jeder Patientin wurden, je nach Anzahl der vorkommenden Drüsen im untersuchten Gewebeschnitt, ein bis zehn Drüsen ausgewertet.



Abb. 3.1: Übersicht eines den Darm infiltrierenden Endometrioseherdes. Dieser setzt sich aus mehreren Einzeldrüsen zusammen, welche Submucosa, Muscularis propria und Mesocolon infiltrieren (Vergrößerung 20-fach).

3.1 Vorkommen und Verteilung D2-40 positiver Lymphgefäße in Endometriosegewebe

Bei allen untersuchten EM-Herden der 38 rectovaginalen Fälle waren reife Podoplaninpositive Lymphgefäße mit Hilfe des Markers D2-40 nachweisbar. Bei 35 von 37 Patientinnen mit peritonealen EM-Herden waren D2-40 positive Lymphgefäße darstellbar. Dabei zeigte sich eine Häufung der Lymphgefäße insbesondere am Rand des EM-Stromas in der Nähe des Übergangs zum umgebenden Gewebe. Dies ruft den Eindruck eines Lymphgefäßsaumes um die EM-Herde hervor (Abb.3.2).




Abb. 3.2: A: D2-40 positive Lymphgefäße einer rectovaginalen Endometriosedrüse die von der Muscularis propria des Darmes umgeben ist. Die Mehrzahl der Lymphgefäße (Pfeile) befindet sich saumartig am Rand des Endometriosestromas in der Nähe zum Übergang zur Muscularis propria (Vergrößerung 100-fach). **B:** D2-40 positive Lymphgefäße (Pfeile) in peritonealer Endometriosedrüse (Vergrößerung 200-fach).

Um die Verteilung der Lymphgefäße näher beschreiben zu können, wurde bei allen untersuchten EM-Läsionen dokumentiert, ob sich die Lymphgefäße in unmittelbarer Nähe zu den Epithelzellen befinden, im Stroma verteilt sind und / oder ob ein sogenannter Stromasaum imponiert.

Bei den rectovaginalen Herden zeigte sich in 94,7 % der untersuchten Fälle ein Lymphgefäßsaum im Stromarandbereich der Drüsen. In 48,5 % der Herde waren die Lymphgefäße über das Stroma verteilt und nur 0,15 % zeigten Lymphgefäße in unmittelbarer Nähe der EM-Epithelzellen. Um mögliche Unterschiede der Verteilung in Abhängigkeit der Drüsengröße darstellen zu können, wurde je nach Infiltrationstiefe der Drüsen der Mittelwert der Größe der EM-Drüsen bestimmt. Dabei war für jede Infiltrationstiefe festzustellen, dass die Drüsen (46,6 %) welche gleichzeitig Lymphgefäße im Stroma und einen Lymphgefäßsaum aufwiesen, signifikant (p<0,001) größer sind, als jene mit Lymphgefäßen im Stroma oder mit einem Saum aus Lymphgefäßen.

Die EM-Herde mit peritonealer Lokalisation zeigten in 85,2 % der Fälle einen Lymphgefäßsaum im Randbereich des Stromas der EM-Drüsen, in 37,0 % Lymphgefäße im Stroma und in 13,0 % Lymphgefäße in unmittelbarer Nähe der EM-Epithelzellen. Es ließ sich diesbezüglich kein signifikanter Zusammenhang zwischen Lymphgefäßverteilung und Größe der EM-Drüsen nachweisen.

3.2 Vergleich der Dichte D2-40 positiver Lymphgefäße in Endometriosegewebe und Endometriose-freiem Gewebe

Die Bestimmung der Dichte von Lymphgefäßen ermöglichte es, quantitative Aussagen über das Vorkommen von Lymphgefäßen in EM-Herden treffen und Vergleiche mit EMfreiem Gewebe anstellen zu können. Zu diesem Zweck wurde in den immunhistochemisch mit D2-40 gefärbten Schnitten, wie oben beschrieben, die Lymphgefäßdichte (LVD) in LV/mm² für die EM-Drüsen und das EM-freie Kontrollgewebe ermittelt.

Die Bestimmung der LVD wurde für das rectovaginale EM-Gewebe in Abhängigkeit von der Infiltrationstiefe vorgenommen, da die einzelnen Schichten des Darmes und die Vagina entsprechend ihrer physiologischen Funktion unterschiedliche Dichten an Lymphgefäßen aufweisen. Das EM-Gewebe wurde mit korrespondierendem EM-freien Gewebe verglichen.

Es ließ sich insgesamt eine im Vergleich zu entsprechendem EM-freien Gewebe hoch signifikant (p < 0,0001) erhöhte Dichte D2-40 positiver Lymphgefäße in den EM-Drüsen feststellen (Tabelle 3.1; Abb. 3.3). Die LVD von EM-Drüsen in der Vagina war um das 3,2-fache höher als in EM-freiem vaginalem Gewebe. In EM-Drüsen des Mesocolons war die LVD im Vergleich zur LVD EM-freien Mesocolons um den Faktor 3,5 höher. Die EM-Drüsen der Muscularis propria des Darmes zeigten eine erhöhte LVD um den Faktor 4,8 gegenüber gesunder Muscularis propria. In der Submucosa lokalisierte EM-Läsionen hatten eine 1,8-fach erhöhte LVD im Vergleich zu EM-freier Submucosa.

Die mittlere LVD aller untersuchten rectovaginalen EM-Drüsen unabhängig von der infiltrierten Schicht entsprach 25,06 \pm 1,24 LV/mm². Beim Vergleich der LVD der EM-Drüsen in Abhängigkeit von ihrer Infiltrationstiefe miteinander ließen sich keine signifikanten (p=0,4939) Unterschiede aufzeigen.

EM-Drüsen mit peritonealer Lokalisation zeigten eine um den Faktor 2,8 höhere LVD D2-40 positiver Gefäße als EM-freies Gewebe. Mit Hilfe der statistischen Analyse ließ sich somit auch bei der peritonealen EM ein hoch signifikanter Unterschied zu EM-freiem Kontrollgewebe nachweisen (Tabelle 3.1; Abb. 3.3).

Tabelle 3.1: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) D2-40 positiver Gefäße in rectovaginalen Endometriosedrüsen (rv EM) sowie peritonealen Endometriosedrüsen (p EM) mit Endometriose-freiem Gewebe; mit p-Werten.

D2-40	rv EM LVD (LV/mm²)	EM-freies Gewebe LVD (LV/mm²)	p-Wert
Vagina	31,36±5,62	9,91 ±0,69	<0,0001
Mesocolon	26,01 ±1,73	$7,35 \pm 0,47$	<0,0001
Muscularis propria	22,81 ±1,84	$4,76 \pm 0,44$	<0,0001
Submucosa	22,66±1,84	12,94±0,89	<0,0001
	р ЕМ LVD (LV/mm²)	EM-freies Gewebe LVD (LV/mm²)	p-Wert
Peritoneum	27,47 ±2,99	9,71 ±0,65	<0,0001





Der Vergleich der LDV von peritonealen Drüsen mit rectovaginalen EM-Drüsen in Abhängigkeit von ihrer Infiltrationstiefe ergab keine signifikanten (p = 0,5005) Unterschiede.

3.3 Vorkommen LYVE-1 positiver Lymphgefäße und ihre Dichte in Endometriosegewebe und Endometriose-freiem Gewebe

Mit dem Lymphgefäßmarker LYVE-1, im Rahmen der embryonalen Lymphangiogenese der erste positive Lymphgefäß-spezifische Marker, ließen sich deutlich mehr Gefäße darstellen als mit D2-40 (Abb. 3.4). Die charakteristische Verteilung der Lymphgefäße in der Art eines Saumes zwischen Stroma und angrenzendem Gewebe, wie für D2-40, konnte für LYVE-1 nicht mehr so eindeutig beobachtet werden. Die Gefäße schienen vielmehr kontinuierlich über das Stroma der EM angeordnet zu sein.



Abb. 3.4: A: Immunhistochemischer Nachweis LYVE-1 positiver Lymphgefäße (Pfeile) in rectovaginaler Endometriosedrüse (Vergrößerung 100-fach). B: Immunhistochemischer Nachweis LYVE-1 positiver Lymphgefäße (Pfeile) in peritonealer Endometriosedrüse (Vergrößerung 200-fach).

Auch die Bestimmung der Dichte von LYVE-1 positiven Lymphgefäßen wurde differenziert für die verschiedenen anatomischen Schichten entsprechend der Infiltrationstiefe der EM-Herde vorgenommen. Der Vergleich der Dichte LYVE-1 positiver Lymphgefäße von rectovaginalem EM-Gewebe mit EM-freiem Kontrollgewebe zeigte für alle Schichten signifikant höhere Werte für das EM-Gewebe (Tabelle 3.2, Abb. 3.5).

Die EM-Drüsen der Vagina zeigten eine um den Faktor 10,5 erhöhte LVD gegenüber gesunder Vagina. Die LVD mesocolischer EM-Drüsen war um den Faktor 9,2 höher als die LVD EM-freien Mesocolons. EM in der Muscularis propria zeigte eine 13,5-mal höhere Dichte von Lymphgefäßen als entsprechendes Kontrollgewebe. In der Submucosa gelegene EM-Drüsen wiesen verglichen mit EM-freier Submucosa eine Erhöhung der LVD um den Faktor 2,0 auf.

Verglich man die LVD der EM-Läsionen mit verschiedener Infiltrationstiefe untereinander, so zeigten die Läsionen mit vaginaler Infiltration eine signifikant (p<0,01) höhere Dichte gegenüber den die verschiedenen Darmschichten infiltrierenden EM-Drüsen. Die Gegenüberstellung der EM-Läsionen mit unterschiedlich tiefer Infiltration der Darmschichten ergab keine signifikanten Unterschiede. Wurde die Infiltrationstiefe der rectovaginalen EM-Herde nicht berücksichtigt, so ließ sich eine mittlere LVD von 46,12 \pm 4,55 LV/mm² für alle EM-Herde ermitteln.

Der Vergleich peritonealer EM-Drüsen zeigte für LYVE-1 positive Gefäße ebenfalls eine hoch signifikant, um den Faktor 2,7, größere Dichte von Lymphgefäßen, als EM-freies peritoneales Gewebe (Tabelle 3.2, Abb. 3.5).

Tabelle 3.2: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) LYVE-1 positiver Gefäße in rectovaginalen Endometriosedrüsen (rv EM) sowie peritonealen Endometriosedrüsen (p EM) mit Endemetriose-freiem Gewebe; mit p-Werten.

LYVE-1	rv EM LVD (LV/mm²)	EM-freies Gewebe LVD (LV/mm²)	p-Wert	
Vagina	98,10±17,24	9,37 ±1,13	<0,0001	
Mesocolon	41,29±5,64	4,47 ±0,42	<0,0001	
Muscularis propria	34,60 ±6,12	2,57 ±0,22	<0,001	
Submucosa	31,66±8,33	$15,89 \pm 0,95$	<0,001	

	р ЕМ LVD (LV/mm²)	EM-freies Gewebe LVD (LV/mm ²)	p-Wert	
Peritoneum	44,98±5,07	16,74±1,40	<0,0001	_





Bei dem Vergleich der LVD peritonealer EM mit den die verschiedenen Darmschichten infiltrierenden EM-Drüsen ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die LVD der die Vagina infiltrierenden EM unterschied sich jedoch signifikant (p < 0,01) von der LVD der EM-Läsionen des Peritoneums.

3.4 Vorkommen Prox-1 positiver Lymphgefäße und ihre Dichte in Endometriosegewebe und Endometriose-freiem Gewebe

Die immunhistochemische Untersuchung mit Hilfe des Lymphgefäß-spezifischen Markers Prox-1, ein Transkriptionsfaktor und Hauptregulator der embryonalen Lymphangiogenese, zeigte wie für LYVE-1 eine deutlich höhere Anzahl positiver Gefäße im Vergleich zur Immunhistochemie mit D2-40. Die positiven Gefäße waren ebenfalls gleichmäßig über das Stroma der EM verteilt. Als Transkriptionsfaktor zeigte dieser eine typische Kernfärbung (Abb. 3.6).



Abb. 3.6: A: Immunhistochemischer Nachweis Prox-1 positiver Lymphgefäße in rectovaginaler Endometriosedrüse. Pfeile zeigen auf positive Zellkerne von Lymphendothelzellen. Die ebenfalls reaktiven EM-Epithelzellen sind mit einem Stern gekennzeichnet (Vergrößerung 400-fach). **B:** Immunhistochemischer Nachweis Prox-1 positiver Lymphgefäße (Pfeile) in peritonealer Endometriosedrüse (Vergrößerung 200-fach).

Die Analyse der rectovaginalen EM-Drüsen mit verschiedenen Infiltrationstiefen in Bezug auf Prox-1 positive Lymphgefäße ergab eine hoch signifikant größere LVD für das EM-Gewebe im Vergleich zu korrespondierendem EM-freien Gewebe (Tabelle 3.3; Abb.3.7).

Die in der Vagina lokalisierten EM-Herde zeigten eine um den Faktor 5,7 erhöhte Dichte von Lymphgefäßen gegenüber gesunder Vagina. Die EM-Drüsen des Mesocolons wiesen im Vergleich zu entsprechendem EM-freien Kontrollgewebe eine 7,3-fache höhere Dichte von Lymphgefäßen auf. Die LVD der EM-Läsionen in der Muscularis

propria war um den Faktor 11,1 gegenüber EM-freier Muscularis propria erhöht. In der Submucosa gelegene EM-Drüsen zeigten 2,2-mal mehr Prox-1 positive Lymphgefäße als die Submucosa gesunden Darmes.

Der Vergleich der rectovaginalen EM-Drüsen mit verschiedener Infiltrationstiefe untereinander ergab einen signifikanten (p < 0,01) Unterschied der vaginalen EM-Drüsen gegenüber den Darm infiltrierenden Drüsen. Die LVD der das Mesocolon, die Muscularis propria und die Submucosa infiltrierenden EM-Drüsen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Dichte Prox-1 positiver Lymphgefäße für rectovaginale EM ohne Differenzierung der Infiltrationstiefe betrug 47,56 ± 3,84 LV/mm². Im Peritoneum lokalisierte EM-Drüsen zeigten im Vergleich zu EM-freiem peritonealen Kontrollgewebe eine um den Faktor 4,5 hoch signifikant höhere Dichte Prox-1 positiver

Lymphgefäße (Tabelle 3.3; Abb.3.7)

Tabelle 3.3: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) Prox-1 positiver Gefäße in rectovaginalen Endometriosedrüsen (rv EM) sowie peritonealen Endometriosedrüsen (p EM) mit Endemetriose-freiem Gewebe; mit p-Werten.

