

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor: Prof. Dr. med. W. Jonat)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIFFERENTIELLE EXPRESSIONSMUSTER
VON MMP-2, MMP-9 UND PCNA IN VERSCHIEDENEN
ENDOMETRIOSESTADIEN
UND ENDOMETRIUMKARZINOMEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

JULIA KRÄMER

aus Aachen

Kiel 2010

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Christoph Mundhenke

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Wolfram Klapper

Tag der mündlichen Prüfung: 08.08.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 08.08.2011

gez.: Prof. Dr. med. Alexander Strauss

Inhalt

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
2. EINLEITUNG.....	2
2.1 ENDOMETRIOSE.....	2
2.2 DAS ENDOMETRIUMKARZINOM.....	5
2.3 MATRIXMETALLOPROTEINASEN.....	6
2.4 PCNA.....	8
2.5 IMMUNHISTOCHEMIE	9
2.6 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT.....	10
3. MATERIAL UND METHODEN	12
3.1 PATIENTENKOLLEKTIV	12
3.2 IMMUNHISTOCHEMIE	13
3.3 WAHL DER ANTIKÖRPER UND IHRER KONZENTRATIONEN	15
3.4 AUSWERTUNG DER FÄRBUNG.....	16
3.4.1 MMP-2 UND MMP-9	16
3.4.2 PCNA.....	17
3.5 STATISTIK	18
4. ERGEBNISSE.....	19
4.1 MMP-2.....	19
4.2 MMP-9.....	21
4.3 PCNA.....	24
4.4 DARMENDOMETRIOSE UND PERITONEALENDOMETRIOSE.....	27
4.5 DARMENDOMETRIOSE UND ENDOMETRIUMKARZINOM.....	29
4.6 MAKROSKOPISCHE UND MIKROSKOPISCHE ASPEKTE	30
5. DISKUSSION	33
5.1 MMP-2.....	33
5.2 MMP-9.....	35
5.3 PCNA.....	36
5.4 MAKROSKOPISCHE UND MIKROSKOPISCHE ASPEKTE	38
5.5 IMMUNHISTOCHEMIE	39
6. ZUSAMMENFASSUNG	41
7. LITERATUR	43

8. ANHANG	55
<i>8.1 Pufferlösungen.....</i>	<i>55</i>
<i>8.2 Tabellen</i>	<i>56</i>
9. DANKSAGUNG	65
10. LEBENSLAUF	66

1. Abkürzungsverzeichnis

DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazellulärmatrix
EEC	Endoskopische Endometriose Klassifikation
EGF	Epidermal Growth Factor
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
HRP	Horse Radish Peroxidase
IG	Immunglobulin
IRS	Immunreaktiver Score
k DA	Kilo Dalton
MMP	Matrixmetalloprote(in)ase
NS	Nicht signifikant
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PP	Prozentsatz der positiven Zellen
rAFS	Revidierte Version American Fertilty Society
SI	Staining Intensity = Färbeintensität
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TGF- α	Transforming Growth Factor α
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF- α	Tumornekrosefaktor α

2. Einleitung

2.1 Endometriose

Das ektope Vorkommen (außerhalb des Cavum uteri) von Gewebe ähnlich der Gebärmutter Schleimhaut bezeichnet man als Endometriose (Healy et al 1998). Der Begriff der Endometriose wurde erstmals 1860 von Carl von Rokitansky verwendet.

Je nach Lokalisation unterscheidet man die Endometriosis genitalis interna, betroffen ist das Myometrium, von der Endometriosis genitalis externa, bei der die Organe des kleinen Beckens wie z.B. die Ovarien oder das Peritoneum von Blase oder Douglasraum betroffen sind. Davon abzugrenzen ist die Endometriosis extragenitalis, die sich außerhalb des kleinen Beckens wie z.B. an Lunge, Blase oder Darm manifestiert (Diedrich et al 2000).

Die Endometriose ist die zweithäufigste gutartige gynäkologische Erkrankung der Frau. So entwickeln etwa zehn bis 20 Prozent aller Frauen in ihrer reproduktiven Lebensphase eine Endometriose. Die Endometrioseprävalenz bei fertilen Frauen liegt dementsprechend bei 0,5 – 5% (Donnez et al 2002). In Deutschland treten schätzungsweise 40.000 Neuerkrankungen jährlich auf (AWMF 2010).

Ein sehr häufiges Symptom ist die Dysmenorrhoe. Jedoch abhängig von der Lokalisation kann es zu Dyspareunie, Dysurie, chronischen Unterbauchschmerzen, zyklischer Hämaturie, blutiger Defäkation und Sterilität kommen. Es kann auch, wie in bis zu 50% der Fälle, völlige Beschwerdefreiheit vorliegen.

Die Ätiologie dieser benignen, im reproduktiven Alter auftretenden Erkrankung ist bis heute nicht vollständig geklärt. Eine der häufig genannten Theorien ist die Transplantations- oder Implantationstheorie. Dabei kommt es bei der physiologischen retrograden Menstruation zur Ansiedlung von Endometrium-ähnlichem Gewebe an anderen Stellen (Sampson et al 1927).

Der zweite mögliche Ansatz geht davon aus, dass es sich um eine Metaplasie handelt. Dabei führt die wiederholte Irritation des Zölomepithels durch verschiedene Faktoren zur Transformation der pluripotenten Zölomzelle in endometriales Gewebe (Meyer R. 1919). Auch eine immunologische Theorie, wie auch die Kombination von mehreren der genannten Theorien, werden diskutiert.

Bei der Progredienz der Erkrankung spielt die peritoneale Entzündung und die in neueren Studien nachgewiesenen Zytokine und Entzündungszellen, Makrophagen und Leukozyten, eine bedeutende Rolle (Giudice und Kao 2004; Wu und Ho 2003; Harada et al 2001).

Die Klassifizierung in verschiedene Gruppen bzw. Stadien ist bei der Endometriose mehrfach geschehen. Die beiden heute gebräuchlichen Systeme der Klassifikation sind die revidierte Version der American Fertility Society (rAFS 1997) und die Endoskopische Endometriose Klassifikation von Mettler und Semm (EEC 1983). Beide teilen die Endometriose in vier Stadien ein. Dabei bewertet die rAFS in einem Punkteschema die peritonealen Herde, die Obliteration des rectouterinen Raumes, vorkommende Endometriome und Adhäsionen. Die Punkte werden addiert und in die 4 Stadien umgesetzt. Bei der EEC hingegen bestimmt der gravierendste Einzelbefund das Stadium. Somit liegt in dieser Klassifikation beim Auftreten von extragenitalen Herden immer ein Stadium IV vor.

Makroskopisch sowie mikroskopisch ergibt sich ein buntes Bild der Endometrioseherde. Von hochdifferenzierten Drüsen und Stroma mit Hormonabhängigkeit bis hin zu verschiedenen Differenzierungsgraden ohne wesentlichen zyklischen Einflüssen (s. Tab.1). Betrachtet man die Lokalisation, so muss man zwischen oberflächlichen frei wachsenden peritonealen Herden und tiefen infiltrierenden Herden, die in Muskelschichten von Blase, Darm und Uterus eingewachsen sind (Adenomyose), unterscheiden. Letztere verhalten sich ähnlich wie basales Endometrium, d.h. nur mit geringer sekretorischer Umwandlung und ohne menstruelle Blutung am Zyklusende. Die oberflächliche Endometriose ist meist nur wenige Millimeter groß und reagiert zyklusabhängig ähnlich wie eutopes Endometrium (Steck T. 2004), solange sie noch nicht fibrotisch umgewandelt ist.

Generell muss man aktive von inaktiven endometriotischen Läsionen differenzieren. Histologische Zeichen von Proliferation, d.h. Mitosen, Sekretion und ein hoher Grad von Vaskularisation weisen auf aktive Herde hin. Diese imponieren makroskopisch meist polypös oder vesikulär und mit rötlichem Kolorit. Bei Inaktivität liegen fibrotisch umgewandelte und eher weißlich bzw. blauschwarz pigmentierte Läsionen vor. Sie bestehen aus undifferenziertem abgeflachtem Drüsenepithel mit wenigen Proliferationsmerkmalen.

Weiterhin spielt das Vorkommen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Endometrioseherden eine wichtige Rolle. Unter Östrogeneinfluss kommt es zur

Proliferation, unter Gestageneinfluss tritt das ektopische Gewebe in die Sekretionsphase ein (Bergqvist et al 1993).

Die hormonelle Beeinflussbarkeit spiegelt sich in den heutigen Therapieansätzen wieder. Diese basieren auf mehreren Säulen. Zunächst gibt es einen medikamentös endokrinen Ansatz. Zum Einsatz kommen hier Medikamente wie Danazol, und GnRh-Analoga. Des Weiteren steht auch die meist laparoskopisch durchgeführte Operation zur Verfügung. Selbst bei einer Kombination aus beiden Methoden zu einem Dreistufenkonzept: 1. Diagnose 2. Medikamente 3. Second Look Operation gibt es noch eine relativ hohe Rezidivrate (Donnez et al 2002, Busacca et al 1999, Falcone et al 1996).

Trotz der hohen Inzidenz und der daraus resultierenden volkswirtschaftlichen Bedeutung gibt es nur wenige Gruppen, die sich der Grundlagenforschung zur Endometriose widmen. (Schweppe KW 2003). Denn auch wenn es sich um eine als pathologisch-histologisch benigne eingestufte Erkrankung handelt, leiden 4-12% aller Frauen in der Reproduktionsphase unter dieser Erkrankung und in 20% aller Sterilitätspatientinnen spielt die Endometriose funktionell oder mechanisch eine entscheidende Rolle. Bei infiltrativen Wachstum der Endometriose kann sie sich sogar organübergreifend Ausbreiten und somit zu ausgedehnten operativen Eingriffen führen (Ulrich U. 2009).

Intestinale Endometriose

Bei extragenitalem Endometriosebefall des Verdauungstraktes ist am häufigsten das Rectosigmoid betroffen. Daneben können auch das Septum rectovaginale, das Duodenum, das Coecum oder die Appendix befallen sein. Die Herde infiltrieren meist die Serosa, teilweise auch die Muskularis. Seltener findet man transmurale oder muköse Endometrioseherde. Die Symptomatik kann auch hier sehr unterschiedlich sein. So kann es zu zyklischen Darmblutungen kommen, aber auch uncharakteristische Symptome wie zyklusunabhängige Schmerzen und Defäkationsproblemen bis hinzu stenotischen Veränderungen des Darmes kommen vor (Brucker C. 2004). Insgesamt ist die Behandlung der Endometriose bei immer noch unklarer Ätiologie schwierig und erfolgt häufig erst sehr spät, da es schon bis zur Diagnosestellung im Mittel sechs Jahre dauert (Schweppe KW 2003). Dabei sind bei der intestinalen Endometriose inzwischen gute diagnostische Mittel präoperativ möglich, wie z.B. der endorectale Ultraschall (Doniec JM. 2003), die transvaginale

Sonographie (Hudelst G. 2009) oder die MRT. Alle drei Möglichkeiten zeigen eine hohe Sensibilität und Spezifität (Bazot M. 2009). Das wirkliche Ausmaß der Endometriose zeigt sich jedoch oft erst intraoperativ.

<i>Farbe</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Aktivität</i>	<i>Fibrose</i>	<i>Entstehung</i>
Rot	Flammendrote Läsion drüsige Erhabenheit endometriotischer Polyp wasserhelles Bläschen	Proliferierend	Gering	Früh
Blau oder schwarz	Gruppierte erhabene Flecke pigmentierte weiße Flecke „schrottschussartige“ Läsion kleines Zystchen mit schokoladenartigem Inhalt	Intermittierend	Variabel	Intermediär
Weiß oder braun	Strahlige Narbe sternförmige Einziehung	niedrig	hoch	spät

Tab.1: Makroskopische Einteilung der peritonealen Endometriose, Aktivität und zeitliche Zuordnung im Verlauf der Erkrankung

2.2 Das Endometriumkarzinom

Das Endometriumkarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung des Genitaltraktes der Frau und das 4. häufigste Karzinom bei der Frau (Jemal et al 2005). Der Altersgipfel liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr. Das Risiko zur Entwicklung eines Endometriumkarzinoms steigt mit zunehmendem Alter an. Die Ursache für diese in 75% postmenopausal auftretende maligne Erkrankung ist nicht vollständig geklärt. Jedoch ist ein wichtiger prädisponierender Faktor die langandauernde bzw. erhöhte Einwirkung des Östrogens, das durch unterschiedliche Gründe wie späte Menopause, Östrogenbehandlung ohne Gestagensersatz etc. vorliegen kann (Beresford et al 1997). Wie auch bei vielen anderen Krebserkrankungen können sich

die Karzinome schrittweise über Vorstufen entwickeln. Eine zunächst harmlose Endometriumhyperplasie mit Atypien kann zu dem häufigsten Korpuskarzinom, dem Adenokarzinom (80% der Uteruskarzinome) entarten (Mutter et al 2000). Weitere Faktoren zur Entstehung und vor allem zur weiteren Ausbreitung sind nach neuesten Studien multimodal. So spielen nicht nur die genetische Mutation (Inoue 2001), die schon vorher angesprochene hormonelle Regulation, Apoptosemechanismen (Vassileva et al 2004) sondern auch die Beteiligung der MMP's und TIMP's eine große Rolle (Graesslin et al 2005, Guo et al 2002). Weiterhin sind MMP-2 und MMP-9 an der Metastasierung des Endometriumkarzinoms beteiligt (DiNezza et al 2002). Dabei ist die lymphogene Ausbreitung diskontinuierlich, die hämatogene Streuung in die Lunge, Leber, Knochen und Gehirn findet erst in fortgeschrittenen Stadien statt (Mariani et al 2001).

Das typische Adenokarzinom wird nach dem histopathologischen Grading in ein G1 Stadium, d.h. einem gut differenzierten Tumor eingeteilt, der dem Endometrium in Aufbau und Eigenschaft ähnelt. In der Regel ist das Wachstum des Primärtumors exophytisch und er breitet sich in Fundus- und Korpusschleimhaut aus. Bei endophytischen Wachstum beginnt die myometrane Infiltration früh.

Das endometrioides Adenokarzinom, das auch hier in dieser Arbeit verwendet wurde, weist ähnliche Eigenschaften auf wie die endometriotischen Läsionen. Jedoch sind hier die Schritte der Infiltration und Metastasierung, die als Malignitätskriterien gelten, vorhanden.

2.3 Matrixmetalloproteinasen

Die Matrixmetalloproteinasen (MMP's) bilden eine große Familie von zink-abhängigen Endopeptidasen, die an zahlreichen Prozessen des Abbaus von Extrazellulärmatrix beteiligt sind (Raza et al 2000, Woessner JF 1991). Die Gruppe der beim Menschen vorkommenden MMP's umfasst inzwischen mehr als 20 Substanzen, die auf Grund von ihrer Struktur und Substratspezifität in verschiedene Unterklassen eingeteilt worden sind: Die Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13), die Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), die Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11), die Matrilysine (MMP-7), membrangebundene MMP's (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP und MT4-MMP) und die nicht weiter klassifizierten MMP's (Visse et al. 2003,

Cockett et al.,1998; Yu et al., 1996). Der Aufbau dieser strukturell verwandten Enzyme ist ähnlich. Alle besitzen vier Domänen: 1. eine Signalpeptidsequenz, 2. eine Propeptid-domäne, 3. eine katalytische Domäne und 4. eine carboxyterminale Hämopexindomäne. Außerdem haben die Gelatinasen noch eine 5. Domäne, die Gelatine bindet (Visse et al 2003).

Auch ist allen gemeinsam, dass sie in einer Pro-enzymform in den Extrazellulärraum sezerniert werden und dort zunächst durch Abspaltung der Propeptid-domäne aktiviert werden müssen. Zur Sekretion dieser sogenannten Zymogene sind eine Reihe von Zellen befähigt, unter anderem Makrophagen, Leukozyten, Fibroblasten, Keratinozyten, Endothel-, aber auch Tumorzellen (Ravanti et. al 2000, Liotta et al 1998). Die Regulation der Aktivität der MMP's bzw. ihre Hemmung ist ein komplexer Vorgang. Auf Genebene wird sie von Wachstumsfaktoren und Zytokinen kontrolliert. So stimulieren zum Beispiel Interleukin-1, TNF- α , TGF- α , EGF und PDGF die Gentranskription. Die Hemmung steht vor allem unter dem Einfluss der Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP's). Diese Inhibitorproteine spielen somit eine wichtige Rolle, um ein Gleichgewicht im ECM-Abbau herzustellen. Störungen dieses fein regulierten Gleichgewichts führen zu einem erhöhten Kollagenabbau (Infiltration, Metastasierung) oder zu geringerem Kollagenabbau (Fibrose) (Siegenthaler W. et al 2006).

