

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel

# **Immunhistochemische Untersuchung des Stammzellmarkers Sox-2 in Lymphknoten von Endometriosepatientinnen**

Dissertation  
Zur Erlangung des doctor medicinae  
Der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Inna Danielyan  
aus Jerewan, Armenien  
-2016-

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität  
Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. h. c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Götte
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Burkhard Greve

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2016

**Aus dem Universitätsklinikum Münster**  
**Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe**  
**Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel**

Referent: Prof. Dr. Martin Götte

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Burkhard Greve

## **Zusammenfassung**

### **Immunhistochemische Untersuchung des Stammzellmarkers Sox-2 in Lymphknoten von Endometriosepatientinnen**

Inna Danielyan

Die Endometriose ist eine bislang nur unzureichend verstandene Erkrankung, bei der trotz des benignen Grundcharakters die Erkrankung für viele betroffene Patientinnen eine große Belastung darstellt, da diese mangels adäquater Therapien häufige Operationen notwendig machen kann. Arbeiten unserer und weiteren Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass eine fehlgeleitete Stammzellfunktion das Entstehen der Endometriose begünstigen kann, da ektop verschleppte endometriale Stammzellen unter anderem aufgrund ihres unlimitierten proliferativen Potentials die Entstehung von Endometrioseherden begünstigen.

Hierbei könnte eine Fehlexpression des adulten Stammzellmarkers Sox-2, eines pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktors nach Daten unserer Arbeitsgruppe eine besondere Rolle spielen. Im Rahmen dieses Projektes untersuchten wir die Hypothese, dass Sox-2 positive Stammzellen über den Weg der lymphovaskulären Metastasierung an ektipe Orte gelangen und somit zur Pathogenese der Erkrankung beitragen. Mittels Immunhistochemie wurde in Sentinel-Lymphknoten und zufällig gewonnenen Lymphknoten von Endometriosepatientinnen erstmals eine vergleichende Expression sowie eine mit Östrogen- und Progesteronrezeptoren assoziierte Expression von Sox-2 charakterisiert. Via Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie konnte eine Kolokalisation von Sox-2 und Östrogenrezeptoren gezeigt werden.

Die hier erstmals dargestellten Daten könnten ein Ausgangspunkt für die zukünftige Entwicklung von therapeutischen Möglichkeiten der Endometriose werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2016

## Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Immunhistochemische Untersuchung des Stammzellmarkers Sox-2

---

in Lymphknoten von Endometriosepatientinnen

---

---

---

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

---

Universitätsklinikum Münster

---

---

unter der Anleitung von:

Prof. Dr. Martin Götte

---

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ingolstadt, 18.09.2015

---

Ort, Datum

Inna Danielyan

---

Name/ Unterschrift

Für meine Familie

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
CA-125	cancer antigen 125
CD	cluster of differentiation
CK	Cytokeratin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ER	Östrogenrezeptor / Östrogenrezeptor
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
k.A.	keine Angaben
LK	Lymphknoten
MRT	Magnetresonanztomographie
MMP	Matrix-Metalloproteasen
Oct	Octamer
PBS	Phosphate buffered saline
PR	Progesteronrezeptor
pH	pondus Hydrogenii
SLK	Sentinel-Lymphknoten
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B	zum Beispiel
Zuf. LK	zufällige Lymphknoten

## Symbolverzeichnis und Maßeinheiten

cm	Zentimeter
ccm	Kubikzentimeter
E+	Östrogen-Rezeptor positiv
P+	Progesteron-Rezeptor positiv
N	negativ
n	Stichprobenumfang, Stoffmenge
µm	Mikrometer



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
Erklärung .....	2
Abkürzungsverzeichnis .....	4
Symbolverzeichnis und Maßeinheiten .....	5
1 Einleitung .....	8
1.1 Allgemeines .....	8
1.2 Der Uterus und das Endometrium .....	10
1.3 Endometriose .....	11
1.3.1 Pathogenese .....	11
1.3.2 Diagnose .....	13
1.3.3 Therapie .....	14
1.3.4 Die Endometriose beeinflussende Faktoren .....	15
1.4 Lymphatisches System .....	19
1.4.1 Lympabfluss des weiblichen Genitales .....	20
1.4.3 Lymphatisches System und Endometriose .....	22
1.5 Stammzellen .....	25
1.5.1 Stammzellen und Endometriose .....	26
1.6 Sox-2 .....	28
1.7 Fragestellung .....	30
2 Material und Methoden .....	31
2.1 Patientenkollektiv .....	31
2.2 Immunhistochemie .....	33
2.3 Doppelimmunfluoreszenz .....	34

2.4 Statistik.....	36
2.5 EDV-Programme.....	36
3 Ergebnisse.....	37
3.1.1 Verteilung Sox-2 exprimierender Zellen in den Lymphknoten von Endometriose Patientinnen.....	37
3.1.2. Sox-2-Expression in Sentinel-Lymphknoten und zufällig gewonnenen Lymphknoten.....	39
3.1.3 Sox-2 kolokalisiert mit Östrogenrezeptoren in den Lymphknoten.....	41
4 Diskussion.....	42
4.1 Studie zu Sox-2.....	42
4.2 Kritische Beurteilung des Studienaufbaus.....	46
5. Literaturverzeichnis.....	48
7. Danksagung.....	61

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines

Der Aufbau der hypothalamus-hypophysär-ovariellen Achse während der Pubertät, mit der folgenden Ausbildung steuernder hormoneller Impulse ist für das funktionelle Endometrium verantwortlich (Petraglia et al., 2008). Das Endometrium ist ein dynamisches Gewebe, das sich während der gesamten reproduktiven Phase einer Frau zyklischen Änderungen, wie dem Wachstum, der Erneuerung, der Differenzierung und dem Abbau unterzieht. Binnen eines Zyklus wächst das Endometrium von 0.5 bis 7 mm rund 400 Mal zwischen der Pubertät und der Menopause.

Das Endometrium hat zwei Schichten: Die basale Schicht, die während der Menstruation erhalten bleibt, und die funktionale Schicht, die jeden Monat fast komplett abgebaut wird. Die hohen regenerativen Fähigkeiten des funktionalen Endometriums regten zu der Hypothese an, dass diese Regenerationsfähigkeit durch spezielle Zellen bedingt ist. Aus diesem Grund wurde die Existenz somatischer Stammzellen im Endometrium postuliert (Teixeira et al., 2008).

2004 wurde die Anwesenheit der Stammzellmarker, c-Kit/CD117 und CD34 im humanen Endometrium zwischen der fetalen und postmenopausalen Periode nachgewiesen. CD117 ist ein Zelloberflächenmarker, der hämatopoetische Zellen und Keimzellen kennzeichnet, und spielt eine große Rolle in der Differenzierung und Proliferation. CD34 kennzeichnet hämatopoetische multipotente Stammzellen, die sich in alle Zelltypen des Blutes entwickeln können. Zusätzlich wurde auch festgestellt, dass diese Zellen sich im stromalen Anteil des basalen Endometriums befinden und demgemäß die Abstoßung während der Menstruation vermeiden ( Cho et al., 2004). Chan et al. haben in einer Studie koloniebildende Eigenschaften der endometrialen Zellen nachgewiesen. Laut dieser Studie besitzen 0,22% der epithelialen und 1,25% der stromalen Zellen in humanem Endometrium ein hohes proliferatives Potenzial, und bilden daher eine wahrscheinliche Quelle für die erhöhte proliferative Kapazität des Endometriums ( Chan et al., 2004).

Die mögliche Existenz aus dem Knochenmark stammender Stammzellen im Endometrium wurde in Knochenmark-Transplantatempfängern mit unterschiedlicher HLA-Signatur von Spender und Empfänger untersucht. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die vom Donor kommenden Knochenmarksstammzellen sich sowohl in dem epithelialen als auch stromalen Anteil des neu gebildeten Endometriums des Empfängers nachweisen lassen (Taylor et al., 2004).

Die Rolle vom Knochenmark abstammender Stammzellen in humanem Endometrium, als Mediator regenerativer Prozesse unter pathologischen Bedingungen ist Anlass für aktuelle Diskussionen. Eine geschädigte endometriale Nische könnte ein Signal für die Reaktivierung der Besiedlung von den Knochenmarkstammzellen sein (Cervello et al., 2012).

Die Beteiligung endometrialer Stammzellen in der Pathogenese gynäkologischer Krankheiten, wie der Endometriose und des endometrialen Karzinoms, scheint sehr wahrscheinlich zu sein. Gargett und Chan haben erläutert, dass die Dysregulation der Stammzellen im Endometrium als ein Schub beziehungsweise ein Ausgangspunkt für die Entwicklung der proliferativen Erkrankungen des Endometriums fungieren könnte (Gargett & Chan, 2006). Diese Einschätzung teilten auch Oliveira et al (Oliveira et al., 2012). Für die Bestimmung des stabilen Phänotyps endometrialer Stammzellen wurden stromale Zellen des Endometriums gezüchtet und die Anwesenheit von spezifischen Markern, wie CD146, CD105, CD73, CD90, CD73, MS11, NOTCH-1 and SOX-2 geprüft (Schüring et al., 2011). Durch in vitro-Differenzierungsexperimente konnte hierbei das multipotente Differenzierungspotential dieser Zellen nachgewiesen werden, da sich unter geeigneten Kulturbedingungen die Zellen in Knochen-, Knorpel-, und Adipozyten-ähnliche Zellen differenzieren ließen. Darüber hinaus konnten Arbeiten der hiesigen Arbeitsgruppe erstmals eine erhöhte Expression von Stammzellmarkern (Musashi-1, SOX-2) in Endometriosegewebe im Vergleich zu gesundem sekretorischem Endometrium nachweisen (Götte et al., 2008, 2011).

Die Pathogenese, die Verbreitungswege der Endometriose und weitere mögliche beteiligte Faktoren beinhalten noch viele unbeantwortete Fragen. Eine dieser Fragen ist, ob das lymphatische System eine relevante Rolle für die allgemeine Pathogenese, die Rezidivhäufigkeit und die Progression der Krankheit spielen kann.

Mechsner et al konnten in den letzten Jahren zeigen, dass Endometriosezellen sehr wahrscheinlich über Lymphgefäße in entsprechende regionäre Lymphknoten verschleppt werden konnten

(Mechsner et al., 2008, Mechsner et al., 2009). Nach einer Sentinellymphnotenmarkierung bei sicht/tastbarer rektovaginaler Endometriose konnten gezielt in diesen Lymphknoten in 30% der Fälle Endometrioseeläsionen und in 73 % der Fälle ER- und PR-positive freie Zellen nachgewiesen werden, die Endometriosecharakter haben. Passend dazu sind auch Lymphgefäße sowohl in peritonealen als auch in tief infiltrierenden Endometrioseeläsionen nachweisbar. Der hohe Anteil an unreifen Lymphgefäßen lässt dabei auf eine hohe Lymphangiogeneseaktivität schließen (Keichel et al, 2011, Reichert 2012).

Während einer Operation werden nur die sichtbaren endometrialen Herde entfernt, so dass möglicherweise in den Lymphknoten enthaltene Endometriosezellen unbeschädigt bleiben und können als eine Zielstruktur für die nachoperative hormonelle Stimulation dienen. Solche aktivierten, Endometriose auslösenden Zellen könnten in den Lymphknoten eine unbestimmte Zeit verbleiben und schließlich zu einem Rezidiv führen (Clemens et al., 2011).

## **1.2 Der Uterus und das Endometrium**

Der Uterus ist ein birnenförmiges Organ mit ungefähr 7-9 cm Länge. Er besteht anatomisch aus dem Korpus uteri und Cervix uteri. Das über der Tubenmündung liegende Segment des Korpus uteri wird Fundus uteri genannt. Die zwei Teile der Cervix uteri werden entsprechend ihrer Lokalisation als Portio vaginalis und Portio supravaginalis bezeichnet.

Die Wand des Uterus umfasst von innen nach außen die drei folgenden Schichten:

- Endometrium

Das Endometrium enthält die Lamina functionalis und die Lamina basalis und ist an den zyklischen Veränderungen beteiligt. Histologisch lässt sich einschichtiges hochprismatisches Zylinderepithel erkennen.

Die Lamina funktionalis wird zyklusabhängig mit den sezernierenden Drüsen abgestoßen, während die Lamina basalis, in der sich neben dem Bindegewebe auch basale Drüsenanteile und Gefäße befinden, in der Desquamationphase persistiert.

- Myometrium

Das Myometrium wird mit den Kreismuskeln und Langmuskeln repräsentiert, wobei die helicalen Muskelfasern aus der Tiefe in die Deckschichten führen.

- Perimetrium

Das Perimetrium ist eine Ausstülpung des parietalen Peritoneums, welches an das viszerale Peritoneum an die anliegenden Organe angrenzt.

(Stauber & Weyerstahl, 2007)

### **1.3 Endometriose**

Endometriose ist eine chronische, gutartige Erkrankung, bei der sich endometriale Drüsen und Stomazellen außerhalb der Uterushöhle befinden und ektope Herde bilden. Die Beschwerden bei den Betroffenen sind Dysmenorrhö, Unterbauchschmerzen, Miktions- und Defäkationsschmerzen sowie unerfüllter Kinderwunsch. Von 6% bis 10% der weiblichen Population sind 35-50% der Frauen mit Beckenschmerzen betroffen. (Sasson et al., 2008).

Die Entstehung und die Pathogenese der Endometriose ist komplex und wird immer noch kontrovers diskutiert. Allerdings gibt es verschiedene Theorien, durch die die Entstehung der Endometriose erklärt werden könnte.

#### **1.3.1 Pathogenese**

Die bekannteste Theorie ist die Theorie der retrograden Menstruation. Diese Theorie stützt sich auf das Phänomen der retrograden Menstruation durch die Eileiter in der Bauchhöhle (Sampson JA., 1927). Laparoskopische Untersuchungen haben nachgewiesen, dass 76- 90 % der menstruierenden Frauen mit offenen Eileitern eine retrograde Menstruation haben. Außerdem wird behauptet, dass die Frauen mit der Endometriose einen größeren Umfang der retrograden

Menstruation und auch ein abnormales myometrales Kontraktionsverhältnis im Vergleich zu den Gesunden haben (Halme et al., 1984; Liu et al., 1986; Salamanca et al., 1995).

Eine weitere Theorie basiert auf der Metaplasie des Zölomepithels, infolge einer noch unklaren, möglicherweise inflammatorischen Stimulation. Diese Theorie bezieht sich auf eine Metaplasie der viszeralen und abdominalen Peritonealzellen. Die Verteidiger dieser Hypothese gehen davon aus, dass das Thoraxperitoneum, Bauchperitoneum, das Beckenperitoneum sowie die Müllerschen Gänge von der selben zöломischen Wand des Embryos entstehen (Gruenwald P., 1942).