Prox-1	rv EM LVD (LV/mm ²)	EM-freies Gewebe LVD (LV/mm ²)	p-Wert
Vagina	92,42±17,02	$16,29 \pm 1,66$	<0,0001
Mesocolon	$46,38 \pm 4,84$	$6,35 \pm 0,57$	< 0,0001
Muscularis propria	$32,94 \pm 3,07$	$2,97 \pm 0,24$	< 0,0001
Submucosa	37,16±9,83	17,15 ± 1,47	< 0,001
	р ЕМ LVD (LV/mm²)	EM-freies Gewebe LVD (LV/mm ²)	p-Wert
Peritoneum	42,01 ± 5,26	9,33 ±0,63	< 0,0001



Abb. 3.7: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) Prox-1 positiver Lymphgefäße (LV) von rectovaginalen Endometriosedrüsen (EM) mit EM-freiem Kontrollgewebe, sowie Vergleich von peritonealen EM-Drüsen mit EM-freiem Kontrollgewebe. (… p < 0,0001, … p < 0,001)

Verglich man die LVD von peritonealen EM-Herde mit der LVD der den Darm verschieden tief infiltrierenden rectovaginalen EM-Herde, so ergab dies keinen signifikanten (p = 0,42) Unterschied zwischen peritonealen, mesocolischen, muskulären und submukösen Läsionen. Die LVD von EM mit vaginaler Infiltration unterschied sich dagegen signifikant (p < 0,01) von der peritonealer EM.

3.5 Vergleich der Dichte D2-40, LYVE-1 und Prox-1 positiver Lymphgefäße in Endometriosegewebe

Die verschieden Lymphgefäßendothelmarker D2-40, LYVE-1 und Prox-1 zeigten deutliche Unterschiede bezüglich der Dichte positiver Lymphgefäße. Um die Unterschiede der LVD näher quantifizieren zu können, wurden eine vergleichende statistische Analyse vorgenommen.

3.5.1 Vergleich der Dichte D2-40, LYVE-1 und Prox-1 positiver Lymphgefäße in rectovaginalem Endometriosegewebe

Alle infiltrierten Schichten rectovaginaler EM wiesen eine höhere LVD für LYVE-1 im Vergleich zur LVD für D2-40 auf (Abb. 3.8). Für EM-Infiltrate der Vagina waren dies mit einer Erhöhung um den Faktor 3,1 höchst signifikante (p < 0,0001), im Mesocolon mit einem Faktor von 1,6 höchst signifikante (p = 0,0012), in der Muscularis propria mit einem Faktor von 1,5 signifikante (p = 0,018) und in der Submucosa mit einem Faktor von 1,4 nicht signifikante Ergebnisse (Abb. 3.8).

Die Gegenüberstellung der LVD von D2-40 und Prox-1 positiven Gefäßen ergab, dass vaginale EM-Drüsen eine um den Faktor 3,0 hoch signifikant (p = 0,002), mesocolische Drüsen eine um den Faktor 1,8 höchst signifikant (p < 0,0001), muskuläre Drüsen eine um den Faktor 1,4 hoch signifikant (p = 0,0036) und submuköse Drüsen eine um den Faktor 1,6 nicht signifikant höhere Dichte Prox-1 positiver Gefäße aufwiesen (Abb. 3.8). Dagegen ließen sich bei einem Vergleich der Dichten LYVE-1 und Prox-1 positiver Lymphgefäße für keine der infiltrierten Schichten der rectovaginalen EM signifikante Unterschiede ausmachen (Abb. 3.8). Dabei zeigten EM-Infiltrate der Vagina und der Muscularis propria für LYVE-1 eine jeweils um den Faktor 1,1 erhöhte LVD gegenüber Prox-1. Umgekehrt verhält es sich bei der LVD für die Drüsen des Mesocolons und der Submukösen Herde eine um den Faktor 1,2 höhere LVD Prox-1 positiver Lymphgefäße.



Abb. 3.8: Lymphgefäßdichte (LVD) in rectovaginalen Endometriosedrüsen. Gegenüberstellung der LVD für die verwendeten Lymphgefäßendothelmarker D2-40, LYVE-1 und Prox-1. Der Vergleich erfolgte in Abhängigkeit von der durch die rectovaginale Endometriosedrüse infiltrierten Schicht. (--- p < 0,0001, + p < 0,005, n.s. p > 0,05).

3.5.2 Vergleich der Dichte D2-40, LYVE-1 und Prox-1 positiver Lymphgefäße in peritonealem Endometriosegewebe

Die LVD LYVE-1 positiver Lymphgefäße in peritonealen EM-Drüsen war um den Faktor 1,6 hoch signifikant (p = 0,0034) gegenüber D2-40 positiven Lymphgefäßen erhöht. Die Dichte Prox-1 positiver Lymphgefäße war um den Faktor 1,5 signifikant (p = 0,0128) gegenüber der von D2-40 positiven Lymphgefäßen erhöht. Die LVD LYVE-1 und Prox-1 positiver Lymphgefäße unterschieden sich nicht signifikant (p = 0,7688) voneinander. Die Dichte LYVE-1 positiver Lymphgefäße war verglichen mit der LVD für Prox-1 um das 1,1-fache erhöht (Abb. 3.9).



Abb. 3.9: Lymphgefäßdichte (LVD) in peritonealen Endometriosedrüsen. Gegenüberstellung der LVD für die verwendeten Lymphgefäßendothelmarker D2-40, LYVE-1 und Prox-1 (++ p < 0,001, + p < 0,05).

3.6 Expression von VEGF-C und VEGF-D in Endometriosegewebe

VEGF-C und VEGF-D sind die wichtigsten Wachstumsfaktoren der Lymphangiogenese. Dass das in dieser Arbeit untersuchte EM-Gewebe gegenüber EM-freiem Gewebe eine signifikant erhöhte LVD aufwies, konnte bereits nachgewiesen werden. Um zu untersuchen ob EM-Zellen VEGF-C und VEGF-D exprimieren, wurden rectovaginale und peritoneale EM-Drüsen immunhistochemisch untersucht. Dabei wurden für die Intensität der Färbung, wie beschrieben, Scores vergeben. Epithel- und Stromazellen wurden einzeln bewertet.

3.6.1 Expression von VEGF-C und VEGF-D in rectovaginalem Endometriosegewebe

In 99,6 % der untersuchten rectovaginalen EM-Drüsen ließ sich eine Expression von VEGF-C in den Epithelzellen und für 97,3 % in Stromazellen nachweisen. Dabei zeigten 82,9 % der Epithelzellen eine hohe, 15,5 % eine moderate und 1,5 % eine geringe

Intensität der immunhistochemischen Färbung (Diagramm 3.1). Die Stromazellen zeigten, verglichen mit den Epithelzellen, insgesamt eine geringere Expression von VEGF-C (Abb. 3.10). Eine hohe Intensität ließ sich für die Stromazellen bei keiner der Drüsen nachweisen. 45,8 % der Stromazellen zeigten eine moderate und 51,5 % eine geringe Intensität. Des Weiteren war in 74,6 % der Fälle eine Reaktivität von Gefäßen im Stroma der EM mit Anti-VEGF-C erkennbar.

Eine Expression von VEGF-D ließ sich für 100 % der untersuchten Drüsen im Epithel und für 93,2 % im Stroma nachweisen. Die Epithelzellen zeigte in 62,5 % eine hohe, in 32,2 % eine moderate und in 5,3 % eine geringe Intensität der immunhistochemischen Färbung. Auch bei VEGF-D fiel, beim Vergleich von Stromazellen mit Epithelzellen, eine insgesamt geringere Expression des Wachstumsfaktors in den Stromazellen (Abb. 3.10) auf. Diese zeigten in 0,8 % eine hohe, in 46,2 % eine moderate und in ebenfalls 46,2 % eine geringe Intensität (Diagramm 3.1). Die Gefäße im Stroma waren in 77,6 % der Fälle Anti-VEGF-C reaktiv.



Abb. 3.10: Expression der Lymphangiogenese spezifischen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D in Epithel- und Stromazellen rectovaginaler Endometriose. Quantifizierung der Expressionsstärke durch Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung.





Abb. 3.11: Expression von VEGF-C (**A**) und VEGF-D (**B**) in rectovaginaler Endometriosedrüse, lokalisiert an der Grenze zwischen Muscularis propria und Mesocolon (Vergrößerung 100-fach). In beiden Abbildungen zeigen die Epithelzellen (Pfeil) eine hohe Intensität und die Stromazellen (Stern) eine moderate Intensität der immunhistochemischen Färbung.

3.6.2 Expression von VEGF-C und VEGF-D in peritonealem Endometriosegewebe

Bei den untersuchten peritonealen Drüsen ließ sich bei 100 % eine Expression von VEGF-C durch Epithelzellen und bei 94,6 % durch Stromazellen nachweisen. Die Epithelzellen zeigten in 70,9 % eine hohe Intensität der immunhistochemischen Färbung und in 29,1 % eine moderate Intensität (Diagramm 3.2). Auch hier zeigten die Stromazellen, verglichen mit den Epithelzellen, eine insgesamt geringere Expression von VEGF-C (Abb. 3.11). In 3,6 % der untersuchten Drüsen zeigten die Stromazellen eine hohe Intensität, in 53,6 % eine moderate und in 37,5 % eine geringe Intensität der Färbung. Auch für die peritoneale EM war eine Reaktivität von Gefäßen im Stroma der EM mit Anti-VEGF-C in 92,7 % erkennbar.

Die Expression von VEGF-D konnte in 98,1 % der untersuchten EM-Drüsen im Epithel und in 94,5 % im Stroma nachgewiesen werden. Die Epithelzellen zeigten in 55,6 % eine hohe, in 38,9 % eine moderate und in 3,7 % eine geringe Intensität der immunhistochemischen Färbung (Diagramm 3.2). Wiederum zeigte sich, dass die Stromazellen insgesamt eine geringere Expression des Wachstumsfaktors, als die Epithelzellen aufwiesen (Abb. 3.11). 3,6 % der Stromazellen zeigten eine hohe, 40,0 % eine moderate und 50,9 % eine geringe Färbeintensität. Es präsentierte sich bei 98,1 % der untersuchten Drüsen eine Anti-VEGF-D Reaktivität der Gefäße im EM-Stroma.



Abb. 3.12: Expression der Lymphangiogenese spezifischen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D in Epithel- und Stromazellen peritonealer Endometriose. Quantifizierung der Expressionsstärke durch Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung.



Abb. 3.13: Expression von VEGF-C (**A**) und VEGF-D (**B**) in peritonealen Endometriosedrüse (Vergrößerung 100-fach). In beiden Abbildungen zeigen die Epithelzellen (Pfeil) eine hohe Intensität und die Stromazellen (Stern) eine moderate Intensität der immunhistochemischen Färbung.

3.6.3 Vorkommen VEGF-C und VEGF-D positiver Makrophagen in Endometriosegewebe

Bei der mikroskopischen Beurteilung der Immunistochemie für VEGF-C und VEGF-D war zu beobachten, dass nicht nur EM-Zellen und Gefäßendothelzellen eine Expression der Wachstumsfaktoren zeigten, sondern dass auch im EM-Stroma vorkommende Makrophagen VEGF-C und VEGF-D exprimieren (Abb. 3.12). Von den Fällen mit rectovaginaler EM waren bei 76,3 % VEGF-C positive und 71,1 % VEGF-D positive Makrophagen vorhanden. Bei den Fällen mit peritonealer EM waren bei 62,3 % sowohl VEGF-C als auch VEGF-D positive Makrophagen im EM-Stroma nachweisbar.





Abb. 3.14: Vorkommen VEGF-C (**A**) und VEGF-D (**B**) positiver Makrophagen (Pfeile) im EM-Stroma einer peritonealen Endometriosedrüse.

3.7 Vergleich der Lymphgefäßdichte in Abhängigkeit von der VEGF-C und VEGF-D Expression in Endometriosegewebe

In dieser Arbeit konnte für rectovaginale und peritoneale EM gezeigt werden, dass EM-Zellen selbst die Lymphgefäß-spezifischen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D exprimieren. Daher war es von Interesse, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF-C und VEGF-D durch EM-Zellen und der Dichte der in den EM-Drüsen vorkommenden Lymphgefäße besteht. Um dies zu untersuchen, wurden die LVD von EM-Läsionen mit hoher der mit moderater Intensität der Anti-VEGF-C und Anti-VEGF-D immunhistochemischen Färbung gegenübergestellt. Dafür wurden die Färbintensität der EM-Epithelzellen herangezogen, da diese im Vergleich zu den Stromazellen eine deutlich stärkere Expression aufwiesen. Die EM-Drüsen mit geringer und keiner Expression wurden auf Grund der sehr geringen Fallzahlen nicht in die Testung einbezogen.

3.7.1 Vergleich der Dichte D2-40 positiver Lymphgefäße in Abhängigkeit von der VEGF-C/ VEGF-D Expression in Endometriosegewebe

Bei dem Vergleich der beiden Gruppen wurde für rectovaginale EM keine Unterteilung in Untergruppen abhängig von der Infiltrationstiefe vorgenommen.

Die Gegenüberstellung der rectovaginalen EM-Drüsen mit einer moderaten und einer hohen Intensität der VEGF-C Immunhistochemie zeigte, dass EM-Drüsen mit einer hohen Intensität eine um den Faktor 1,2 nicht signifikant erhöhte LVD für D2-40 aufwiesen. Auch der Vergleich der peritonealen EM ergab eine nicht signifikant um den Faktor 1,6 höhere Dichte D2-40 positiver Lymphgefäße für Drüsen mit hoher VEGF-C Intensität. Da sich die Dichte D2-40 positiver Lymphgefäße zwischen den rectovaginalen und peritonealen EM-Drüsen in den beiden Untergruppen nicht signifikant unterschied, wurde ein gemeinsamer Vergleich dieser vorgenommen. Dabei zeigte sich nun für die Drüsen mit hoher VEGF-C Expression eine um den Faktor 1,3 signifikant höhere LVD für D2-40 gegenüber Drüsen mit moderater Expression (Tabelle 3.4).

Auch für die VEGF-D-Immunhistochemie ließ sich bei einem Vergleich der Dichte D2-40 positiver Lymphgefäße in rectovaginalen EM-Drüsen für die Gruppe mit einer hohen Intensität und die Gruppe mit einer moderaten Intensität nur ein geringfügiger 1,1-facher nicht signifikanter Unterschied feststellen. Bei den peritonealen EM-Drüsen war ebenfalls kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen mit verschieden ausgeprägter VEGF-D Expression nachweisbar. Die EM-Läsionen mit hoher VEGF-D Expression 1,2-fach höhere LVD auf. Da sich auch hier die Gruppen mit moderater Expression und die Gruppen mit hoher Expression bei dem Vergleich von rectovaginaler und peritonealer EM nicht signifikant unterschieden, wurde wiederum ein gemeinsamer Vergleich vorgenommen. Anders als für den Vergleich der LVD in Abhängigkeit von der VEGF-C Expression eine um den Faktor 1,1 nicht signifikant erhöhte LVD gegenüber den Drüsen mit moderater VEGF-D Expression eine um den Faktor 1,1 nicht signifikant erhöhte LVD gegenüber den Drüsen mit moderater VEGF-D Expression (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Lymphgefäßdichte (LVD) für D2-40 in Abhängigkeit von VEGF-C und VEGF-D Expression.
Quantifizierung der Expressionsstärke durch Intensität der immunhistochemischen Färbung (IRS: 2 =
moderat, 3 = hoch). Vergleiche rectovaginaler Endometriosedrüsen (rv EM), peritonealer Endometriose-
drüsen (p EM) sowie rv EM und p EM gemeinsam (rv + p EM), mit p-Werten.