Die MMP's sind sowohl an physiologischen Prozessen als auch an einer Reihe pathologischer Prozesse beteiligt.

Sie sind ein entscheidender Faktor bei der malignen Tumordinfiltration und – Ausbreitung wie z.B. bei verschiedenen Hirntumoren (Özen et al, 2004; Kunishio et al 2004), bei gastrointestinalen Tumoren (Gu et al 2005, Murray et al 1998), bei gynäkologischen Tumoren (Di Nezza et al 2002, Liokumovich et al 1999) und Lungentumoren (Pritchard et al 2001). Genauso sind sie aber auch an physiologischen Prozessen wie Wundheilung (Ravanti et al 2000), Embryogenese (Lelongt et al 1997), Menstruation (Selvais et al 2009, Hudelist et al 2005, Kokorine et al 1996) und einer Reihe benigner Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (Sabeh F 2010) und Atherosklerose beteiligt. Besonders erwähnt sei hier schon das Vorkommen in eutopischen und ektopischen endometrialen Gewebe (Kim et al 2007; Uzan et al. 2004, Osteen et al 2003).

MMP-2 (Gelatinase A)

Diese Typ IV-Kollagenase mit einem inaktiven Molekulargewicht von 72kDa (aktiv 66kDa) zeichnet sich besonders dadurch aus, dass sie eine Schlüsselrolle übernimmt. Typ IV Kollagen ist einer der wichtigsten Bestandteile der Basalmembran und der Durchbruch dieser ist ein wichtiger Schritt in der Ausbreitung von Gewebe (Stetler-Stevenson et al 1994). Außer Typ-IV-Kollagen degradiert sie aber auch Kollagen vom Typ V, VII, X und XI, Gelatin, Laminin, Fibronectin und viele andere in der Extrazellulärmatrix vorhandenen Proteine. Eine Überexpression wurde in vielen Tumoren festgestellt. Weiterhin zeigte sich auch dass eine solche Überexpression dieses Enzyms im Endometrium von Endometriose betroffenen Frauen vorlag (Chung et al 2002). Auch das Profil der MMP-2 in den unterschiedlichen ektopen Endometrium ähnlichen Geweben ist je nach Stadium bzw. Infiltration der Endometrioseherde unterschiedlich (Uzan et al 2004).

MMP-9 (Gelatinase B)

Auch die MMP-9 mit einem etwas höheren Molekulargewicht von 92 kDa (inaktive Form) ist eine Kollagenase. Sie spaltet außer das für den ersten Schritt zur Infiltration wichtige Typ IV- Kollagen auch noch Kollagen vom Typ II und Typ V, sowie unter anderem auch Gelatin, Galektin-3 und Elastin. Erstmals wurde sie im Sekretionsprodukt von Makrophagen und Granulozyten nachgewiesen (Hibbs et al 1985 und 1987). Sie wurde in zahlreichen humanen Krebserkrankungen im neoplastischen als auch im umgebenden Stromagewebe gefunden, so auch in der infiltrierenden aggressiven Form der Endometriose (Ria et al 2002). Wie auch die Gelatinase A kommt die Gelatinase B nicht nur physiologisch in der Proliferationsphase des Endometriums vor, sondern vermehrt auch im hyperplastischen Endometrium und beim Endometriumkarzinom (Graesslin et al 2005).

2.4 PCNA

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ist ein 36 kDa großes Kernprotein, auch bekannt als Cyclin. Seine Erstbeschreibung fand 1978 durch Miyashi et al statt. Es

ist ein wichtiges Polymerase δ assoziiertes Protein bei eukaryontischer DNA und wird vor allem in der frühen G1-Phase und S-Phase des Zellzyklus synthetisiert (Tan et al 1986, Bravo et al 1987). Dabei ist PCNA streng Zellkern assoziiert. Dieses Protein hat seine große Bedeutung darin, dass es als Marker für die Zellproliferation, d.h. die DNA-Synthese eingesetzt werden kann. Es kann in Zellen nachgewiesen werden, die den Zellzyklus gerade verlassen haben, aber nicht in länger ruhenden Zellen (Yu et al 1991). Seine Halbwertszeit beträgt 20 Stunden. Gefunden hat man PCNA auch vermehrt bei DNA-Schäden nach UV-Belastung, so dass der Schluss nahe liegt, dass PCNA auch bei DNA-Reparatur eine Rolle spielt (Nishida et al 1988, Toshi und Bravo 1988). Wichtig scheint es auch bei der Transkription der DNA zu sein (Hong et al 2003). Hauptsächlich kommt es in 2 Formen vor, einer löslichen und einer unlöslichen (Bravo R. et al 1987). Letztere steht direkt im Zusammenhang mit der DNA-Replikation und ist immunhistochemisch nachweisbar.

Der auch hier angewandte monoklonale Antikörper PC10 markiert in konventionell fixiertem Gewebe proliferierende Bezirke (Hall et al 1990). Inzwischen haben viele Studien mit PC 10 an verschiedenen regenerierenden Geweben und Malignomen stattgefunden, unter anderem auch beim Endometriumkarzinom (Yu et al 1993).

2.5 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode zur Darstellung von Proteinen in Geweben bzw. in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle. Diese Proteine werden mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. Zu Grunde liegend ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion: Die Antikörper binden sich spezifisch und stabil an die Gewebseigenschaft, das Epitop des Antigens und werden dann durch ein Detektionssystem im Präparat, z.B. in einem Gewebeschnitt dargestellt. Dabei unterscheidet man die direkte von der indirekten Methode. Es kommt zur direkten Umwandlung eines zugegebenen Substrates in einen mikroskopisch sichtbaren Farbstoff durch ein an den Antikörper gebundenes Enzym. Bei der indirekten Methode wird auf den Primärantikörper zunächst ein Sekundärantikörper gegeben. Erst dieser enthält das Enzym, welches das Substrat schließlich in den sichtbaren Farbstoff umwandelt. Die so genannte Polymer-Methode ist eine 2- Schrittmethode

der indirekten Technik, die sensitiver und signalverstärkend ist. Es wird an den Sekundärantikörper ein oder mehrere Polymermoleküle gebunden. Diese wiederum sind mit mehreren Enzymen bestückt, die das Substrat umsetzen. So erreicht man eine verstärkte Anfärbung am Ort des Antigens.

2.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Wenig ist bekannt über die Faktoren, die zum aggressiv-infiltrativen Wachstumsverhalten bei Darmendometriose mit regelrechter Infiltration unter Arrosion und Durchbrechen von verschiedenen Schichten wie z.B. Basalmembranen führen. Es fehlt bis heute die Klärung der Ätiologie und Pathogenese dieser häufigen benignen gynäkologischen Erkrankung. Somit sind auch sichere diagnostische und vor allem therapeutische Einteilungen nicht möglich. Frauen, die unter dieser Erkrankung leiden, werden oft erst spät bzw. inadäquat therapiert, da Fragen zum Wachstumsverhalten, Eindringtiefe als auch das Fortschreiten bzw. der Übergang auf weitere Organe wie z.B. dem Darm nicht ausreichend beantwortet sind. Im klinischen Alltag kommt es häufig zu einer verzögerten Diagnosestellung, da die Differentialdiagnose bei fehlenden pathognomischen Symptomen schwierig ist. Die Behandlung andererseits ist durch eine hohe Rezidivrate gekennzeichnet. Auch gibt es keine kausale Behandlungsmöglichkeit, die eine Heilung bzw. überhaupt ein Auftreten der Endometriose verhindern kann, da die Ursache für die Entstehung und Entwicklung nicht abschließend wissenschaftlich geklärt ist. Die Unterscheidung zwischen oberflächlicher und tief infiltrierender Endometriose, sowie das Feststellen des Aktivitätsgrades sind auch diagnostisch in keiner einfachen Methode bislang möglich. Diese Problematik erschwert die Erstellung eines individuellen Behandlungskonzeptes.

Ziel dieser Arbeit ist, die Proliferationsaktivität von Darmendometriose im Vergleich zur oberflächlichen Peritonealendometriose und zum gut differenzierten endometrioiden Adenokarzinom des Corpus uteri anhand der Expression von MMP-2, MMP-9 und PCNA zu untersuchen. Die beiden MMP`s 2 und 9 zeigen den ersten notwendigen Schritt zur Infiltration von Gewebe bei Tumorausbreitung, d.h. den Durchbruch der Basalmembranen, an. Auch sind diese beiden Marker in

Endometrioseherden vermehrt darstellbar und können so als Marker von Aggressivität und Ausbreitungstendenzen von Gewebe angesehen werden.

Anhand dessen soll nun die Frage, ob es bei der infiltrativen Darmendometriose zur verstärkten MMP-2 oder MMP-9 Expression im Vergleich zur weniger aggressiven Endometriose des Peritoneums kommt, beantwortet werden.

Weiterhin soll erörtert werden, ob es Unterschiede bei der infiltrativen Darmendometriose hinsichtlich der MMP-2, MMP-9 und PCNA-Expression im Vergleich zum gut differenzierten Endometriumkarzinom gibt.

Geklärt werden soll auch, ob man vom makroskopischen Bild der Endometrioseherde auf Unterschiede im Proliferationsverhalten schließen kann.

Durch die Bearbeitung dieser grundsätzlichen Fragestellung soll ein Beitrag zum besseren Verständnis der Biologie der Endometriose und ggf. in der Folge zur Erstellung einer individuelleren Therapie geleistet werden.

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 97 Fälle von Patientinnen der Universitätsfrauenklinik Kiel aus dem Behandlungszeitraum von 1995 bis 2005 untersucht. Bei allen Fällen wurde die Formalinfixierung und Paraffineinbettung des Operationspräparates an dem Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie im Universitätsklinikum Kiel vorgenommen. Auch die Diagnose und die weitere histologische Einteilung wurden dort vorgenommen.

Insgesamt zehn Fälle mussten aus der Wertung genommen werden, da sie bzgl. der repräsentativen Anzahl von Zellen im Gewebeschnitt nicht genügten.

Somit gingen eine Gruppe von Patientinnen mit der Diagnose „Endometrioseherde im Darm“ (n=27 Fällen), eine Gruppe von Patientinnen mit der Diagnose „Peritonealendometriose“ (n=22) und eine Gruppe von Patientinnen mit diagnostizierten Endometriumkarzinom (n=38) in die Untersuchung ein. In dieser letzten Gruppe wurden nur Fälle von hochdifferenzierten endometrioiden Adenokarzinomen berücksichtigt, bei denen ein Stadium G1 oder G2 vorlag. Das Untersuchungsmaterial stammte aus Abrasionen oder Hysterektomien. Das Alter der Patientinnen dieser Fallgruppe lag zum Zeitpunkt der Operation zwischen 36 und 89 Jahren.

Die Kriterien für die Zugehörigkeit in die Gruppe mit Endometrioseherde im Darm wurden in ihrer Lokalisation nicht weiter eingeschränkt. Folglich wurden in diese Gruppe Patientinnen mit Endometrioseherden im Rectosigmoid aber auch an Lokalisationen im Kolon bzw. der Appendix aufgenommen.

Das Alter der Patientinnen dieser Gruppe lag zwischen 26 und 56 Jahren. Zur Gruppe der Fälle mit Vorliegen der Endometrioseherde im Peritoneum zählten Patientinnen mit ähnlicher Alterstruktur wie die, der zuvor genannten Endometriosegruppe (Alter von 24 Jahren bis 43 Jahren). Die Lokalisation der endometrioiden Läsionen im Peritoneum war nicht weiter eingeschränkt.

3.2 Immunhistochemie

Zur Herstellung der Schnittpräparate wurden die tiefgefrorenen Paraffinblöcke an einem Rollenmikrotom (Modell 2050 Supercut, Fa. Reichert und Jung, Nussloch) geschnitten.

Die hier gewonnenen 2 - 4 µm starken Schnitte wurden dann zur Ausdehnung und Glättung in ein 38 °C erwärmtes Wasserbad gegeben. Danach wurden sie auf Objektträger (Super Frost Plus, Braunschweig) aufgezogen.

Die Trocknung der Schnitte wurde über mindestens 9 Stunden bei 37°C in einem Brutschrank durchgeführt.

Bevor die eigentliche immunhistochemische Färbung erfolgte, wurden die Schnitte durch ein Xylolbad entparaffiniert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

Anschließend wurde eine hitzeinduzierte Antigenmaskierung in dem Mikrowellengerät (Sharp R332, Sharp Electronics Europe GmbH, Hamburg) bei 900 Watt in jeweils einem Liter Citratpuffer (s.Anhang) für die Dauer von 15 min für MMP-2 und MMP-9 bzw. 18 min für PCNA durchgeführt.

Danach wurden alle Schnitte zur routinemäßigen Blockade der endogenen Peroxidase, die zu unspezifischer Hintergrundfärbung führen kann, 20 Minuten mit einem Endogenem Peroxidase Blocking Reagenz (Dako Cytomation, Carpinteria, USA) bei Raumtemperatur inkubiert.

Abweichend von den Geweben, das mit MMP-2 und PCNA untersucht werden sollte, wurden die mit MMP-9 zu behandelnden Schnitte zusätzlich für 15 Minuten einem Anti-Goat-Serum mit der Konzentration 1:5 (X0907 Dako, Glostrup, Dänemark) ausgesetzt, um die hierbei auftretenden ausgeprägte Hintergrundfärbung weiter zu reduzieren. Die hier angewendete immunhistochemische Färbung ist eine Polymerkonjugat - Methode des Envison-Kits von Dako Cytomation (Chilosi et al 1994, Kämmerer et al 2001) und stellt eine zwei-Schritt- indirekte Methode dar.

Dabei wird zunächst ein primärer unkonjugierter Antikörper auf das Gewebe aufgetragen und inkubiert. Der sekundäre Antikörper aus dem Kit besteht aus einem Dextran an dem sowohl Enzymmoleküle (HRP=Horse-Radish-Peroxidase) als auch

sekundäre Ziegen-Antikörpermoleküle gegen Kaninchen- und Mausimmunglobuline gekoppelt sind. Nach Inkubation mit diesem, visualisiert das Farbgemisch, die zweite Komponente des Kits, bestehend aus 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid und einer Pufferlösung die Wasserstoffperoxid enthält, die eigentlichen Antigenlokalisationen.

Wie bei allen indirekten Methoden wird das eigentliche Signal durch Mehrfachbindung des sekundären Antikörpers an verschiedenen Epitopen des primären Antikörpers amplifiziert. So ist eine hohe Sensivität gesichert.

Nach Auftragen des primären Antikörpers, wobei je nach Gewebsgröße 100-150µl der Antikörpermischung verwendet wurden, und der jeweiligen Inkubationszeit entsprechendem Belassen, wurden die weiteren Schritte mit dem Dako Envision Detection Kit (Dakocytomation, Glostrup, Dänemark) durchgeführt.

Der sekundäre Antikörper, eine Meerrettich-Peroxidase (HRP Rabbit/Mouse) wurde für 30 Minuten aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte mit dem Farbstoff, Diaminobenzidin (DAB +Chromogen X50, Envision Kit) in einer Konzentration von 1:50.

Unter Sicht wurde nach zwei Minuten der Färbevorgang bzw. die Reaktion der Meerrettichperoxidase mit dem DAB-Reagenz, die zu einer Braunfärbung führt, durch Leitungswasser gestoppt. Die Zellkern-Gegenfärbung erfolgte mit Mayers-Hämalaun (Merck, Darmstadt) für fünf Minuten. Nach Dehydrierung mittels aufsteigender Ethanolreihe und Xylolbad, erfolgte die Eindeckelung der Schnitte mit jeweils einen Tropfen von CV Mount Eindeckmedium (Leica Instruments, Nussloch). Bei der Einbettung war darauf zu achten, dass die Präparate luftfrei verblieben. Zum Schluss wurden die fertigen Präparate zur Aushärtung eine Nacht unter dem Laborabzug belassen. Für die Waschvorgänge zwischen den einzelnen Färbeschritten wurde Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS-Puffer) (s. Anhang) verwendet.

3.3 Wahl der Antikörper und ihrer Konzentrationen

Für die Wahl der Antikörper, ihre jeweiligen Konzentrationen, die Inkubationszeit als auch etwaige Zwischenschritte wurden Vorversuchsreihen durchgeführt.