Die Embryonic Rest Theorie geht davon aus, dass die ursprünglichen Müllerschen Zellen in der Bauchhöhle unter bestimmten Umständen das Wachstum der endometrialen Herde verursachen (Von Recklinghausen., 1896). Die endometrialen Herde in der Migrationsbahn des Müllerschen Systems unterstützen diese Theorie (Isaac et al., 2008).

Die lymphatische bzw. hematologische Ausbreitung von Endometriose wird ebenfalls als ein möglicher Ausdehnungsweg betrachtet (Halban., 1924). Mikrovaskuläre Studien des lymphatischen Flusses vom Uterus zu den Ovarien haben das mögliche Zusammenspiel des lymphatischen Systems in der Etiologie des Ovarialkarzinoms dargestellt (Hey-Cuningham et al., 2011). Die deutlichsten Hinweise auf die gutartige Metastasierung der Endometriose weit vom Uterus bilden die klinischen Fälle der Knochen-, Lungen-, und Gehirndometriose (Jubanyik et al., 1997).

Die Transplantattheorie beschreibt die Beobachtung, dass einige ektope Herde an bereits operierten Stellen, wie Sectio caesarea und Episiotomie, gefunden worden sind (Novac et al., 1995; Pasalega et al., 2011).

Die Endometriose scheint eine komplexe Krankheit zu sein und braucht verschiedene Attribute um sich entwickeln zu können, nämlich die Anwesenheit von endometrialen Drüsen und Stromazellen, Adhäsion endometrialen Zellen außerhalb der Uterushöhle, Invasion ins Gewebe, Erhaltung und Wachstum (Jani et al., 2010). Die ektopen endometrialen Herde entwickeln sich selbständig und daher sind sie schlecht kontrollierbar. Sie weisen eine Angiogenese auf und sind in der Lage, auf hormonelle Stimulation zu reagieren ( Pasalega et al., 2011).

### **1.3.2 Diagnose**

Die Endometriose wird mittels laporoskopischer Inspektion mit Biopsie diagnostiziert. Die körperliche Untersuchung sowie bildgebende Verfahren, wie Ultraschall und MRT und die Laboruntersuchung von CA 125 liefern zusätzliche diagnostische Informationen.

Die laporoskopische Visualisierung der ektopen endometrialen Herde stellt makroskopisch sichtbare rote, schwarze und weiße Läsionen mit unterschiedlichem Pigmentationsgrad sowie fibrotischen Verdickungen dar (Schindler., 2007). Rote Herde charakterisieren frühe Stadien von Endometriose, während die gefäßarmen weißen Läsionen als unaktiv angesehen werden (Nisolle et al., 1990). Fortgeschrittene Stadien der Endometriose stellen sich als schwarze und pigmentierte Herde dar, in denen sich die Endometriose in 76-93% der Fälle histologisch nachweisen lässt (Moen et al., 1992).

Laut Buchweitz et al, könnte die Messung von Autofluoreszenz bei der Laporoskopie zur besseren Visualisierung der schlecht erkennbaren unpigmentierten sowie okkulten endometrialen Herde dienen. Die Autofluoreszenz ist verwendbar für die Identifizierung von Unterschieden zwischen der vesikelbildenden Endometriose und anderen identischen peritonealen Änderungen. Im Vergleich zu der Fluoreszenz mit Einführung von exogenem Photosensibilisator, empfiehlt sich diese Methode als gut verträglich, braucht keine Vorbereitung und ruft keine Photosensibilität hervor (Buchweitz et al., 2006).

Der histologische Befund bei der Endometriose zeigt sowohl Strukturen, die dem eutopen Endometrium ähneln, wie Epithelzellen und endometriales Stroma, als auch atypische Elemente, nämlich fibrotisches Gewebe, Blut und pigmentierte Histozyten (Jansen et al., 1986).

Mittels des Ultraschalls können die endometriotischen Zysten gut entdeckt werden. Trotzdem bietet die Methode nur ungenügende Möglichkeiten die peritonealen Herde zu entdecken und gibt nur indirekt Hinweise auf Adhäsionen. Durch MRT- Bildgebung kann die Blasenendometriose oder rektovaginale Endometriose visualisiert werden (Robert Z et al., 2003).



### 1.3.3 Therapie

Die Therapie der Endometriose kann zurzeit, angesichts der unvollständig verstandenen Etiologie und Pathogenese, keine dauerhafte Heilung anbieten und variiert abhängig von Alter, Symptomatik und bestehendem Kinderwunsch.

Derzeitig besteht das operative Therapiekonzept dennoch in der Entfernung aller sichtbaren Endometrioseläsionen, was oftmals zu einer signifikanten Schmerzreduktion führen kann. Da es sich oftmals um junge Patientinnen mit Kinderwunsch handelt, muss organerhaltend und Gewebeschonend operiert werden. Als endgültige Behandlung für die Patientinnen mit abgeschlossenem Kinderwunsch wird eine Hysterektomie mit beidseitiger Adnexektomie durchgeführt. Konservative Resektion in sano durch Laparatomie oder Laparoskopie kombiniert mit einer hormonellen Therapie ist oft eine Therapie der Wahl (Acien et al., 2013).

Der postoperative Einsatz von GnRH –Analoge führt zu der Verlängerung der rezidivfreien Episoden. Die Effektivität von GnRH-Analoga im Vergleich zu Gestagenen im Bezug auf die regressiven Veränderungen von Endometriosebesiedlungen ist durch prospektive randomisierte Studie nachgewiesen worden. Eine sechsmonatige Behandlung scheint am besten das Rezidivrisiko zu beeinflussen (Schweppe., 2005).

Verschiedene Wirkungsmechanismen sind für die erfolgreiche Anwendung von oralen Kontrazeptiva verantwortlich. Laut Fauconnier und Chapron sind die oralen Kontrazeptiva in der Lage, das Wachstum der endometrialen Herde und die Krankheitssymptomatik zu verhindern (Fauconnier et al., 2005). Eine andere Studie betont die durch Reduzierung der Prostaglandine bedingten antiphlogistischen Eigenschaften dieser Therapie. Darüber hinaus scheinen orale Kontrazeptiva ein wirkungsvolles Medikament für die Bekämpfung von Endometrioserezidiven zu sein (Seracchioli et al., 2009).

Aufgrund der erhöhten P450Aromatase- Produktion im erkranktem Gewebe wurde der Einsatz von Aromatasahemmern empfohlen. Die kombinierte Wirkung von Aromatasehemmern entweder mit Progestagen oder mit oralen Kontrazeptiva verbessert die Lebensqualität der Patientinnen und lindert Schmerzen (Ferrero et al., 2011).

Durch Hemmung peripherer Steroidhormonrezeptoren wirkendes Danazol ergibt gute Ergebnisse bei Behandlung der Infertilität. Klinische Studien weisen darauf hin, dass die präoperative

Anwendung von Danazol die Schwangerschaftsrate positiv beeinflussen könnte (Chatterjee et al., 2012).

Trotz der therapeutischen Maßnahmen bleibt leider das Rezidivrisiko der Erkrankung relativ hoch. Postoperative chronische Schmerzen sind ebenfalls nicht ausgeschlossen und benötigen, je nach Bedarf, eine individuelle Schmerztherapie für die Linderung der krankheitsbedingten Schmerzen (Schindler AE, 2008).

### **1.3.4 Die Endometriose beeinflussende Faktoren**

Die monatliche Desquamation während des Zyklus fördert proliferative Prozesse und die Regeneration im Endometrium. Für das hohe Niveau der proliferativen Prozesse im Endometrium sind wahrscheinlich dort vorhandenen Stammzellen verantwortlich (Du & Taylor, 2009). Vom Endometrium kommende Progenitorzellen könnten durch die Eileiter in die Bauchhöhle gelangen und sich dort implantieren. Vom Knochenmark stammende Stammzellen könnten auch ihren Beitrag an der Ausbildung der endometrialen Herde leisten (Sasson et al., 2008). Die histologisch nachgewiesene Endometriose bei den Patientinnen ohne aktives Endometrium, mit Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrom und bei Männern, die nach einem Prostatakarzinom hochdosiertes Östrogen bekommen, spricht für eine nichtendometriale Abstammung der Endometriose (Rosenfeld et al., 1981; Schrodt et al., 1980).

Mittels retrograder Menstruation in die Bauchhöhle gelangte endometriale Fragmente, müssen die Beseitigung durch das Immunsystem vermeiden, um sich implantieren oder entwickeln zu können. Es ist auch erforderlich, weitere Voraussetzungen zu erfüllen, wie z.B die Schaffung der neuro-vaskulären Versorgung, die Invasion des Epithels sowie kontinuierliches Wachstum und Überleben, d.h. die Vermeidung von Apoptose und Nekrose.

Solche Fähigkeiten besitzen die Stammzellen, die zu der Verstärkung der Implantationsfähigkeit außerhalb des Uterus neigen. Möglicherweise begünstigen sie auch eine verstärkte Anhaftung an vorgeschädigtem Peritoneum für ihre Implantation. Die Herde, die sich selbst auflösen können,

stammen möglicherweise von den transient amplifizierenden Zellen, während sich die persistierenden von den eigentlichen Stammzellen ableiten (Gargett & Masuda., 2010).

Laut Wingfield et al hat sowohl das eutope Endometrium als auch das ectope Endometrium der an Endometriose erkrankten Frauen eine erhöhte Überlebensfähigkeit im Vergleich zum Endometrium der gesunden Frauen (Wingfield et al., 1995). So eine Hochregulation von antiapoptosischem Gen BCL-2 wurde sowohl im eutopen als auch im ektopen Endometrium der Endometriose Patientinnen gezeigt (Joner et al.,1998). Darüber hinaus gibt es zahlreiche Hinweise auf eine erhöhte Apoptoseresistenz in Endometrioseläsionen im Vergleich zum gesunden Endometrium, welche von Nasu et al. zusammengefasst wurden (Nasu K et al., 2009). Zahlreiche pathophysiologische Untersuchungen der Endometrioseläsionen haben weitere molekulare Hinweise entdeckt, wie genetisch prädisponierende Faktoren, die Östrogenabhängigkeit, die Progesteronresistenz und die Entzündung (Richard et al., 2012). Die Implantationsfähigkeit der genetisch veränderten endometrialen Zellen scheint erblich zu sein. Das Risiko für die Verwandten erster Linie von Endometriosepatientinnen ist sechs mal höher als bei nicht betroffenen Patientinnen (Simpson et al., 1980).

Die proliferative Fähigkeit des Endometriums kann ebenso wie die Anheftung an das Mesothel oder das Vermeiden der Beseitigung durch das Immunsystem durch hormonelle Veränderungen beeinflusst werden. Die Endometriose wird als östrogenabhängige Krankheit betrachtet und dieses Konzept unterstützen auch molekulare Hinweise (Kitwaki et al., 2002). Im ektopen Endometrium gibt es im Vergleich zum eutopen eine erhöhte Expression des Enzyms Aromatase und eine niedrige Expression von 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenase (17 $\beta$ -HSD) Typ2 (Zeitoun et al., 1998). Als Folge der veränderten Expression steigt die lokale Konzentration von E<sub>2</sub>, welche die vermehrte Bildung von Prostaglandin E<sub>2</sub> stimuliert (Noble et al., 1997). Endometriale Herde beeinflussen auch Progesteronezeptoren (PR) dahingehend, dass sie zur allgemeinen Senkung der PR-Expression bis hin zur Abwesenheit von PR führen (Attia et al., 2000 EM4). Also die unvollständige Transformation des Endometriums von einem proliferativen zum sekretorischen Status begünstigen die Implantation sowie das Überleben des ektopen Endometriums (Richard et al., 2012).

Die endometrialen Herde benötigen eine gute vaskuläre Versorgung für ihre Persistenz. Dies ist besonders wichtig in der peritonealen Umgebung, die im Vergleich mit dem Endometrium,

relativ gefäßarm ist. Die Angiogenese fördert auch das pathologische Nervenwachstum und trägt so zur Entstehung von Schmerzsymptomen bei (Asante et al., 2011). Die Proliferation, die Adhäsion und die Neoangiogenese im proliferativen Endometrium der Endometriosepatientinnen werden durch die Hochregulation von TNF- $\alpha$ , IL-8 und MMP erleichtert (Kyama et al., 2006). Vermehrte Gefäßbildungen in den endometrialen Herden könnten auch auf vom Endometrium, Knochenmark oder aus der Zirkulation stammenden Stammzellen beruhen (Laschke et al., 2011). Der die Angiogenese stark fördernde vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) lässt sich mit einer hohen Konzentration in der peritonealen Flüssigkeit von Endometriosepatientinnen nachweisen (McLaren et al., 1996).

Als Haupttherapie wird heutzutage die laparoskopische Entfernung der endometrialen Läsionen betrachtet, die in der Lage ist, von der Krankheit verursachte Schmerzen zu lindern und merklich die Lebensqualität der Patientinnen zu erhöhen (Abbot et al., 2003). Obwohl fast 80 % der Endometriosepatientinnen von dem Eingriff profitieren (Lyons et al., 2006), bleibt das Rezidivrisiko immer noch hoch. 2 Jahren nach der Operation, wurden mit 21% der Fälle ein Rezidiv entdeckt, während in 5 Jahren dieses auf 40-50% ansteigt (Guo., 2009).

Das Rezidiv lässt sich wahrscheinlich durch nach der Operation gebliebene, aktive endometriale Zellen erklären, was dadurch belegt ist, dass neue Läsionen sich oft unweit von den alten, schon operierten Regionen im Becken befinden (Vigneli et al., 2005). Laut Berlanda et al, bleibt das erneute Auftreten der Endometriose auch für die Patientinnen, die bereits eine Hysterektomie erlebt haben, trotzdem noch aktuell (Berlanda et al., 2010).

Der überall akzeptierte gutartige Ursprung der Endometriose ist dadurch in Frage gestellt, dass die Endometriose in mehreren Kriterien einer bösartigen Erkrankung gleicht. Das irregulierte Zellwachstum, die Invasion, die Neoangiogenese, DNA aneuploidy vom Drüsenepithel und der monoclonale Ursprung sprechen gegen eine gutartige Entstehung (Nezhat et al., 2002&2008; Ballouk et al., 1994; Jimbo et al., 1997). Die Beteiligung der Lymphknoten in der Erkrankung ist das nächste Kriterium, welches die Endometriose noch näher zu den bösartigen Krankheiten stellen könnte.