D2-40	VEGF-C/ IRS=2 LVD (LV/mm²)	VEGF-C/ IRS=3 LVD (LV/mm²)	p-Wert	VEGF-D/ IRS=2 LVD (LV/mm²)	VEGF-D/ IRS=3 LVD (LV/mm²)	p-Wert
rv EM	21,39±2,78	26,12±1,42	0,1788	23,83±2,03	25,50±1,43	0,5005
рЕМ	$20,03 \pm 2,27$	31,21 ± 4,16	0,0896	24,83±3,38	$30,45 \pm 4,47$	0,3914
rv + p EM	20,06 ± 1,94	26,96±1,36	0,0295	24,02±1,77	$26,32 \pm 1,40$	0,3231

3.7.2 Vergleich der Dichte LYVE-1 positiver Lymphgefäße in Abhängigkeit von der VEGF-C/ VEGF-D Expression in Endometriosegewebe

Der Vergleich der Dichte LYVE-1 positiver Lymphgefäße von rectovaginaler EM mit hoher und moderaten VEGF-C Expression zeigte, dass die Drüsen mit hoher Expression eine um den Faktor 1,6 nicht signifikant erhöhte LVD aufwiesen. Ebenso verhielt es sich bei der Gegenüberstellung der LVD für die peritoneale EM. Hier zeigten die Drüsen mit einer hohen VEGF-C Intensität eine nicht signifikant um den Faktor 1,5 höhere LVD gegenüber Drüsen moderater Intensität. Da auch für die Gruppen verschiedener VEGF-C Expression keine Unterschiede der LVD für LYVE-1 bei rectovaginaler und peritonealer Drüsen feststellbar waren, wurde wiederum ein gemeinsamer Vergleich durchgeführt. Es ließ sich eine um den Faktor 1,6 signifikant höhere LVD der Gruppe mit einer hohen VEGF-C Expression nachweisen (Tabelle 3.5, Abb. 3.13).

Bei der Gegenüberstellung der Dichte LYVE-1 positiver Gefäße in rectovaginalen EM-Drüsen zeigten die Herde mit hoher VEGF-D und moderater VEGF-D Expression eine annähernd gleich hohe LVD. Von den EM-Drüsen mit peritonealer Lokalisation zeigte die Gruppe mit hoher VEGF-D Expression eine um den Faktor 1,5 nicht signifikant höheren Dichte LYVE-1 positiver Gefäße gegenüber den Drüsen mit moderater Expression (Tabelle 3.5, Abb. 3.13).

Der anschließende gemeinsame Vergleich von peritonealen und rectovaginalen EM-Drüsen erfolgte, da auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen dem peritonealen und rectovaginalen Gewebe nachweisbar waren. Der gemeinsame Vergleich zeigte für die Expression von VEGF-D eine nicht signifikant 1,1-fach erhöhte LVD der EM-Drüsen hoher Expression gegenüber Drüsen mit moderater Expression (Tabelle 3.5, Abb. 3.13).

Tabelle 3.5: Lymphgefäßdichte (LVD) für LYVE-1 in Abhängigkeit von VEGF-C und VEGF-D Expression.						
Quantifizierung der Expressionsstärke durch Intensität der immunhistochemischen Färbung (IRS: 2 =						
moderat, 3 = hoch). Vergleiche rectovaginaler Endometriosedrüsen (rv EM), peritonealer Endometriose-						
drüsen (p EM) sowie rv EM und p EM gemeinsam (rv + p EM), mit p-Werten.						

LYVE-1	VEGF-C/ IRS=2 LVD (LV/mm²)	VEGF-C/ IRS=3 LVD (LV/mm²)	p-Wert	VEGF-D/ IRS=2 LVD (LV/mm²)	VEGF-D/ IRS=3 LVD (LV/mm²)	p-Wert
rv EM	31,31 ± 3,57	$50,90 \pm 5,44$	0,1288	42,80 ± 7,40	42,51 ± 5,07	0,9737
рЕМ	35,57±4,91	51,61±6,81	0,1742	35,60 ±4,38	52,74±8,04	0,1182
rv + p EM	33,04 ± 2,88	$51,41 \pm 4,42$	0,0493	40,52±5,24	$45,28 \pm 4,29$	0,4918

3.7.3 Vergleich der Dichte Prox-1 positiver Lymphgefäße in Abhängigkeit von der VEGF-C/ VEGF-D Expression in Endometriosegewebe

Wie zuvor bei den Vergleichen der LVD für D2-40 und LYVE-1, ließ sich auch für die Dichte Prox-1 positiver Lymphgefäße in Abhängigkeit von der VEGF-C Expression durch die Epithelzellen kein signifikanter Unterschied bei rectovaginaler und peritonealer EM nachweisen. Es waren jedoch auch hier für die mittlere LVD der Drüsen mit hoher Intensität deutlich höhere Werte festzustellen (Tabelle 3.6, Abb.3.13). So war die LVD für rectovaginale EM 1,6-mal höher und die LVD für peritoneale EM 1,4-mal höher, als für Drüsen mit einer moderaten Intensität. Um auch hier zu prüfen, ob ein gemeinsamer Vergleich peritonealer und rectovaginaler EM-Drüsen signifikante Unterschiede aufweist, wurde die Gruppen mit verschiedener Intensität der VEGF-C Immunhistochemie einander gegenüber gestellt. Es ließen sich dabei für rectovaginale und peritoneale EM keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit gleicher Intensität feststellen. Im gemeinsamen Vergleich zeigten die Drüsen mit hoher Intensität eine signifikant 1,5-mal höhere Dichte Prox-1 positiver Gefäße gegenüber den Drüsen mit moderater VEGF-C Intensität (Tabelle 3.6).

Rectovaginale EM-Drüsen mit einer hohen VEGF-D Expression wiesen einen nicht signifikant 1,1-fach höheren Wert der Dichte Prox-1 positiver Gefäße im Vergleich zu EM-Drüsen mit moderater VEGF-D Expression auf. Für die peritonealen EM-Läsionen konnte in der Gruppe mit einer hohen Intensität der VEGF-D immunhistochemischen Färbung ebenfalls eine um den Faktor 1,6 nicht signifikant höhere LVD für Prox-1 gegenüber der Gruppe mit moderater Intensität ermittelt werden. Wie zuvor bei den anderen Lymphgefäßendothelmarkern ergab der Vergleich der rectovaginalen und peritonealen Drüsen in Abhängigkeit von ihrer VEGF-D Expression keine signifikanten Unterschiede bezüglich der LVD für Prox-1. Somit folgte ebenfalls der gemeinsame Vergleich der Drüsen rectovaginaler und peritonealer EM. Hier wies die Gruppe mit hoher Intensität der VEGF-D immunhistochemischen Färbung eine 1,2-fach nicht signifikant erhöhte LVD für Prox-1 gegenüber Drüsen mit moderater Intensität auf (Tabelle 3.6, Abb. 3.13).

Tabelle 3.6: Lymphgefäßdichte (LVD) für Prox-1 in Abhängigkeit von VEGF-C und VEGF-D Expression. Quantifizierung der Expressionsstärke durch Intensität der immunhistochemischen Färbung (IRS: 2 = moderat, 3 = hoch). Vergleiche rectovaginaler Endometriosedrüsen (rv EM), peritonealer Endometriosedrüsen (p EM) sowie rv EM und p EM gemeinsam (rv + p EM), mit p-Werten.

Prox-1	VEGF-C/ IRS=2 LVD (LV/mm²)	VEGF-C/ IRS=3 LVD (LV/mm²)	p-Wert	VEGF-D/ IRS=2 LVD (LV/mm²)	VEGF-D/ IRS=3 LVD (LV/mm²)	p-Wert
rv EM	32,28±3,84	50,34±4,42	0,0929	41,90±3,98	45,20±4,31	0,6205
рЕМ	35,57 ± 4,91	$49,07 \pm 6,67$	0,2538	$30,14 \pm 4,02$	48,73±7,74	0,0767
rv + p EM	33,58 ± 2,99	50,03±3,70	0,042	$38,24 \pm 3,07$	46,15±3,76	0,1568



Abb. 3.15: Lymphgefäßdichte (LVD) für D2-40, LYVE-1 und Prox-1 positive Lymphgefäße (LV). Vergleich der LVD von Endometriosedrüsen mit moderater (2) und hoher (3) Intensität der Immunhistochemie (IRS) der Endometrioseepithelzellen bei Verwendung von Antikörpern gegen VEGF-C und VEGF-D ($\cdot p < 0.05$).

3.8 Einfluss hormoneller Therapie auf Lymphgefäßdichte sowie Expression von VEGF-C und VEGF-D

Die hormonelle Therapie stellt eine bedeutende Säule der EM-Behandlung dar. Daher sollte hier geprüft werden, ob diese einen Einfluss auf die Dichte der in EM-Läsionen vorkommenden Lymphgefäße und die Expression der Lymphangiogenese induzierenden Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D ausübt.

3.8.1 Vergleich der Lymphgefäßdichte von Endometriosegewebe in Abhängigkeit von hormoneller Therapie

Der Vergleich der LVD D2-40 positiver Lymphgefäße in rectovaginaler EM ergab, dass die Drüsen welche, Patientinnen ohne präoperative hormonelle Therapie entnommen wurden eine fast identische LVD wie die Drüsen von Patientinnen mit präoperativer hormoneller Therapie aufwiesen. Ganz anders verhielt es sich mit der Dichte LYVE-1 und Prox-1 positiver Lymphgefäße. Hier zeigten die Drüsen von Frauen ohne Hormontherapie eine signifikant höhere LVD gegenüber denen von Frauen mit Hormontherapie. Für LYVE-1 war die LVD um den Faktor 1,7 höher als bei Drüsen unter Hormonbehandlung. Die Dichte Prox-1 positiver Lymphgefäße in EM-Drüsen von Patientinnen ohne hormonelle Therapie zeigte 1,5-mal höhere Werte als bei EM-Drüsen mit hormoneller Therapie.

Dagegen ergab der Vergleich der LVD für Drüsen mit peritonealer Lokalisation von Patientinnen mit und ohne Hormontherapie bei keinem der untersuchten Lymphgefäßendothelmarker einen signifikanten Unterschied. Die LVD D2-40 positiver Läsionen ohne hormonelle Therapie war um den Faktor 1,1 geringfügig höher als bei Läsionen unter hormoneller Therapie. EM-Drüsen von Patientinnen ohne Hormontherapie wiesen eine 1,4-mal höhere Dichte LYVE-1 positiver Lymphgefäße auf, als die Drüsen von Patientinnen, bei denen zuvor eine Hormonbehandlung erfolgte. Für die Prox-1 Immunhistochemie ließ sich für die Drüsen ohne erfolgte hormonelle Therapie eine um den Faktor 1,1 wenig höhere Dichte als für die EM-Läsionen von Patientinnen mit erfolgter hormoneller Therapie nachweisen.

	rv EM mit HT LVD (LV/mm²)	rv EM ohne HT LVD (LV/mm²)	p-Wert	p EM mit HT LVD (LV/mm²)	p EM ohne HT LVD (LV/mm²)	p-Wert
D2-40	25,34 ± 1,95	25,35 ± 1,69	0,9981	25,26±5,96	28,12±3,49	0,6928
LYVE-1	28,51 ± 3,37	49,02 ± 5,61	0,0284	33,60 ± 10,61	47,42±5,71	0,303

0,0258

 $41,24 \pm 5,64$

 $43,33 \pm 14,23$

0,7643

Prox-1

 $33,15 \pm 3,62$

 $49,52 \pm 4,38$

Tabelle 3.7: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) rectovaginaler (rv EM) und peritonealer (p EM) Endometriosedrüsen von Patientinnen mit präoperativer und ohne präoperative hormonelle Therapie (HT) für die verschiedenen Lymphgefäßendothelmarker: D2-40, LYVE-1 und Prox-1; mit p-Werten.



Abb. 3.16: Lymphgefäßdichte (LVD) rectovaginaler Endometriosedrüsen (rv EM) und peritonealer Endometriosedrüsen (pEM) für die verschiedenen Lymphgefäßendothelmarker D2-40, LYVE-1 sowie Prox-1. Vergleich der EM-Drüsen von Patientinnen mit präoperativer und ohne präoperative hormonelle Therapie (HT) (+ p < 0.05).

3.8.2 Einfluss von hormoneller Therapie auf die Expression von VEGF-C und VEGF-D

Die statistische Analyse zur Testung der Abhängigkeit der VEGF-C Expression durch EM-Drüsen und der Durchführung einer Hormontherapie erfolgte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests. Dazu wurden die Gruppen mit verschieden starker Intensität der EM-Epithelzellen bei der Anti-VEGF-C und Anti-VEGF-D immunhistochemischen Färbung mit und ohne präoperative Hormontherapie einander gegenüber gestellt.

3.8.2.1 Einfluss von hormoneller Therapie auf die Expression von VEGF-C und VEGF-D bei rectovaginaler Endometriose

Es zeigte sich für die EM-Drüsen der Patientengruppe ohne präoperative hormonelle Therapie in 91,4 % eine hohe Intensität und in 8,6 % eine moderate Intensität der VEGF-C Immunhistochemie. Bei Patientinnen mit präoperativer hormoneller Therapie wiesen die EM-Läsionen in 68,7 % eine hohe, in 25,3 % eine moderate, in 4,8 % eine geringe und in 1,2 % keine VEGF-C Expression auf. Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die EM-Drüsen der Patientinnen mit einer rectovaginalen EM, bei denen zuvor keine Hormontherapie erfolgt war, eine deutlich höhere Expression von VEGF-C aufwiesen (Diagramm 3.3). Die diesbezügliche Testung ergab einen hoch signifikanten (p<0,001) Zusammenhang.