So ergab sich für jeden der drei Antikörper durch eine Verdünnungsreihe (1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:1000, 1:3000) schließlich die letztendliche Konzentration, die das beste Färbeergebnis erbrachte. Dementsprechend wurde für MMP-2 eine Konzentration von 1:10 festgelegt. Dies bedeutet auf einen Anteil des vorliegenden Antikörpergemisch (10mg/ml) wurden zehn Anteile Verdünnungsmittel gegeben. Für MMP-9 ergab sich eine Konzentration von 1:25 und für PCNA eine Konzentration von 1:3000 - auch hier jeweils bezogen auf die vorliegende Konzentration des fertigen Antikörpergemisches (MMP-9 – 10µg/ml; PCNA – 200µg/ml). Dabei kam das Verdünnungsmittel Antibody Dilution (Dako S 3022, Glostrup, Dänemark) zum Einsatz. Auch die jeweilige beste Inkubationszeit hat sich aus den Vorversuchsreihen ergeben, die wie folgt festgelegt worden sind: Der MMP-2 Antikörper wurde für 1 Stunde inkubiert, für MMP-9 ergab sich eine Inkubationszeit von 2h (wobei hier eine feuchte Kammer zum Einsatz kam um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern) und für den PCNA- Antikörper von 45 min.

Zur Reduktion der ausgeprägten Hintergrundfärbung durch hydrophobe Wechselwirkungen wurde bei den MMP-9 Färbereihen noch ein Zwischenschritt eingeführt (s.o.).

Bei allen Versuchsreihen sowie bei den letztendlichen Färbereihen wurden immer eine negative und eine positive Kontrolle mitgeführt. Bei der Negativkontrolle wurde jeweils ein Schnittpräparat ausschließlich mit dem Verdünnungsmedium des primären Antikörpers im ersten Inkubationsschritt inkubiert und anschließend wie üblich weiter behandelt.

Die Positivkontrolle wurde abhängig vom Antikörper gewählt. Sie diente zur Feststellung, ob die Färbung erfolgreich war, da dieses gewählte Gewebe immer positiv auf die Färbung reagiert. Bei den MMP-2 und PCNA Färbereihen wurde ein Gewebeschnitt eines Kolonkarzinoms mitgeführt und bei den MMP-9 Färbungen wurde ein Mammakarzinom Präparat verwendet.

Die nach mehreren Versuchsreihen ausgewählten Antikörper waren die in der folgenden Tabelle (Tab.2).

Anti-körper	Ursprung	Verdünnung	Ig-Sub klasse	Firma	Referenzen
MMP-2	Maus mono-klonaler Antikörper Clone 4D3	Zellkulturüberstand	IgG1	Abcam	Murray GI et al. 1998a Murray GI et al. 1998b
MMP-9	Maus mono-klonaler Antikörper Clone 56-2A4	10µg/ml	IgG1	Calbiochem	Stetler-Stevenson WG et al. 1993 Woessner JF et al. 1991
PCNA	Maus mono-klonaler Antikörper Clone PC10:sc-56	200µg/ml	IgG2a	Santa Cruz Bio-technology	Bravo R et al. 1987 Woods AL et al. 1991 Hong R et al. 2003

Tab 2: Verzeichnis der verwendeten Antikörper

3.4 Auswertung der Färbung

3.4.1 MMP-2 und MMP-9

Es gibt verschiedene Methoden zur Auswertung von immunhistochemischen Färbungen. Hier wurde sich für das modifizierte semi-quantitative Verfahren nach Remmele und Stegner entschieden (Remmele und Stegner 1987). Nach ihrem immunreaktiven Score (IRS) wird zum einen der Prozentsatz der positiven Zellen (PP) bewertet und zum anderen die Farbintensität (Staining intensity=SI). Für letztere

ist es unerlässlich jeweils den Vergleich mit der im Färbegang mitgeführten Kontrolle durchzuführen. Die Einteilung des prozentualen Anteils der positiven Zellen erfolgt in fünf Gruppen. Dabei werden vier Punkte zugeordnet wenn mehr als 80% der Zellen positiv sind. Bei drei Punkten liegt der positive Zellanteil zwischen 51 und 80%, bei zwei Punkten zwischen 10 und 50% und unter 10% wird mit einem Punkt bewertet. Bei Vorliegen von nur negativ bewerteten Zellen werden null Punkte zugeteilt.

Die Färbeintensität wird in vier Gruppen aufgeschlüsselt. Null wird zugeordnet wenn keine Färbereaktion stattgefunden hat. Bei einem Punkt liegt eine schwache Färbereaktion vor, bei zwei Punkten eine mäßige und bei drei Punkten eine starke Färbereaktion. Anschließend werden die Punkte von PP und SI miteinander multipliziert, so dass sich ein Score für jeden Gewebeschnitt zwischen 0 und 12 ergibt. Färbungen mit einem Score von drei werden als positiv gewertet, ab einem Score von neun als stark positiv. Der mittlere Bereich umfasst einen IRS von sechs bis neun (Tab.3).

SI - Einteilung	PP - Einteilung	IRS = Stärke
0 = keine Färbereaktion	0 = keine positiven Zellen	3-6 = schwach
1 = schwache Färbereaktion	1 = < 10% positive Zellen	6-9 = mäßig
2 = mäßige Färbereaktion	2 = 10-50% positive Zellen	9-12 = stark
3 = starke Färbereaktion	3 = 51-80% positive Zellen	
	4 = > 80% positive Zellen	

Tab.3: Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner

3.4.2 PCNA

Bei den Färbungen mit PCNA, einem Proliferationsmarker wurde eine andere Auswertmethode vorgenommen. Es wurden repräsentative Färbereale aufgesucht und diese prozentual ausgezählt. Ein Areal umfasst immer 200 Zellen, das dann auf den genauen prozentualen Anteil der positiven Zellen ausgezählt wurde. Dabei gilt ein Bereich mit über 70 % positiv angefärbten Zellkernen als stark proliferierend. Zwischen 20 % und 70% positiven Färberegebnis bezeichnet eine mäßig

Proliferation und bei weniger als 20% positiv angefärbten Zellkernen als schwache Proliferation.

3.5 Statistik

Die Ergebnisse wurden vor allem deskriptiv mit Hilfe von Microsoft Excel (Microsoft Technologies, Seattle, USA) ausgewertet. Bei der Signifikanzbestimmung durch den Mann-Whitney Test kam das Programm Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA) zur Anwendung. Als signifikant wurden p- Werte kleiner als 0,05 bezeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 MMP-2

Eine Antigenexpression für MMP-2 ist in allen drei Gewebegruppen nachweisbar. Dabei zeigen sich die prägnantesten Färbeergebnisse in der Gruppe der endometrioiden Adenokarzinomen. Hier stellen sich sowohl der insgesamt größte prozentuale Anteil der Gewebeproben positiv dar (89,47%), als auch die häufigsten stark positiv gewerteten Gewebeschnitte (60,53%). Somit sind 34 von den 38 Gewebeschnitten positiv angefärbt. Davon wiederum ergeben 23 einen Immunreaktiven Score von größer als 8 (Tab.4).

Die Gruppe der Gewebeschnitte „Endometrioseherde im Darm“ zeigt in 74,07 % der Fälle eine positive Färbeantwort, d.h. 20 Schnitte sind positiv. Dabei weisen 16 Schnitte einen IRS von ≥ 9 auf (59,26 %) und sind so als stark positiv angefärbt zu beurteilen.

Bei sieben Präparaten ergibt sich ein IRS von kleiner als 3. Sie sind folglich als negativ zu bewerten (Tab.5).

In der Gruppe der Gewebeschnitte „endometriotische Läsionen im Peritoneum“ ist die Immunreaktivität mit MMP-2 am wenigsten stark ausgeprägt. In gut der Hälfte der Fälle (59,09 %), d.h. 13 von 22 Präparaten zeigt sich eine positive Färbereaktion. Bei 6 Präparaten (27,27 %) kommt es zu einer stark positiven Färbereaktion (Tab.6).

Eine zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse für die immunhistochemische Färbung mit MMP-2 in allen drei Gruppen zeigt Abbildung 2. Abbildung 1 zeigt beispielhaft stark positiv gewertete Anfärbungen von Endometrioseschläuchen in einem Darmgewebeschnitt und einem Schnitt aus der Gruppe mit peritonealen Läsionen.

Ergebnisse

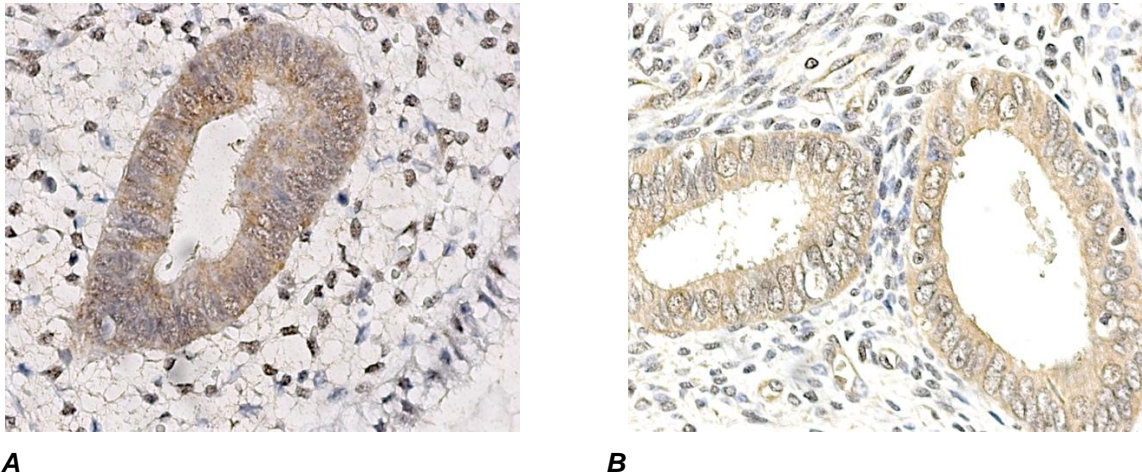


Abb. 1 Immunhistochemischer Nachweis von MMP-2

A: In einem Endometrioseschlauch im Darm (20x)

B: In zwei Endometrioseschläuchen im Peritoneum

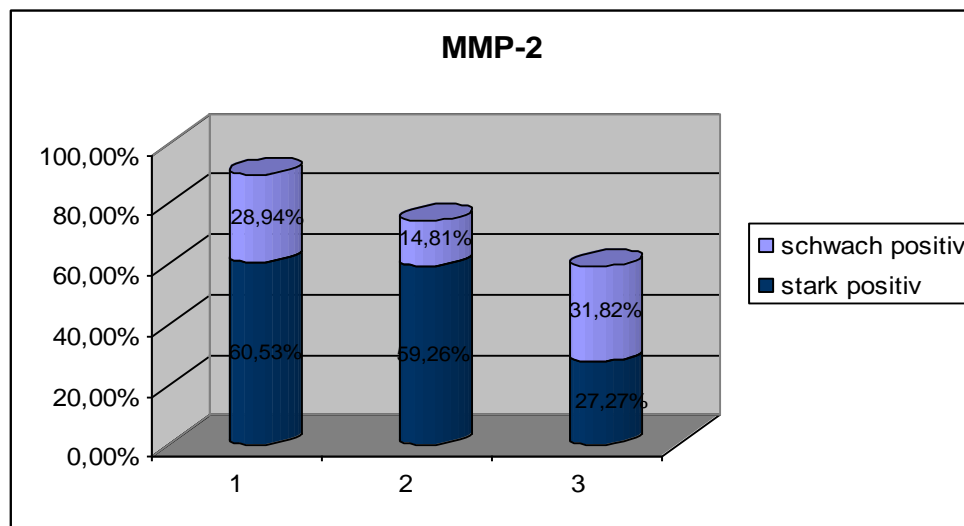


Abb.2: Prozentuale Anteile der **MMP-2** immunhistochemisch positiven Zellen in

1: Endometriumkarzinom, 2: Endometriose in Darm, 3: Endometriose im Peritoneum

Die Höhe des Balkens entspricht der Anzahl der Zellen mit positiver Antigenexpression.

Der untere Anteil des Balkens ergibt die Anzahl der stark positiven Zellen (Score ≥ 9) und der obere Anteil die Anzahl der positiven Befunde (Score ≥ 3).

Score : 0-12

Score ≥ 3 positiv

Score ≥ 9 stark positiv

Die Ergebnisse für die drei verschiedenen Gewebearten durch Bestimmung des arithmetischen Mittelwertes, der Standardabweichung sowie des Standardfehlers verdeutlicht Abbildung 3. Es ergibt sich ein mittlerer Score von 8,18 für das

Endometriumkarzinom, ein Score von 7,41 für die Gruppe der Darmendometriose und ein Score von 5,36 für die Peritonealendometriose (Abb.3).

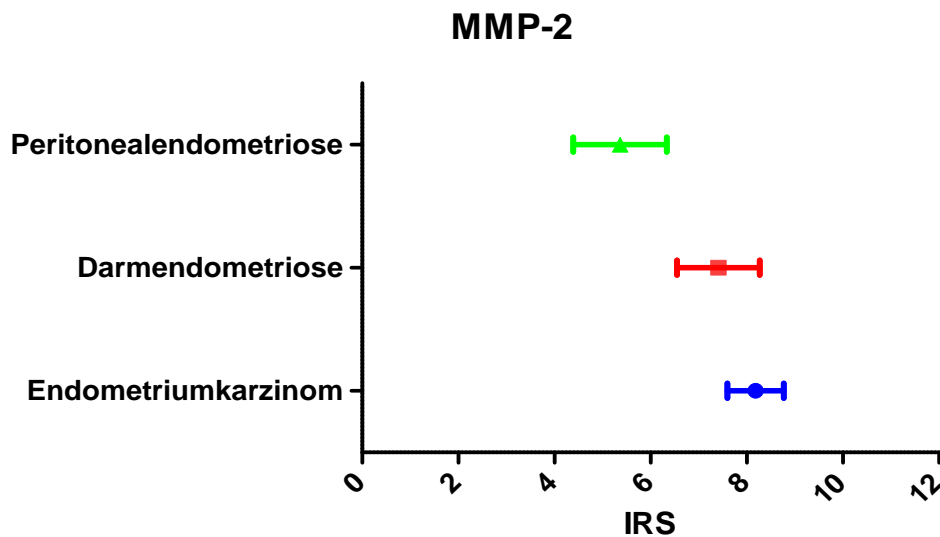


Abb.3: Darstellung von arithmetischen Mittelwert \pm Standardfehler
 Endometriumkarzinom versus Darmendometriose nicht signifikant
 Endometriumkarzinom versus Peritonealendometriose $p=0,0209$
 Darmendometriose versus Peritonealendometriose nicht signifikant

4.2 MMP-9

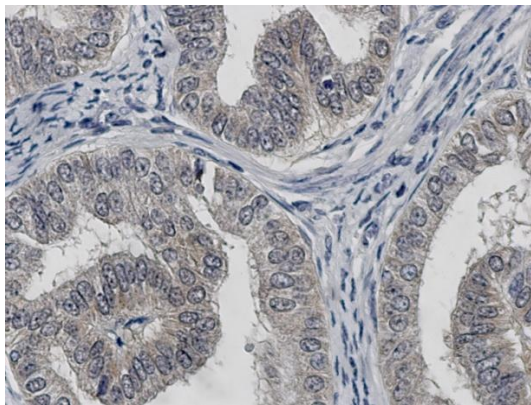
Die Ergebnisse für die Färbungen mit dem Antikörper MMP-9 sind ähnlich ausgefallen wie die Ergebnisse mit der Antikörper MMP-2 Färbung. Auch hier ist die häufigste positive Anfärbereaktion in der Gewebegruppe der Endometriumkarzinome festzustellen. Insgesamt fallen jedoch prozentual weniger Schnitte positiv und mehr Schnitte schwach positiv aus als bei der Färbung mit dem Antikörper MMP-2.

Hier sind 27 von den 38 Präparaten (71,05%) positiv angefärbt und nur 8 Schnitte (21,05%) zeigen einen IRS ≥ 9 und können so als stark positiv gewertet werden. Damit sind 11 Schnitte (28,95%) gar nicht angefärbt bzw. Erreichen nur einen IRS von < 3 (Tab.7).

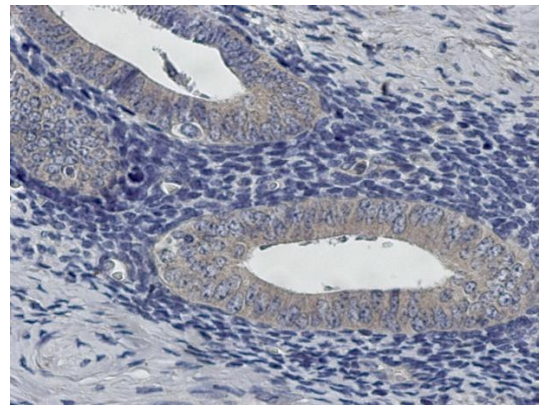
Ergebnisse

Die beiden anderen Fallgruppen, Endometrioseherde im Darm und endometriotische Läsionen im Peritoneum unterscheiden sich nicht wesentlich von einander. Anders als bei der Auswertung mit MMP-2 ist es hier die Gruppe der Endometrioseherde im Darm, die insgesamt etwas weniger positive Fälle aufweist. Es färben sich insgesamt nur 12 der 27 Schnitte positiv an (44,40%). Davon zeigen sich auch nur 3 Schnitte (11,11%) mit einem IRS von ≥ 8 (Tab.8).