Die Verbindung zwischen der Lymphknotenbeteiligung und der Invasionsstufe ist bereits nachgewiesen. Mechsner et al haben gezeigt, dass die Größe der Läsionen und die

Lymphknotenbeteiligung im direkten Verhältnis zueinander stehen (Mechsner et al., 2006). Alle Patientinnen, mit Darminfiltration hatten Endometriose-positive Lymphknoten. Diese Tatsache spricht dafür, dass sich die Invasion und die LK-Beteiligung miteinander in Verbindung stellen lassen. Es stellt sich die Frage, ob die LK-Endometriose als eine Dissemination von den in der Darmwand lokalisierten Hauptherden betrachtet werden könnte (Mechsner et al., 2008). Das vorgeschrittene Stadium der Endometriose könnte auch als Folge der LK-Beteiligung angesehen werden, wobei sowohl die in den LK befindlichen endometrialen Zellen als auch möglicherweise an der Pathogenese beteiligte Stammzellen als eine Quelle für die neue Invasion fungieren könnten. Die Theorie von der Dissemination der endometrialen Drüsen und Stromazellen durch LK wurde bereits durch frühere Studien belegt (Poyatos et al., 2003; Insabato et al., 1996). Die Situation, in der endometriale Herde retroperitoneal lokalisiert sind, ist beispielsweise durch die lymphatische Verbreitung zu erklären. Jedoch ist die primäre Beteiligung der Lymphknoten als eine Lokalisation der Endometriose eine Seltenheit (Moore et al., 1988).

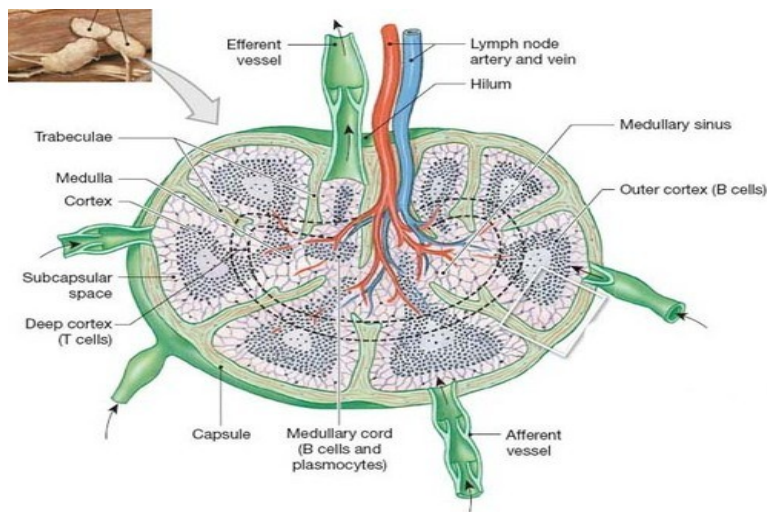
Die Rolle der lokalen Lymphknoten für die Krankheitsprognose wird bislang immer noch vernachlässigt, denn es werden während der Operation immer noch nur sichtbare und oberflächliche Läsionen entfernt. Die Rationalität der LK-schonenden Operationen ist allerdings in diesem Fall umstritten, da das Risiko der Lymphknotenbeteiligung relativ hoch ist (Mechsner et al., 2008).

## 1.4 Lymphatisches System

Das lymphatische System besteht aus lymphatischen Gefäßen und lymphatischen Organen.

Man unterscheidet primäre und sekundäre lymphoide Organe. Die primären lymphoiden Organe sind Thymus und Knochenmark; sie sind für die Bildung und Maturation der lymphatischen Zellen verantwortlich. Die sekundären Organe steuern die weitere Maturation und die Immunantwort. Zu den sekundären Lymphorganen zählen die Milz, die Peyer'schen Plaques, die Tonsillen, die Lymphknoten und der Wurmfortsatz (Quere, I, 2010).

Lymphknoten sind kleine, bis zu einen Millimeter große, nierenförmige Strukturen. Eine aus Bindegewebe bestehende Kapsel umhüllt hierbei die äußere Rinde (Cortex) und das innen gelegene Mark (Medulla). Radiäre Abzweigungen der Kapsel dringen in den Knoten ein (Lüllmann-Rauch, 2003). (Abb.1)



**Abbildung 1:** Lymphknoten ( Quelle: <http://www.lymphomation.org>)

.Die interstitiale Flüssigkeit fließt durch die mit Ankerfilamenten im Gewebe befestigten Lymphkapillaren von terminalen Lymphgefäßen durch die Präkollektoren und Kollektoren bis zum Rumpf und den Lymphsammelstämmen. Während der von der muskulären Schicht in der

Gefäßwand vermittelten Kontraktion von Lymphgefäßen wird die intestinale Flüssigkeit langsam gepumpt, indem der retrograde Fluss, dank der Einbahnklappen, vermieden wird. (Quere et al., 2010). In den Lymphknoten leiten die zuführenden Gefäße die Lymphe in die Randsinus. Von dort fließt sie über Intermediärsinus zu den Marksinus. In diesen wird die Lymphe gesammelt und von dort in die ableitenden Gefäße geleitet

Es ist bekannt, dass die Funktion des lymphatischen Systems darin besteht, die übermäßige interstitiale Flüssigkeit, sowie Proteine, Lipide und die Abfallprodukte vom interstitialen Raum zurück zu der Blutzirkulation zu bringen. Das System dient auch als Transportkanal für Immunzellen und erleichtert immunologische Antwort ( Charman, W et al., 1992; Schwatz, M et al., 2008). Die Lymphknoten wiederum neutralisieren Bakterien, Viren und Abfallstoffe. Unter Berücksichtigung der oben genannten Funktionen scheint das lymphatische System eine komplexe Rolle nicht nur für die Zirkulation sondern auch für das Immunsystem zu spielen. Zusätzlich ist die Bedeutung des Systems auch für die Metastasierung von Tumorzellen bemerkenswert groß (Schwatz., 2001).

#### **1.4.1 Lymphabfluss des weiblichen Genitales**

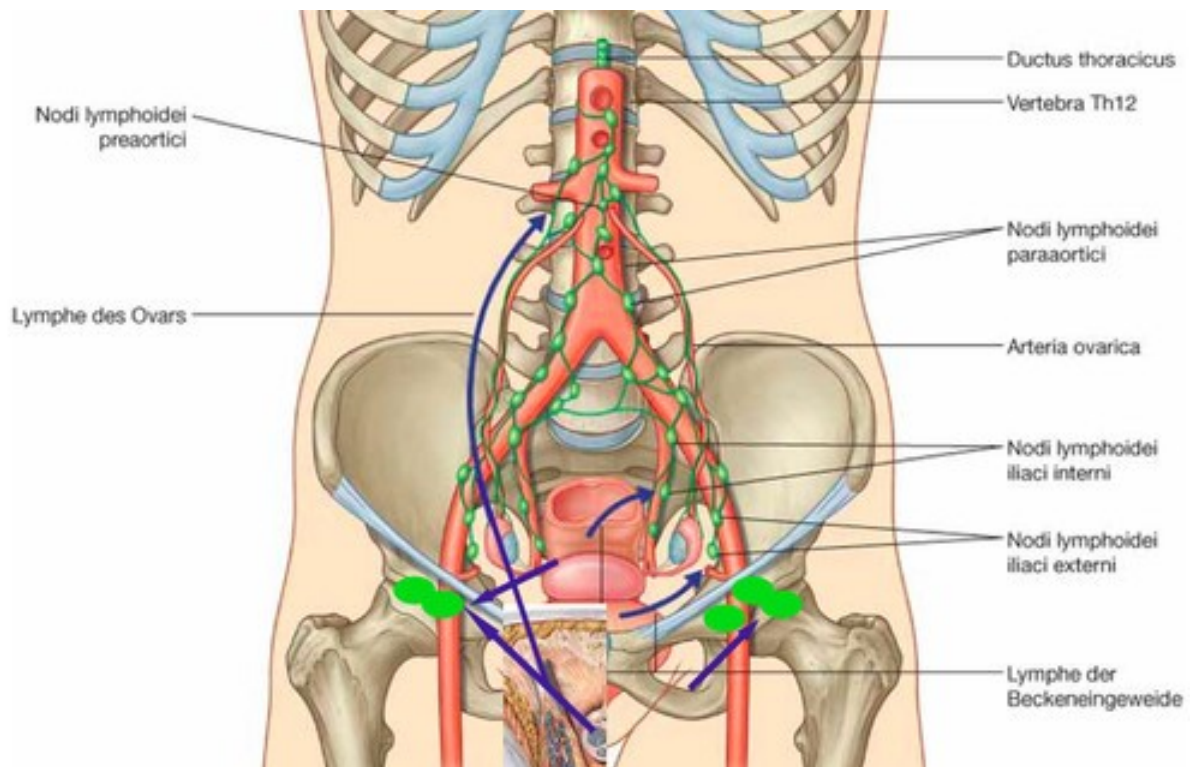
Insgesamt fließt die Lymphe von den weiblichen Genitalien durch die verschiedenen Lymphknotengruppen über die aortalen Lymphknoten und V. cava inferior in die lumbalen Lymphknoten. ( Abb. 2)

Die inneren Genitalien nutzen drei Abflusswege.

- Von den Ovarien und Tuben läuft die Lymphe zu den lumbalen und aortalen Lymphknoten und schließlich in die V.cava inferior.
- Das Fundus uteri und Corpus uteri werden in die sacralen Lymphknoten , die inneren und äußeren iliacalen Lymphknoten drainiert.

- Uterus, Cervix und auch mittlere und obere Teile der Vagina werden von den tiefen, inguinalen Lymphknoten versorgt.

(Schünke et al., 2006)



**Abbildung 2:** Grundlegende Wege des Lymphdarainage des Beckens ( Quelle: [www. quizlet.com](http://www.quizlet.com))

Die mögliche lymphatische Ausbreitung der Endometriose könnte beziehungsweise sollte über die Lymphbahn folgen, die den Uterus draniert. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, den Lymphabfluss des Uterus hier detailliert darzustellen.

Es gibt fünf bekannte Lymphwege:

1. Aus dem Uterus in die inneren und allgemeinen iliakalen und aortalen Lymphknoten, durch infundibuläre Bänder des Beckens.



2. Aus den Obturator-, inneren und äußeren iliakalen Lymphknoten in die allgemeinen iliakalen Lymphknoten durch das Ligamentum cardinale.
3. In die inguinalen Lymphknoten durch das Ligamentum teres uteri und Ligamentum umbilicale mediale.
4. Direkt in den Eierstöcken.
5. Direkt in den Eileitern (Ueki , 1991).

Es ist anzumerken, dass die oben beschriebenen Lymphbahnen ebenfalls für das endometriale Karzinom und das Zervixkarzinom von Relevanz sind (Thomakos et al., 2006). In anderen Worten stellen die möglichen gemeinsamen Verbreitungswege der Endometriose und des endometrialen sowie Zervixkarzinoms, die Endometriose einen Schritt näher an bösartige Erkrankungen.

### **1.4.3 Lymphatisches System und Endometriose**

Obwohl die Existenz der endometrialen Herde in den Beckenlymphknoten in rectovaginalen und mit 26% in perokolischen LK von 35 Patienten mit rectosigmoidaler Endometriose (Thomakos et al.; Abrao et al., 2006), sowie die Beteiligung der mesorektalen Lymphknoten nachgewiesen wurde, ist ihre Rolle und die Funktion für die Entstehung und die Entwicklung der Endometriose noch unklar. In den zufällig entnommenen Nodi lymphoidei paracolici von 8 (33%) von 24 Patientinnen mit tief infiltrierender rectovaginaler Endometriose und in 3( 25%) von 12 Sentinel-Beckenlymphknoten waren endometriale Herde nachweisbar (Mechsner et al., 2008, 2010). Außerdem waren laut Clemens B et al in 11% der ovariellen oder peritonealen Endometriosefälle Beckenlymphknoten beteiligt. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Lymphknoten als Vorrat für die Endometriosezellen fungieren und zum chronischen Verlauf dieser Krankheit führen könnten. Vielleicht könnten die endometrialen Herde in den Lymphknoten auch eine adäquate Immunantwort hemmen und damit die Erkrankung zum

Rezidiv bringen. Nachgewiesene endometriale Drüsen bzw. endometriales Stroma in Lymphknoten könnten auch als Ergebnis der lymphatischen Drainage betrachtet werden (Ueki, 1991).

Interessanterweise wurde das lymphatische Eindringen mit vergleichbaren Zahlen für die Patientinnen mit der tief infiltrierenden Endometriose und dem Mammakarzinom präsentiert, nämlich von 13% bis 36% für die Endometriose und 8%-40% für das Mammakarzinom (Noel et al., 2008; Arnaout-Alkarain et al., 2007). Das ist nicht die einzige Ähnlichkeit zwischen bösartigen Tumoren und der tief infiltrierenden Endometriose, denn beide neigen zum aggressiven Wachstum mit der Heranziehung benachbarter Gewebe (Thomas et al., 2004).

Die Beteiligung von Lymphknoten bei der Endometriose wurde erstmals 1925 von Halban J. beobachtet. Seitdem ist dieses Ereignis unbeachtet seiner Seltenheit bei operierten Patientinnen mit Endometriose nachgewiesen und dokumentiert worden (Thomakos et al., 2006). Demnach unterstützen die klinischen Fälle und die verschiedenen Studien, in denen endometriale Drüsen und endometriales Stroma in den Lymphknoten gefunden wurden, die Theorie der lymphatischen Entwicklung von Endometriose (Insaboto et al., 1996).