Bei der VEGF-D Immunhistochemie zeichnete sich eine gegenteilige Tendenz ab (Diagramm 3.3). Hier zeigten die EM-Drüsen ohne vorherigen Einfluss einer hormonellen Therapie eine deutlich weniger hohe Expression von VEGF-D. Die Epithelzellen zeigten in 36,2 % eine hohe, in 61,2 % eine moderate und in 2,6 % eine geringe Intensität bei der immunhistochemischen Färbung. Von den Drüsen mit erfolgter hormoneller Therapie war in 79,5 % eine hohe, in 16,9 % eine moderate und in 3,6 % eine geringe Expression von VEGF-D durch die Epithelzellen nachweisbar. Dies stellte eine hoch signifikante (p < 0,001) Wahrscheinlichkeit einer Abhängigkeit voneinander dar.



Abb. 3.17: Expression von VEGF-C und VEGF-D in Epithelzellen rectovaginaler Endometriosedrüsen. Quantifizierung der Expressionsstärke durch Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung. Vergleich der Drüsen von Patientinnen mit präoperativer und ohne präoperative hormoneller Therapie (HT).

3.8.2.2 Einfluss von hormoneller Therapie auf die Expression von VEGF-C und VEGF-D bei peritonealer Endometriose

Bei den im Peritoneum lokalisierten EM-Drüsen zeigte sich bei nicht erfolgter hormoneller Therapie in 75 % eine hohe und in 25 % eine moderate Intensität der VEGF-C immunhistochemischen Färbung. Bei den Herden von Patientinnen unter hormoneller Therapie betrug der Anteil der Drüsen mit hoher VEGF-C Expression 55 % und der mit moderater 45 %. Auch hier konnte man feststellen, dass die EM-Drüsen welche Patientinnen ohne Hormontherapie entnommen wurden eine höhere Expression von VEGF-C durch die Epithelzellen aufwiesen (Diagramm 3.4). Die statistische Testung ergab in diesem Fall jedoch keinen signifikanten (p = 0,1820) Zusammenhang zwischen hormoneller Therapie und VEGF-C Expressionstärke.

Auch bei der VEGF-D Immunhistochemie zeigte sich bei den peritonealen EM-Drüsen ein ähnliches Bild wie bei den rectovaginalen EM-Herden. Hier konnte man eine deutlich höhere Expression von VEGF-D bei zuvor erfolgter Hormontherapie feststellen (Diagramm 3.4). So zeigten die Epithelzellen in 72,7 % eine hohe und in 27,3 % eine moderate Intensität der Immunhistochemie. Dagegen konnte man in 53,5 % eine hohe, in 39,5 % eine moderate, in 4,6 % eine geringe und in 2,4 % keine Intensität der Epithelzellen von Patientinnen ohne vorherige Hormontherapie in der immunhistochemischen Färbung nachweisen. Hierbei handelte es sich jedoch um keine statistisch signifikante (p = 0,403) Abhängigkeit der beiden Aspekte.



Abb. 3.18: Expression von VEGF-C und VEGF-D in Epithelzellen peritonealer Endometriosedrüsen. Quantifizierung der Expressionsstärke durch Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung. Vergleich der Drüsen von Patientinnen mit präoperativer und ohne präoperative hormoneller Therapie (HT).

3.9 Vergleich der Lymphgefäßdichte in Abhängigkeit von der klinischen Größe der primären rectovaginalen Endometrioseherde

In unserer Arbeitsgruppe wurde zuvor eine Studie zur Untersuchung des Vorkommens von EM-Läsionen und Östrogen- / Progesteronrezeptor positiven Zellen in zufällig entnommenen Lymphknoten bei Patientinnen mit tief infiltrierender Endometriose durchgeführt (Mechsner et al. 2009). Diese ergab unter anderem, dass die klinische Herdgröße positiv mit dem Vorkommen von EM-Läsionen in Lymphknoten korreliert. Daher stellte sich die Frage, ob die klinische Herdgröße möglicherweise auch mit der LVD korreliert. Dazu wurden die primären rectovaginalen EM-Herde entsprechend ihrer klinisch eingeschätzten oder durch die Pathologen bestimmten Größe in vier Gruppen unterteilt. Die Gruppe der Größe 1 schließt Herde ein, welche weniger als 1 cm groß sind, die Gruppe der Größe 2 Herde mit einer Größe von 1 bis 2 cm, die Gruppe der Größe 3 Herde mit einer Größe von 2 bis 3 cm und die Gruppe der Größe 4 Herde mit einer Größe über 3 cm.

Der Vergleich der Dichte D2-40 positiver Lymphgefäße in rectovaginaler EM ergab zwischen den Gruppen unterschiedlicher Primärherd-Größe keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 3.8). Des Weiteren ließen sich sowohl für die Immunhistochemie mit Antikörpern gegen LYVE-1, als auch gegen Prox-1 keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der LVD von EM-Drüsen verschiedener Primärherdgrößen feststellen (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) rectovaginaler Endometriosedrüsen mit unterschiedlicher klinischer Primärherdgröße für die verschiedenen Lymphgefäßendothelmarker: D2-40, LYVE-1 und Prox-1; mit p-Werten (Größe 1:<1 cm, Größe 2:1-2 cm, Größe 3: 2-3 cm, Größe 4:>3 cm).

	Größe 1 LVD (LV/mm²)	Größe 2 LVD (LV/mm²)	Größe 3 LVD (LV/mm²)	Größe 4 LVD (LV/mm²)	p-Wert
D2-40	$26,56 \pm 2,70$	24,23±2,83	19,60±2,48	26,60±1,95	0,3031
LYVE-1	59,67 ± 12,60	40,71 ± 4,34	32,07±7,65	43,64±5,73	0,2859
Prox-1	56,46 ± 14,97	41,74 ± 8,20	25,47 ± 5,77	42,19±5,85	0,3798

Tendenziell lässt sich für alle hier verwendeten Lymphgefäßendothelmarker sagen, dass die LVD der rectovaginalen EM-Drüsen aus Primärherden mit der geringsten klinischen Größe am höchsten zu sein schien, sich zunächst mit zunehmender Größe verringerte und dann bei Drüsen von Primärherden mit einer klinischen Größe von mehr als 3 cm wieder zunahm (Abb. 3.15).



Abb. 3.19: Lymphgefäßdichte (LVD) in rectovaginalen Endometriosedrüsen (rv EM). Vergleich der LVD für D2-40, LYVE-1 und Prox-1 positive Lymphgefäße (LV) in Abhängigkeit von der primären klinischen Herdgröße (Größe 1:<1 cm; Größe 2:1-2 cm; Größe 3:2-3 cm; Größe 4:>3 cm).

3.10 Vergleich der Lymphgefäßdichte peritonealer Endometriose in Abhängigkeit vom rASRM-Stadium

Zur Prüfung, ob die Dichte der im EM-Gewebe vorkommenden Lymphgefäße mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert, wurde die LVD von peritonealen EM-Drüsen verschiedener rASRM-Stadien verglichen.

Der Vergleich der LVD verschiedener rASRM-Stadien zeigte, dass es für keinen der hier verwendeten Lymphgefäßendothelmarker signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen rASRM-Stadien gibt (Tabelle 3.9). Lediglich für D2-40 zeichnete sich eine diskrete Tendenz einer erhöhten LVD in höheren rASRM-Stadien ab (Abb. 3.16).

Tabelle 3.9: Vergleich der Lymphgefäßdichte (LVD) peritonealer Endometriosedrüsen von Patientinnen mit unterschiedlichen Endometriose-Stadien entsprechend der revidierten Klassifikation der American Society of Reproductive Medicine (rASRM) für die verschiedenen Lymphgefäßendothelmarker: D2-40, LYVE-1 und Prox-1; mit p-Werten.

	rARSM I LVD (LV/mm²)	rASRM II LVD (LV/mm²)	rASRM III LVD (LV/mm²)	rASRM IV LVD (LV/mm²)	p-Wert
D2-40	25,59 ±5,71	24,76±3,05	36, 80±9,76	30,58 ±14,61	>0,05
LYVE-1	35,78±8,33	44,02±4,90	65,65 ±20,62	41,72±11,55	>0,05
Prox-1	40, 92±11,07	37,27 ±5,98	60,46 ±17,18	41,47 ±15,79	>0,05



Abb. 3.20: Lymphgefäßdichte (LVD) peritonealer Endometriosedrüsen (p EM) in Abhängigkeit vom rASRM-Stadium der Patientinnen. Vergleich der LVD für die verschiedenen Lymphgefäßendothelmarker D2-40, LYVE-1 und Prox-1.

4 Diskussion

In der Fachliteratur wird EM häufig als rätselhafte Erkrankung bezeichnet, denn obwohl zahlreiche Theorien zu ihrer Entstehung entwickelt wurden, kann bis zum heutigen Zeitpunkt keine alle Phänomene der EM erklären. Besondere Probleme der EM stellen der chronische Verlauf und die hohe Rezidivneigung trotz chirurgischer Sanierung sowie medikamentöser Therapie dar. Zwar handelt es sich bei der EM um eine benigne Erkrankung, sie besitzt jedoch einige Eigenschaften die eher den malignen Tumoren zugeordnet werden. So sind ein invasives destruierendes Wachstum und Angiogenese zu beobachten (Thomas and Campbell 2000). Weitere Aspekte ähneln malignen Erkrankungen. EM kommt selten auch an vom kleinen Becken entfernten Organen wie zum Beispiel am Nabel oder in der Lunge vor. In Lymphknoten bei tief infiltrierenden Formen der EM konnten ebenfalls EM-Läsionen (Abrao et al. 2006; Mechsner et al. 2008; Noël et al. 2008; Mechsner et al. 2009) sowie Östrogen- / Progesteron-Rezeptor positive Zellen (Mechsner et al. 2008; Mechsner et al. 2009) mit wahrscheinlich endometriotischem Ursprung nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen erinnern an das Auftreten von Metastasen in tumorfernen Organen und Lymphknoten.

Bei den Tumoren stellen die Lymphgefäße den Hauptweg zur Verbreitung von Tumorzellen dar (Alitalo et al. 2005). Daher ist es denkbar, dass auch EM-Zellen auf diesen Wegen zu entfernten Organen, wie Nabel oder Lymphknoten gelangen und wohlmöglich sogar die Entstehung neuer Lymphgefäße fördern. Zahlreiche Arbeiten zur Angiogenese und zu Angiogenese fördernden Faktoren im Rahmen der EM liegen vor (Taylor et al. 2002; Groothuis et al. 2005). Aus der Tumorforschung ist bekannt, dass bei Angiogenese und Lymphangiogenese ähnliche Mechanismen wirksam werden. Im Rahmen der EM wäre das Auftreten von an Metastasen erinnernden Absiedlungen in Analogie zu den Tumoren durch ein Stattfinden von Lymphangiogenese erklärbar. Das Vorkommen von Lymphgefäßen sowie Lymphangiogenese fördernden Faktoren in EM-Gewebe als Hinweis auf Lymphangiogenese sind bisher nicht untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit Hilfe der Immunhistochemie das Vorkommen von Lymphgefäßen, deren Dichte im Vergleich zu EM-freiem Gewebe und die Expression Lymphgefäß-spezifischer Wachstumsfaktoren in EM-Herden zu untersuchen, sowie deren Korrelation mit klinischen Aspekten (hormoneller Therapie, rASRM-Stadium und Herdgröße) zu prüfen.

4.1 Vorkommen von Lymphgefäßen in Endometriosegewebe

In dieser Studie wurde für rectovaginale und peritoneale EM-Herde erstmals das Vorkommen von Lymphgefäßen immunhistochemisch mit der Hilfe der Lymphgefäßendothelmarker D2-40, LYVE-1 und Prox-1 nachgewiesen. Das Phänomen der Lymphangiogenese ist in Bezug auf die Pathogenese der EM ein bislang unerforschtes Gebiet. Es liegen lediglich Daten zu eutopem Endometrium vor, in dem die Existenz von D2-40 positiven Lymphgefäßen sowohl in der Funktionalis als auch in der Basalis gezeigt werden konnte (Donoghue et al. 2007). Der Nachweis LYVE-1 positiver Gefäße im Endomtrium gelang bisher nicht (Koukourakis et al. 2005; Red-Horse et al. 2006). Der zuvor einzige Nachweis D2-40 positiver Gefäße in rectovaginalen EM-Herden konnte durch Noël an einer kleinen Fallzahl erbracht werden (Noël et al. 2008).

Für das hier untersuchte Gewebe war die Anordnung der Lymphgefäße in Form eines Stromasaums für fast alle rectovaginalen sowie den überwiegenden Teil der peritonealen EM-Herde in der Immunhistochemie mit D2-40 morphologisch besonders eindrücklich. Diese sich im Stromarandbereich nahe des Übergangs von EM-Stroma zu umgebenem Gewebe befindlichen Gefäße erinnern an den häufig bei malignen Tumoren beschriebenen Ring peritumoraler Gefäße, insbesondere bei Sarkomen (Leu et al. 2000), Cervixcarcinom (Schoppmann et al. 2002) und Mammacarcinom (Schoppmann et al. 2004). Während peritumorale Gefäße bei Malignomen oft nachgewiesen werden können, erfolgt ein Nachweis intratumoraler Gefäße deutlich seltener. Dabei herrscht noch Unklarheit darüber, ob zwischen den Tumorzellen befindliche Lymphgefäße fehlen oder ob diese dem Gewebedruck des Tumors nicht standhalten und kollabieren (Skobe et al. 2001). Möglich wäre es auch, dass auf intratumoralen Lymphgefäßen die derzeit bekannten Lymphgefäßmarker herunterreguliert sind und somit nicht als Lymphgefäße identifiziert werden können (Schoppmann et al. 2002). Die Lymphgefäße der EM-Drüsen waren alle innerhalb des Stromas lokalisiert. Auch wenn der Großteil der D2-40 positiven Gefäße saumartig im Stromarandbereich angeordnet war, so wurden bei der Hälfte des untersuchten rectovaginalen und bei mehr als einem Drittel des untersuchten peritonealen EM-Gewebes ebenso gleichmäßig über das EM-Stroma verteilte Lymphgefäße gefunden.

Interessanterweise konnte für die Immunhistochemie mit Antikörpern gegen LYVE-1 und Prox-1 keine so prominente saumartige Anordnung von Lymphgefäßen gefunden werden. Hier zeigten die Lymphgefäße eher eine kontinuierliche Verteilung im

Stromabereich und scheinen möglicherweise ein Hinweis auf die Neuentstehung von Lymphgefäßen im Stroma zu sein.

Diese Beobachtungen zum Vorkommen von Lymphgefäßen in EM-Gewebe bestätigen die Vermutung, dass sich unter den zuvor durch mehrere Autoren mit Hilfe morphologischer Kriterien und panendothelialen Markern beschriebenen, nicht näher differenzierten Gefäßen (Nisolle et al. 1993; Matsuzaki et al. 1998; Bourlev et al. 2006) auch zahlreiche Lymphgefäße befinden.