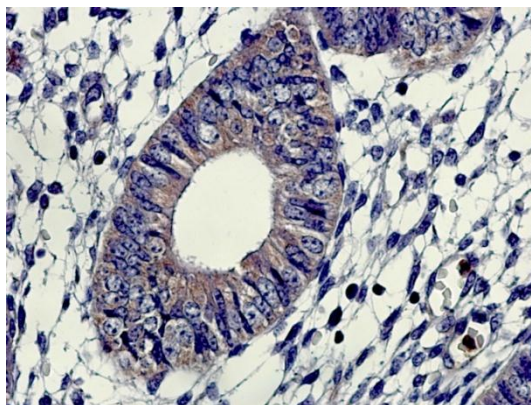
Die Gruppe der endometriotischen Läsionen im Peritoneum weist auch hier etwas mehr als die Hälfte (59,09 %), d.h. 13 von 22 Präparaten positive Immunreaktionen mit dem Antikörper MMP-9 auf. Einen IRS ≥ 9 zeigen jedoch nur 2 Schnitte (9,09%) (Tab. 9). Die Abbildung 4 zeigt die Immunreaktionen mit dem Antikörper MMP-9 in allen drei Gewebegruppen.



A



B



C

Abb.4 Immunhistochemischer Nachweis von MMP-9

A: In endometrioiden Adenokarzinom

B: In Darmendometriose

C: In Endometrioseherd im Peritoneum

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse für die Färbungen in den drei Gewebegruppen zeigt Abbildung 5.

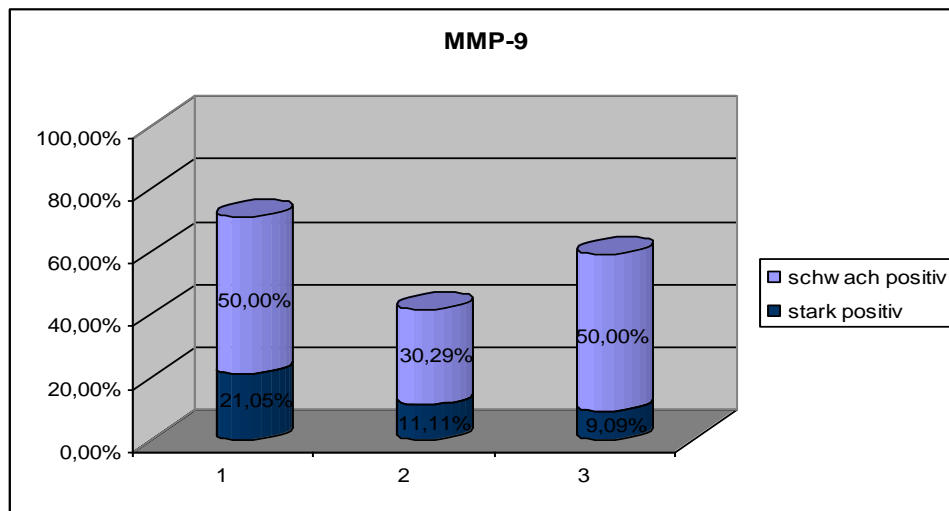


Abb.5: Prozentuale Anteile der MMP-9 immunhistochemisch positiven Zellen in
 1: Endometriumkarzinom , 2: Endometriose im Darm, 3: Endometriose im Peritoneum
 Die Höhe des Balkens entspricht der Anzahl der Zellen mit positiver Antigenexpression.
 Der untere Anteil des Balkens ergibt die Anzahl der stark positiven Zellen (Score ≥ 9) und der obere Anteil die Anzahl der positiven Befunde (Score ≥ 3).
 Score : 0-12 ; Score ≥ 3 positiv; Score ≥ 9 stark positiv

Die arithmetischen Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung und dem Standardfehler sind in Abbildung 6 wiedergegeben. Hier zeigt sich bei der insgesamt schwächer ausgefallenen Färbung für die Gruppe der Endometriumkarzinome ein mittlerer immunreaktiver Score von 5,11. Die Endometriosegewebe zeigen beide einen mittleren IRS um 3. Die Gruppe der Darmendometriose erhält einen Score von 3,07 während die Gruppe der Peritonealendometriose einen Score von 3,77 aufweist.

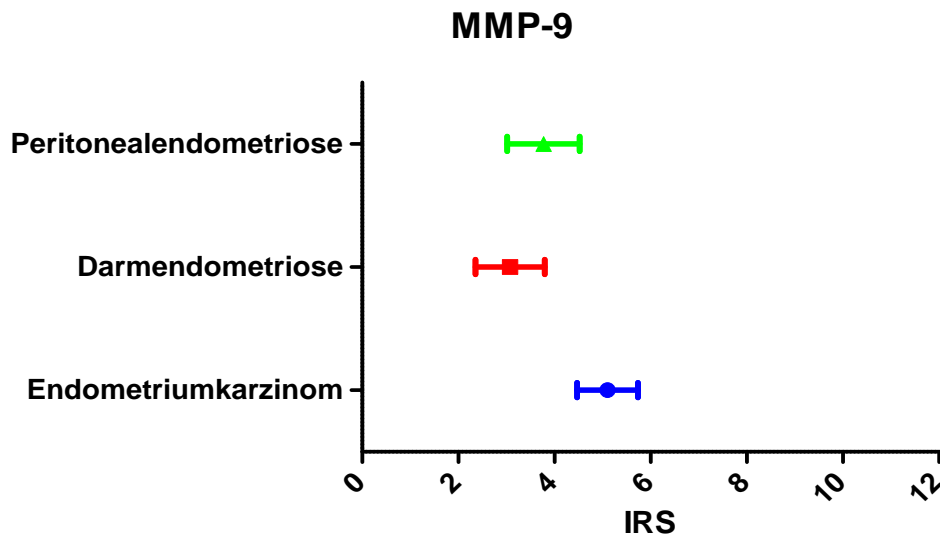


Abb.6: Darstellung von arithmetischen Mittelwert \pm Standardfehler
 Endometriumkarzinom versus Darmendometriose **$p=0,0261$**
 Endometriumkarzinom versus Peritonealendometriose nicht signifikant
 Darmendometriose versus Peritonealendometriose nicht signifikant

4.3 PCNA

Die Ergebnisse der Färbungen mit dem Proliferationsmarker PCNA sind in den Tabellen 10-12 dargestellt. Die Auswertung der gefärbten Schnittpräparate erfolgt in einer anderen Vorgehensweise als bei den beiden anderen Antikörpern MMP-2 und MMP-9. Hier werden repräsentative Färbeareale aufgesucht und diese prozentual ausgezählt. Dabei gilt ein Bereich mit über 70 % positiv angefärbten Zellkernen als stark proliferierend. Zwischen 20 % und 70% positiven Färbeergebnis bezeichnet eine mäßig Proliferation und bei weniger als 20% positiv angefärbten Zellkernen als schwache Proliferation des Gewebes.

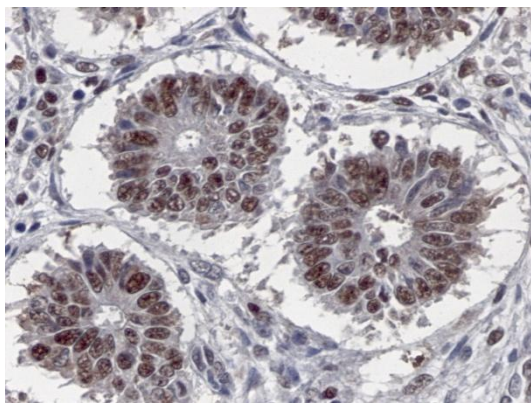
Sodann ergibt sich bei der Gruppe der Endometriumkarzinome in 28,95% der Fälle (11 von 38 Präparaten) eine starke Proliferationstendenz. Als mäßig proliferierendes Gewebe sind 21 von 38 Schnitten (55,26%) zu bezeichnen. Weniger als 20% der Zellkerne sind in 6 Schnitten (15,79%) nachweisbar positiv (Tab.10).

In der Gruppe der Darmendometriose zeigt sich die stärkste Proliferation, d.h. die Mehrheit der Schnittpräparate mit PCNA-Zellkernfärbung zeigen in den ausgewählten Arealen mehr als 70% positive Zellkerne. Insgesamt sind 66,66% (18 von 27 Präparaten) so zu bewerten. Nur 2 Schnitte (7,41%) weisen prozentual

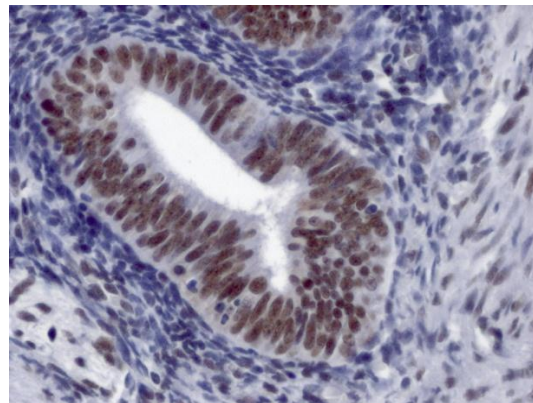
weniger als 20 % positive Anfärbung auf. Die anderen 7 Schnitte (25,93%) zeigen eine mäßige Proliferation zwischen 20 und 70% (Tab.11).

In der Fallgruppe „Endometriotische Läsionen im Peritoneum“ sind 10 von den 22 Präparaten (45,45%) dem starken Proliferationsverhalten zu zuordnen. Als mäßig proliferierend sind 4 Schnitte (18,18%) zu verzeichnen. Die übrigen 8 Schnitte zeigen unter 20% positive Zellkernanfärbungen und sind folglich nur als schwach proliferierendes Gewebe einzuteilen (Tab.12).

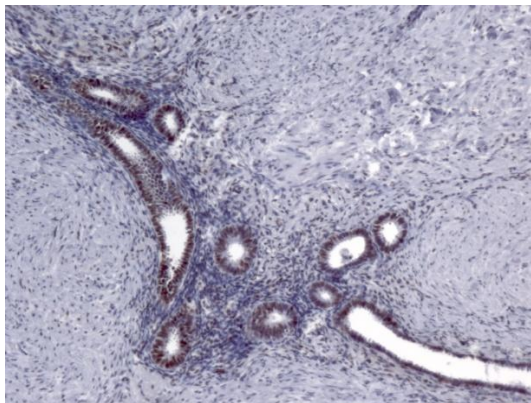
Zur weiteren Verdeutlichung der Ergebnisse dienen Abbildung 7 und 8.



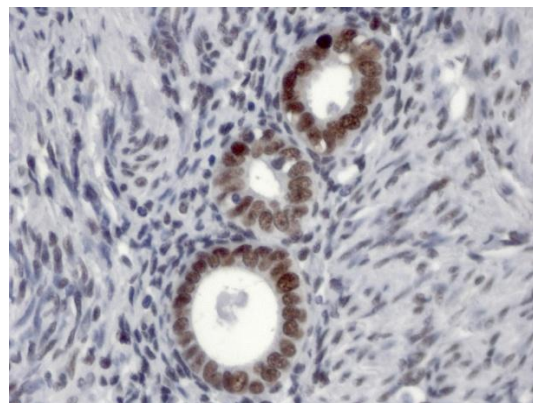
A



B



C



D

Abb. 7 Immunhistochemischer Nachweis von PCNA

A: beim endometrioiden Adenokarzinom (20x) B: bei Endometrioseherd im Darm (20x)
C: bei Endometrioseherd im Peritoneum (10x) D: bei Endometrioseherd im Darm (20x)

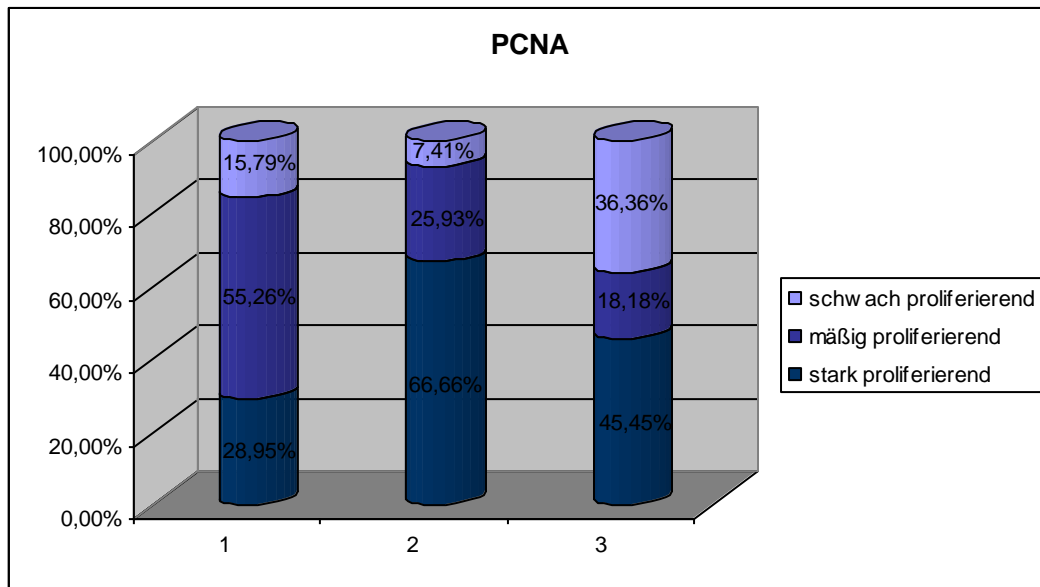


Abb.8: PCNA Darstellung mit Einteilung stark proliferierend ab 70%, mäßig proliferierend 20-70%, schwach proliferierend < 20%;
PCNA 1: Endometriumkarzinom 2: Darmendometriose 3: Peritonealendometriose

Die arithmetischen Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler zeigen auf Grund der anderen Auswertmethode (1-100%) größer erscheinende Unterschiede in den drei Gewebegruppen. Es zeigt sich eine mittlere Proliferationstendenz beim Endometriumkarzinom von 48,41%. Einen ähnlichen Mittelwert kann man für die Peritonealendometriose errechnen (48,14%). Eine starke mittlere Proliferationsrate ergibt sich bei der Darmendometriose. Hier liegt der arithmetische Mittelwert bei 71,85% (Abb. 9).

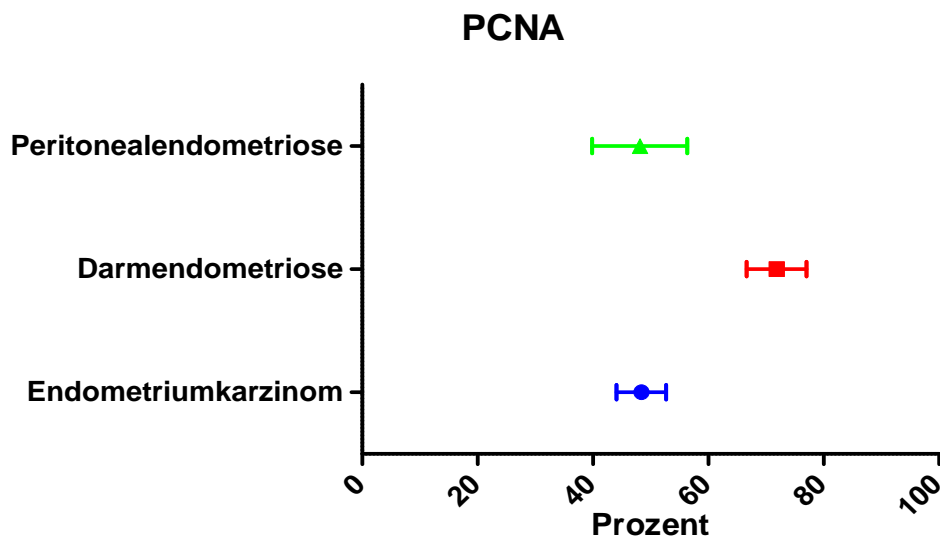


Abb.9: Darstellung von arithmetischen Mittelwert \pm Standardfehler
 Endometriumkarzinom versus Darmendometriose $p=0,0008$
 Endometriumkarzinom versus Peritonealendometriose nicht signifikant
 Darmendometriose versus Peritonealendometriose $p=0,0394$

4.4 Darmendometriose und Peritonealendometriose

Betrachtet man nun zunächst die beiden Fallgruppen mit der unterschiedlichen Endometrioselokalisierung (Abb.7), so zeigt sich ein Unterschied für die Färbung mit dem MMP-2 Antikörper. In der Gruppe der Darmendometriose sind 74,07% der Präparate positiv gefärbt zu bewerten. Die Schnittpräparate der Peritonealendometriose sind in 59,09% der Fälle positiv angefärbt.