An der Verbreitung der Endometriose durch das lymphatische System können verschiedene Faktoren beteiligt sein. Einer von diesen ist die Abwesenheit einer adäquaten Immunreaktion, die die Dissemination der endometrialen Fragmente mittels der Lymphknoten ermöglichen kann (Berbic et al., 2013). Die lokale Immunzellen im Uterus zeigen eine dynamische Umbaufähigkeit während des Zyklus, die mit der Destruktion, Remodellierung und Regeneration des endometrialen Gewebe verbunden ist (Salamonsen et al., 2000). Im Endometrium vorhandene Neutrophile und Makrophagen sind vermutlich bereits vor der Menstruation für den normalen Verlauf der Menstruation verantwortlich (Bulmer et al., 1992). Darüber hinaus scheint die Menstruation mit dem begleitenden Ödem und der leukozytären Infiltration ein entzündlicher Prozess zu sein, der die Abstoßung des Endometriums und auch der potenziell vorhandenen Mikroorganismen arrangiert (Finn, 1986; Salamonsen et al., 1999; 2002). Aus diesem Grund könnten die aufgespalteten endometrialen Fragmente, zwecks einer geeigneten immunologischen Prozessierung durch die afferenten lymphatischen Gefäße in die Lymphknoten von Uterus gelangen. Einerseits sind die endometrialen Zellen in der lymphatischen Zirkulation einer neuen Umgebung ausgesetzt, wodurch sie nicht mehr mit spezifischen Wachstumsfaktoren und

Nährstoffen für ihr Überleben versorgt werden, demgemäß unterziehen sie sich der Apoptose (Sawicki et al., 1997), andererseits, falls es die endometrialen Zellen geschafft haben, die immunologische Zerstörung und Überwachung sowohl im Endometrium als auch in den Lymphknoten zu vermeiden, könnten die lebensfähigen Zellen sich in den geeigneten Stellen implantieren und die Ausbildung pathologischer Herde auslösen. Zudem weist dies darauf hin, dass bei den Endometriose Patienten das lymphatische System nicht mehr in der Lage ist, die adäquate Destruktion von endometrialen Zellen zu gewährleisten und trägt demnach zu der invasiven Entwicklung der Krankheit bei (Barbic et al., 2013). Es ist bekannt, dass die endometrialen Zellen über eine Reihe von Eigenschaften verfügen, die deren Überleben, Adhäsion und Progression außerhalb des Uterus erlaubt. Ein Beispiel dafür ist die reduzierte Apoptose im eutopen Endometrium bei der Endometriose (Meresman et al., 2000). Diese Tatsache lässt vermuten, dass in die Lymphknoten gelangte endometriale Zellen aufgrund der verminderten Apoptose dort länger lebensfähig bleiben. Auch die während der proliferativen Phase gesteigerte mikrovaskuläre Dichte scheint bei der Endometriose die Migration der endometrialen Zellen in die Lymphknoten zu verbessern (Hey-Cunningham et al., 2010).

Den Weg der endometrialen Zellen von Lymphknoten zur Bauchhöhle und Peritoneum kann man sich folgendermaßen vorstellen: Efferente lymphatische Kanäle verlassen die Sentinel-Lymphknoten des Uterus und überqueren den Beckenbereich und die Beckenwand (Burke et al., 1996; O'Boyle et al., 2000). Zusätzlich weist das subperitoneale Gewebe normalerweise eine Kommunikation zwischen den lymphatischen Kanälen von Uterus und dem Beckenbereich auf (Trbojevic et al., 2006; Hey-Cunningham et al., 2011). Demnach versucht das lymphatische System durch die adäquate Immunantwort fremde Komponenten zu beseitigen und einer möglichen Dissemination vorzubeugen. Trotzdem kann in einigen pathologischen Situationen, wie z.B. Krebs und Endometriose, keine effiziente Beseitigung stattfinden und das ursprünglich schützende System verwandelt sich in einen Metastasierungsweg der Krankheit (Barbic et al., 2013).

Somit könnten die lymphatischen Gefäße eine Route für die Verbreitung der Endometriose darstellen. Die vermehrte Dichte der lymphatischen Gefäße im ektopen endometrialen Gewebe von Endometriosepatientinnen wurde im Vergleich zum gesunden Gewebe nachgewiesen. Die erhöhte Expression der Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D bestätigen weiterhin, dass

Endometriose die Lymphangiogenese stimuliert (Keichel et al., 2011). Es ist bekannt, dass bei bösartigen Tumoren die mikrovaskuläre Dichte ein Prognosefaktor und ein zuverlässiges Anzeichen für die mögliche bösartige Entartung der präkarzinösen Kondition ist. Die ausgiebige Ausbildung eines lymphatischen Gefäßnetzes gewährleistet wiederum die Ausbreitung der Krebszellen (Van der Auwera et al., 2006).

Die Endometriose zeigt in dieser Beziehung eine deutliche Ähnlichkeit mit malignen Erkrankungen, wie z.B die Infiltration von benachbarten Organen sowie die metastatische Verbreitung (Thomas et al., 2000) , die Invasion mit der Einbeziehung von Nervenfasern und die Angiogenese (Taylor et al., 2002; Anaf et al., 2000). Trotzdem zeigen weder Endometriose-Zellen noch ER/PR-positive Endometriose-ähnliche Zellen eine mitotische Aktivität oder untypische Formen bzw. eine verschobene Kern-Zytoplasma-Relation (Barier et al., 2007).

Das Zusammenspiel der Lymphknoten deutet eine chronische Ausprägung der Endometriose an und prognostiziert die erhöhte lokale und entferntere Rezidivwahrscheinlichkeit. Die Wirkung der endometrialen Herde auf die Lymphknoten als Immunsuppressor und deren Unterstützung in der Persistenz von der Krankheit ist nicht ausgeschlossen. Obwohl die Existenz von Müller'schen Einschlüssen in den Lymphknoten bei den Borderline-Tumoren auch ein häufiges Phänomen ist, reflektiert diese Tatsache keine Prognose des aggressiven Verlaufs der Krankheit (Keichel et al., 2011).

## **1.5 Stammzellen**

Stammzellen verfügen über die Kapazität der Selbsterneuerung und für die Produktion neuer Tochterzellen, die sich weiter differenzieren können. Insgesamt unterscheidet man adulte und embryonale Stammzellen (Bongso et al., 2004; Gargett, 2007). Abhängig von der Differenzierung lassen sich totipotente-, pluripotente- und multipotente Stammzellen unterscheiden. Unter der Differenzierung versteht man nicht nur die zellteilungbedingte phänotypische Änderung der Zellen, sondern auch die funktionsbedingte Genexpression (Bach et al., 2000).

Die totipotenten Zellen sind in der Lage, alle embryonalen und extraembryonalen Gewebe zu erzeugen. Im Vergleich zu diesen differenzieren sich die pluripotenten Zellen nur in die embryonalen Keimblätter. Das Potenzial der adulten multipotenten Stammzellen ist noch geringer, da sie nur als Quelle für die Zellen innerhalb eines Keimblattes dienen können. Die unipotenten Stammzellen differenzieren sich nur innerhalb einer Zelllinie (Trounson, 2006). Adulte Stammzellen befinden sich in einer speziellen anatomischen Struktur, in der so genannten Nische (Li & Xie, 2005). Aufgrund spezifischer Signale der umgebenden Zellen bleiben sie undifferenziert und geschützt vor der Differenzierung, der Proliferation, und der Apoptose; bei Bedarf können sie jedoch Proliferations- und Differenzierungssignale zu den residenten Zellen übermitteln (Moore & Lemischka, 2006).

Adulte Stammzellen sind nach Abschluss der embryonalen Entwicklung im ganzen Körper gefunden worden (Maruyama et al., 2010). Sie besitzen ein großes Selbsterneuerungspotenzial und sind für die Regeneration des Gewebes verantwortlich (Patel, et al., 2008). Anhand der hohen proliferativen Kapazität könnten die Stammzellen vermutlich die Regenerationsprozesse im Endometrium steuern (Moore & Lemischka, 2006). Jeden Monat wird infolge der Menstruation eine neue funktionelle Schicht des Endometriums erzeugt, die ihren vermuteten Ursprung in der verbleibenden basalen Schicht hat (Spencer et al., 2005). Um das monatliche umfangreiche Wachstum des funktionalen Endometriums ermöglichen zu können, müssten die für die Regenerationen zuständigen Zellen offensichtlich ein hohes Regenerationspotenzial besitzen.

### **1.5.1 Stammzellen und Endometriose**

Die Regenerations- und koloniebildende Fähigkeit der Stammzellen wurde in verschiedenen Studien experimentell untersucht (Chan et al., 2004; Gargett, 2004; Schwab et al., 2005). Den Studien von Schwab et al. zufolge gibt es keinen Unterschied zwischen dem koloniebildenden Epithel des proliferativen, sekretorischen und inaktiven Endometriums. Darüber hinaus könnte man vermuten, dass die Progenitorzellen sich in der basalen Schicht des Endometriums befinden und nach der Menstruation ihre Funktion fortsetzen.

Die Existenz der Stammzellen im humanen Endometrium wurde auf molekularer Ebene zuerst mit der Entdeckung des Transkriptionsfaktors Oct-4 veranschaulicht. Dieser Faktor ermöglicht im Zusammenspiel mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Pluripotenz der Stammzellen und ist sowohl im embryonalen Stammzellen als auch in den Keimzellen erkennbar (Matthai et al., 2006). Es ist nachgewiesen, dass die manipulierte Expression von Oct-4, sowie c-Myc und Klf-4 die Modifikation differenzierter menschlicher Körperzellen zu sogenannten induzierten pluripotenten Stammzellen ermöglicht. Die Expression der weiteren Stammzellmarker Musashi-1 und SOX2 im endometrialen Stroma ebenso wie erhöhte Musashi-1 Expression im proliferativen Endometrium gegenüber dem sekretorischen (Götte et al., 2008, 2011), unterstützt die Hypothese eines möglichen stammzellbedingten Ursprungs der proliferativen Erkrankungen des Endometriums.

Die multipotenten Fähigkeiten der endometrialen Stammzellen, nämlich die Differenzierung in die myogene, chondrogene, osteogene und adipogene Zelllinie ist unter anderem in den Studien von Schwab und Gargett demonstriert worden. Das einzigartige Differenzierungspotenzial der endometrialen Stammzellen wurde im Vergleich zum Gewebe vom Myometrium, uterosacralen Ligamentum, und Eileiter verdeutlicht (Wolff et al., 2007). Weitere Studien an klonalen, aus Routinebiopsien gewonnenen endometrialen Stromazellen mit mesenchyalem Stammzellcharakter bestätigten diese Ergebnisse (Schüring et al., 2011).

Die adulten Stammzellen haben ein variables Differenzierungspotenzial und können unter bestimmten Umständen vom gewöhnlichen Differenzierungsweg abweichen. So sind bei Leukämiepatienten transplantierte Stammzellen im Gehirn gefunden worden (Mezey et al., 2003). Es ist vorstellbar, dass außerhalb des Uterus vorkommende Stammzellen auch an der Pathogenese der Endometriose beteiligt sein könnten. Eine Quelle dieser Zellen ist hierbei wahrscheinlich das Knochenmark, aus dem diese Zellen mittels des lymphovaskulären Systems transportiert werden können (Sasson et al., 2010). Stammzellen, die auf diesem Weg in die Bauchhöhle gelangen könnten, verfügten hierbei über das Potenzial, ihre Zelllinie weiterhin zu erneuern und die Entstehung endometrialer Herde auslösen.

Die gewählte Gruppe von Stammzellen scheint eine hohe Adhäsions-, Migrations-, und Invasionsfähigkeit in ektopen Lokalisationen zu haben. Das heißt, dass die mesenchymalen Stammzellen des ektopen Endometriums auch veränderte Migrations- und Invasionsprozesse zeigen sollten als die des eutopen Endometriums. So wurde tatsächlich nachgewiesen, dass im Vergleich zum eutopen Endometrium, vom ektopen Endometrium gewonnene mesenchymale Stammzellen ein großes Migrations- und Invasionspotenzial haben. Die selbe Studie bekundet allerdings hierbei die phenotypische Gleichwertigkeit, z.B. Expression des Pluripotenz induzierenden Oct-4 Stammzellmarkers, zwischen ektopen und eutopen Stammzellen (An-Pei Kao et al., 2011).

Die ektopen endometrialen Zellen, insbesondere die epithelialen und Drüsenzellen in den Herden unterscheiden sich jedoch in anderen Eigenschaften von den entsprechenden eutopen Zelltypen. Der Unterschied liegt unter anderem in der Expression von E-Cadherin sowie von Transkriptionsfaktoren und Proteinen der extrazellulären Matrix und deren Rezeptoren (Gaetje et al., 1997). Diese Tatsache bezieht sich auf die Annahme, dass die Stammzellen von der Umgebung moduliert werden könnten, und von dem ursprünglich programmierten Differenzierungsweg abweichen (Starzinski-Powitz et al., 2003). Außerdem existiert auch ein Unterschied in der Genexpression vom eutopen Endometrium der Endometriose Patientinnen gegenüber einem Kontrollkollektiv (Giudice, 2003; Taylor, et al., 2002). Zusammenfassend könnte man sagen, dass die Existenz von eutopen Herden die Genexpression im gesunden endometrialen Gewebe beeinflusst, und damit auch dessen Funktion verändert (Figuiera et al., 2011).

## **1.6 Sox-2**

Von der Blastozyste stammende embryonale Stammzellen sind in der Lage sowohl sich selbst zu erneuern als auch sich in alle bekannte Körperzelllinien zu differenzieren. Deswegen sind für Pluripotenz und Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen zuständige Faktoren von großem Interesse für die Forschung.

Verschiedene Studien mit Mäusen haben drei Pluripotenz-regulierende Faktoren in den embryonalen Stammzellen impliziert, nämlich Oct 4, Nanog und Sox2. Diese drei Faktoren haben sich im Mausmodell als Schlüsselemente für die frühere Entwicklung präsentiert und fungieren als regulierendes Netzwerk der Pluripotenz (Fong et al., 2008).

Sox-2 stammt aus der Sox-2 Familie Gruppe B und wird mit einem einzigen Exongen kodiert. Das Gen gehört zum Intron des „Sox-2 overlapping transkript“ Gens (National Center for biotechnology information, 2008)

Sox2 ist ein „high-mobility group DNA bindende Domäne“ Transkriptionsfaktor, der in den pluripotenten Zelllinien des Embryos exprimiert wird. Die Expression von Sox2 ist zuerst in allen vier embryonalen Blättern zu sehen, wobei die später bis zur IZM (innere zelluläre Masse) und Epiblast und später bis zu den Stammzellen eingeschränkt wird. Im Vergleich zu Oct4 und Nanog, wird Sox2 auch in den multipotenten Zellen des extraembryonalen Ektoderms exprimiert, so dass die Rolle von Sox2 in der Bewahrung des Entwicklungspotenzials hier differieren könnte. Die Abwesenheit von Sox 2 führt zu früher embryonaler Letalität (Avilion AA et al, 2003).

Das flexible Wirkungspotenzial des Sox-2 Proteins ist in der Lage, sowohl in seinem aktiven als auch in inaktiven Zustand die Zellfunktion zu beeinflussen. Die Flexibilität der Wirkung von Sox-2 assoziiert sich wahrscheinlich mit unterschiedlichen Gen-Kooperationen (Wilson & Koopman, 2002). Welche Funktion durch die Sox-2 Wirkung ausgelöst wird, hängt vom Zusammenspiel von den an einem spezifischen Prozess gleichzeitig teilnehmenden, weiteren Transkriptionsfaktoren ab (Kamachi et al., 1999).