Eine lymphovaskuläre Invasion durch EM-Zellen, wie in der Studie von Noël zum Vorkommen von EM-Läsionen in Lymphknoten von Patientinnen mit tief infiltrierender EM beschrieben, konnte nicht festgestellt werden (Noël et al. 2008). Allerdings wurden die sogenannten EM-Zellen in den Lymphgefäßen ausschließlich durch morphologische Kriterien identifiziert, ohne beweisende immunhistochemischen Färbungen (Noël et al. 2008). Die Lymphgefäße in der vorliegenden Arbeit zeigten meist nur ein sehr schmales Lumen und waren eher mit wenigen Immunzellen anstatt eindrücklich mit Zellen gefüllt, wie es häufig bei Tumoren der Fall ist (Ji 2006). Es ist nicht auszuschließen, dass es sich möglicherweise zum Teil ebenfalls um intravasale EM-Zellen handelt. Denn das Vorkommen von EM-Herden in entfernteren Organen und insbesondere in Lymphknoten legt nahe, dass Lymphgefäße als mögliche Ausbreitungswege fungieren (Abrao et al. 2006; Mechsner et al. 2008; Noël et al. 2008; Mechsner et al. 2009). In der Vergangenheit beobachteten mehrere Autoren endometriale Zellen in Lymphgefäßen des Uterus und zogen eine Verbreitung von Epithel- und Stromazellen über Lymphgefäße als mögliche Ursache der EM in Betracht (Halban 1924; Sampson 1927; Javert 1949; Ueki 1991). Der Nachweis von Endometriumzellen in Lymphgefäßen des Uterus erfolgte bisher rein morphologisch. Doppelfärbung mit D2-40 und Antikörpern gegen Östrogen- oder Progesteron-Rezeptoren könnten zukünftig die Identifikation einzelner sich in den Lymphgefäßen befindlichen Zellen mit möglicher endometriotischer Herkunft erleichtern.

4.2 Lymphgefäßdichte in Endometriosegewebe

Die Lymphgefäßdichte (LVD) ist ein wichtiger Parameter für die Beurteilung von Malignomen in der klinischen Routine und der Forschung geworden. Bei den verschiedenen Tumorentitäten korreliert die LVD mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen sowie dem Überleben der Patienten (Van der Auwera et al. 2006).

In dieser Arbeit wurde erstmals eine Bestimmung der LVD rectovaginaler und peritonealer EM-Drüsen für die verschieden verwendeten Lymphgefäßendothelmarker (D2-40, LYVE-1 und Prox-1) vorgenommen. Dies ermöglichte einen quantitativen Vergleich der LVD von EM-Gewebe und korrespondierendem EM-freien Gewebe. Dieser Vergleich zeigte, dass sowohl rectovaginale als auch peritoneale EM eine mehrfach erhöhte LVD für alle drei getesteten Marker gegenüber der LVD von entsprechendem EM-freien Gewebe aufwies.

Mit Hilfe panendothelialer Marker konnte bereits gezeigt werden, dass das EM-Stroma gegenüber EM-freiem Gewebe eine erhöhte Vaskularisierung aufweist (Machado et al. 2008). Die vorliegenden Ergebnisse stehen mit diesen Beobachtungen im Einklang und beweisen darüber hinaus, dass sich unter diesen Gefäßen auch zahlreiche Lymphgefäße befinden. Machando stellte bei der Untersuchung zur Vaskularisierung von EM-Gewebe fest, dass rectale EM-Läsionen besonders stark vaskularisiert waren (Machado et al. 2008). Die eigenen Untersuchungen können beim Vergleich der LVD von den Darm infiltrierender EM mit der LVD peritonealer EM allerdings keinen Unterschied feststellen. Die Vagina infiltrierende EM zeigt jedoch zum Teil eine deutlich erhöhte LVD im Vergleich zu den EM-Läsionen colorectaler sowie peritonealer Lokalisation.

Die Beobachtung einer erhöhten LVD ist für chronisch entzündliche Krankheitsprozesse seit einiger Zeit bekannt, für die Pathogenese der EM jedoch neu. So konnte eine gesteigerte Dichte an Lymphgefäßen gegenüber entsprechendem gesunden Gewebe für die Psoriasis (Braverman 1983; Fiedler et al. 2008), die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Geleff et al. 2003; Pedica et al. 2008) und die chronische Transplantatabstoßung der Niere (Kerjaschki et al. 2004) nachgewiesen werden. Auch EM weist einen chronischen, entzündlichen Krankheitsverlauf auf (Bulun 2009). Daher passen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gut zu den Beobachtungen der erhöhten LVD der zuvor genannten chronisch inflammatorischen Erkrankungen. Patientinnen mit EM zeigen eine gestörte Immunabwehr mit veränderten Immunzellkonzentrationen und einen dysregulierten Zytokinhaushalt (Bulun 2009). Diese immunologischen Veränderungen werden zum einem als Grund für die Begünstigung der Implantation der Endometriumzellen, deren Wachstum außerhalb des Uterus und der Neoangiogenese angesehen (Lebovic et al. 2001). Zum anderen könnten diese Veränderungen, auf welche an späterer Stelle näher eingegangen werden soll, einen Einfluss auf die Lymphangiogenese ausüben.

Das Vorhandensein einer deutlich erhöhten Anzahl von Lymphgefäßen und der charakteristische Stromasaum unmittelbar am Übergang des umgebenden Gewebes erwecken den Eindruck, dass das EM-Gewebe durch die Bildung neuer Lymphgefäße seinen Anschluss an das Lymphgefäßsystem des umgebenden Gewebes sichert. Dieser Mechanismus ist für Tumorgewebe gut untersucht und ermöglicht dem Tumor durch die Senkung des interstitiellen Druckes die Aufrechterhaltung der Flüssigkeitshomöostase sowie die Sicherstellung des Zustromes von Nährstoffen und Sauerstoff (Cao 2008). Da in EM-Gewebe Neoangiogenese sowie entzündliche Prozesse stattfinden, ist davon auszugehen, dass auch bei EM reichlich Extravasat anfällt. Somit liegt es nahe, dass EM wie Tumoren Lymphangiogenese zur Reduktion des interstiellen Druckes fördert.

Interessanterweise zeigte der Vergleich der LVD für D2-40, LYVE-1 und Prox-1 untereinander, dass die LVD für LYVE-1 sowie für Prox-1 eineinhalb- bis dreimal so hoch war, wie für D2-40. Dagegen glichen sich die Dichten LYVE-1 und Prox-1 positiver Lymphgefäße annähernd. Diese Differenzen bezüglich einer Gegenüberstellung der LVD für die verschiedenen Marker wurden so bisher noch nicht beschrieben.

Während die Lymphangiogenese des Embryos gut erforscht ist, ist das Wissen zur Lymphangiogenese im adulten Organismus bei pathologischen Vorgängen lückenhaft. Dabei ist noch unbekannt, welchen zellulären Ursprungs die neu gebildeten Lymphgefäße sind, ob sie aus vorhandenen Lymph- oder Blutgefäßen aussprossen, ob sie aus Progenitorzellen oder sogar Makrophagen entstehen (Oliver 2004). In der embryonalen Lymphangiogenese knospen Lymphgefäße aus Venen aus und LYVE-1 stellt dabei den ersten nachweisbaren Lymphgefäß-spezifischen Marker auf den unreifen Lymphgefäßen dar (Oliver 2004). Auch Prox-1 ist einer der frühen Marker, der im Rahmen der Entwicklung des Lymphgefäßssystems im Embryo kurze Zeit nach LYVE-1 nachweisbar ist (Wigle and Oliver 1999). Als Transkriptionsfaktor spielt er eine Schlüsselrolle bei der Umwandlung des venösen in einen lymphatischen Phänotyp des Endothels (Hong et al. 2002; Petrova et al. 2002). D2-40 ist in dieser Entwicklung ein deutlich später nachweisbarer Marker reiferer Lymphgefäße (Oliver 2004). Bisher ist völlig unklar ob nicht möglicherweise im Rahmen der Lymphangiogenese des adulten Organismus ähnliche Mechanismen wie in der Embryonalentwicklung ablaufen. Es ist denkbar, dass im EM-Gewebe, wie im Embryo, neue Gefäße aus vorhandenen Venen aussprossen und so die gefundene Diskrepanz der LVD zwischen D2-40 und LYVE-1 / Prox-1 erklärbar wäre. Wenn neue Lymphgefäße aus Venen analog zur Embryonal-

entwicklung aussprossen, müssten diese ebenfalls im frühen Stadium zuerst LYVE-1 und Prox-1 exprimieren. Da LYVE-1 und Prox-1 auch auf reifen Lymphgefäßen erhalten bleibt, könnte dies die erhöhte LVD gegenüber D2-40 positiven Gefäßen erklären, welche erst in einem späteren Stadium der Lymphgefäßentwicklung in Erscheinung treten.

4.3 Expression Lymphangiogenese-spezifischer Wachstumsfaktoren

Doch was könnte im EM-Gewebe zur Ausbildung neuer Lymphgefäße führen? Zu den wichtigsten die Lymphangiogenese stimulierenden Faktoren gehören die Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D.

In der vorliegenden Untersuchung wurde erstmals der Nachweis zur Expression der Lymphgefäß-spezifischen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D durch EM-Zellen mit rectovaginaler sowie peritonealer Lokalisation erbracht. Bisher konnte nur Takehara in wenigen Endometriomen die Expression von VEGF-C immunhistochemisch zeigen (Takehara et al. 2004). Die Expression des mit VEGF-C und VEGF-D verwandten Blutgefäß-spezifischen Wachtumsfaktors VEGF wurde bereits sowohl in EM-Gewebe als auch in eutopem Endometrium nachgewiesen (Charnock-Jones et al. 1993; Donnez et al. 1998; Bourlev et al. 2006).

In den eigenen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass sowohl Epithel-, als auch Stromazellen beide Lymphgefäß-spezifischen Wachstumsfaktoren exprimieren. Dabei wiesen die Epithelzellen eine vergleichsweise stärkere Expression von VEGF-C und VEGF-D gegenüber den Stromazellen auf. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen anderer Autoren, welche immunhistochemisch die Expression von Lymphgefäß- und Blutgefäß-spezifischen Wachstumsfaktoren durch EM-Zellen untersuchten. Diese Autoren konnten ebenfalls eine stärkere Expression von Wachstumsfaktoren der VEGF-Familie durch EM-Epithel feststellen: für VEGF-C bei Endometriomen und VEGF-A bei peritonealer EM (Takehara et al. 2004; Bourlev et al. 2006). Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von Lymphgefäßspezifischen Wachstumsfaktoren in eutopem Endometrium präsentierten ähnliche Ergebnisse. Die Epithelzellen des eutopen Endometriums zeigten immunhistochemisch im Vergleich zu den Stromazellen ebenfalls eine stärkere Expression von VEGF-C. Es wurde jedoch kein Unterschied bezüglich der Expressionsstärke von VEGF-D zwischen den verschiedenen Zelltypen des Endometriumgewebes festgestellt (Donoghue et al.

2007). Auch in Bezug auf die Expression von Lymphgefäß-spezifischen Wachstumsfaktoren lassen sich Parallelen zu anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen erkennen. So deutet der Nachweis der Expression von VEGF-C durch Synovialzellen bei rheumathoider Arthritis auf eine Beteiligung des Wachstumsfaktors bei dieser Erkrankung hin (Wauke et al. 2002; Cha et al. 2007).

Passend zu dieser Hypothese, zeigte die Korrelation der Expression der Wachstumsfaktoren mit der Dichte von Lymphgefäßen, dass EM-Drüsen mit einer hohen VEGF-C Expression höhere Werte der LVD aufwiesen, als EM-Drüsen mit einer geringeren VEGF-C Expression. Hierbei war jedoch nur für den gemeinsamen Vergleich von rectovaginalem und peritonealem EM-Gewebe ein signifikanter Unterschied der LVD nachweisbar. Dennoch zeigte sich bei der einzelnen Korrelation der VEGF-C Expression mit der LVD für rectovaginale sowie peritoneale EM eine deutlich Tendenz erhöhter Werte der LVD in den Gruppen der EM-Drüsen mit stärkerer Expression des Wachstumsfaktors. Für VEGF-D konnte ein weniger deutlicher Zusammenhang zwischen der Expression des Wachstumsfaktors und der Höhe der LVD gefunden werden. Hier zeigt sowohl der einzelne, als auch der gemeinsame Vergleich rectovaginaler und peritonealer EM-Drüsen eine positive, jedoch nicht signifikante Korrelation von VEGF-D Expression und LVD.

Dass ein Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke Lymphgefäß-spezifischer Wachstumsfaktoren und der Höhe der LVD besteht, konnte zuvor für verschiedene Tumoren beschrieben werden: Mammacarcinom (Choi et al. 2005), Cervixcarcinom (Gombos et al. 2005), Colorectalarcinom (Fan et al. 2006).

Diese Erkenntnisse zum Tumorgewebe, sowie die Ergebnisse dieser Arbeit zur Korrelation der Expression Lymphgefäß-spezifischer Wachstumsfaktoren und der LVD verdeutlichen die Bedeutung von VEGF-C / VEGF-D für die Lymphangiognese der EM. Daher sollte dieser Aspekt bei endometriotischem Gewebe weiterhin erforscht werden. Zukünftig könnte die Untersuchung von EM-Gewebe eines umfangreicheren Patienten-kollektives bezüglich des Zusammenhangs von Wachstumfaktorexpression und LVD eindeutigere Ergebnisse für VEGF-C von rectovoginaler sowie peritonealer EM einzeln betrachtet und für VEGF-D von EM insgesamt liefern.

VEGF-C und VEGF-D gehören unbestritten zu den bedeutendsten Lymphangiogenese stimulierenden Faktoren. Der Vorgang zur Bildung neuer Lymphgefäße ist jedoch äußerst komplex und somit gibt es eine Reihe weiterer Substanzen die in den Prozess der Lymphangiogenese involviert sind. An dieser Stelle soll auf die Bedeutung der

Zytokine eingegangen werden, denn sie spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Lymphangiogenese, sondern auch im Pathomechanismus der EM (Lebovic et al. 2001; Wu and Ho 2003). Sie sind wichtige Mediatoren der Zellkommunikation mit vielfältigen Aufgaben. Zytokine wirken auf Immunzellen chemotaktisch, sind für deren Aktivierung verantwortlich und fördern Zelldiffernzierung (Mouta and Heroult 2003). Im Rahmen der EM werden sie sowohl von Immunzellen, als auch von EM-Zellen selbst produziert (Wu and Ho 2003).