Die insgesamt bei allen Gewebegruppen schwächer ausgefallene Färbung mit MMP-9 fällt im Vergleich stärker bei der Gruppe „endometriotische Läsionen“ aus. Es zeigen sich hier 59,09% der Schnitte positiv. Bei der Gruppe der Darmendometriose waren 44,40% der Schnittpräparate als positiv zu bewerten (Abb.10).

Ergebnisse

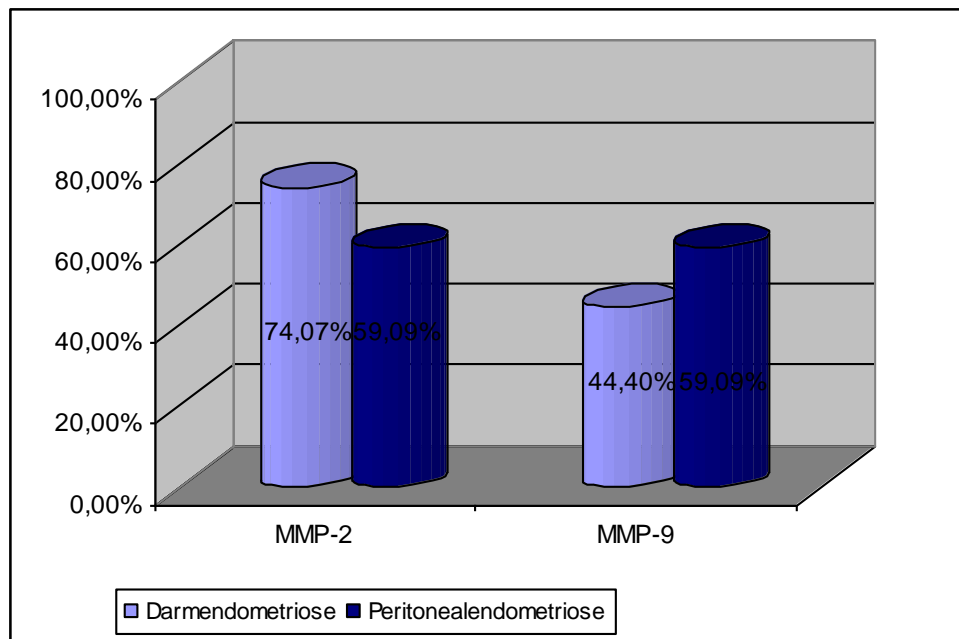


Abb.10 : MMP-2 und MMP-9 Darstellung bei unterschiedlicher Endometrioselokalisierung

Da die Gruppen jedoch eine geringe Fallzahl beinhalten zeigt Tabelle 13, dass die Unterschiede nicht statistisch signifikant sind und von daher nur eine Tendenz darbieten.

Endometrium- karzinom (A)	Darm- endometriose (B)	Peritoneal- endometriose (C)	A versus B	A versus C	B versus C	
MMP-2	8,184±0,5853	7,407±0,8594	5,364±0,9704	NS	p=0,0209	NS
MMP-9	5,105±0,6331	3,074±0,7199	3,773±0,7529	p=0,0261	NS	NS
PCNA	48,41±4,306	71,85±5,197	48,14±8,252	p=0,0008	NS	p=0,0394

Tab.13: Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler für alle Gewebsgruppen und Färbungen
NS: Nicht signifikant

4.5 Darmendometriose und Endometriumkarzinom

Der Unterschied des Färbeergebnisses (MMP-2 und MMP-9) der infiltrativen Darmendometriose gegenüber dem gut differenzierten Endometriumkarzinom wird in Abbildung 10 sowie in Tabelle 13 wiedergegeben.

Es zeigt sich, dass sich 89,47% der Schnittpräparate mit MMP-2 und 71,05% der Schnittpräparate mit MMP-9 in der Gruppe der Endometriumkarzinome positiv darstellen. Die Schnitte in der Gruppe der Darmendometriose zeigen im Vergleich dazu, für MMP-2 in 74,07% und für MMP-9 in 44,40% eine positive Reaktion (Abb.11). Dabei ist der Unterschied mit $p=0,0261$ für die Färbung mit MMP-9 als signifikant zu bezeichnen.

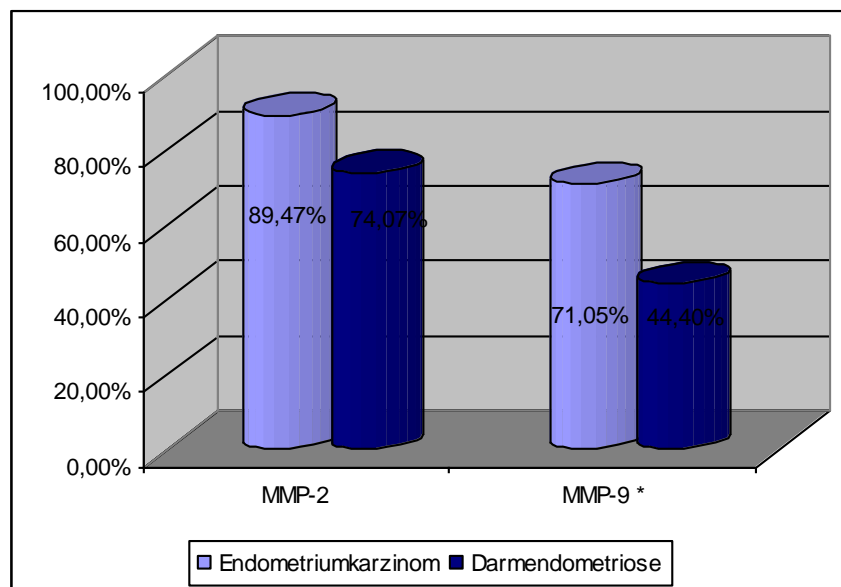


Abb.11 Darstellung von MMP-2 und MMP-9 im Vergleich Endometriumkarzinom und Darmendometriose. MMP-9*: signifikanter Unterschied mit $p=0,0261$

Bei Betrachtung des Proliferationsmarkers PCNA fällt jedoch das Ergebnis der beiden Gruppen ähnlich aus (Abb.6). Bei den Endometriumkarzinomen zeigen sich insgesamt 84,21% der Schnitte in mäßiger und starker Proliferation. In der Gruppe der infiltrativen Darmendometriose liegen 92,59% in der o.g. Einteilung. In Bezug auf den arithmetischen Mittelwert muss man jedoch einen statistisch signifikanten

Unterschied zu Gunsten einer ausgeprägteren Proliferation der infiltrativen Darmendometriose unterstreichen.

4.6 Makroskopische- und Mikroskopische Aspekte

Bei der Peritonealendometriose wurde eine Einteilung nach makroskopischen und mikroskopischen Aspekten in aktive und inaktive Herde vorgenommen (Schindler 2007). Man unterscheidet zwischen roten, blau-schwarzen, gelben und weißen Endometrioseherden, die parallel nebeneinander vorkommen können. Diese unterschiedlichen makroskopischen Aspekte sprechen wiederum für Aktivität oder Inaktivität der jeweiligen Endometrioseläsion.

Makroskopie Peritonealendometriose	
<p>aktiv:</p> <ul style="list-style-type: none"> - rote Herde - Hypervaskularisierung - Entzündungszeichen - vesikuläre Implantate 	<p>inaktiv:</p> <ul style="list-style-type: none"> - schwarze, braune Herde - wenig Blutgefäße - weißliche Peritonealverdickungen
<u>Mikroskopie</u>	
Epithel	
<p>aktiv:</p> <ul style="list-style-type: none"> - endometroid - hoch zylindrisch - variabel im Zyklus - hoch differenziert wie Endometrium - endokrin moduliert - eutroph - häufige Mitosen 	<p>inaktiv:</p> <ul style="list-style-type: none"> - isthmoid - kubisch - keine Veränderung im Zyklus - niedrig differenziert - atrophisch - seltene Mitosen
Stroma	
<p>aktiv:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ödem - Entzündungszellen - Erythrozyten - viele Kapillaren - eutroph 	<p>inaktiv:</p> <ul style="list-style-type: none"> - kondensiert - Fibrose - Siderophagen - wenig Kapillaren - kondensiert

Tab. 14: Aktive und inaktive Endometriose: Makroskopische und mikroskopische Erscheinungsformen

Unter Berücksichtigung von mikroskopischen Kriterien (Tab.14) für aktiv oder inaktive Herde (Schindler 2007, Schweppes 2000) sind in der Fallgruppe (n=22) 12 Gewebeschnitte die inaktiven Läsionen zu zuordnen sind und fünf Präparate, die als aktive Endometrioseherde zu bezeichnen sind. Fünf der Fälle wurden in diese Einteilung nicht aufgenommen. Eine präzise Zuordnung nach makroskopischer bzw. mikroskopischer Klassifizierung war nicht gegeben (Abb.12).

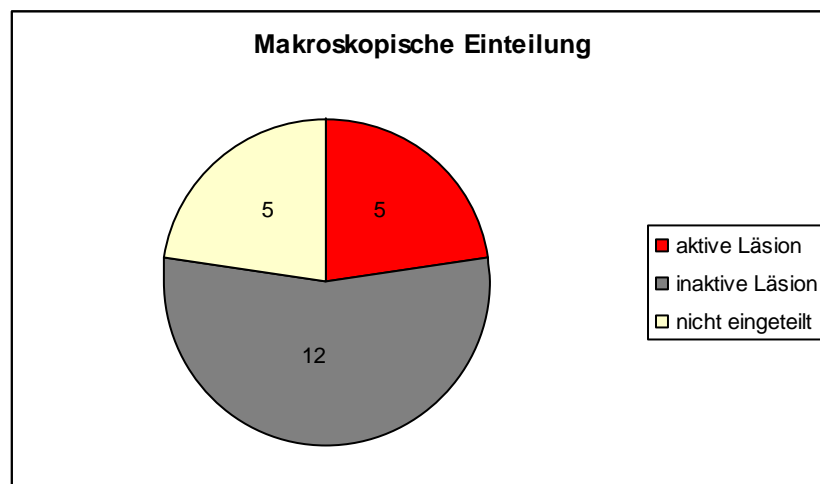


Abb.12 Darstellung der Makroskopischen Untergruppen bei Peritonealendometriose

Die Darmendometriose, die als infiltrativ zu bezeichnen ist, kann in den wenigsten Fällen nach makroskopischen Kriterien eingeordnet werden, sondern ist viel mehr häufig ein Zufallsbefund. Diese tiefliegenden Läsionen sind meist laparoskopisch nicht sichtbar und können so auch keiner makroskopische Einteilung unterstellt werden.

Die in der Fallgruppe der Peritonealendometriose als aktiv bezeichneten Läsionen spiegeln dieses auch in allen drei Färbungen wieder. Bei der MMP-2 Antikörperfärbung zeigen sich entsprechend 4 der 5 Präparate mit einem IRS von 12 und ein Präparat mit einem Score von 3. Dasselbe Präparat zeigt auch bei der

Ergebnisse

MMP-9 Färbung einen IRS von 0. Hier sind bei 2 von den 4 aktiven Läsionen ein IRS von 8 und 9 und einmal ein IRS von 12 zu zuordnen. Ein weiteres Präparat zeigt jedoch auch einen Score von 0. Vergleicht man dieses nun mit der Färbung mit dem Proliferationsmarker PCNA, so kann man feststellen das hier dasselbe Präparat eine geringe Proliferation aufweist (5%). Die anderen 4 ergeben, wie es bei einem aktiven Herd zu erwarten ist, eine starke Proliferation jeweils über 70% (78,5%; 84%; 96% und 97,5%).

Bei den inaktiv bewerteten Läsionen zeigen sich 6 Präparate mit einer geringen Proliferation, d.h. weniger als 20% der Zellkerne zeigen eine positive Färbung. Weitere 2 Präparate zeigen eine gering mäßige Proliferation (35% und 38%). Jedoch wiesen auch 4 Gewebsschnitte eine eher als starke Proliferation eingeteilte positive Zellverteilung auf.

Bei den Darstellungen der MMP`s erreicht kein Präparat einen IRS > 6. Somit gibt es keine stark positiven Reaktionen bei den inaktiv eingeteilten Läsionen. Bei MMP-2 gefärbten Präparaten zeigen sich 7 der 12 Schnitte mit einem IRS <3 und sind somit negativ (1x0, 3x1, 3x2) zu bewerten. Des weiteren gibt es zwei Schnitte mit einem IRS von 4 und drei Schnitte mit einem IRS von 6.

Fünf Schnitte sind negativ (2x0, 3x1) bei der Färbung mit MMP-9 und 2 Schnitte haben einen IRS von 3. Weitere 3 Präparate sind mit einem IRS von 4 zu bewerten. Aber auch hier gibt es 2 Präparate die einen IRS von 6 erreichten.

5. Diskussion

5.1 MMP-2

Während des Prozesses der Infiltration und Ausbreitung müssen Zellen epitheliale und endotheliale Basalmembranen, zu deren Hauptbestandteil das Typ IV Kollagen gehört, durchqueren. Zu den Typ IV Kollagen hydrolytisch spaltenden Proteasen gehört die MMP-2 (Gelatinase A). MMP-2 konnte in einem breiten Spektrum maligner Tumoren aber auch in physiologischen Prozessen wie z.B. die Menstruation in hoher Expression nachgewiesen werden (Selvais et al 2009, Gu et al 2005, Di Nezza et al 2002, Liokumovich et al 1999, Murray et al 1998).

Auch in unseren immunhistochemischen Untersuchungen ist MMP-2 zu 89,47% positiv in Endometriumkarzinomen nachweisbar. Somit zeigt sich hier das deutlichste Färbeergebnis der drei untersuchten Gewebegruppen. Dieses Ergebnis entspricht der aktuellen Studienlage. Das Vorkommen von MMP's in unterschiedlichen Tumorstadien bei Endometriumkarzinomen ist weit reichend beschrieben (Shaco-Levy et al 2008, Guo et al 2002, Park et al 2001, Inoue et al 1997). Das ähnliche Vorgänge zur Infiltration bzw. Progression der Endometriose führen wie bei einem malignen Tumorgeschehen war schon Ansatz bei Koninckx et al 1999.

So erbringt auch die Färbungen beider Gruppen von Endometriosegewebe in unserer Untersuchung eine moderate bis starke Expression der MMP-2.

Die Endometriose, die als multifaktorielle Erkrankung angesehen werden kann und deren Pathogenese bis heute nicht endgültig und eindeutig geklärt ist, hat auch die Fähigkeit zur Implantation bzw. Invasion ähnlich den Tumorzellen. Für diese Fähigkeit der ektopen Endometriumzellen spielen die MMP's ebenfalls eine entscheidende Rolle. In einer Vielzahl von Studien konnte die Etablierung, das Wachstum und die Aktivität von Endometrioseherden durch verstärkte Expression von MMP's dargestellt werden (Hudelist et al 2005, Chung et al 2002, Ria et al 2002, Sillem et al 2001, Wenzl et al 1998).

Es zeigt sich in unserer Untersuchung eine Tendenz zu einer stärkeren immunhistochemischen Reaktion bei der Gruppe der infiltrativen Darmendometriose. Hier wurden drei Viertel der 27 Gewebsschnitte (74,04%) MMP-2 positiv gewertet. Dem gegenüber zu stellen sind 59,09% MMP-2 positive Reaktionen bei der Gruppe der Peritonealendometriose. Unsere Ergebnisse zeigen eine Tendenz für

aggressiveres Verhalten der Darmendometriose gegenüber der Peritonealendometriose, widergespiegelt in einer höheren Expression und vor allem sehr stark positiven Expression des Antikörpers MMP-2. (IRS >8).

Dies stimmt überein mit Studien zu Angiogenesefaktoren und MMP's *in vitro* und *in vivo*, in denen unterschiedliche Lokalisationen der Endometriose verglichen wurden und sich ähnliche Ergebnisse zeigten (Kim et al 2007, Uzan et al 2004, Chung et al 2002; Ria et al 2002). Weiterhin wird eine unterschiedliche Pathogenese bzw. unterschiedliche Entität der Endometriose auf Grund ihres unterschiedlich aggressiven und infiltrativen Verhaltens diskutiert (Matsuzaki et al 2009), so dass manche Autoren sogar von einer anderen Form bei der intestinalen Endometriose ausgehen. Die Konsequenz wäre sicherlich auch in der angewandten klinischen Medizin dies als gesondertes Krankheitsbild zu betrachten und ggf. auch anders zu behandeln.