Sox2 zeigt eine hohe Expression sowohl in humanen als auch in murinen embryonalen Zellen. Im Fall einer Sox 2 Expressionsverringerung in Mäusen ist mit dem Verlust des pluripotenten Zustands und einer Differenzierungsneigung zu rechnen (Chew et al., 2005). Laut Fong et al führt die Reduktion der Sox2 Expression in humanen embryonalen Zellen ebenfalls zum Verlust des undifferenzierten Zustandes der Stammzellen und resultiert in Änderungen in der Zellmorphologie. Außerdem führt die Herabregulation von Sox 2 zur Verminderung der Expression weiterer Stammzellmarker einschließlich Oct 4 und Nanog (Fong et al., 2008).



## **1.7 Fragestellung**

Hauptfragen, die im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden sollen sind:

- Sind Sox-2 positive Zellen in Lymphknoten von Endometriosepatientinnen vorhanden?
- Gibt es einen Unterschied der Sox2 Expression zwischen Sentinel-Lymphknoten und zufällig gefundenen Lymphknoten?
- Gibt es eine Koloalisation zwischen Sox-2 und Östrogenrezeptoren?
- Gibt es eine Korrelation zwischen der Sox-2 Expression in Lymphknoten und ER/PR positiven Lymphknoten?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Die analysierten Gewebeproben aus Operationspräparaten wurden zwischen dem Jahr 2002 und 2008 vom Endometriose-Zentrum der Frauenklinik der Charité, Berlin gesammelt. Insgesamt wurden in dieser Studie Lymphknotenproben von 40 Frauen im Alter zwischen 22 und 49 Jahren nach Operation wegen symptomatischer tief infiltrierender Endometriose untersucht. Es waren entweder zufällig mit entnommene Lymphknoten, wie sie bei Darmteilresektionen z.B. im Mesocolon finden oder Sentinel-Lymphknoten, die nach Markierung mit 4 ccm Patent Blue® detektiert wurden, für die histologische Untersuchung zur Verfügung gestellt (Mechsner S., et al., 2008, 2009). Das mittlere Alter der Patientinnen betrug 35 Jahre, wie in der Tabelle 1 erkennbar.

Zusammen mit der Hämatoxylin und Eosin Färbung wurden die Schnitte mittels immunhistochemischer Auswertung mit Antikörpern gegen Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Forschungslabor der Frauenklinik Charité evaluiert.

Die zusammengefassten Ergebnisse dieser Auswertung sowie das Erkrankungstadium nach rASRM (American, Society for Reproductive Medicine, 1997) stellt die Tabelle 1 dar.

Die Gewebeproben von 40 Patientinnen wurden via Immunhistochemie auf eine Sox-2 Expression untersucht. Zwei Patientinnen konnten wegen einer nicht sicher zu beurteilenden diffusen Färbung aus der statistischen Auswertung jeweils in den Gruppen der Sentinel-Lymphknoten und der zufälligen Lymphknoten nicht berücksichtigt werden. Zwei weitere Patientinnen sind angesichts fehlender Daten aus dem Vergleich mit Östrogen- und Progesteronrezeptoren nicht berücksichtigt worden.

Für die Untersuchung einer möglichen Kolo-kalisation von Sox-2 mit Östrogenrezeptoren wurden drei Lymphknotenschnitte mit hoher Sox-2 Expression in Form einer Doppelimmunfluoreszenz untersucht.

**Tabelle 1: Patientinnenübersicht Immunhistochemie ( Sox-2)**

Material dieser Patientinnen wurde sowohl für Immunhistochemische Untersuchung als auch für Doppelimmunfluoreszenz verwendet. SLK= Sentinel-Lymphknoten, zuf. LK=zufällig gefundener Lymphknoten.

Fall Nr.	Alter in Jahren	rASRM	Lymphknotentyp	ER/PR/negativ
1	27	3	SLK	PR
2	24	2	SLK	PR
3	36	2	SLK	negativ
4	39	1	SLK	PR
5	40	4	SLK	PR
6	29	4	SLK	ER/PR
7	35	3	SLK	negativ
8	30	3	SLK	ER/PR
9	46	3	SLK	PR
10	30	4	SLK	ER/PR
11	32	4	SLK	k.A.
12	28	2	SLK	negativ
13	37	4	SLK	k.A.
14	47	3	SLK	negativ
15	44	3	SLK	ER/PR
16	31	3	SLK	ER/PR
17	22	3	SLK	PR
18	29	3	SLK	PR
19	34	3	SLK	PR
20	37	4	SLK	ER/PR
21	40	3	Zuf. LK	negativ
22	49	4	Zuf. LK	ER/PR
23	40	4	Zuf. LK	negativ
24	46	2	Zuf. LK	PR

25	33	4	Zuf. LK	negativ
26	31	4	Zuf. LK	PR
27	38	2	Zuf. LK	negativ
28	39	1	Zuf. LK	negativ
29	27	4	Zuf. LK	PR
30	35	4	Zuf. LK	ER/PR
31	36	4	Zuf. LK	ER/PR
32	31	4	Zuf. LK	PR
33	31	3	Zuf. LK	PR
34	33	4	Zuf. LK	ER/PR
35	47	4	Zuf. LK	ER/PR
36	39	3	Zuf. LK	negativ
37	30	4	Zuf. LK	ER/PR
38	34	2	Zuf. LK	PR
39	35	3	Zuf. LK	negativ
40	28	2	Zuf. LK	PR

## 2.2 Immunhistochemie

Nachdem die Patientinnenproben nach den standardisierten Richtlinien in 10%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurden, werden Schnitte mit 3  $\mu\text{m}$  Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Danach wurden die Schnitte zwei Mal fünf Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigender Ethanolreihe 100%-75%-50% rehydriert und mit PBS gewaschen. Dann folgte 30 minutiges Kochen im Dampfbad mit Citrat Puffer (pH=6, DAKO, Glostrup, Dänemark). Die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurde mittels der Peroxidaselösung (DAKO) durchgeführt, während für die Blockierung von unspezifischen Signalen die Proben mit 10%igem Aurion BSAC und PBS in der Verdünnung 1:10 behandelt wurden. Nach dem fünfmaligen Waschen mit PBS wurde der monoklonale Primärantikörper Maus-anti-human Sox2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) verdünnt mit AK Lösung (DAKO) in einem Verhältnis 1:100 zugefügt und für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Auf der negativen Kontrolle wurde kein Primerantikörper aufgetragen. Nach der Inkubation des Primärantikörpers folgen 3 Waschschrte mit PBS. Für die Visualisierung des Primerantikörpers wird Anti-Maus POD Polymer (DAKO) und Substrat-Chromogen (NovaREd Substate) benutzt. Die

Behandlungszeit mit Substrat-Chromogen variiert je nach Antikörper und betrug in diesem Fall 10-15 Minuten.

Durch das 10sekündige Eintauchen in Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) lässt sich die Kerngegenfärbung durchführen. Zum Schluss werden Schnitte in Kaisers Glyceringelatine (Merck) eingebettet.

Die Dokumentation und Bewertung der Färberesultate wurde mittels des Zeiss Axiophot 100 Mikroskops vorgenommen. Das Mikroskop ist mit CCD Kamera und Axiovision Software (Zeiss, Göttingen, Deutschland) ausgerüstet. 60 Gesichtsfelder je Schnitt wurden mit 32facher Vergrößerung zwecks der Entdeckung von Sox2-positiven Zellen untersucht.

Bei der Beurteilung der Lymphknoten konnte festgestellt werden, dass die Sox2-positiven Zellen relativ gleichmäßig verteilt sind, sodass die Beurteilung der gesamten Oberfläche je Schnitt nicht nötig war. Die Beurteilung der Schnitte wurde immer am oberen linken Quadranten des Präparates begonnen, gefolgt von einander folgenden Gesichtsfeldern, bis die Zahl 60 erreicht wurde. Die positiven Zellen wurden entsprechend der anatomischen Lokalisation, subcapsulären Areal, Kortex und medullären Areal der Lymphknoten geordnet und zusammengezählt. Der überwiegende Anteil der Zellen befand sich in der medullären Zone der Lymphknoten.

Die Intensität der Färbung wurde dabei auch berücksichtigt. Die Zellen wurden als positiv bewertet, wenn die spezifische Färbung 2-3 Punkte auf einer Skala von 0-3 aufweisen konnte. Fast alle Zellen haben eine adäquate Frabintensität gezeigt und wurden dementsprechend als positiv erachtet.

### **2.3 Doppelimmunfluoreszenz**

Die Patientenproben werden in 10%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, danach wurden von den Paraffinblöcken 3  $\mu\text{m}$  Schnitte mittels eines Mikrotoms angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Für die Durchführung der Färbung wurden die Proben zuerst in Xylol 5 Minuten entparaffiniert und danach durch die absteigende Ethanolreihe jeweils 3 Minuten

rehydriert und einmalig im Wasser gewaschen. Eine weitere Demaskierung im Dampfbad für 35 Minuten wurde mit Citratpuffer (pH=6; DAKO) vorgenommen. Danach folgt die Blockierung mit 10%igem Aurion BSAc (bovine serum albumin) in PBS (1:10) . Anschließend werden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit verdünnten Primärantikörpern inkubiert.

Primärantikörper:

- monoklonaler Maus-anti SOX-2 (1:100) (R&D-Systems)
- polyklonaler Kaninchen- anti ER (1:50) (Santa Cruz)

Auf die Negativkontrolle wurden keine Primärantikörper gebracht.

Nach drei einanderfolgenden Waschgängen mit PBS werden die Proben mit Sekunderantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur in Kontakt gebracht. Von diesem Zeitpunkt an wurde im Dunkeln (abgedunkelter Raum, verschlossene Inkubationskammer) gearbeitet.

Sekundärantikörper:

- anti Maus Ig G, AlexaFluor 546 (rote Fluoreszenz) 1:500 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)
- anti rabbit Ig G AlexaFluor 488 (grüne Fluoreszenz) 1:500 (Molecular Probes)

Der Fluoreszenz-Antikörper wird auch auf die Negativkontrollen aufgebracht , um das eigene Fluoreszenzpotenzial und die Autofluoreszenz des Gewebes einschätzen zu können.

Die bereits in Glyceringelatine eingebetteten Schnitte wurden mit dem Leica DMLB Konfokalen Fluoreszenzlasermikroskop (Leitz, Wetzlar, Deutschland) in den entsprechenden Fluoreszenzkanälen untersucht. Hierbei kamen die Werkseinstellungen für FITC und TRITC (grüne bzw. rote Fluoreszenz) zum Einsatz.

## **2.4 Statistik**

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbung wurde der parametrische T-Test genutzt. Der T-Test analysiert den Unterschied zwischen empirisch gefundenen Mittelwerten zweier Gruppen. Mittels dieses Tests kann festgestellt werden, ob der Mittelwertunterschied zwischen zwei Gruppen wesentlich ist, oder auch zufällig entstanden sein könnte.

Damit der T-Wert mit der Berücksichtigung der Nullhypothese berechnet werden könnte, wird eine Standardisierung der Mittelwertdifferenz der beiden Stichproben mit dem geschätzten Standardfehler durchgeführt. Die T-Verteilung bietet die Möglichkeit eine Auftretenswahrscheinlichkeit unter der Nullhypothese zu dem empirischen T-Wert zu zuordnen. Die empirische Mittelwertsdifferenz wird bei einem  $p < 0,05$  als statistisch signifikant definiert und ein  $p < 0,01$  als statistisch sehr signifikant bezeichnet.

## **2.5 EDV-Programme**

Statistische Auswertung – SPSS (Version 15)

Grafische Darstellung- Adobe Photoshop CS2, MS Word Office, MS Excel Office

Textverarbeitung- MS Word Office

## **3 Ergebnisse**

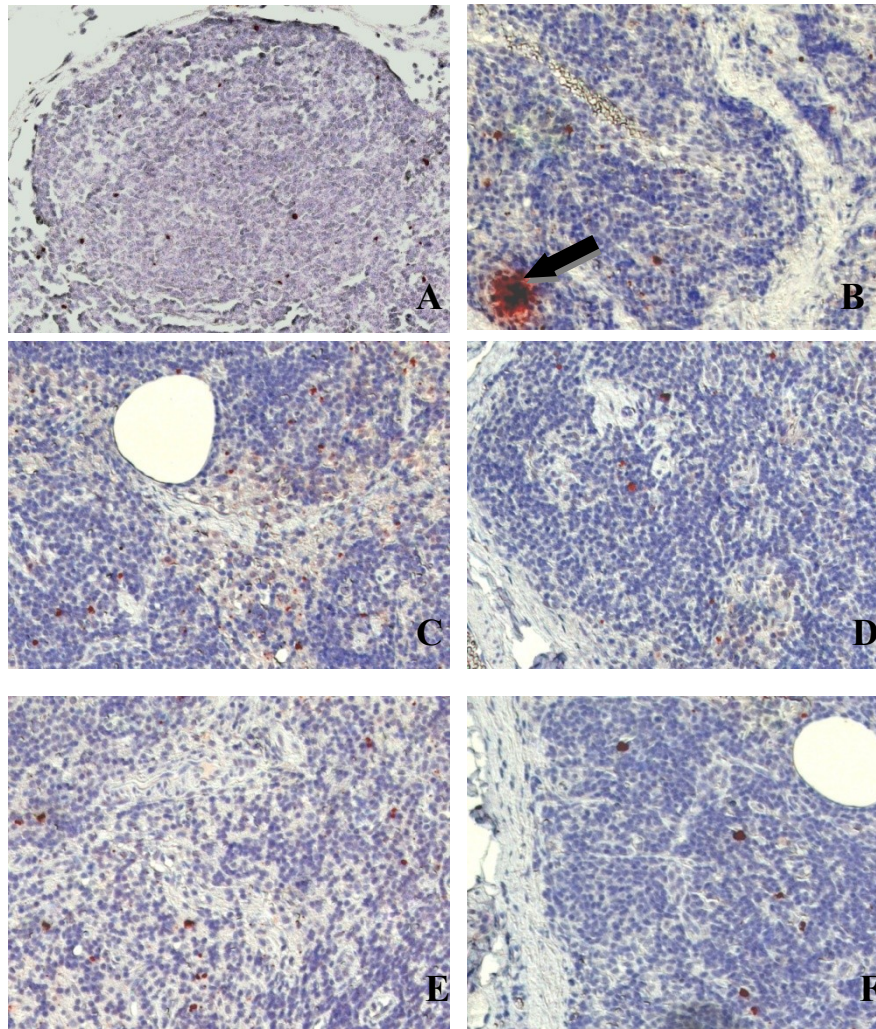
### **3.1.1 Verteilung Sox-2 exprimierender Zellen in den Lymphknoten von Endometriose Patientinnen**

Die Expression der Sox-2 exprimierenden Zellen wurde via Immunhistochemie an Lymphknotenschnitten von 38 Patientinnen (Tabelle 1) untersucht. Im hochauflösenden Mikroskop wurden nukleäre und zytoplasmatische Färbungen nachgewiesen und die Anzahl der positiven Zellen pro 60 Gesichtsfelder summiert.