Ristimäki konnte mit Hilfe von Zellkulturversuchen nachweisen, dass die Zytokine IL-1 α , IL-1 β , TNF- α die Transkription von VEGF-C mRNA induzieren (Ristimaki et al. 1998). Für EM sind interessanterweise erhöhte Konzentrationen genau dieser sowie weiterer Zytokine beschrieben (Lebovic et al. 2001; Wu and Ho 2003). Zudem wurde bei der rheumatoiden Arthritis eine hoch signifikante Korrelation des VEGF-C-Spiegels mit der Konzentration von IL-1 β , TNF- α in der Synovialflüssigkeit gefunden (Wauke et al. 2002; Cha et al. 2007). Das Angiogenese fördernde Potential dieser Entzündungsmediatoren ist für EM bereits beschrieben (Lebovic et al. 2001; Taylor et al. 2002; Wu and Ho 2003). Daher liegt es nahe, dass auch die am Pathomechanismus der EM beteiligten Zytokine die Expression von VEGF-C und möglicherweise sogar von VEGF-D im EM-Gewebe induzieren.

Es gibt zunehmend Hinweise aus der Malignomforschung, dass Zytokine weitere indirekte Effekte auf die Lymphangiogenese ausüben. Wie bereits erwähnt locken sie Immunzellen an. Schoppmann konnte zeigen, dass Cervixcarcinom-assoziierte Makrophagen VEGF-C und VEGF-D sezernieren. Er stellte fest, dass die Anzahl dieser Wachstumsfaktoren produzierenden Immunzellen mit der LVD korreliert (Schoppmann et al. 2002). Schoppmann wies in der gleichen Arbeit nach, dass Makrophagen den VEGFR-3 exprimieren und durch das Milieu des Tumors (VEGF-D, Zytokine) aktiviert werden, um anschließend VEGF-C und VEGF-D zu sezernieren. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Tumoren durch Anlocken und Aktivieren von VEGF- C sowie VEGF-D produzierenden Makrophagen die Lymphangiogenese potenzieren. Diese Erkenntnisse unterstreichen die besondere Rolle von Makrophagen bei der pathologischen Lymphangiogenese.

Vermutungen, dass bei EM ähnlich Vorgänge ablaufen könnten, werden durch die Beobachtungen dieser Arbeit von ebenfalls VEGF-C und VEGF-D positiven Makrophagen im Stromabereich der EM bestärkt. In der Peritonealflüssigkeit bilden die Makrophagen unter den zellulären Komponenten den Hauptanteil (Eischen et al. 1994).

Diskussion

In der Peritonealflüssigeit von EM-Patientinnen konnten sowohl erhöhte Zellzahlen, als auch eine stärkere Aktivierung von Makrophagen gefunden werden (Halme et al. 1984; Halme et al. 1987). McLaren konnte zeigen, dass EM-assoziierte Makrophagen VEGF sezernieren und vermutet sogar, dass sie die Hauptquelle für VEGF in der Peritonealflüssigkeit sind (McLaren et al. 1996). Die Kenntnisse zur Bedeutung von Makrophagen für die Angiognese der EM durch die Expression von Zytokinen sowie VEGF (McLaren 2000) stützten die Annahme, dass Makrophagen auch in die Lymphangiogene bei EM involviert sind.

Der Nachweis der Expression der Wachstumsfaktoren mit einer Schlüsselrolle der pathologischen Lymphangiogenese, der Nachweis einer erhöhten LVD von EM-Gewebe gegenüber EM-freiem Gewebe und die Korrelation der VEGF-C / VEGF-D Expression mit der LVD bekräftigen die Theorie, dass Lymphangiogenese im Rahmen der EM stattfindet und durch EM-Zellen selbst induziert wird. Die Beobachtung VEGF-C sowie VEGF-D positiver Makrophagen im EM-Gewebe vermittelt den Eindruck, als würden auch EM-Zellen, ähnlich wie Tumorzellen, den Vorgang der Lymphangiogenese durch die Rekrutierung von Makrophagen verstärken.

4.4 Korrelation klinischer Aspekte mit Lymphgefäßdichte und Expression von Wachstumsfaktoren

Angiogenese ist für die physiologische Funktion des Endometriums von essentieller Bedeutung. Sowie das Endometrium zyklischen, durch Östrogen und Progesteron gesteuerten Veränderungen unterliegt, so wird auch die Angiogenese des Endometriums durch die weiblichen Sexualhormone reguliert (Rogers et al. 2009). Daher ist es nicht überraschend, dass VEGF als wichtigster Wachstumsfaktor der Angiogenese durch die Sexualhormone induzierbar ist (Hyder et al. 2000). Die höchste Expression von VEGF kann im Endometrium in der Sekretionsphase, der Phase mit den höchsten Sexualhormonspiegeln, gemessen werden (Charnock-Jones et al. 1993; Shifren et al. 1996).

Diese Erkenntnisse ließen vermuten, dass eine hormonelle Therapie auch Einfluss auf das gut vaskularisierte EM-Gewebe haben könnte. Untersuchungen von EM-Geweben zeigten, dass GnRH-Analoga und Gestagen-Monopräparate die Stromavaskularisierung reduzieren (Donnez et al. 1996; Ryan and Taylor 1997; Khan et al. 2010). Dabei

scheinen GnRH-Analoga in rectovaginalen EM-Läsionen eher einen geringen Effekt auf die Vaskularisierung zu haben (Donnez et al. 1996).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass bei rectovaginalem EM-Gewebe die Dichte LYVE-1 und Prox-1 positiver, möglicherweise weniger reifer, Gefäße bei präoperativer hormoneller Therapie signifikant geringer war. Diese Beobachtungen zeigen im Gegensatz zu den Ergebnissen zur Angiogenese von Donnez, dass rectovaginales EM-Gewebe bezüglich der Lymphangiogenese möglicherweise gut auf eine hormonelle Therapie anspricht. Für peritoneale EM konnten mit der Hilfe von LYVE-1 geringere, wenn auch nicht signifikante, Werte für die Dichte positiver Gefäße nachgewiesen werden. Für D2-40 positive Gefäße konnten bei den rectovaginalen sowie den peritonealen und für Prox-1 positive Gefäße bei den peritonealen EM-Lasionen keine Unterschiede bezüglich der LVD nachgewiesen werden. Da D2-40 positive Gefäße reifere Gefäße darstellen, könnte diese Beobachtung die Vermutung stützen, dass hormonelle Therapie die Induktion von Lyphangiogenese vermindert.

Es gibt keine Arbeiten zum Einfluss hormoneller Therapie auf die LVD des Endometriums, daher können hier nur die Beobachtungen zur LVD von Endometriumgewebe während der verschiedenen Zyklusphasen vergleichend herangezogen werden. Die Ergebnisse von Donoguhe et al. decken sich mit den eigenen Beobachtungen, die für die verschiedenen Zyklusphasen keinen signifikanten Unterschied der Dichte D2-40 positiver Gefäße im Endometrium finden konnten (Donoghue et al. 2007). Zu den anderen Lymphgefäßendothelmarkern liegen keine Daten bezüglich der LVD im eutopen Endometrium vor. Auch bei Untersuchungen der Blutgefäßdichte während der verschiedenen Zyklusphasen des Endometriums konnte bisher keine zyklusabängige Änderung festgestellt werden (Rogers et al. 1993; Charnock-Jones et al. 2000; Bourlev et al. 2006).

Untersuchungen zur Blutgefäßdichte von ektopem Endometiumgewebe zeigen zum Teil gegensätzliche Ergebnisse bezüglich einer Abhängigkeit von der Zyklusphase. Während Bourlev eine erhöht Blutgefäßdichte in der Proliferationsphase ermittelte, konnte Matsuzaki keine zyklusabhängigen Unterschiede beobachten (Matsuzaki et al. 1998; Bourlev et al. 2006).

Die Analyse der Expression des Lymphgefäß-spezifischen Wachstumsfaktors VEGF-C in Abhängigkeit von einer erfolgten Hormontherapie ergab, dass ein deutlich größerer Anteil der EM-Läsionen ohne erfolgte Hormontherapie eine höhere Expression von VEGF-C aufwies, als EM-Läsion mit erfolgter Hormontherapie. Während sich bei peri-

tonealem Gewebe lediglich eine Tendenz abzeichnete, wies das rectovaginale EM-Gewebe diesbezüglich einen signifikanten Unterschied auf. Paradoxerweise zeigte die Analyse der Expression von VEGF-D in Abhängigkeit von einer hormonellen Therapie ein genau umgekehrtes Bild. Hier zeigten rectovaginale und peritoneale EM-Läsionen unter dem Einfluss hormoneller Therapie eine deutlich höhere Expression gegenüber Läsionen ohne erfolgte hormonelle Therapie. Dabei wiesen die rectovaginalen Läsionen wiederum signifikante und die peritonealen Läsionen nur tendenzielle Unterschiede auf. Ob die Expression der lymphgefäßspezifischen Wachstumsfaktoren im eutopen Endometrium hormonabhängig reguliert sein könnte, ist fraglich. Die Untersuchungen von Donoghue und Kollegen zeigten, dass ausschließlich die unprozessierte Form von VEGF-C in der Proliferationsphase eine signifikant erhöhte Expression im Endometrium, VEGF-D jedoch keine zyklusabhängigen Unterschiede aufwies (Donoghue et al. 2007). Für die Angiogenese des Endometriums können jedoch eindeutige zyklusabhängige Expressionsunterschiede für VEGF gefunden werden (Charnock-Jones et al. 1993; Shifren et al. 1996). Auch in der Peritonealflüssigkeit von Patientinnen mit EM können verschiedene Konzentrationen in den einzelnen Zyklusphasen nachgewiesen werden (McLaren et al. 1996).

Die Ergebnisse dieser Arbeit können bisher keinen eindeutigen Beweis eines Einflusses der hormonellen Therapie auf die Lymphangiogenese im Rahmen der EM erbringen. Dennoch gibt es den Hinweis eines möglichen Zusammenhanges, welcher durch die gewonnenen Erkenntnisse zur Angiogenese von eutopem und ektopem Endometrium gestützt wird. Daher sollte der Frage nach einem Zusammenhang zwischen hormoneller Therapie und Lymphangiogenese zukünftig weiterhin nachgegangen werden. Bis heute ist unklar, welche Bedeutung die sich im EM-Gewebe befindlichen Lymphgefäße auf den Verlauf der Erkrankung haben. Denkbar wäre es, dass die hormonelle Therapie diesen Verlauf positiv beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin geprüft, ob das Erkrankungsstadium (entsprechend der rARSM-Klassifikation) der peritonealen EM-Herde mit der LVD korreliert. Der Vergleich der peritonealen EM-Herde der verschiedenen rASRM-Stadien erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Herden verschiedener Erkrankungsstadien. Die scheinbar erhöhte LVD von EM-Läsionen aus der Gruppe des rASRM-Stadium III ist sehr wahrscheinlich durch die geringe Fallzahl in dieser Gruppe erklärbar. Ob die rASRM-Stadien überhaupt mit klinischen Aspekten oder der biolo-

gischen Aktivität der EM korrelieren ist umstritten (Parazzini 1999). Dennoch konnte bezüglich der Angiogenese bei EM ein Zusammenhang zwischen dem rASRM-Stadium und der VEGF Konzentration in der Peritonealflüssigkeit von Patientinnen mit EM gefunden werden (McLaren et al. 1996; Shifren et al. 1996; Mahnke et al. 2000). Da Zytokine erwiesenermaßen die Angiogenese sowie Lymphangiogenese fördern, passt hierzu der Nachweis einer positiven Korrelation der in der Peritonealflüssigkeit von EM-Patientinnen gemessen Zytokinkonzentrationen mit dem rASRM Stadium (Ryan et al. 1995; Arici et al. 1996). Es wäre daher vorstellbar, dass auch die VEGF-C und VEGF-D Expresssion im EM-Gewebe positiv mit dem Erkrankungsstadium korreliert. Mit Hilfe der eigenen immunhistochemischen Untersuchungen konnten keine Unterschiede der Expressionsstärke der Wachstumsfaktoren zwischen den Gruppen mit verschiedenen rASRM-Stadien gefunden werden. In weiteren Studien sollten die Daten daher mit Hilfe anderer quantitativer Methoden (PCR, ELISA) überprüft werden, um auch mögliche kleinere Unterschiede zwischen den Gruppen bestimmen zu können.

In den Arbeiten zum Vorkommen von EM-Läsionen in Lymphknoten und Sentilel-Lymphknoten bei tief infiltrierender EM wurde eine positive Korrelation zwischen der klinischen Primärherdgröße der EM und dem Auftreten von EM-Läsionen in den Lymphknoten gefunden (Abrao et al. 2006; Mechsner et al. 2008; Noël et al. 2008; Mechsner et al. 2009). Auch die Untersuchungen unserer eigenen Arbeitsgruppe zum Vorkommen Östrogen-/ Progesteron-Rezeptor positiver endometriotischer Zellen konnte zeigen, dass eine positive Korrelation mit der klinischen Größe der Primärherde tiefinfiltrierender Endometriose vorliegt (Mechsner et al. 2008; Mechsner et al. 2009). Die Vermutungen, dass demzufolge die Dichte der Lymphgefäße in den Primärherden positiv mit dem Auftreten von EM-Läsionen in den Lymphknoten korreliert, haben sich jedoch nicht bestätigt. Die Analyse der Primärherde der Patientinnen unserer Studien zur Untersuchung von EM-Läsionen in Lymphknoten ergab hier keine signifikanten Unterschiede der LVD in Abhängigkeit von der klinischen Herdgröße. Vielmehr schien sich die Tendenz abzuzeichnen, dass die Herde mit einer Größe unter einem Zentimeter die höchste LVD aufwiesen. Dieses Phänomen ist möglicherweise durch die höhere proliferative Aktivität kleinerer Läsionen erklärbar. Studien mit einem größeren Patientenkollektiv könnten hier zukünftig auch kleinere Unterschiede aufdecken, was in der vorliegenden Arbeit aufgrund der geringen Fallzahl nicht gelang. Auch diesbezüglich könnten quantitative Methoden zur Bestimmung der Höhe der Expression
von VEGF-C und VEGF-D für Fälle tief infiltrierender EM mit oder ohne EM-Läsionen Aufschluss über den Zusammenhang von Lymphangiogenese und dem Vorkommen von Läsionen in Lymphknoten bei EM geben, denn es liegt nahe, dass die gesteigerte lymphatische Vaskularisierung von EM-Gewebe die Verbreitung von EM-Zellen in entfernte Organe begünstigt.