Wir haben zusätzlich eine Unterteilung der Peritonealendometriose in Aktivitätsstadien vorgenommen, ausgehend von einem makroskopischen und mikroskopischen Aspekt der Endometrioseherde. In unserem Fall liegen etwas mehr als zwei Drittel inaktive Läsionen vor. Betrachtet man dieses, verwundert es wiederum nicht, dass die MMP-2 hier weniger angefärbt ist als bei der infiltrativen Darmendometriose, unter der Voraussetzung, das man von einem makroskopischen Aspekt auf einen Aktivitätsgrad schließen kann.

Zum Tragen kommt, dass unsere Fallgruppen zu klein sind, als das ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Endometriosegruppen auszumachen wäre, d.h. es ist lediglich eine Tendenz die man bewerten kann. Folglich kann man vielleicht die Aussage treffen, das bei einem signifikanten Unterschied mit $p= 0,0209$ betreffend der MMP-2 eine wesentlich weniger aggressive und weniger infiltrative Form der Peritonealendometriose zu Grunde liegt, verglichen mit dem gut differenzierten Endometriumkarzinom.

Zusammenfassend zeigt sich MMP-2 am stärksten nachweisbar beim Endometriumkarzinom. Die infiltrative Darmendometriose weist tendenziell jedoch auch eine stärkere Anfärbbarkeit gegenüber der Peritonealendometriose auf.

5.2 MMP-9

Wie auch die Gelatinase A kommt die Gelatinase B nicht nur physiologisch in der Proliferationsphase des Endometriums vor, sondern vermehrt auch im hyperplastischen Endometrium und beim Endometriumkarzinom (Graesslin et al 2005). Prinzipiell ist die MMP-9 auch eine Kollagenase, die maßgeblich an Invasion und Infiltration bei vielen Tumorleiden bzw. auch bei der Endometrioseausbreitung eine wesentliche Rolle spielt (Shaco-Levy et al 2008). Überraschenderweise zeigen sich unsere Ergebnisse gegenläufig zu den mit MMP-2 vorgenommenen Färbungen. Die insgesamt schwächer ausgefallene Färbung bzw. Färbeintensität, die auf Grund der Auswahl des Bewertungssystems des IRS (Färbeintensität x Prozentsatz der positiven Zellen) niedrigere Gesamtscores erbringt, zeigt eine Übereinstimmung dahingehend, das auch hier die Gruppe der Endometriumkarzinome den prozentual höchsten Anteil an positiven und stark positiven Ergebnissen zeigt (71,05%). Da das Karzinom von den drei untersuchten Gewebe das aggressivste und infiltrativste darstellt ist dies ein Ergebnis, das zu erwarten war.

Jedoch sind bei den endometriotischen Läsionen, jene vermehrt positiv, die im Peritoneum lokalisiert sind. Streng genommen zeigen sich hier, wie bei den MMP-2 Färbungen, 59,09% der Fälle positiv. Damit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass eigentlich eher eine vergleichbar weniger starke Anfärbung der Präparate bei der infiltrativen Darmendometriose vorliegt. Hier zeigen sich nur 44,40% positiv, im Vergleich zu den 74,04 % positiv gefärbten Schnitten mit MMP-2.

Insgesamt können auch hier unsere Untersuchungen nur Tendenzen zeigen, da bei dem letztendlich geringen Unterschied, dieser statistisch nicht signifikant ist. Sodann müsste man mit mehr Fällen pro Gruppe die Färbungen wiederholen um diese Tendenzen, die sich abzeichnen, zu bestätigen. Wieso es aber zu dieser zunächst gegensätzlich erscheinenden Aussage kommt, kann vielerlei Ursachen haben. Angemerkt seien an dieser Stelle bereits die Fehlerquellen bei rein immunhistochemischen Vorgehen, die an späterer Stelle noch einmal ausführlichst beleuchtet werden. Neben der Methodik ist auch inhaltlich in der Literatur kontrovers diskutiert, ob nicht die infiltrative Endometriose, also ein fortgeschrittenes Stadium der Endometriose, nach der revidierten Fassung der American Society for reproductive medicine ein Stadium IV, nicht eine tendenziell inaktivere Form darstellt

und so folglich im Vergleich zur Peritonealendometriose weniger MMP's und Angiogenesefaktoren aufweist (Grund et al 2008, Malik et al 2002).

Die Unterscheidung von aktiven und inaktiven Läsionen wurde in dieser Arbeit nur für die Peritonealendometriose und auch dort nur nach rein makro- und mikroskopischen Kriterien durchgeführt.

Zusammenfassend zeigt sich MMP-9 am stärksten nachweisbar beim Endometriumkarzinom. Ein vergleichbar starkes Expressionsverhalten zeigen die beiden Endometrioseformen, d.h. etwa die Hälfte der Gewebeschnitte bei beiden Gruppen sind positiv anfärbbar, bei jedoch insgesamt bezüglich der Färbeintensität schwächer ausfallendem Ergebnis im Vergleich zur MMP-2 Färbung.

5.3 PCNA

Der auch hier angewandte monoklonale Antikörper PC10 markiert in konventionell fixiertem Gewebe proliferierende Bezirke (Hall et al 1990). In diesem Sinne nutzten wir diesen Marker um das Proliferationsverhalten sowohl bei den endometriotischen Läsionen als auch beim Karzinom des Endometriums zu beurteilen und etwaige Unterschiede darzustellen und diese in Korrelation zu den MMP Antikörperfärbungen und einem makroskopischen Aspekt zu setzen.

Bei unserem Ergebnis zeigt sich erstaunlicherweise die infiltrative Darmendometriose als stärkstes proliferierendes Gewebe. Insgesamt waren 66,66% mit einer über 70 % positiven Zellkernfärbung als stark proliferierendes Gewebe zu werten. Die Gewebeschnitte der Endometriumkarzinome zeigen in der Mehrheit (55,26%) nur eine mäßige Proliferation, d.h. zwischen 20 und 70% positive PCNA Bereiche. Mit einem $p= 0,0008$ ist dieser Unterschied zur Darmendometriose auch als statistisch signifikant zu bewerten.

Für dieses Ergebnis gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Zunächst einmal spielt auch hier die Auswertungsmethode eine Rolle. Es wurde anders als bei den beiden anderen Antikörpern nur repräsentative Areale ausgezählt. Die Gewebeschnitte der Endometriumkarzinome zeigen im Durchschnitt mehr Material auf einem Objektträger und es ist daher aufwendiger einen wirklich repräsentativen Bereich zu bestimmen und das Risiko einen solchen nicht zu treffen entsprechend größer. Des

Weiteren wurden in diese Gruppe ältere Paraffinblöcke mit einbezogen. Auch dabei besteht ein höheres Risiko der Verfälschung, da das Alter der Gewebeprobe einen Einfluss auf die Färbequalität haben kann.

Schließlich wurden hier nur gut differenzierte Endometriumkarzinome ausgewählt, die im Vergleich zu schlecht differenzierten Endometriumkarzinomen ein weniger starkes Proliferationsverhalten zeigen. Simionescu et al zeigte 2006 das bei gut differenzierten Endometriumkarzinomen nur 40% der Zellkerne sich positiv mit PCNA darstellten, folglich nur ein mäßiger Proliferationsindex vorlag im Vergleich zu anderen schlechter differenzierten Endometriumkarzinomen, die einen Färbeindex bis zu 85% aufwiesen.

Ebenfalls ist zu diskutieren, ob PCNA als alleiniger Marker ausreicht um eine Aussage über ein Proliferationsverhalten eines Gewebes zu treffen. Zahlreiche Studien haben die Aussagekraft von PCNA, der schon lange genutzte Marker in der Immunhistochemie gegenüber anderen Zellkernproliferationsmarkern wie Ki 67, 5-Bromodeoxyuridine und in situ Hybridization von Histon mRNA (ISH) untersucht und kommen zu dem Schluss, dass PCNA je nach Gewebe nicht mit der Proliferation *in vivo* korreliert und die o.g. anderen Marker zu bevorzugen sind (Zacchetti et al 2003, Muskhelishvili et al 2003, Mokry et al 1995).

Übereinstimmend mit unserem Ergebnis, dass die infiltrative Darmendometriose sich als stärker proliferierendes Gewebe gegenüber der oberflächlichen Peritonealendometriose darstellt, zeigten mehrere Studien Proliferationsunterschiede bezüglich unterschiedlicher Endometrioselokalisationen (Scotti et al. 2000, Nisolle et al. 1997). Bei 54,55% der Präparate mit Peritonealendometriose kann nur eine mäßige bzw. schwache (<20%) Proliferation ermittelt werden. Dieser Unterschied kann hier in unserer Untersuchung mit einem $p=0,0394$ als statistisch signifikant gewertet werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass die infiltrative im Darm lokalisierte Endometriose eine höhere Proliferationsrate zeigt und aggressiver als die Peritonealendometriose ist. Die MMP-2 Färbung hat dasselbe Ergebnis erbringen können.

Abschließend ergibt sich für die Färbung mit PCNA das stärkste Färbeergebnis für die infiltrative Darmendometriose und sie ist hiermit als stärkstes proliferierendes Gewebe gegenüber der Peritonealendometriose und dem Endometriumkarzinom statistisch signifikant nachgewiesen.

5.4 Makroskopische und Mikroskopische Aspekte

Die Endometrioseläsionen können in unterschiedlichem Aktivitätsstadium nebeneinander vorliegen. Zur Einteilung stellt sich die Frage, ob man dabei auf makroskopisches bzw. mikroskopisches Aussehen zurückgreifen kann bzw. dieses einen Rückschluss auf das Proliferationsverhalten zulässt. Makroskopisch unterscheidet man rote von weißen bzw. bläulich schwarzen Endometrioseherden bei der Peritonealendometriose (Tab.1).

Die Aktivität des jeweiligen Endometrioseherdes ist ein relevanter Faktor zur möglichen Erstellung eines individuellen Therapiekonzeptes. Denn nur das Vorliegen der Endometriose impliziert nicht etwa die Notwendigkeit einer Behandlung (Schweppes KW 2003).

In unseren Untersuchungen haben wir unter zu Hilfenahme von Operationsberichten und pathologischen Befundberichten eine entsprechende Einteilung der Peritonealendometriose in aktive und inaktive Herde nach makro- und mikroskopischen Aspekten vorgenommen.

Sicherlich kann man bei der geringen Fallzahl nur eine Tendenz ablesen. Wir bezeichneten insgesamt 5 Läsionen als aktiv und 12 Herde eher als inaktiv. 5 Fälle mussten wir aus der Wertung nehmen, da eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war (Abb.12 und Tab.14).

Korrespondierend zu unserem Ergebnis stellte schon Fujishita et al 1999 die Unterschiede im Proliferationsverhalten mittels PCNA in den in unterschiedlichen Aktivitätsstadien befindlichen Endometrioseherde fest. Wir beobachten, dass eine starke Proliferation (>70%) in 4 der 5 Fälle der aktiven, roten Läsionen und 8 von den 12 Präparaten der inaktiv zugeordneten Läsionen eine geringe bis mäßige Proliferation zeigten.

Dieselbe Tendenz kann bei den Färbungen mit MMP-2 und MMP-9 entdeckt werden. Bei den inaktiv gewerteten Läsionen zeigt sich bei beiden MMP Färbungen kein IRS > 6. Die aktiven Herde sind bei den MMP-2 Färbungen in 4 der 5 Fälle mit einem IRS von 12 bewertet. Bei der schwächeren Färbung von MMP-9 zeigen 3 der 5 Präparate einen hohen Score von 8,9 und 12.

Verschiedene Studien konnten ein unterschiedlich starkes Vorkommen bzw. Expressionsmuster von MMP's entsprechend einem Aktivitätsstadium zeigen. So

konnte Kokorine et al nach Einteilung in weiße, schwarze und rote Endometrioseherde die verstärkte Expression von MMP-1 direkt mit deren Aktivitätszustand korrelieren.

Unsere Untersuchungsergebnisse zeigen eine Korrelation zwischen makro- und mikroskopischen Aspekten und dem Aktivitätsstadium der Peritonealendometriose.

5.5 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine bewährte Methode zur Darstellung von Proteinen in Geweben bzw. in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle. Diese Proteine werden mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. Zu Grunde liegend ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Zu beachten ist allerdings, dass diese Methode auch einige Fehlerquellen und Störgrößen beinhaltet.

Bei unseren Untersuchungen wurde eine rein manuelle Technik der immunhistochemischen Färbungen vorgenommen. Somit hat jeder einzelne Färbeprozess das Risiko der Variabilität in der Zusammensetzung, der für die jeweilige Färbung benutzten Pufferlösung, Chemikalien und Antikörpergemische, die letztendlich einen Einfluss auf die Stärke der immunhistochemischen Reaktion haben können. Um diesen Problem entgegenzusteuern, wurde eine maximal mögliche Anzahl von Objektträgern in einem Versuchsdurchgang gefärbt.

Doch auch die Auswertung einer immunhistochemischen Methodik ist kritisch zu hinterfragen. Es ergibt sich immer eine inter- und intra-observer Variabilität.

In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse durch zwei Beobachter ausgezählt. Es kann zu abweichenden Ergebnissen bei der Bewertung ein und derselben Färbung durch die beiden Beobachter kommen (interobserver Variabilität), als auch durch ein und denselben Beobachter bei mehrfach hintereinander Betrachtung derselben Färbung (intraobserver Variabilität). Des Weiteren spielt das zu erwartende Ergebnis eine Rolle. Zur Vermeidung dieser Art von Fehlerquelle und Erreichen einer möglichst hohen Objektivität wurde die Auswertung ohne Kenntnis weiterer klinischer Daten vorgenommen.

Störgröße kann auch das Bewertungssystem der immunhistochemischen Auswertung sein. Der in unserer Untersuchung angewandte IRS, ist der weitverbreitetste im klinischen Alltag. Er beinhaltet zusätzlich zum Prozentsatz der

positiven Zellen die Bewertung der Färbeintensität, d.h. ein Gewebe, in dem nur ein IRS von 3 erreicht wird, kann auch zustande kommen durch 50-80% positive Zellen bei schwacher Färbeintensität. So sind auch die insgesamt niedrigen IRS Werte bei der Färbung mit MMP-9 zu erklären.

Zu Bedenken bleibt auch immer das *in vitro* vorgenommene Vorgehensweise letztendlich nur Momentaufnahmen sind und so ein möglicherweise verzerrtes Bild eines dynamischen molekularen Prozesses wiedergeben. Das eigentlich stattfindende komplexe Schema von Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen, dass zu einem Prozess wie Infiltration d.h. Durchbrechen von Basalmembranen führt, steht *in vivo* ein deutlicher Unterschied zu den vielleicht *in vitro* nachgewiesenen Faktoren und so implizierten möglichen Funktionen.

Abschließend wäre anzumerken, dass in Betrachtung der o.g. Anfälligkeit für Fehlerquellen in der immunhistochemischen Methodik, mindestens eine weitere genaue Quantifizierungsmethode zum Beispiel eine PCR durchgeführt werden sollte um die Ergebnisse zu verifizieren.

6. Zusammenfassung

Mit einer Inzidenz von 40.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland ist die Endometriose eine häufige und durch ihre möglichen Symptome und Folgen eine wichtige Erkrankung im Bereich der Frauenheilkunde. Trotzdem bleiben bis heute viele Fragen zur Pathogenese und den Ursachen eines ggf. aggressiv-infiltrativen Wachstums offen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Proliferationsaktivität von Darmendometriose im Vergleich zur oberflächlichen Peritonealendometriose und zum endometrioiden Adenokarzinom des Corpus uteri anhand der Expression von MMP-2, MMP-9 und PCNA zu untersuchen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass es Unterschiede im Expressionsverhalten der verschiedenen Antikörperfärbungen gibt. MMP-2 und PCNA sind vermehrt in der infiltrativen Darmendometriose im Vergleich zur Peritonealendometriose zu finden. Dabei ist der Unterschied bei der PCNA-Färbung mit $p=0,0394$ als statistisch signifikant zu bezeichnen. Für MMP-9 stellen wir eine vermehrte Expression für die Peritonealendometriose fest. Jedoch erreicht dieses Ergebnis keine statistisch signifikante Relevanz.

Hinsichtlich des Vergleiches zum gut differenzierten Endometriumkarzinom erweist sich die infiltrative Darmendometriose als stärker proliferierendes Gewebe. Dies verdeutlicht die PCNA Färbung mit einem statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,0008$).

Mit der höchsten MMP 2 und MMP-9 Expression der drei Gewebearten bestätigt sich jedoch die Annahme, dass ein malignes Geschehen noch aggressiver und infiltrativer ist, als die benigne zu bezeichnende Endometriose. Möglicherweise finden hier jedoch ähnliche molekularpathologische Prozesse statt wie beim Endometriumkarzinom.