Die Sox-2 positive Zellen konnten sowohl in der kortikalen als auch in der medullären Zone der Lymphknoten identifiziert werden. Hierbei ergab sich eine höhere Anzahl Sox-2-positiver Zellen in der medullärer Schicht (Abb. 3).

Gelegentlich konnten auch Sox-2 positiv gefärbte Zellgruppen, Zellnester genannt, detektiert werden ( Abb. 3B) (Vgl. Götte et al. Fertil Steril 2011).





**Abbildung 3:** Repräsentative immunhistochemische Färbemuster von Sox-2 im Lymphknoten vor dem Hintergrund der Endometriose

**A);D);F)** Sox-2 positive Einzelzellen im Kortex der Lymphknoten

**C)E)** Sox-2 positive Einzelzellen in der Medulla der Lymphknoten

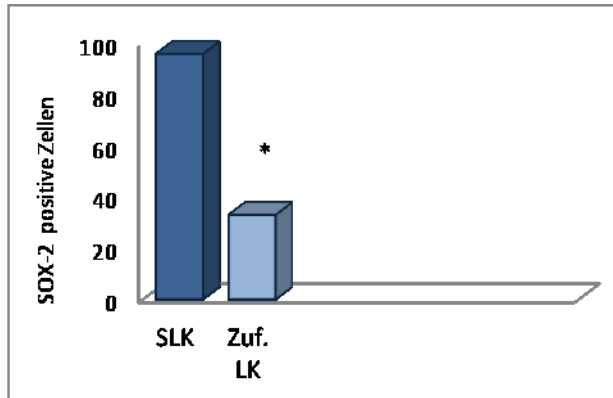
**B)** Gruppe Sox-2 positiver Zellen (Zellnester) im kortikalen Anteil der Lymphknoten (siehe Pfeil).

### **3.1.2. Sox-2-Expression in Sentinel-Lymphknoten und zufällig gewonnenen Lymphknoten**

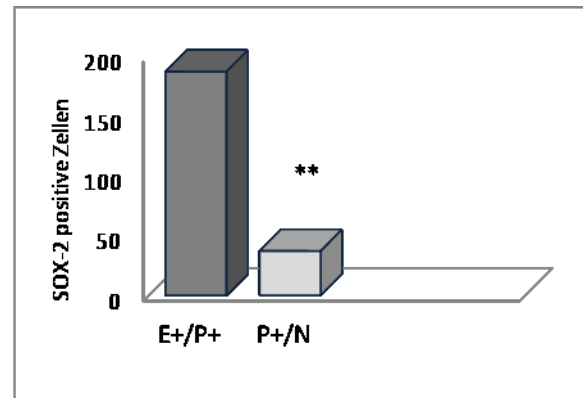
Die Anzahl der Sox-2 positiven Zellen in den Sentinel-Lymphknoten (n=19) war knapp dreifach höher als in den zufälligen Lymphknoten ( n=19) ( Abb. 4A).

Eine signifikant fünffach erhöhte Sox-2 Expression zeigte die für Östrogen und Progesteron

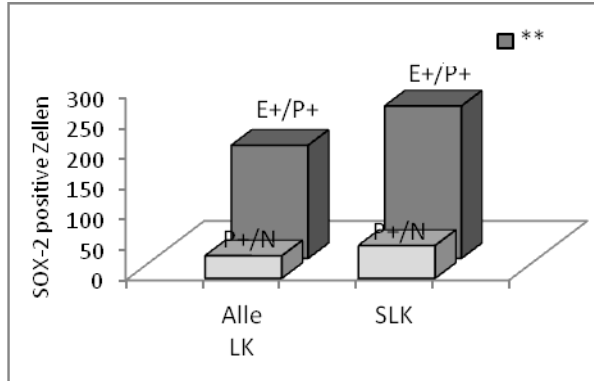
( E+/P+) positive Patientengruppe ( n=12) im Vergleich zur hormonrezeptornegativen (N) oder alleine für Progesteronrezeptor positiven (P+) Gruppe (n=26) (Abb. 4B). Eine identische hormonbezogene Sox-2 Expression konnte auch separat für die Gruppe von Sentinel-Lymphknoten nachgewiesen werden. Eine signifikant erhöhte, hormonrezeptorassoziierte Sox-2 Expression im gemeinsamen Kollektiv (alle LK) sowie isoliert in den Sentinel-Lymphknoten stellt die Abb. 4C dar.



A



B



C

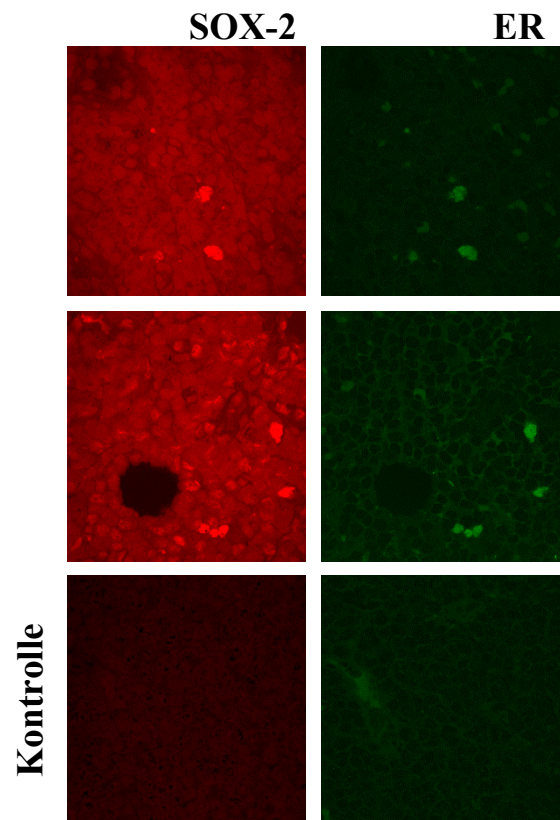
**Abbildung 4:** Verteilung SOX-2 positiver Zellen in Lymphknoten

- A) Signifikant erhöhter Anzahl SOX-2 exprimierender Zellen in der Sentinel-Lymphknoten vs. zufällig gewonnenen Lymphknoten ( $*p < 0,05$ ).
- B) Signifikant erhöhter Gesamtzahl der SOX-2 positiven Zellen in für Estrogen und Progesteron positiven Lymphknoten im Vergleich zur hormonnegativen oder alleine für Progesteron positiven Lymphknoten ( $**p < 0,01$ ).
- C) Signifikant erhöhte SOX-2 Expression in für Estrogen und Progesteron positiven Lymphknoten sowohl im gesamten Kollektiv (B) als auch in der Gruppe von Sentinel-Lymphknoten ( $**p < 0,01$ ).

### 3.1.3 Sox-2 kolokalisiert mit Östrogenrezeptoren in den Lymphknoten

Zur Untersuchung einer möglichen Koexpression von Sox-2 und dem Östrogenrezeptor wurde eine Doppelimmunfluoresz an Lymphknotenschnitten durchgeführt und via konfokalem Mikroskop untersucht.

Sox-2 zeigte eine ausgeprägte Kolokalisation mit dem Östrogenrezeptor, wobei die Östrogenrezeptor Expression nicht immer auf die Sox-2 exprimierende Zellen beschränkt war ( Abb. 5).



**Abbildung 5:** Kolokalisation von Sox-2 und ER in den Lymphknoten

Oberes und mittleres Teilbild zeigen eine Kolokalisation von Sox-2 und Östrogenrezeptoren (ER). Das untere Teilbild zeigt eine negative Kontrolle.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Studie zu Sox-2**

Als ein möglicher pathogenetischer Weg der Endometriose ist die lymphovaskuläre Metastasierung beschrieben worden, laut dessen das Endometriumsgewebe über die Lymphbahnen an die ektopen Orte gelangt und dort Endometrioseherde etablieren könnte. Die Endometriose-artigen Zellen und Endometrioseläsionen in Lymphknoten konnten durch die Arbeitsgruppe von Dr. PD. Mechsner und anderen nachgewiesen werden (Mechsner et al., 2008; Abrao et al., 2006). Unsere eigene Arbeitsgruppe hat zeigen können, dass in Endometrioseherden im Vergleich zum sekretorischen Endometrium gesunder Probandinnen vermehrte Zellen vorkommen, die den Transkriptionfaktor und Stammzellmarker Sox-2 exprimieren (Götte et al., 2011).

Die in unserer Studie auffällig erhöhte Sox-2 Expression in Sentinel-Lymphknoten im Vergleich zur Patientinnengruppe mit zufällig gewonnenen Lymphknoten unterstützt sowohl die Hypothese der lymphatischen Dissemination als auch das Stammzellkonzept der Endometriose.

Die endometrialen Stamm- und Progenitorzellen gewährleisten die zyklische Regeneration des Endometriums und ermöglichen so den Aufbau des Endometriums (Gargett et al., 2006). Diese Zellen sind möglicherweise ebenfalls für den raschen Aufbau des Endometriums während der Schwangerschaft verantwortlich (Chan et al., 2004). Andererseits könnten diese auf Grund ihres hohen proliferativen Potentials und hohen Differenzierungspotentials die Entstehung und die Progression der Endometriose begünstigen.

Verschiedene Studien zeigen, dass Frauen mit Endometriose mehr Zelltrümmer des basalen Endometriums in ihrem Menstruationsblut aufweisen als die Gesunde (Leyendecker et al., 2002). Darüber hinaus werden während der retrograden Menstruation bei Endometriosepatientinnen vermutlich eine vermehrte Anzahl der endometrialen Fragmente basaler Abstammung in die Bauchhöhle geschleppt. Die Wichtigkeit der basalen Fragmente für die Endometrioseentstehung steht in Beziehung zu einer erhöhten Zahl von Progenitor- bzw. Stammzellen in dieser Region (Gargett & Guo et al., 2010).

Als eine andere potentielle Quelle für die endometrialen Zellen dient das Knochenmark. Eine regelmäßige Migration der Stammzellen vom Knochenmark sollte wahrscheinlich als physiologischer Prozess betrachtet werden und als Nachweis für die Transdifferenzierung der Stammzellen fungieren (Taylor et al., 2004). Die vom Knochenmark stammenden Stammzellen könnten vielleicht anhand einer Verteilung über das lymphatische System zur Entstehung der extragenitalen Endometriose beitragen.

Die in den 1920er Jahren zum ersten Mal beschriebene Theorie der lymphatischen bzw. hämatogenen Metastasierung der Endometriose ist in der Lage, das Phänomen der extragenitalen Endometriose zu erklären (Sampson JA., et al 1927). Die histologisch nachgewiesene Endometriose außerhalb der Bauchhöhle, so z.B. im Gehirn, in den Knochen und Lungen, sowie das Auftreten der Erkrankung bei Patientinnen mit extragenitaler Endometriose nach der Hysterektomie und Adnexektomie beidseits (Veerawamy et al., 2010) weisen darauf hin, dass die Endometriose als eine komplexe Erkrankung, die möglicherweise das lymphatische und hämatogene System als einen Weg der Ausbreitung nutzt, betrachtet werden sollte.

In unserer Studie konnten wir eine signifikant erhöhte Anzahl von Zellen, die den Stammzell-Transkriptionsfaktor Sox-2 exprimieren, in Sentinel-Lymphknoten von Patientinnen mit tief infiltrierender Endometriose nachweisen. Die Sox-2 Expression zeigte sich in Sentinel-Lymphknoten verglichen mit zufällig gewonnenen Lymphknoten dreifach erhöht. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die lymphatische Ableitung in die lokal drainierenden Lymphknoten zusammen mit den pluripotenten Stammzellen in die Pathophysiologie der Endometriose involviert sind. Adulte Stamm- und Progenitorzellen können aufgrund ihres Differenzierungspotenzials und hohen Lebenserwartung als potenzielle Quelle für die weitere Besiedlung dienen oder Endometrioseherde in den Lymphknoten selbst bilden. Außerdem unterstützt die erhöhte Anzahl Sox-2 positiver Zellen in Sentinel-Lymphknoten die Hypothese des Stammzellursprungs der Endometriose.

Viele weitere Studien weisen auf die Beteiligung der Lymphknoten in Patienten mit Endometriose hin. Die endometrialen Läsionen sind in ca. 25 % der Fälle mit den typischen Strukturen mit drüsenepithelialen Zellen und stromalen Zellen präsentiert worden. Obwohl die Endometriose in den Lymphknoten nicht so häufig vorkommt, bzw. nicht so häufig diagnostiziert wird, könnten die endometrialen Zellen, die sich in den LK befinden ein Auslöser

von Rezidivfällen sein. Die Entfernung der Lymphknoten könnte in diesem Fall zur Verringerung der Rezidivfällen führen. Außerdem die Evaluation der regionalen lymphatischen Verbreitung der Endometriose könnte für Effizienz der adjuvanten hormonellen Therapie prognostische Daten liefern (Gong et al., 2011).

Die Unversehrtheit der regionalen Lymphknoten schließt die Beteiligung des lymphatischen Systems in der allgemeinen Pathogenese von Endometriose nicht aus. Die lymphatischen Gefäße können als Transportwege für endometriale und stromale Zellen fungieren. Laut Noel et al wurde in 4 von 11 Patientinnen mit der Lymphknotenbeteiligung und in 2 von 15 ohne LK-Beteiligung lymphovasculäre Invasion festgestellt (Noel et al., 2008)

Unter Berücksichtigung der oben genannten Umstände könnte man vermuten, dass die Endometriosepatientinnen von der Entfernung der regionalen Lymphknoten profitieren würden. Den Patientinnen mit befallenen Lymphknoten würde man dennoch eine adjuvante hormonelle Therapie anbieten (Gong et al., 2010, EM1).

ER-PR positive Zellen in den Beckenlymphknoten wurden in 83% der Frauen mit der tief infiltrierenden Endometriose und in 80% mit ovarieller beziehungsweise peritonealer Endometriose gefunden. Diese Zellen waren sowohl für den CD-10 Marker als auch für CK Marker negativ. Die Ausbreitung der ER-PR positiven Zellen von den primären endometrialen Herden ins lymphatische System wird als sehr wahrscheinlich betrachtet (Mechsner et al., 2008, Clemens et al., 2011).