4.5 Ausblick

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Vermutung, dass EM nicht nur reichlich vaskularisiert ist, sondern dass im EM-Gewebe auch zahlreiche Lymphgefäße vorkommen. Eine deutlich erhöhte LVD gegenüber korrespondierendem EM-freien Gewebe, eine höhere LVD möglicherweise weniger reifer Gefäße sowie der Nachweis der wichtigsten Lymphgefäß-spezifischen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D stützen die Hypothese, dass die vorkommenden Lymphgefäße neuen Ursprungs sind. Damit werden die bisher für die EM beschrieben malignen Eigenschaften, wie Gewebeinvasion, Gewebedestruktion und Angiogenese, durch eine weitere, die Lymphangiogense, ergänzt. Da die Lymphgefäße den Hauptweg zur Verbreitung von Tumorzellen in Lymphknoten und entfernte Organe darstellen, ist es naheliegend dass EM-Zellen auf diesem Weg ebenfalls in Lymphknoten oder extraperitoneale Organe gelangen. Zumal Beobachtungen endometriotischer Zellen in Lymphgefäßen vorliegen (Noël et al. 2008). Der Nachweis einer erhöhten LVD von EM-Gewebe und der Expression Lymphgefäß-spezifischer Wachstumsfaktoren durch EM-Zellen sowie im EM-Stroma lokalisierter Makrophagen zeigen des Weiteren deutliche Parallelen zu chronisch entzündlichen Erkrankungen auf und unterstreichen somit den chronischen, entzündlichen Charakter der EM.

Zur Klärung eines Zusammenhangs zwischen klinischen Aspekten, wie dem rASRM-Stadium oder der Primärherdgröße, sollten zukünftig weitere Studien folgen. Die hormonelle Therapie scheint sich jedoch hemmend auf die Lymphangiogenese auszuwirken und somit den Verlauf der EM positiv zu beeinflussen.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass nicht nur die Angiogenese sondern auch die Lymphangiogenese Teil des Pathomechanismus von EM ist.

73

5 Zusammenfassung

Endometriose ist eine gutartige östrogenabhängige Erkrankung, bei welcher der Gebärmutterschleimhaut ähnliches Gewebe außerhalb der Gebärmutterhöhle vorkommt. Endometriose zeigt einen chronischen, entzündlichen Krankheitsverlauf und weist Gemeinsamkeiten mit malignen Erkrankungen, wie invasives Wachstum, Angiogenese oder an Metastasen erinnernde Absiedlungen an entfernten Organen, auf. So konnten in Lymphknoten aus OP-Resektaten tief infiltrierender Endometriose Endometrioseläsionen und endometriotische Zellen nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass Endometriosezellen auf lymphatischem Wege zu Lymphknoten gelangen. Dies wirft die Frage auf, ob Endometriose nicht nur Angiogenese sondern ebenso Lymphangiogenese induziert. Zum heutigen Zeitpunkt liegen jedoch kaum Daten zum Vorkommen von Lymphgefäßen und zu Lymphangiogenese stimulierenden Wachstumsfaktoren im Endometriosegewebe vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das Vorkommen von Lymphgefäßen, deren Dichte und Verteilung in Endometriosegewebe zu untersuchen. Zu prüfen, ob sich die Lymphgefäßdichte von Endometriosegewebe von korrespondierendem Endometriosefreiem Gewebe unterscheidet. Es wurde zudem untersucht, ob Endometriosezellen Lymphgefäß-spezifische Wachstumsfaktoren exprimieren und ob die Expressionsstärke mit der Lymphgefäßdichte korreliert. Darüber hinaus wurde geprüft, ob Lymphgefäßdichte oder Wachstumsfaktorexpression mit klinischen Aspekten (hormonelle Therapie, primäre Herdgröße, Erkrankungsstadium) korreliert.

Dazu wurden rectovaginale (n=38) und peritoneale (n=37) Endometriosedrüsen von 75 Patientinnen mit symptomatischer Endometriose immunhistochemisch untersucht. Lymphgefäße wurden mit Hilfe der etablierten Lymphgefäßendothel-spezifischen Marker Podoplanin (D2-40), LYVE-1 und Prox-1 identifiziert. Aus der Gruppe der Wachstumsfaktoren wurde die Expression von VEGF-C und VEGF-D, den wichtigsten Lymphangiogenese-spezifischen, untersucht.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass Endometriosegewebe dicht lymphatisch vaskularisiert ist und die wichtigsten Lymphangiogenese stimulierenden Wachstumsfaktoren VEGF-C sowie VEGF-D exprimiert. Sowohl in rectovaginalen, als auch in peritonealen Endometrioseläsionen waren Podoplanin, LYVE-1 und Prox-1 positive Lymphgefäße nachweisbar. Diese Lymphgefäße wiesen im Vergleich zu Lymphgefäßen im korrespondierenden Endometriose-freien Gewebe eine vielfach höhere Dichte auf.

74

Die Dichte LYVE-1 sowie Prox-1 positiver Gefäße war im Vergleich zu D2-40 positiven Gefäßen signifikant erhöht, was ein möglicher Hinweis für das Vorhandensein unreifer Gefäße in Endometriosegewebe ist. Die Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D wurden in nahezu allen untersuchten Endometrioseläsionen sowohl von Endometriose-epithelzellen als auch von -stromazellen exprimiert. Dabei korrelierte die Expressionsstärke von VEGF-C positiv mit der Lymphgefäßdichte aller verwendeten Lymphgefäßendothelmarker.

Bezüglich klinischer Aspekte liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Hinweis, dass die hormonelle Therapie einen hemmenden Einfluss auf Lymphgefäßdichte und VEGF-C Expression in Endometriosegewebe ausüben könnte. Zur Korrelation von Erkrankungsstadium oder primärer Herdgröße mit Lymphgefäßdichte und Wachstumsfaktorexpression konnte jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang gefunden werden.

Ergebnisse Endometriosegewebe Diese zeigen. dass reichlich lymphatisch vaskularisiert ist. Die Beobachtung der Expression von Lymphangiogenese stimulierenden Wachstumsfaktoren durch Endometriosezellen, die signifikant höhere Lymphgefäßdichte im Vergleich zu Endometriose-freiem Gewebe und der Nachweis möglicher unreifer Lymphgefäße deuten darauf hin, dass Endometriosegewebe Lymphangiogenese stimuliert. Dies erhärtet die Vermutung, dass Lymphgefäße als mögliche Wege für Endometriosezellen zu Lymphknoten dienen.

Zusammenfassend unterstreichen diese Ergebnisse die Bedeutung der Lymphangiogenese im Rahmen der Pathogenese von Endometriose und ergänzen die bisher bekannten malignen Eigenschaften um eine Weitere.

75

6 Literaturverzeichnis

- Abrao MS, Podgaec S, Dias JA, Jr., et al. Deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum and lymph nodes. *Fertil Steril* 2006. 86(3): 543-7.
- Abtahian F, Guerriero A, Sebzda E, et al. Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science* 2003. 299(5604): 247-51.
- ACOG. ACOG practice bulletin. Medical management of endometriosis. Number 11, December 1999 (replaces Technical Bulletin Number 184, September 1993). Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 2000. 71(2): 183-96.
- Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M, et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br J Cancer* 2000. 83(7): 887-91.
- Albrecht H. Die Endometriose. Biologie und Pathologie des Weibes. Seitz L and Amreich IA. Berlin, Innsbruck, München, Wien, Urban und Schwarzenberg. 4: 190-288. 1955.
- Alitalo K, Tammela T and Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005. 438(7070): 946-53.
- Arici A, Tazuke SI, Attar E, Kliman HJ and Olive DL. Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells. *Mol Hum Reprod* 1996. 2(1): 40-5.
- Aselli G. De lactibus sive lacteis venis. Mediolani. 1627.
- ASRM. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997. 67(5): 817-21.
- Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, et al. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 2005. 25(6): 2441-9.
- Baluk P, Fuxe J, Hashizume H, et al. Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J Exp Med* 2007. 204(10): 2349-62.
- Baluk P and McDonald DM. Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2008. 1131: 1-12.
- Banerji S, Ni J, Wang SX, et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999. 144(4): 789-801.
- Bazot M, Darai E, Hourani R, et al. Deep pelvic endometriosis: MR imaging for diagnosis and prediction of extension of disease. *Radiology* 2004. 232(2): 379-89.

- Berger A, Rouzier R, Carnot F, et al. Primary adenocarcinoma of the rectovaginal septum: a case report and literature review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001. 95(1): 111-3.
- Borgfeldt C and Andolf E. Cancer risk after hospital discharge diagnosis of benign ovarian cysts and endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004. 83(4): 395-400.
- Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, et al. The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction* 2006. 132(3): 501-9.
- Braverman IM. The role of blood vessels and lymphatics in cutaneous inflammatory processes: an overview. *Br J Dermatol* 1983. 109 (25): 89-98.
- Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, et al. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 1997. 151(4): 1141-52.
- Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Horvat R, et al. [Podoplanin--a specific marker for lymphatic endothelium expressed in angiosarcoma]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1999. 83: 270-5.
- Brinton LA, Gridley G, Persson I, Baron J and Bergqvist A. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997. 176(3): 572-9.
- Brooks JJ and Wheeler JE. Malignancy arising in extragonadal endometriosis: a case report and summary of the world literature. *Cancer* 1977. 40(6): 3065-73.
- Bulun SE. Endometriosis. N Engl J Med 2009. 360(3): 268-79.
- Cao Y. Why and how do tumors stimulate lymphangiogenesis? *Lymphat Res Biol* 2008. 6(3-4): 145-8.
- Cha HS, Bae EK, Koh JH, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces vascular endothelial growth factor-C expression in rheumatoid synoviocytes. *J Rheumatol* 2007. 34(1): 16-9.
- Chapron C, Dumontier I, Dousset B, et al. Results and role of rectal endoscopic ultrasonography for patients with deep pelvic endometriosis. *Hum Reprod* 1998. 13(8): 2266-70.
- Charnock-Jones DS, Macpherson AM, Archer DF, et al. The effect of progestins on vascular endothelial growth factor, oestrogen receptor and progesterone receptor immunoreactivity and endothelial cell density in human endometrium. *Hum Reprod* 2000. 15 Suppl 3: 85-95.
- Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, et al. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod* 1993. 48(5): 1120-8.

- Cheong Y, Tay P, Luk F, et al. Laparoscopic surgery for endometriosis: How often do we need to re-operate? *J Obstet Gynaecol* 2008. 28(1): 82-5.
- Choi WW, Lewis MM, Lawson D, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol* 2005. 18(1): 143-52.
- D'Hooghe TM, Debrock S, Hill JA and Meuleman C. Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? *Semin Reprod Med* 2003. 21(2): 243-54.
- Danussi C, Spessotto P, Petrucco A, et al. Emilin1 deficiency causes structural and functional defects of lymphatic vasculature. *Mol Cell Biol* 2008. 28(12): 4026-39.
- Donnez J, Nisolle M, Casanas-Roux F, Brion P and Da Costa Ferreira N. Stereometric evaluation of peritoneal endometriosis and endometriotic nodules of the rectovaginal septum. *Hum Reprod* 1996. 11(1): 224-8.
- Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F and Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998. 13(6): 1686-90.
- Donoghue JF, Lederman FL, Susil BJ and Rogers PA. Lymphangiogenesis of normal endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Hum Reprod* 2007. 22(6): 1705-13.
- Ebert AD. Endometriose: Ein Wegweiser für die Praxis. Berlin, De Gruyter. 2002.
- Eischen A, Duclos B, Schmitt-Goguel M, et al. Human resident peritoneal macrophages: phenotype and biology. *Br J Haematol* 1994. 88(4): 712-22.
- Fakih H, Baggett B, Holtz G, et al. Interleukin-1: a possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* 1987. 47(2): 213-7.
- Fan YZ, Li GM, Huang GP and Li XP. [Clinical significance of detection on lymphatic microvessel, lymphatic microvessel density and vascular endothelial growth factor-C in patients with colorectal carcinoma]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2006. 9(6): 477-82.
- Fiedler E, Helmbold P and Marsch WC. Increased vessel density in psoriasis: involvement of lymphatic vessels in the papillary dermis. *Br J Dermatol* 2008. 159(1): 258-61.
- Foster RS, Jr. General anatomy of the lymphatic system. *Surg Oncol Clin N Am* 1996. 5(1): 1-13.
- Fujishita A, Nakane PK, Koji T, et al. Expression of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Fertil Steril* 1997. 67(5): 856-64.
- Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R and Starzinski-Powitz A. Invasiveness of endometriotic cells in vitro. *Lancet* 1995. 346(8988): 1463-4.

- Gale NW, Prevo R, Espinosa J, et al. Normal lymphatic development and function in mice deficient for the lymphatic hyaluronan receptor LYVE-1. *Mol Cell Biol* 2007. 27(2): 595-604.
- Gambone JC, Mittman BS, Munro MG, Scialli AR and Winkel CA. Consensus statement for the management of chronic pelvic pain and endometriosis: proceedings of an expert-panel consensus process. *Fertil Steril* 2002. 78(5): 961-72.
- Geleff S, Schoppmann SF and Oberhuber G. Increase in podoplanin-expressing intestinal lymphatic vessels in inflammatory bowel disease. *Virchows Arch* 2003. 442(3): 231-7.
- George ML, Tutton MG, Janssen F, et al. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia* 2001. 3(5): 420-7.
- Giudice LC and Kao LC. Endometriosis. Lancet 2004. 364(9447): 1789-99.
- Goldman J, Rutkowski JM, Shields JD, et al. Cooperative and redundant roles of VEGFR-2 and VEGFR-3 signaling in adult lymphangiogenesis. *Faseb J* 2007. 21(4): 1003-12.
- Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang PJ and Acs G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 2005. 11(23): 8364-71.
- Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E and Grummer R. Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 2005. 8(2): 147-56.
- Guo SW. Recurrence of endometriosis and its control. *Hum Reprod Update* 2009. 15(4): 441-61.
- Halban J. Metastatic hysteroadenosis. Wien Klin Wochenschr 1924. 37: 1205-6.
- Halin C and Detmar M. Chapter 1. Inflammation, angiogenesis, and lymphangiogenesis. *Methods Enzymol* 2008. 445: 1-25.
- Halis G, Kopf A, Mechsner S, et al. Schmerztherapeutische Optionen bei Endometriose. *Deutsches Ärtzeblatt* 2006. 103(17): 1146-53.
- Halme J, Becker S, Hammond MG, Raj MH and Raj S. Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with mild endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1983. 145(3): 333-7.
- Halme J, Becker S and Haskill S. Altered maturation and function of peritoneal macrophages: possible role in pathogenesis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1987. 156(4): 783-9.
- Halme J, Becker S and Wing R. Accentuated cyclic activation of peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1984. 148(1): 85-90.