Zur Validierung der hier beschriebenen Korrelation zwischen makroskopischen Aspekten und dem Proliferationsverhalten, erscheinen weitere Studien mit größeren Fallgruppen erstrebenswert. In diese sollte auch der Nachweis von Angiogenesefaktoren einbezogen werden. Ein quantifizierbarer Nachweis unterschiedlicher Aggressivitätsstufen der Endometriose kann einen großen Vorteil erbringen. Zum besseren Verständnis der Pathogenese der Endometriose und die

sich hieraus mögliche Entwicklung einer individuelleren Therapie können die hier vorgestellten Ergebnisse einen Beitrag leisten.

7. Literatur

American Society For Reproductive Medicine (1997): Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis. *Fertility and Sterility* 67: 817–821

AWMF-Leitlinienregister (2010): Diagnostik und Therapie der Endometriose

Bazot M, Lafont C, Rouzier R, Roseau G, Thomassin-Naggara I, Darai E. (2009): Diagnostic accuracy of physical examination, transvaginal sonography, rectal endoscopic sonography, and magnetic resonance imaging to diagnose deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril* 92: 1825-1833

Beresford S.A.A., Weiss N.S., Voigt L.F., McKnight B. (1997): Risk of endometrial cancer in relation to use oestrogen combined with cyclic progestagen therapy in postmenopausal women. *The Lancet* 349: 458-461

Bergqvist A., Ljungenberg O., Skoog L. (1993): Immunohistochemical analysis of oestrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium. *Hum Reprod* 8: 1915-1922

Bravo R., Macdonald-Bravo H. (1987): Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J.Cell.Biol.* 105: 1549-1554

Busacca M., Bianchi S., Agnoli B., Candiani M., Calia C., De Marinis S., Vignali M. (1999): Follow-up of laparoscopic treatment of stage III-IV endometriosis. *J AM Assoc Gynecol Laparosc* 6: 55-58

Chilosi M., Lestani M., Pedron S., Montagna L., Benedetti A., Pizzolo G., Menestrina F.(1994): A rapid immunostaining method for frozen sections. *Biotech. Histochem.* 69: 235-239

Chung HW, Wen Y, Chun SH, Nezhat C, Woo BH, Lake Polan M. (2001): Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. *Fertil Steril* 2001; 75: 152–159

Chung HW, Lee JY, Moon HS, Hur SE, Park MH, Wen Y, Polan ML (2002): Matrix metalloproteinase-2, membranous type 1 matrix metalloproteinase, and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in ectopic and eutopic endometrium. *Fertil Steril.* 78(4): 787-95

Cockett MI, Murphy G, Birch ML, O'Connell JP, Crabbe T, Millican AT, Hart IR, Docherty AJP (1998): Matrix metalloproteinases and metastatic cancer. *Biochem. Soc. Symp.* (998) 295-313

Diedrich, Hohgreve W., Jonat W., Schneider K.-T.M., Weiss J.M. (2000): *Endometriose. Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe*, Springer Verlag

Di Nezza LA, Misajon A, Zhang J, Jobling T, Quinn MA, Ostor AG, Nie G, Lopata A, Salamonsen LA. (2002): Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. *Cancer* 94: 1466-1475

Doniec JM, Kahlke V, Peetz F, Schniewind B, Mundhenke C, Löhnert MS, Kremer B. (2003): Rectal endometriosis: high sensitivity and specificity of endorectal ultrasound with an impact for the operative management. *Dis Colon Rectum* 46(12):1667-73.

Donnez J., Squifflet J., Pirard C., Jadoul P., Wyns C., Smets M. (2002): The efficacy of medical and surgical treatment of endometriosis- associated infertility and pelvic pain. *Gynecol Obstet Invest* 54 Suppl 1: 2-10

Falcone T., Goldberg JM., Miller KF.(1996): Endometriosis: medical and surgical intervention. *Curr Opin Obstet Invest* 54 Suppl 1: 2-10

Fujii S (1991): Secondary mullerian system and endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 165:219-225

Fujishita A, Hasuo A, Khan KN, Masuzaki H, Nakashima H, Ishimaru T. (1999): Immunohistochemical study of angiogenic factors in endometrium and endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 1999;48 Suppl 1:36-44.

Giudice LC and Kao LC (2004) Endometriosis. *Lancet* 364,1789–1799

Graesslin O., Cortez A., Fauvet R., Lorenzato M., Birembaut P., Daraï E. (2006): Metalloproteinase-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: a clinical-pathological correlation study. *Annals of Oncology* 17: 637-645

Grund EM, Kagan D, Tran CA, Zeitvogel A, Starzinski-Powitz A, Nataraja S, Palmer SS (2008): Tumor Necrosis Factor-Regulates Inflammatory and Mesenchymal Responses via Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase, p38, and Nuclear Factor kappaB in Human Endometriotic Epithelial Cells. *Mol Pharmacol* 73:1394–1404,

Gu ZD, Chen KN, Li M, Gu J, Li JY (2005): Clinical significance of matrix metalloproteinase-9 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol.*14(6): 871-4

Guo W, Chen G, Zhu C, Wang H (2002): Expression of matrix metalloproteinase-2, 9 and its tissue inhibitor-1, 2 in endometrial carcinoma. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*.37(10):604-7

Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Campeljoh R, Dover R, Waseem N, Lane DP (1990): Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.*162: 285-94

Harada T, Iwabe T and Terakawa N (2001) Role of cytokines in endometriosis. *Fertil Steril* 76,1–10.

Healy DL, Rogers PAW, Hii L, Wingfield M (1998). Angiogenesis: A new theory for endometriosis. *Hum Reprod Update* 4: 736–740.

Hibbs MS, Hastv KA, Sever JM, Kang AH, Mainardi CL (1985): Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* 260: 2493-2500

Hibbs MS, Hoidal JR, Kang AH (1987): Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured collagens by cultured human alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* 80: 1644-1650

Hong R., Chakravarty D. (2003): The Human Proliferating Cell Nuclear Antigen Regulates Transcriptional Coactivator p300 Activity and Promotes Transcriptional Repression. *J. Biol. Chem.* 278: 44505-44513

Hudelist G, Singer CF, Keckstein J (2005): Matrix metalloproteinases and their role in menstruation and endometriosis. *Zentralbl Gynakol.* 127(5): 320-4

Hudelist G, Tuttlies F, Rauter G, Pucher S, Keckstein J. (2009): Can transvaginal sonography predict infiltration depth in patients with deep infiltrating endometriosis of the rectum? *Hum Reprod* 24: 1012-1017

Hudelist G, Oberwinkler KH, Singer CF, Tuttlies F, Rauter G, Ritter O, Keckstein J. (2009): Combination of transvaginal sonography and clinical examination for preoperative diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod* 24 1018-1024

Inoue M. (2001): Current molecular aspects of the carcinogenesis of the uterine endometrium. *Int J Gynecol Cancer*. 11: 339–348.

Inoue Y, Abe K, Obata K, Yoshioka T, Ohmura G, Doh K, Yamamoto K, Hoshiai H, Noda K. (1997): Immunohistochemical studies on matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and type-IV collagen in endometrial carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res*. 23(2):139-45.

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. (2005): Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 55:10-30.

Kämmerer U., Kapp M., Gassel A.M., Richter T., Tank C., Dietl J., Ruck P. (2001): A New Rapid Immunohistochemical Staining Technique Using the EnVision Antibody Complex. *J. Histochem Cytochem*. 49(5): 623-630

Kim HO, Yang KM, Kang IS, Koong MK, Kim HS, Zhang X, Kim I (2007): Expression of CD44s, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases-2 and Ki-67 in peritoneal, rectovaginal and ovarian endometriosis. *J.Reprod Med.*, 52(3): 207-13

Kokorine I, Marbaix E., Henriet P et al (1996): Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J Cell Sci* 109:2151-2160

Kokorine I, Nisolle M, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E. (1997): Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) is related to the activity of human endometriotic lesions. *Fertil Steril.* 68(2):246-51.

Koninckx PR, Barlow D, Kennedy S. (1999): Implantation versus infiltration: the Sampson versus the endometriotic disease theory. *Gynecol Obstet Invest.* 47 Suppl 1:3-9; discussion 9-10.

Kunishio K, Okada M, Matsumoto Y, Nagao S. (2003): Matrix metalloproteinase-2 and -9 expression in astrocytic tumors. *Brain Tumor Pathol.* 20 (2): 39-45

Lelongt B., Trugnan G., Murphy G., Ronco PM. (1997): Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are produced in early stages of kidney morphogenesis but only MMP-9 is required for renal organogenesis in vitro. *J of Cell Biol.* 136(6): 1363-1373

Liokumovich P., Goldberg I., Davidson B., Gotlieb WH., Zahavi T., Ben Baruch G. (1999): Expression of metalloproteinases endometrial stromal sarcoma: immunohistochemical study using image analysis. *J Clin Pathol* 52: 198-202

Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1989): Metalloproteinases and Malignant Conversion: Does Correlation Imply Causality? *Journal of the National Cancer Institute*, 81 (8): 556 -557

Malik E., Kressin P., Buchweitz O., Diedrich K. (2002): Endometriose und Aktivität. *Gynäkologe* 35:232–237

Mariani A, Webb MJ, Keeney GL, Calori G, Podratz KC (2001): Hematogenous dissemination in corpus cancer. *Gynecol Oncol.* 80:233-8.

Matsuzaki S, Maleysson E, Darcha C (2009): Analysis of matrix metalloproteinase-7 expression in eutopic and ectopic endometrium samples from patients with different forms of endometriosis. *Human Reproduction* Vol.00, No.0 pp. 1–9

Meyer R. (1919): Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenomyome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zentralbl Gynäkol* 43: 745-750

Miyashi K., Fritzler M.J., Tan E.M. (1978): Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.* 121: 2228-34

Mokrý J, Němecek S (1995): Immunohistochemical detection of proliferative cells. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove.* 38(3):107-13.

Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. (2003): Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem.* 51(12):1681-8.

Mutter GL and The Endometrial Study Group (2000): Endometrial intraepithelial neoplasia (EIN): will it bring order to chaos. *Gynecol Oncol.* 76: 287–290.

Murray G.I., Duncan M.E., O'Neil P., McKay J.A., Melvin W.T, Fothergill J.E. (1998): Matrix Metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in oesophageal cancer. *J.Pathol,* 185: 256-261

Murray G.I. (1998): Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut* 43: 791-7

Nishida C., Reinhard P., Linn S. (1988): DNA repair synthesis in human fibroblasts requires DNA polymerase delta. *J. Biol. Chem.* 263: 501-10

Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. (1997): Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 1997;68:912–919.

Özen Ö., Krebs B., Hemmerlein B., Pekrun A., Kretzschmar H., Herms J. (2004): Expression of Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in Medulloblastomas and their prognostic relevance. *Clinical Cancer Research* Vol.10, 4746-4753

Osteen KG, Yeaman GR, Bruner-Tran KL (2003): Matrix metalloproteinases and endometriosis. *Semin Reprod Med.* 21(2): 155-64

Park DW, Ryu HS, Choi DS, Park YH, Chang KH, Min CK. (2001): Localization of matrix metalloproteinases on endometrial cancer cell invasion in vitro. *Gynecol Oncol.* 82(3):442-9.

Pritchard SC, Nicolson MC, Lloret C, McKay JA, Ross VG, Kerr KM, Murray GI, McLeod HL (2001): Expression of matrix metalloproteinases 1,2,9 and their tissue inhibitors in stage II non-small cell lung cancer: implications for MMP inhibition therapy. *Oncol Rep* 8(2): 421-4

Ravanti L., Kähäri VM., (2000): Matrix metalloproteinases in wound repair. *Int. J Mol Med.* 6(4):391-407

Raza SL, Cornelius LA. (2000): Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *J Investigative Dermat Symp Proceed* 5: 47–54.

Remmele W., Stegner H.E. (1987): Vorschlag zur einheitlichen Definition eines immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologe* 8: 138-140

Ria R., Loverro G., Vacca A et al (2002): Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 agree with progression of ovarian endometriomas. Eur J Clin Invest 32: 199-206

Sabeh F, Fox D, Weiss SJ (2010): Membrane-type I matrix metalloproteinase-dependent regulation of rheumatoid arthritis synoviocyte function. J Immunol. 184(11):6396-406.

Sampson J (1927): Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. Am J Obstet Gynecol 14:422-469

Schindler A.E. (2007): Epidemiologie, Pathogenese und Diagnostik der Endometriose, J. für Fertilität und Reproduktion ,17(4): 22-27

Schweppe KW. (2003): Endometriose - Eine Erkrankung ohne Lobby. Zentralbl Gynäkol 125, 233

Schweppe KW. (2000): Aktivität der Endometriose – Therapierelevanz bei Schmerz- und Sterilitätspatientinnen. In: Mettler L. Endometriose. PMI, Frankfurt, 58–67.

Scotti S, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E. (2000): Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. Mol Hum Reprod 6:610–617.

Selvais C, Gaide Chevonnay HP, Lemoine P, Dedieu S, Henriët P, Courtoy PJ, Marbaix E, Emonard H. (2009): Metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 ectodomain decreases endocytic clearance of endometrial matrix metalloproteinase-2 and -9 at menstruation. Endocrinology. 150(8):3792-9.

Semm K (1983): Die Klassifikation der Endometriose. Endometriose 1

Shaco-Levy R, Sharabi S, Benharroch D, Piura B, Sion-Vardy N. (2008): Matrix metalloproteinases 2 and 9, E-cadherin, and beta-catenin expression in endometriosis, low-grade endometrial carcinoma and non-neoplastic eutopic endometrium. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 139(2):226-32

Siegenthaler W., Blum H.E. (2006): Gestörte Matrixhomöostase. Klinische Pathophysiologie , Thieme 9. Auflage

Sillem M, Prifti S, Koch A, Neher M, Jauckus J, Runnebaum B. (2001): Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in uterine endometrial cells of patients with and without endometriosis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 95: 167–174

Simionescu C, Georgescu CV, Mărgăritescu C, Bălă S, Marinescu M, Enăchescu V, Pătru E. (2006): P53 and PCNA immunoexpression in endometrial carcinomas. Rom J Morphol Embryol. 47(2):137-41.

Steck T., Felberbaum R., Küpker W., Brucker C., Finas D. (2004): Endometriose – Entstehung, Diagnose, Verlauf und Therapie. Springer-Verlag Wien

Stetler-Stevenson WG (1994): Proteases and their inhibitors in invasion and metastasis. Progelatinase A activation during tumor cell invasion. Inv. Metast. 14 (5) 259-268

Tan C.K., Castillo C., So A.G., Downey K.M. (1986): An auxiliary protein for DNA polymerase delta from fetal calf thymus. J. Biol. Chem. 261: 12310-6

The American Fertility Society (1997): Revised American Fertility Society for reproductive medicine classification of endometriosis. Fertil. Steril. 67: 817-821

Toshi L., Bravo R. (1988): Changes in cyclin/PCNA distribution during DNA repair synthesis. *J. Cell. Biol.* 107: 1623-8

Ulrich U, Müller F, Tuttlies F, Keckstein J. (2009): Diagnostik und Therapie der Endometriose - aktuelle Entwicklungen. *Frauenarzt* 50: 506-510

Uzan C., Cortez A., Dufournet C., Fauvet R., Siffroi J.-P., Daraï E. (2004): Eutopic endometrium and peritoneal, ovarian and bowel endometrial tissues express a different profile of matrix metalloproteinases-1 and -2. *Virchows Arch* , 445: 603-609

Vassileva V, Millar A, Briollais L et al (2004): Apoptotic and growth regulatory genes as mutational targets in mismatch repair deficient endometrioid carcinomas of young patients. *Oncol Reprod.* 11: 931–937

Visse R, Nagase H (2003): Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. *Circ Res.* 92(8): 827-839

Von Rokitansky C. (1860): Über Uterusdrüsen – Neubildung in Uterus und Ovarialsarkomen. *Ztsch K K Gesellsch der Ärzte zu Wien* 37, 577-81

Wenzl RJ, Heinzl H. (1998): Localization of matrix metalloproteinase-2 in uterine endometrium and ectopic implants. *Gynecol Obstet Invest* 45: 253–257

Woessner JF.(1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5: 2145–2154

Woods A.L, Hall P.A., Shepherd N.A., Hanby A.M., Waseem N.H., Lane D.P., Levison D.A. (1991): The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to

histological grade, S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. *Histopathol.*19: 21-2

Wu MY and Ho HN (2003) The role of cytokines in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 49,285–296.