Eine via Doppelimmunfluoreszenz erstmalig beschriebene Kollokalisierung von Östrogenrezeptoren und Sox-2 Stammzellmarker in Lymphknoten bringt Nachweise für einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Stammzellkonzept der Endometriose und ER/PR positiv „endometriotic-like cells“. Laut Mechsner et al, waren disseminierte ER/PR positive Zellen meistens im Parenchym der Lymphknoten lokalisiert, was mit der häufigsten Lokalisation der Sox-2 positiven Zellen in unserer Studie übereinstimmt. Die biologische Rolle der Östrogen- und Progesteronrezeptor positiven Zellen in Lymphknoten lässt noch genug Raum für Diskussionen. Der positive Hormonrezeptorstatus der in den Lymphknoten befindlichen Zellen bildet einen deutlichen Hinweis auf einen nicht-leukozytären Ursprung und macht eine Abstammung vom Endometrium wahrscheinlich. Die Ausbreitung von ER/PR positiven Zellen

anhand des lymphatischen Systems von primären Herden in die regionalen LK, sowie die potenzielle Rolle dieser Zellgruppen im Rezidivfall oder im chronischem Verlauf der Endometriose könnte einen wichtigen Pathogenesemechanismus darstellen (Mechsner et al., 2010).

Proliferative Prozesse im Endometrium werden sowohl von Östrogen als auch durch den Pluripotenzmarker Sox-2 kontrolliert. Die Kolokalisation beider Marker in LK-Zellen könnte auf eine Östrogenabhängigkeit beim Überleben dieser Zellen an der ektopen Lokalisation hindeuten. Laut unserer Daten war die Anzahl von Sox-2 positiven Zellen in der für ER/PR positiven Lymphknotengruppe signifikant erhöht. Die signifikant erhöhte hormonrezeptor-assoziierte Sox-2 Expression galt für die gesamte Patientengruppe, sowie für die gesonderte Sentinel-Lymphknoten-Gruppe.

Zhang et al, behaupten, dass das Östrogen als Katalysator für Differenzierung von Stammzellen des Knochenmarks in Epithelzellen fungiert und in gleicher Weise endometriale Stromazellen stimuliert. Die Differenzierung von Stammzellen sei abhängig von  $17\beta$ -E<sub>2</sub> und brauche eine gewisse lokale Hormonkonzentration für die epitheliale Differenzierung (Zhang et al., 2012). Diese Beobachtung stimmt gut mit den Ergebnissen unserer Studie überein.

Laut der vorhergehenden Studien mit unserem Patientenkollektiv konnten Endometriose-Läsionen in Lymphknoten selbst identifiziert werden. In unserer Untersuchung wurde jedoch kein Zusammenhang der Sox-2 Expression in LK und dem Endometriosebefall der LK festgestellt. Diese Tatsache könnte vielleicht bedeuten, dass die ER/PR positive LK mit vermehrter Sox-2 Expression eine Vorstufe von lokalen Endometriose in LK darstellen, während bereits differenzierte stromale und epitheliale Zellen Sox-2 herabregulieren. Die Herabregulation des Stammzellmarkers Oct-4 auf Grund der aktivierten endometrialen Stromazellen wurde schon postuliert (Zhang et al., 2012), was indirekte Hinweise für oben genannte Hypothese liefert.

Unter der aktuellen Voraussetzung, dass die Endometriose als nicht bösartiger Prozess bezeichnet wird, gibt es selbstverständlich keinen Grund für die regionale Lymphknotenentfernung. Unter Berücksichtigung der oben dargelegten Ergebnisse schließt unsere Studie dennoch nicht aus, dass die Patientinnen mit Endometriose von solch einer Maßnahme profitieren könnten.



Das Hauptziel der chirurgischen Therapie ist die Entfernung aller von Endometriose befallenen Regionen. Aus dieser Sicht wäre die Vernachlässigung der möglichen assoziierten lymphatischen Involvierung eher irrational (Abrao M., et al., 2006).

Zukünftige Studien müssen darüber hinaus die Rolle von Stammzellen in der Pathogenese von Endometriose weiter etablieren. Disseminierte ER/PR positive Zellen und endometriale Herde in Lymphknoten sollten in einem größeren Patientenkollektiv unter Hinzunahme weiterer Marker für endometriale Stammzellen histopathologisch untersucht werden, um ihre Rolle für den chronischen Verlauf der Krankheit und die Rezidivrate zu enthüllen.

Ein ähnliche Studie mit Involvierung der Uterus drainierenden Lymphknoten von gesunden Probandinnen während der verschiedenen Zyklusphasen und Endometriose Patientinnen wäre sinnvoll, denn man könnte die zellulären Prozesse in Lymphknoten und ihre Rolle für die Endometriose einschließlich der extragenitalen Endometriose besser verstehen, jedoch muss hierzu natürlich die ethische Indikation für die Entnahme solcher Lymphknoten bestehen.

## **4.2 Kritische Beurteilung des Studienaufbaus**

Die vorliegende Untersuchung konnte erstmal eine Expression des diskutierten Stamzellmarkers Sox-2 in Lymphknoten von Endometriose-Patientinnen mittels Immunhistochemie nachweisen. Die Kolo-kalisation von Sox-2 Stamzellmarker mit Östrogenrezeptoren wurde ebenso erstmals

durchgeführt, was zusätzliche Informationen bzgl. hormoneller Wirkung auf die Stammzellendifferenzierung liefert.

Zu diskutieren ist die eingeschränkte Anzahl von Patientinnen in den beiden Untersuchungsgruppen. Verteilt auf 2 Gruppen wurden insgesamt 40 Patientinnen untersucht. Bei jeder Gewebeprobe wurden 60 Gesichtsfelder analysiert. Ein Auszählen der gesamten Schnittfläche hätte die Genauigkeit der Studie ggf. noch erhöhen können, jedoch konnte mit der gewählten Fläche eine sicher bestimmnbare Zahl positiver Zellen mit vertretbarem Aufwand analysiert werden.

Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse könnten durch weitere doppelimmunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen noch weiter abgesichert werden (z.B. gegen epitheliale und stomale Antigene von Endometriumszellen). Desweiteren erscheint eine in vitro-Untersuchung der Östrogenabhängigkeit endometrialer Stammzellen lohnenswert.

Basierend auf der Tatsache, dass die Lymphknoten ein seltenes Material sind und unter der Berücksichtigung der rechtlichen und ethischen Aspekte der Lymphknotenentfernung wurde auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe von gesunden Probandinnen verzichtet.

## 5. Literaturverzeichnis

Abrao, M.S., Podgaec S., Dias Jr. J.A., Averbach M, Garry R, and Luis Fernando Ferraz S. "Deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum and lymph nodes." *Fertility and Sterility*, 2006: 86;543-547.

Acien, P, and I Velasco. "Endometriosis: A disease that remains enigmatic." *ISRN Obstetrics and Gynecology*, 2013: doi: 10.1155/2013/242149. eCollection 2013.

"American Society for Reproductive Medicine. Revised classification of endometriosis." *Fertil Steril*, 1996: 67;817-821.

Anaf, V, Simon P, Nakadi I, Fayt I, and Buxant F et al. "Relationship between endometriotic foci and nerves in rectovaginal endometriotic nodules." *Hum Reprod*, 2000: 5;817-821.

Armaout-Alkarain, A, Kahn HJ, Narod SA, Sun P, and Marks AN. "Significance of lymph vessel invasion identified by endothelial lymphatic marker D2-40 in node negative breast cancer." *Mod Pthol*, 2007: 20;183-191.

Asante, A, and Taylor RN. "Endometriosis: the role of neuroangiogenesis." *Annu Rev Physiol*, 2011: 73;163-182.

Attia, GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, and Carr BR et al. "Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis." *J Clin. Endocrinol. Metab*, 2000: 85;2897-28902.

Auwers, I Van der, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, and Jackson DG et al. "First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours." *Br J Cancer*, 2006: 12;1611-1625.

Avilion, AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, and Vivian N et al. "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on Sox2 function." *Genes Dev*, 2003: 17;126-140.

Bach, SP, Renehan AG, and Potten CS. "Stem cells: the intestinal stem cells as a paradigm." *Carcinogenesis*, 2000: 21;469-476.

Barbieri, RL, Niloff JM, and Bast RC et al. "Elevated serum concentration of CA-125 in patients with advanced endometriosis." *Fertil Steril*, 1986: 45;630-634.

Barrier, BF, Dick EJ, Butler SD, and Hubbard GB. "Endometriosis involving ileocaecal junction with regional lymph node involvement in the baboon-striking pathological finding identical between the human and the baboon; a case report ." *Hum Reprod*, 2007: 789-801.

Berbic, M, Cecilia HM, Black K, Markham R, and Russel P et al. "A novel pilot study of endometrial stromal cells and immune cell populations in sentinel uterine-draining lymph nodes during the menstrual cycle and in endometriosis." *Reprod Sci*, 2013: 00;1-10.

Bongso, A, and Richards M. "History and perspective of stem cell research." *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, 2004: 18;827-842.

Buchweitz, O, Staebler A, Joke T, and Kiesel L. "Detection of peritoneal endometriotic lesions by autofluorescence laparoscopy." *Obstetrics and Gynecology*, 2006: 195;949-954.

Bulmer, JN, Salamonsen LA, and Riston A. "Leukocytes and resident blood cells in endometrium." *N.Y. Acad Sci*, 1991: 622;57-68.

Burke, TW, Levenback C, Tornos C, and Morris MWharton JT et al. "Intraabdominal lymphatic mapping to direct selective pelvic and paraaortic lymphadenectomy in women with high risk endometrial cancer." *Gynecol Oncol*, 1996: 169-173.

Cervello, I, Gil Sanchis C, Mas A, and et al. "Bone marrow-derived cells from male donors do not contribute to the endometrial side population of the recipient." *PLoS ONE*, 2012: 7;e30260.

Chan, RW, Schwab KE, and Gargett CE. "Clonogenicity of human endometrium epithelial and stromal cells." *Biol Reprod*, 2004: 70;1738-1750.

Charman, WN, and Stella VJ. *Lymphatic transport of drugs*. Boca Raton FL: CRC Press, 1992.

Chatterjee, S, Dey S, Chowdhury RG, and Ganguly DD. "Pregnancy outcome in pre-operative danazol treatment followed by laparoscopic correction in infertility associated with endometriosis." *Journal Indian Med. Assoc.*, 2012: 110;694-699.

Chew, JL, Loh YH, and Wensheng Z et al. "Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells." *Mol Cell Biol*, 2005: 25;6031-6046.

Cho, NH, Park YK, Kim YT, Yang H, and Kim SK. "Lifetime expression of stem cells markers in the uterine endometrium." *Fertil Steril*, 2004: 81;403-407.

Clemens, B, Tempfer MD, Wenzl R, Reinhard H, Christoph G, and et al. "Lymphatic spread of endometriosis to pelvic sentinel lymph nodes: a prospective clinical study." *Fertility and Sterility*, 2011: 96;692-696.

Du, H, and Taylor HS. "Stem cells and female reproduction." *Reprod. Sci.*, 2009: 16;126-139.

Fauconnier, A, and Chapron C. "Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications." *Hum Reprod. Update*, 2005: 11;595-606.

Ferrero, S, Gillott DJ, Venturini PL, and Remorgida V. "Use of aromatase inhibitors to treat endometriosis-related pain symptoms: a systematic review." *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2011: 9:89.

Figueira, PGM, Abrao MS, Krikun G, and Taylor H. "Stem cells in endometrium and their role in the pathogenesis of endometriosis." *New York Academy of Sciences*, 2011: 1221;10-17.

Finn, CA. "Implantation, menstruation and inflammation." *Biol Rev Camb Philos Soc.*, 1986: 313-328.

Fong, H, Hohenstein KA, and Donovan PJ. "Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells." *Stem Cells*, 2008: 26;1931-1938.

Gaetje, R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R, and Starzinski-Powitz A. "Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin." *Pathology*, 1997: 150;461-467.

Gargett, BE, and Chan RW. "Endometrial stem/progenitor cells and proliferative disorders of the endometrium." *Minerva Ginecologica*, 2006: 58;511-526.

Gargett, CA. "Uterine stem cells: what is the evidence?" *Hum Reprod*, 2007: 13;87-101.

Gargett, CE. "Stem cells in gynaecology." *Aust. N.Z.J. Obstet. Gynaecol*, 2004: 44;380-386.

Gargett, CE, and Guo SW. "Stem cells and clonality in endometriosis. In: Garcia-Velasco J, Rizk B (eds). Endometriosis." *Current Management and Future Trends*, 2010: 308-317.

Gargett, CE, and Masuda H. "Adult stem cells in the endometrium." *Mol. Hum. Reprod.*, 2010: 16;818-834.

Giudice, IC. "Genomics' role in understanding the pathogenesis of endometriosis." *Semin. Reprod. Med.*, 2003: 21;119-124.

Gong, Y, and Clemens B. "Regional lymphatic spread in women with pelvic endometriosis." *Medical Hypotheses*, 2011: 76;560-563.

Götte, M, Wolf M, and Staebler A et al. "Increased expression of the adult stem cell marker musashi-1 in endometriosis and endometrial carcinoma." *J. Pathol.*, 2008: 215;317-329.

Götte, M, Wolf M, Staebler A, Buchweiz O, Kiesel L, and Schuering A. "Aberrant expression of the pluripotency marker SOX-2 in endometriosis." *Fertility and Sterility*, 2011: 95;338-341.

Götte, M, Wolf M, Staebler A, Buchweitz O, Kelsch R, and Schüring AN. "Increased expression of the adult stem cell marker Musashi-1 in endometriosis and endometrial carcinoma." *J Pathol*, 2008: 215;317-329.

Götte, M, Wolf M, Staebler A, Buchweitz O, Kiesel L, and Schüring AN. "Aberrant expression of the pluripotency marker SOX-2 in endometriosis." *Fertil Steril*, 2011: 95;338-341.

Grauenwald, P. "Origin of endometriosis from the mesenchyme of the coelomic walls." *Obstet. Gynecol.*, 1942: 44;474.

Halban, J. "Hysteroadenosis metastica ( die lymphogene genes dersog. adenofibromatosis hetertopica)." *Wien Klin Wochenschr*, 1924: 37;1205.

Halban, J. "Metastatic hysteroadenosis lymphatic origin of so-called heterotropic adenofibromatosis." *Arch Gynäk*, 1925: 125;475-479.

Halme J, et al. "Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis." *Obstet. Gynecol.*, 1984: 64;154.

Hey Cunningham, AJ, Fazleabas AT, Braundmeier AG, Markham R, and et al. "Endometrial stromal cells and immune cell populations within lymph nodes in a nonhuman primate model of endometriosis." *Reprod Sci*, 2011: 18;747-754.