- Hashimoto I, Kodama J, Seki N, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasive cervical cancer. *Br J Cancer* 2001. 85(1): 93-7.
- Hill JA and Anderson DJ. Lymphocyte activity in the presence of peritoneal fluid from fertile women and infertile women with and without endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1989. 161(4): 861-4.
- Hirai M, Nakagawara A, Oosaki T, et al. Expression of vascular endothelial growth factors (VEGF-A/VEGF-1 and VEGF-C/VEGF-2) in postmenopausal uterine endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001. 80(2): 181-8.
- Hong YK, Harvey N, Noh YH, et al. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn* 2002. 225(3): 351-7.
- Hyder SM, Huang JC, Nawaz Z, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogens and progestins. *Environ Health Perspect* 2000. 108 Suppl 5: 785-90.
- Inoue M, Kobayashi Y, Honda I, Awaji H and Fujii A. The impact of endometriosis on the reproductive outcome of infertile patients. *Am J Obstet Gynecol* 1992. 167(1): 278-82.
- Jackson DG. Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *Apmis* 2004. 112(7-8): 526-38.
- Javert CT. Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis, including five case reports of endometrial tissue in pelvic lymph nodes. *Cancer* 1949. 2(3): 399-410.
- Jeltsch M, Tammela T, Alitalo K and Wilting J. Genesis and pathogenesis of lymphatic vessels. *Cell Tissue Res* 2003. 314(1): 69-84.
- Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev* 2006. 25(4): 677-94.
- Joukov V, Sorsa T, Kumar V, et al. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *Embo J* 1997. 16(13): 3898-911.
- Jussila L and Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 2002. 82(3): 673-700.
- Kahn HJ, Bailey D and Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* 2002. 15(4): 434-40.
- Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004. 5(1): 74-80.

- Karpanen T and Alitalo K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol* 2008. 3: 367-97.
- Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, et al. Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J Am Soc Nephrol* 2004. 15(3): 603-12.
- Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, et al. Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy. *Hum Reprod* 2010. 25(3): 642-53.
- Kinoshita J, Kitamura K, Kabashima A, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2001. 66(2): 159-64.
- Koninckx PR, Kennedy SH and Barlow DH. Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 1998. 4(5): 741-51.
- Koninckx PR, Kennedy SH and Barlow DH. Pathogenesis of endometriosis: the role of peritoneal fluid. *Gynecol Obstet Invest* 1999. 47 Suppl 1: 23-33.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in endometrial and lung cancer. *J Clin Pathol* 2005. 58(2): 202-6.
- Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996. 122(12): 3829-37.
- Laschke MW and Menger MD. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2007. 13(4): 331-42.
- Lebovic DI, Mueller MD and Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2001. 75(1): 1-10.
- Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K and Jain RK. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res* 2000. 60(16): 4324-7.
- Leyendecker G, Wildt L and Mall G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Arch Gynecol Obstet* 2009. 280(4): 529-38.
- Liersch R and Detmar M. Lymphangiogenesis in development and disease. *Thromb* Haemost 2007. 98(2): 304-10.
- Maby-El Hajjami H and Petrova TV. Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease. *Histochem Cell Biol* 2008. 130(6): 1063-78.

- Machado DE, Abrao MS, Berardo PT, Takiya CM and Nasciutti LE. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. *Fertil Steril* 2008. 90(1): 148-55.
- Mahnke JL, Dawood MY and Huang JC. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000. 73(1): 166-70.
- Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, et al. Angiogenesis in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 1998. 46(2): 111-5.
- Matsuzaki S, Canis M, Murakami T, et al. Immunohistochemical analysis of the role of angiogenic status in the vasculature of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 2001. 76(4): 712-6.
- McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update* 2000. 6(1): 45-55.
- McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, et al. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996. 98(2): 482-9.
- McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS and Smith SK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 1996. 11(1): 220-3.
- Mechsner S, Weichbrodt M, Riedlinger WF, et al. Estrogen and progestogen 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): 2202-9.
- Mechsner S, Weichbrodt M, Riedlinger WF, et al. Immunohistochemical evaluation of endometriotic lesions and disseminated endometriosis-like cells in incidental lymph nodes of patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2009. 94(2): 457-63.
- Melin A, Sparen P, Persson I and Bergqvist A. Endometriosis and the risk of cancer with special emphasis on ovarian cancer. *Hum Reprod* 2006. 21(5): 1237-42.
- Meyer R. Über den Stand der Frage der Andenomyositis, Adenomyome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sacromatosa. *Zentralbl Gynakol* 1919(36): 754-50.
- Missmer SA and Cramer DW. The epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2003. 30(1): 1-19, vii.
- Mori H, Sawairi M, Nakagawa M, et al. Peritoneal fluid interleukin-1 beta and tumor necrosis factor in patients with benign gynecologic disease. *Am J Reprod Immunol* 1991. 26(2): 62-7.
- Mouta C and Heroult M. Inflammatory triggers of lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol* 2003. 1(3): 201-18.

- Ness RB, Cramer DW, Goodman MT, et al. Infertility, fertility drugs, and ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Am J Epidemiol* 2002. 155(3): 217-24.
- Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM and Donnez J. Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1993. 59(3): 681-4.
- Noël JC, Chapron C, Fayt I and Anaf V. Lymph node involvement and lymphovascular invasion in deep infiltrating rectosigmoid endometriosis. *Fertil Steril* 2008. 89(5): 1069-72.
- Olive DL and Pritts EA. Treatment of endometriosis. *N Engl J Med* 2001. 345(4): 266-75.
- Olive DL, Weinberg JB and Haney AF. Peritoneal macrophages and infertility: the association between cell number and pelvic pathology. *Fertil Steril* 1985. 44(6): 772-7.
- Oliver G. Lymphatic vasculature development. Nat Rev Immunol 2004. 4(1): 35-45.
- Oliver G and Detmar M. The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev* 2002. 16(7): 773-83.
- Oliver G and Harvey N. A stepwise model of the development of lymphatic vasculature. *Ann N Y Acad Sci* 2002. 979: 159-65; discussion 88-96.
- Olson JE, Cerhan JR, Janney CA, et al. Postmenopausal cancer risk after self-reported endometriosis diagnosis in the Iowa Women's Health Study. *Cancer* 2002. 94(5): 1612-8.
- Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M and Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 1991. 56(1): 45-51.
- Oosterlynck DJ, Meuleman C, Sobis H, Vandeputte M and Koninckx PR. Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertil Steril* 1993. 59(4): 778-82.
- Parazzini F. Risk factors for pelvic endometriosis in women with pelvic pain or infertility. Gruppo Italiano per lo Studio dell' endometriosi. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999. 83(2): 195-9.
- Pedica F, Ligorio C, Tonelli P, Bartolini S and Baccarini P. Lymphangiogenesis in Crohn's disease: an immunohistochemical study using monoclonal antibody D2-40. *Virchows Arch* 2008. 452(1): 57-63.
- Petrova TV, Makinen T, Makela TP, et al. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *Embo J* 2002. 21(17): 4593-9.

- Pritts EA and Taylor RN. An evidence-based evaluation of endometriosis-associated infertility. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003. 32(3): 653-67.
- Pullinger BD and Florey HW. Proliferation of lymphatics in inflammation. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1937. 45(1): 157-70.
- Red-Horse K, Rivera J, Schanz A, et al. Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation. *J Clin Invest* 2006. 116(10): 2643-52.
- Rier SE, Parsons AK and Becker JL. Altered interleukin-6 production by peritoneal leukocytes from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1994. 61(2): 294-9.
- Ristimaki A, Narko K, Enholm B, Joukov V and Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* 1998. 273(14): 8413-8.
- Rogers PA, Au CL and Affandi B. Endometrial microvascular density during the normal menstrual cycle and following exposure to long-term levonorgestrel. *Hum Reprod* 1993. 8(9): 1396-404.
- Rogers PA, Donoghue JF, Walter LM and Girling JE. Endometrial angiogenesis, vascular maturation, and lymphangiogenesis. *Reprod Sci* 2009. 16(2): 147-51.
- Ryan IP and Taylor RN. Endometriosis and infertility: new concepts. *Obstet Gynecol Surv* 1997. 52(6): 365-71.
- Ryan IP, Tseng JF, Schriock ED, et al. Interleukin-8 concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1995. 63(4): 929-32.
- Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol* 1927. 3(2): 93-110.
- Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, et al. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005. 166(3): 913-21.
- Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *Embo J* 2003. 22(14): 3546-56.
- Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, et al. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg* 2004. 240(2): 306-12.
- Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002. 161(3): 947-56.
- Schweppe KW. Endometriose: Aktueller Stand von Diagnose und Therapie. *Frauenarzt* 2005. 46: 371-81.

- Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, et al. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996. 81(8): 3112-8.
- Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001. 7(2): 192-8.
- Sleeman JP, Krishnan J, Kirkin V and Baumann P. Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail? *Microsc Res Tech* 2001. 55(2): 61-9.
- Spaczynski RZ and Duleba AJ. Diagnosis of endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003. 21(2): 193-208.
- Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME and Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002. 2(8): 573-83.
- Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001. 7(2): 186-91.
- Suginami H. A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances. *Am J Obstet Gynecol* 1991. 165(1): 214-8.
- Swartz MA. The physiology of the lymphatic system. *Adv Drug Deliv Rev* 2001. 50(1-2): 3-20.
- Swiersz LM. Role of endometriosis in cancer and tumor development. *Ann N Y Acad Sci* 2002. 955: 281-92; discussion 93-5, 396-406.
- Takehara M, Ueda M, Yamashita Y, et al. Vascular endothelial growth factor A and C gene expression in endometriosis. *Hum Pathol* 2004. 35(11): 1369-75.
- Tammela T and Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* 2010. 140(4): 460-76.
- Taylor RN, Lebovic DI and Mueller MD. Angiogenic factors in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002. 955: 89-100; discussion 18, 396-406.
- Thomas EJ and Campbell IG. Evidence that endometriosis behaves in a malignant manner. *Gynecol Obstet Invest* 2000. 50 Suppl 1: 2-10.
- Tuttlies F, Keckstein J, Ulrich U, et al. [ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis]. *Zentralbl Gynakol* 2005. 127(5): 275-81.
- Ueki M. Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1991. 165(1): 201-9.
- Ulrich U and Keckstein J. [Diagnosing endometriosis]. *Zentralbl Gynakol* 2005. 127(5): 295-8.

- Ulrich U, Rhiem K, Kaminski M, et al. Parametrial and rectovaginal adenocarcinoma arising from endometriosis. *Int J Gynecol Cancer* 2005. 15(6): 1206-9.
- Ulrich U, Richter O, Wardelmann E, et al. [Endometriosis and malignoma]. *Zentralbl Gynakol* 2003. 125(7-8): 239-42.
- Valtola R, Salven P, Heikkila P, et al. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 1999. 154(5): 1381-90.
- Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer* 2006. 95(12): 1611-25.
- Van Gorp T, Amant F, Neven P, Vergote I and Moerman P. Endometriosis and the development of malignant tumours of the pelvis. A review of literature. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004. 18(2): 349-71.
- Vercellini P. Endometriosis: what a pain it is. *Semin Reprod Endocrinol* 1997. 15(3): 251-61.
- Vercellini P, Parazzini F, Bolis G, et al. Endometriosis and ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1993. 169(1): 181-2.
- Wauke K, Nagashima M, Ishiwata T, Asano G and Yoshino S. Expression and localization of vascular endothelial growth factor-C in rheumatoid arthritis synovial tissue. *J Rheumatol* 2002. 29(1): 34-8.
- Weir E, Mustard C, Cohen M and Kung R. Endometriosis: what is the risk of hospital admission, readmission, and major surgical intervention? *J Minim Invasive Gynecol* 2005. 12(6): 486-93.
- Wigle JT, Harvey N, Detmar M, et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *Embo J* 2002. 21(7): 1505-13.
- Wigle JT and Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999. 98(6): 769-78.
- Wilting J, Papoutsi M, Christ B, et al. The transcription factor Prox1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased human tissues. *Faseb J* 2002. 16(10): 1271-3.
- Wu MY and Ho HN. The role of cytokines in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003. 49(5): 285-96.
- Zanetta GM, Webb MJ, Li H and Keeney GL. Hyperestrogenism: a relevant risk factor for the development of cancer from endometriosis. *Gynecol Oncol* 2000. 79(1): 18-22.

PD Dr. Sylvia Mechsner möchte ich für die Überlassung des Promotionsthemas, ihr Vertrauen in mich und die hervorragende Betreuung meinen großen Dank aussprechen. Sie hat mir Raum für eigene Ideen gegeben, mich mit Kritik und Anregungen in zahlreichen Gesprächen stets motivieren können, diese zu verfolgen und damit insbesondere die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten gefördert.

Beim Endometriose-Labor-Team möchte ich mich ganz herzlich für die produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Maria Luisa Barcena de Arellano hat die statistische Auswertung der Daten und die ihr folgende Erstellung der Publikationen stets mit kritischem Blick begleitet und mich diesbezüglich an ihrer Erfahrung teilhaben lassen. Julia Arnold hat mich insbesondere bei der Übersetzung meiner Veröffentlichungen ins Englische begleitet. Dr. Andrea Fiebitz und Carola Rüster danke ich für die technische und organisatorische Unterstützung im Labor. Miriam Weichbrodt und Jessica Gericke möchte ich für die Einführung in das "Laborleben" und in die Methodik der Immunhistochemie danken.

Bei Dr. Uta Reichelt und Dr. Wolfram Riedlinger aus dem Institut für Pathologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin möchte ich mich für die Einführung in die histologischen Besonderheiten der Endometriose, die Hilfe bei der Auswahl der Gewebeproben und Hilfestellung bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen bedanken.

Prof. Dr. Achim Schneider, Prof. Dr. Christhardt Köhler und den Mitarbeitern der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Charité - Universitätsmedizin Berlin bin ich zu großem Dank verpflichtet, denn ohne ihre klinische Arbeit wäre diese Dissertation nicht realisierbar gewesen.

Meinen Eltern gilt besonderer Dank für ihr uneingeschränktes Vertrauen in mich, denn sie haben mir das Studium der Humanmedizin und somit auch diese Promotion ermöglicht. Mein herzlicher Dank richtet sich an Paul Kannmann, er war auch in der Ferne stets an meiner Seite und hat verständnisvoll so manche wertvolle gemeinsame Zeit entbehrt. Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Keichel S, Barcena de Arellano ML, Reichelt U, Riedlinger WFJ, Schneider A, Köhler C, Mechsner S. Lymphangiogenesis in deep infiltrating endometriosis. Hum Reprod 2011. 26(10): 2713-20.

Reichelt U, **Keichel S**, Barcena de Arellano ML, Chiantera V, Schneider A, Mechsner S. High Lymph Vessel Density and Expression of Lymphatic Growth Factors in Peritoneal Endometriosis. Reprod Sci (eingereicht)

Keichel S, Reichelt U, Barcena de Arellano ML, Weichbrodt M, Schneider A, Köhler C, Mechsner S. Immunohistochemische Untersuchungen zur Lymphgefäßdichte in rektovaginaler Endometriose (rvEM). VIII. Deutscher Endometriose-Kongress (2009; Münster)

Mechsner S, **Keichel S**, Barcena de Arellano ML, Reichelt U, Schneider A, Köhler C. Lymphangiogenese in tief infiltrierender Endometriose. IX. Deutscher Endometriose-Kongress (2011; Emmendingen)

Erklärung

"Ich, Susanne Keichel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Endometriose und Lymphangiogenese" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

Magdeburg, den 27.06.2011