Insabato, L, and Pettinato G. "Endometriosis of the bowel with lymph node involvement. A report oh three cases and review of the literature." *Pathol Res Pract*, 1996: 192;957-962.

Isaac, E, Sasson, Hugh S, and Taylor. "Stem cells and the Pathogenesis of Endometriosis." *New York Academy of Sciences*, 2008: 1127;106-115.

Jani, R, Jensen, Charles C, and Coddington. "Evolving Spectrum:The Pathogenesis of Endometriosis." *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 2010: 53;379-388.

Jansen, RP, and P Russel. "Nonpigmented endometriosis: clinical, laparoscopic, and pathologic definition." *Osbstetrics and Gynecology*, 1986: 155(6);1154-1159.

Jones, RK, Searle R, and Bulmer JN. "Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis." *Hum. Reprod.*, 1998: 13;3496-502.

Jubanyik, KJ, and F Comite. "Extrapelvic endometriosis." *Obstet. Gynecol. Clin North*, 1997: 24;411-440.

Kamachi, Y, Cheah KS, and Kondoh H. "Mechanism of regulatory target selection by the Sox high-mobility-group domain proteins as revealed by comparison of Sox1/2/3 and Sox9." *Molecular and Cellular Biology*, 1999: 19;107-120.

Kao, MS An-Pei, Kai-Hung W, Chia-Cheng C, and Jau-Nan L et al. "Comparative study of human eutopic and ectopic endometrial mesenchymal stem cells and the development of an in vivo endometriotic invasion model." *Fertility and Sterility*, 2011: 95;1308-1315.

Kayama, CM, Overbergh L, Debrock S, Valckx D, and Vander Perre S et al. "Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis." *Fertil Steril*, 2006: 85;1667-1675.

Keichel, S, Barcena de Allerano ML, Reichelt U, Riedlinger WFJ, and Schneider A et al. "Lymphangiogenesis in deep infiltrating endometriosis." *Human Reproduction*, 2011: 26;2713-2720.

Kitawaki, J, Kado N, Ishihara H, Koshiba H, and Kitaoka Y et al. "Endometriosis: Pathophysiology as an Östrogen dependent disease." *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2002: 83;149-155.

Laschke, MW, Giebels C, and Menger MD. "Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle." *Hum Reprod Update*, 2011: 17;628-636.

Leyendecker, G, Wildt L, and Mall G. "The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair." *Arch Gynecol Obstet*, 2009: 280;529-538.

Li, L, and Xie T. "Stem cell niche: structure and function." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2005: 21;605-631.

Lui, DTY, and Hitchcock A. "Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology." *Obstet. Gynecol.*, 1986: 93;862.

Lüllmann-Rauch, R. *Taschenbuch Histologie*. 2003.

Maruyama, T, Masuda H, and Ono M et al. "Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology." *Reproduction*, 2010: 140;11-22.

Matthai, C, Horvat R, and Noe M et al. "Expression in human endometrium." *Mol. Hum. Reprod.*, 2006: 12;7-10.



McLaren, J, Prentice A, Charnock-Jones DS, and Smith SK. "Vascular endothelial growth factor ( VEGF) concentration are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis." *Hum Reprod*, 1996: 11;220-223.

Mechsner, S, Weichbrodt M, and Wolfram FJ Riedlinger. "Immunohistochemical evaluation of endometriotic lesions and disseminated endometriosis-like cells in incidental lymph nodes of patients with endometriosis." *Fertility and Sterility*, 2010: 94;457-463.

Mechsner, S, Weichbrodt M, Riedlinger WFJ, Bartley J, and Kaufmann AM et. "Östrogen and Progesteron receptor positive endometriotic lesions and disseminated cells in pelvic sentinel lymph nodes of patients with deep infiltrating rectovaginal endometriosis: a pilot study." *Human Reproduction and Embryology*, 2008: 23;2202-2209.

Meresman, GF, Vighi S, and Buquet RA et al. "Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis." *Fertil Steril*, 2000: 74;760-766.

Mezey, E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, and Crain B. "Transplanted bone marrow generates new neurons in human brain." *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003: 100;1364-1369.

Moen, MH, and Halvorsen TB. "Histologic confirmation of endometriosis in different peritoneal lesions." *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1992: 71;337-342.

Moore, JG, Binstock MA, and Growdon WA. "The clinical implications of retroperitoneal endometriosis." *Obstetrics and Gynecology*, 1988: 158;1291-1298.

Moore, KA, and Lemischka IR. "Stem cells and their niches ." *Science*, 2006: 311;1880-1885.

"National Center of biotechnology information." *Entrez gene: Sox2 SRY( sex determining region Y)-box*, 2008.

Nasu K et al. Involvement of resistance to apoptosis in the pathogenesis of endometriosis. *Histol Histopathol* (2009) 24: 1181-1192

Nisolle, M, Paindaveine B, and Bourdon A et al. "Histologic study of peritoneal endometriosis in infertile women." *Fertil Steril (Fertil Steril)*, 1990: 53;984-988.

Noble, LS, Simpdon ER, Johns A, and Bulun SE. "Aromatase expression in endometriosis." *J Clin Endocrinol Metab*, 1996: 81;174-179.

Noel, JC, Chapron C, Fayt I, and Vincent A. "Lymph node involvement and lymphovascular invasion in deep infiltrating rectosigmoid endometriosis." *Fertility and Sterility*, 2008: 89;1069-1072.

Novac, L, and N Rica. "Endometrioze genitala." *Rev Obst. Gynecol.*, 1995: XLIII(4);179-187.

O'Boyle, JD, Coleman RL, Bernstein SG, Lifshitz S, and Muller CY et al. "Intraoperative lymphatic mapping in cervix cancer patients undergoing radical hysterectomy: a pilot study ." *Gynecol Oncol*, 2000: 79;238-243.

Olive, DL, and Schwartz LB. "Endometriosis." *N. Engl. J. Med.*, 1993: 328;1759-1769.

Oliveira, FR, Dela Cruz C, Del Puerto H, Vilamil QT, Reis FM, and Camargos AF. "Stem cells: are they the answer to the puzzling etiology of endometriosis?" *Histol Histopathol*, 2012: 27;23-29.

Pasalgea, M, Mirea C, Vilcea ID, Vasile I, and Plesea IE et al. "Parietal abdominal endometriosis following Cesarean section." *Romanian Journal of Morphology & Embryology*, 2011: 52 ( 1 Suppl);503-508.

Patel, AN, Park E, and Kuzman M et al. "Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation." *Cell Transplant*, 2008: 17;303-311.

Petraglia, F, Masacchio C, Luisi S, and De Leo V. "Hormone-dependent gynaecological disorders: a pathophysiological perspective for appropriate treatment." *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2008: 22;235-249.

Pittaway, DE, Fajez JA, and Douglas JW. "Serum CA-125 in the evaluation of benign adnexal cysts." *Obstetrics and Gynecology*, 1987: 157;1426-1428.

Poyatos, LR, Perez PA, and Bravo BF et al. "Rectosigmoid endometriosis with lymph node involvement." *Gastroenterol Hepatol*, 1945: 26;23-25.

Quere, I. "Lymphatic system: anatomy, histology and physiology." *Presse Med*, 2010: 39;1269-1278.

Recklinghausen, F Von. "Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube: their origin as remnants of the wolffian body." *Wien Klin Wochenschr*, 1896: 8;530.

Richard, O, Burney, Linda C, and Giudice. "Pathogenesis und pathophysiology of endometriosis." *Fertility and Sterility*, 2012: 98;511-519.

Rosenfeld, DL, and Lecher BD. "Endometriosis in the patient with Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome." *Obstetrics and Gynecology*, 1981: 139:105.

Salamanca, A, and E Beltran. "Subendometrial contractility in menstrual phase visualized by transvaginal sonography in patients with endometriosis." *Fertility Sterility*, 1995: 64;195.

Salamonsen, LA, and Lathbury LJ. "Endometrial leukocytes and menstruation." *Hum Reprod Update*, 2000: 6;16-27.

Salamonsen, LA, and Woolley DE. "Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells." *Reprod Immunol*, 1999: 44;1-27.

Salamonsen, LA, Zhang J, and Brasted M. "Leukocyte networks and human endometrial remodelling." *Reprod Immunol*, 2002: 57;95-108.

Sampson, JA, Elias S, Malinak LR, and Buttram VC. "Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity." *Am J. Obstet. Gynecol.*, 1927: 3;93-110.43.

Sasson, IE, and HS Taylor. "Stem cells and the pathogenesis of endometriosis." *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1127; 106-115.

Sawicki, G, Salas E, and Murat J et al. "Release of galatinase A during plattelet activation mediated aggregation." *Nature*, 1997: 386;616-619.

Schindler, AE. *Epidemiologie, pathogenese und diagnostik der Endometriose*. Journal für Fertilität und Reproduktion, 2007.

—. "Operative und medikamentöse Therapie der Endometriose/Adenomyose." *Journal für Gynäkologische Endokrinologie*, 2008: 2(2);18-26.

Schrodt, GR, Alcorn MO, and Ibanez J. "Endometriosis of the male urinary system: a case report." *Journal Urology*, 1980: 124;722-723.

Schünke, M, Schulte E, and Schumacher U et al. *Thieme atlas of anatomy. Overview of Lymphatic Trunks and Lymph Node Groups*. 2006.

Schüring, AN, Braun J, Wüllner S, Kiesel L, and Götte M. "mRNA-expression of ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and PR in clonal stem cell cultures obtained from human endometrial biopsies." *ScientificWorldJournal*, 2011: 11:1762-1769.

Schüring, AN, Schulte N, Kelsch R, Röpke A, Kiesel L, and Götte M. "Charakterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics." *Fertil Steril*, 2011: 95;423-426.

Schwab, KE, Chan RW, and Gargett CE. "Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle." *Fertil Steril*, 2005: 84;1124-1130.

Schweppe, K. "Behandlung der endometriose mit GnRH-analoga." *Konsensus -richtlinien vom 8. GnRH-Kongress Salzburg. Gynecol. Tribune (6)*, 2005.

Seracchioli, R, Mabrouk M, Manuzzi C, Vicenzi C, and Vicenzi et al. "Post-operative use of oral contraceptive pills for prevention of anatomical relapse or symptoms recurrence after conservative surgery for endometriosis." *Human Reproduction*, 2009: 24;2729-2735.

Shostak, S. "Redefining stem cells." *Bioessays*, 2006: 28;301-308.

Simpson, JL, Elias S, Malinak LR, and Buttram VC JR. "Heritable aspects of endometriosis .Genetic studies." *Obstetrics and Gynecology*, 1980: 137;327-331.

Spencer, TE, Hayashi K, Hu J, and Carpenter KD. "Comparative Developmental biology of the mammalian uterus." *Curr. Top. Dev. Biol.*, 2005: 68;85-122.

Starzinski-Powitz, A, Zeitvogel A, Schreiner A, and Baumann R. "Endometriose-eine Stammzellerkrankung?" *Zentralbl Gynacol*, 2003: 125;235-238.

Stauber, M, and T Weyerstahl. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. In Georg Thieme Verlag, 20007.

Swartz, MA, Hubbel JA, and Reddy ST. "Lymphatic drainage function and its immunological implications from dendritic cell homing to lymph nodes." *Semin. Immunol*, 2008: 20;147-156.

Swatz, MA. "The physiology of the lymphatic system." *Adv. Drug Deliv.*, 2001: 50;3-20.

Taylor, HS. "Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients." *JAMA*, 2004: 292;81-85.

Taylor, RN, Lebovic DI, and Mueller MD. "Angiogenic factors in endometriosis." *N.Y. Acad Sci*, 2002: 9;922-934.

Taylor, RN, Lundeen SG, and Giudice LC. "Emerging role of genomics in endometriosis research." *Fertil Steril*, 2002: 78;694-698.

Teixeira, J, Rueda BR, and Pru JK. *Uterine stem cells. StemBook Web site*. 2008. [www.stembook.org/node/501](http://www.stembook.org/node/501).

Thomakos, N, Rodolakis A, Vlachos G, and Papaspirou I et al. "A rare case of rectovaginal endometriosis with lymph node involvement." *Gynecol Obstet Invest*, 2006: 62;45-47.

Thomas, EJ, and Campbell G. "Evidence that endometriosis behaves in a malignant manner." *Gynecol Obstet Invest*, 2000: 50;2-10.

Throunson, A. "The production and directed differentiation of human embryonic stem cells." *Endocr. Rev.*, 2006: 208-219.

Trbojevic, J, Nestic D, Lauseviz Z, Brajuskovic G, Miljana O, and Bilijana S. "Histological Characteristics of healthy animal peritoneum." *Acta Vet ( Beogr.)*, 2006: 56;405-412.

Ueki, M. "Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus." *Obstetrics and Gynecology*, 1991: 165;201-209.

Veeraswamy, A, Lewis M, Miphil AM, and Kotikela S et al. "Extragenital Endometriosis." *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 2010: 53;449-466.

Wilson, M, and Koopman P. "Matching SOX: Partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators." *Current Opinion in Genetics & Development*, 2002: 12;441-446.

Wingfield, M, Masperson A, Healy DL, and Rogers PA. "Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis." *Fertil Steril*, 1995: 64;340-346.

Wolff, FF, Wolff AB, Hongling D, and Taylor HS. "Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrium by in vitro chondrogenesis." *Reprod. Sci.*, 2007: 14;524-533.

Zeitoun, K, Takayama K, Sasono H, Suzuki T, and Moghrabi N et al. "Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolise 17beta-estradiol." *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 1998: 83;4474-4480.

Zhang, Wen-Bi, Cheng MJ, Huang YT, and Jiang W et al. "A study in vitro on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into endometrial epithelial cells in mice." *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 2011: 160;185-190.

## **6. Lebenslauf**

## **7. Danksagung**

Herrn Professor Dr. med. Ludwig Kiesel danke ich für die Möglichkeit an der Universitätsfrauenklinik zu promovieren und für seine fortdauernde Unterstützung.

Der besonderer Dank gilt dem Laborteam des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Münster. Für die hervorragende Betreuung und für die Verbesserungsvorschläge möchte ich Herrn Prof. Martin Götte danken. Frau Birgit Pers danke ich für ihre technische Assistenz.

Frau PD Dr. Mechsner und Herrn Giuliano Borrelli möchte ich ausdrücklich für die Hilfe bei der Datenverarbeitung und bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung danken.

Für die tatkräftige Unterstützung bei der statistischen Auswertung möchte ich PD Dr. A. Schüring danken.

Der unfassendste und herzlichste Dank gilt meinem Freund und meiner Familie für den steten Beistand und die ständige Ermutigung .