Yu C.-W., Wilkinson N., Brito M.J., Buckley C.H., Fox H. , Levison D.A. (1993): Patterns of immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 in benign and neoplastic human endometrium. *Histopathology* 23: 367-71

Yu C.-W., Hall P.A., Fletcher C.D.M., Camplejohn R.S., Waseem N.H., Lane D.P., Levison D.A. (1991): Haemangiopericytomas. The prognostic value of immunochemical staining with a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 19: 29-33

Yu AE, Hewitt RE, Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1996): Molecular regulation of cellular invasion - role of gelatinase A and TIMP-2. *Biochem. Cell Biol.* 74 823-831

Zacchetti A, van Garderen E, Teske E, Nederbragt H, Dierendonck JH, Rutteman GR. (2003): Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of KI-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus *in vivo* bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. *APMIS.* 111(3):430-8.

8. Anhang

8.1 Pufferlösungen

Citratpuffer:

0,01 molarer Zitronensäure (Citronensäure-Monohydrat, Fa. Merck, Darmstadt)

1 molarer Natronlauge (NaOH (1N), Fa. Merck, Darmstadt)

Destilliertes Wasser

pH-Wert: 6,0

TBS-Puffer:

83,6 g NaCl (Walter GmbH&CoKg, Kiel)

12 g Tris(hydroxymethyl)-aminoethan (Fa. Merck, Darmstadt)

25% HCL (Salzsäure Fa. Merck, Darmstadt)

Destilliertes Wasser

pH-Wert: 7,4-7,6

8.2 Tabellen

Fall	Gewebe	PP	SI	Score
1	Abradat, mittelgradig differenziert, endometrioides AdenoCa	4	2	8
2	pT1c G1 endometrioides AdenoCa	4	3	12
3	pT1b/c G1 endometrioides AdenoCa	4	3	12
4	pT1b G1 endometrioides AdenoCa	3	3	9
5	pT1a G1 endometrioides AdenoCa	4	2	8
6	Abradat, hochdifferenziertes endometrioides AdenoCa	2	3	6
7	pT1b G2-G3 endometrioides AdenoCa	3	3	9
8	Abradat, hoch differenziertes endometrioides AdenoCa	3	3	9
9	Abradat, mäßig differenziertes endometrioides AdenoCa	2	3	6
10	G1 Hoch differenziertes endometrioides AdenoCa	3	3	9
11	G2 pT1b endometrioides AdenoCa	3	3	9
12	Abradat, hochdifferenziertes endometrioides AdenoCa	0	0	0
13	pT1a G1 endometrioides AdenoCa	1	2	2
14	pT1c G1 endometrioides AdenoCa	2	2	2
15	pT1b G1 endometrioides AdenoCa	3	3	9
16	Abradat, hochdifferenziertes endometrioides AdenoCa	4	3	12
17	pT1c G2 endometrioides AdenoCa	4	3	12
18	pT1c G1 endometrioides AdenoCa	4	3	12
19	pT1c G2-G3 endometrioides AdenoCa	4	3	12
20	pT1c G2 endometrioides AdenoCa	4	3	12
21	pT1b G2 endometrioides AdenoCa	3	3	9
22	pT1c G1 endometrioides AdenoCa	3	3	9
23	pT1b G1 endometrioides AdenoCa	3	3	9
24	pT1b G1 endometrioides AdenoCa	4	3	12
25	Abradat, hochdifferenziertes endometrioides AdenoCa	4	3	12
26	Hochdifferenziertes AdenoCa	2	2	4
27	Hochdifferenziertes AdenoCa	2	3	6
28	Hochdifferenziertes AdenoCa	3	2	6
29	Hochdifferenziertes AdenoCa	0	0	0
30	Hochdifferenziertes AdenoCa	2	1	2
31	Hochdifferenziertes AdenoCa	4	3	12
32	Hochdifferenziertes AdenoCa	3	3	9
33	Hochdifferenziertes AdenoCa	3	2	6
34	Hochdifferenziertes AdenoCa	2	3	6
35	Hochdifferenziertes AdenoCa	4	3	12
36	Hochdifferenziertes AdenoCa	3	3	9
37	Hochdifferenziertes AdenoCa	3	2	6
38	Hochdifferenziertes AdenoCa	4	3	12

Tab.4: Immunreaktivität von MMP-2 in endometrioiden Adenokarzinomen

PP= Prozentsatz der positiven Zellen

SI= Färbeintensität

Fall	Gewebe	PP	SI	Score
1	Rectum	2	1	2
2	Rectum	1	1	1
3	Sigma	3	2	6
4	Rectum	1	2	2
5	Rectum	2	3	6
6	Rectum	4	3	12
7	Rectum	0	0	0
8	Rectum	4	3	12
9	Rectosigmoid	4	1	4
10	Rectum	3	3	9
11	Rectosigmoid	4	3	12
12	Rectum	3	3	9
13	Ileozökalbereich	0	0	0
14	Rectum	4	3	12
15	Kolon	3	3	9
16	Rectum	0	0	0
17	Kolon	4	3	12
18	Rectum	3	3	9
19	Sigma	4	3	12
20	Rectum	3	3	9
21	Sigma	1	2	2
22	Kolon	4	3	12
23	Rectum	2	3	6
24	Sigma	3	3	9
25	Kolon	3	3	9
26	Kolon	4	3	12
27	Sigma	4	3	12

Tab 5: Immunreaktivität von MMP-2 in Endometrioseherde im Darm

PP = Prozentsatz der positiven Zellen

SI = Färbeintensität

Fall	Gewebe	PP	SI	Score	Makroskopie	Beurteilung
1	Vaginale Hinterwand	4	3	12	Frisch blutig gefüllte Zysten	aktiv
2	Peritoneum	4	3	12		
3	Blasendach	2	2	4	Kleine Zysten mit kubischem Epithel	inaktiv
4	Peritoneales Fettgewebe	4	3	12	Regelhaftes endometrioides Epithel, viele Kapillare	aktiv
5	Peritoneum	2	1	2	Zystisch verändertes Gewebe mit kubischem Epithel	inaktiv
6	Douglasraum	3	2	6	Fibrotisches Gewebe, Hämosiderinablagerungen	inaktiv
7	Blasendach	2	1	2		
8	Peritoneum Adnexe	1	1	1	Zystisch, fibrotisch mit Einblutungen	inaktiv
9	Blasenperitoneum	1	2	2	Chronisch entzündlich verändertes Gewebe mit Einblutungen	inaktiv
10	Bauchwand	4	3	12		
11	Perikolisches Fettgewebe	4	3	12	Derbes induriertes perikolisches Fettgewebe, endometrioides Epithel	aktiv
12	Zervix	2	1	2	Abgeflachtes Epithel, siderinbeladene Makrophagen	inaktiv
13	Sakrouterinband	3	2	6	Fibrose , Vernarbung	inaktiv
14	Uterusvorderwand	2	3	6	Weißliche Verkalkungen, kubisches Epithel	inaktiv
15	Sakrouterinband	4	3	12	Hoch zylindrisches, endometrioides Epithel	aktiv
16	Ovar	1	1	1	Zystisch verändert mit älteren Einblutungen	inaktiv
17	Ovar	0	0	0	Weich elastische Konsistenz mit zentraler blutiger Zystenbildung, Verwachsungen, Fibrose	inaktiv
18	Beckenperitoneum	0	0	0		
19	Beckenwand	2	3	6		
20	Beckenwand	2	2	4	Derbes Gewebe, Fibrose	inaktiv
21	Fossa ovarica	1	3	3	Drüsenkomplexe aus hochprismatischen Epithel	aktiv
22	Douglas/Blasendach	1	1	1	Verkalkungen, zystisch erweiterte Drüsen mit kubischem Epithel	inaktiv

Tab 6: Immunreaktivität von MMP-2 in Endometrioseherden im Peritoneum
PP = Prozentsatz der positiven Zellen, SI = Färbeintensität

Fall	Gewebe	PP	SI	Score
1	Abradat, mittelgradig differenziert, endometrioides AdenoCa	3	2	6
2	pT1c G1 endometrioides AdenoCa	4	3	12
3	pT1b/c G1 endometrioides AdenoCa	3	2	6
4	pT1b G1 endometrioides AdenoCa	4	2	8
5	pT1a G1 endometrioides AdenoCa	4	2	8
6	Abradat, hochdifferenziertes endometrioides AdenoCa	0	0	0
7	pT1b G2-G3 endometrioides AdenoCa	0	0	0
8	Abradat, hoch differenziertes endometrioides AdenoCa	3	1	3
9	Abradat, mäßig differenziertes endometrioides AdenoCa	3	2	6
10	G1 Hoch differenziertes endometrioides AdenoCa	4	1	4
11	G2 pT1b endometrioides AdenoCa	1	3	3
12	Abradat, hochdifferenziertes endometrioides AdenoCa	3	2	6
13	pT1a G1 endometrioides AdenoCa	2	1	2
14	pT1c G1 endometrioides AdenoCa	4	3	12
15	pT1b G1 endometrioides AdenoCa	4	2	8
16	Abradat, hochdifferenziertes endometrioides AdenoCa	3	2	6
17	pT1c G2 endometrioides AdenoCa	3	2	6
18	pT1c G1 endometrioides AdenoCa	4	3	12
19	pT1c G2-G3 endometrioides AdenoCa	2	1	2
20	pT1c G2 endometrioides AdenoCa	3	2	6
21	pT1b G2 endometrioides AdenoCa	3	2	6
22	pT1c G1 endometrioides AdenoCa	4	3	12
23	pT1b G1 endometrioides AdenoCa	2	1	2
24	pT1b G1 endometrioides AdenoCa	2	1	2
25	Abradat, hochdifferenziertes endometrioides Adenokarzinom	4	3	12
26	Hochdifferenziertes AdenoCa	4	1	4
27	Hochdifferenziertes AdenoCa	0	0	0
28	Hochdifferenziertes AdenoCa	4	1	4
29	Hochdifferenziertes AdenoCa	0	0	0
30	Hochdifferenziertes AdenoCa	0	0	0
31	Hochdifferenziertes AdenoCa	0	0	0
32	Hochdifferenziertes AdenoCa	4	2	8
33	Hochdifferenziertes AdenoCa	0	0	0
34	Hochdifferenziertes AdenoCa	1	1	1
35	Hochdifferenziertes AdenoCa	3	2	6
36	Hochdifferenziertes AdenoCa	3	3	9
37	Hochdifferenziertes AdenoCa	3	1	3
38	Hochdifferenziertes AdenoCa	3	3	9

Tab.7: Immunreaktivität von MMP-9 in endometrioiden Adenokarzinomen

PP= Prozentsatz der positiven Zellen

SI= Färbeintensität

Fall	Gewebe	PP	SI	Score
1	Rectum	0	0	0
2	Rectum	0	0	0
3	Sigma	0	0	0
4	Rectum	0	0	0
5	Rectum	2	3	6
6	Rectum	4	3	12
7	Rectum	0	0	0
8	Rectum	1	2	2
9	Rectosigmoid	4	1	4
10	Rectum	3	2	6
11	Rectosigmoid	4	3	12
12	Rectum	0	0	0
13	Ileozäkalbereich	0	0	0
14	Rectum	3	2	6
15	Kolon	1	1	1
16	Rectum	0	0	0
17	Kolon	0	0	0
18	Rectum	3	3	9
19	Sigma	2	3	6
20	Rectum	2	3	6
21	Sigma	2	2	4
22	Kolon	2	2	4
23	Rectum	0	0	0
24	Sigma	2	2	4
25	Kolon	1	1	1
26	Kolon	0	0	0
27	Sigma	0	0	0

Tab 8: Immunreaktivität von MMP-9 in Endometrioseherde im Darm

PP = Prozentsatz der positiven Zellen

SI = Färbeintensität

Fall	Gewebe	PP	SI	Score	Makroskopie/ Mikroskopie	Beurteilung
1	Vaginale Hinterwand	3	3	9	Frisch blutig gefüllte Zysten	aktiv
2	Peritoneum	1	1	1		
3	Blasendach	3	1	3	Kleine Zysten mit kubischem Epithel	inaktiv
4	Peritoneales Fettgewebe	0	0	0	Regelhaftes endometrioides Epithel, viele Kapillare	aktiv
5	Peritoneum	0	0	0	Zystisch verändertes Gewebe kubischem Epithel	inaktiv
6	Douglasraum	3	1	3	Fibrotisches Gewebe, Hämosiderinablagerungen	inaktiv
7	Blasendach	2	2	4		
8	Peritoneum Adnexe	3	2	6	Zystisch, fibrotisch mit Einblutungen	inaktiv
9	Blasenperitoneum	1	1	1	Chronisch entzündlich verändertes Gewebe mit Einblutungen	inaktiv
10	Bauchwand	4	2	8		
11	Perikolisches Fettgewebe	4	3	12	Derbes induriertes perikolisches Fettgewebe, endometrioides Epithel	aktiv
12	Zervix	0	0	0	Abgeflachtes Epithel, siderinbeladene Makrophagen	inaktiv
13	Sakrouterinband	3	2	6	Fibrose , Vernarbung	inaktiv
14	Uterusvorderwand	1	1	1	Weißliche Verkalkungen, kubisches Epithel	inaktiv
15	Sakrouterinband	4	2	8	Hoch zylindrisches, endometrioides Epithel	aktiv
16	Ovar	1	1	1	Zystisch verändert mit älteren Einblutungen	inaktiv
17	Ovar	4	1	4	Weich elastische Konsistenz mit zentraler blutiger Zystenbildung, Verwachsungen, Fibrose	inaktiv
18	Beckenperitoneum	0	0	0		
19	Beckenwand	4	2	8		
20	Beckenwand	2	2	4	Derbes Gewebe, Fibrose	inaktiv
21	Fossa ovarica	0	0	0	Drüsenkomplexe aus hochprismatischen Epithel	aktiv
22	Douglas/Blasendach	2	2	4	Verkalkungen, zystisch erweiterte Drüsen mit kubischem Epithel	inaktiv

Tab 9: Immunreaktivität von MMP-9 in Endometrioseherden im Peritoneum

PP = Prozentsatz der positiven Zellen

SI = Färbeintensität

Fall	Gewebe	PP	Fall	Gewebe	PP
1	Abradat, mittelgradig differenziert, endometrioides AdenoCa	81	20	pT1c G2 endometrioides AdenoCa	48
2	pT1c G1 endometrioides AdenoCa	44	21	pT1b G2 endometrioides AdenoCa	68
3	pT1b G1 endometrioides AdenoCa	48,5	22	pT1c G1 endometrioides AdenoCa	74
4	pT1b G1 endometrioides AdenoCa	83,5	23	pT1b G1 endometrioides AdenoCa	48
5	pT1a G1 endometrioides AdenoCa	82,5	24	pT1b G1 endometrioides AdenoCa	33
6	Abradat, hochdifferenziertes endometrioides AdenoCa	26	25	Abradat, hochdifferenziertes endometrioides AdenoCa	54,5
7	pT1b G2-G3 endometrioides AdenoCa	22	26	Hochdifferenziertes AdenoCa	17
8	Abradat, hoch differenziertes endometrioides AdenoCa	20,5	27	Hochdifferenziertes AdenoCa	19
9	Abradat, mäßig differenziertes endometrioides AdenoCa	51	28	Hochdifferenziertes AdenoCa	43
10	G1 Hoch differenziertes endometrioides AdenoCa	78,5	29	Hochdifferenziertes AdenoCa	0
11	G2 pT1b endometrioides AdenoCa	74,5	30	Hochdifferenziertes AdenoCa	3
12	Abradat, hochdifferenziertes endometrioides AdenoCa	30,5	31	Hochdifferenziertes AdenoCa	77,5
13	pT1a G1 endometrioides AdenoCa	12,5	32	Hochdifferenziertes AdenoCa	71
14	pT1c G1 endometrioides AdenoCa	52	33	Hochdifferenziertes AdenoCa	0
15	pT1b G1 endometrioides AdenoCa	60	34	Hochdifferenziertes AdenoCa	40,5
16	Abradat, hochdifferenziertes endometrioides AdenoCa	63,5	35	Hochdifferenziertes AdenoCa	53
17	pT1c G2 endometrioides AdenoCa	73,5	36	Hochdifferenziertes AdenoCa	22,5
18	pT1c G1 endometrioides AdenoCa	35	37	Hochdifferenziertes AdenoCa	41
19	pT1c G2-G3 endometrioides AdenoCa	91,5	38	Hochdifferenziertes AdenoCa	96

Tab.10: Immunreaktivität von PCNA in endometrioiden Adenokarzinomen
PP = positive Zellen in Prozent

Fall	Gewebe	Positive Zellen in %	Fall	Gewebe	Positive Zellen in%
1	Rectum	66	15	Kolon	83,5
2	Rectum	83	16	Rectum	24,5
3	Sigma	76	17	Kolon	16,5
4	Rectum	70	18	Rectum	93,5
5	Rectum	91	19	Sigma	21
6	Rectum	99	20	Rectum	91,5
7	Rectum	45	21	Sigma	85
8	Rectum	68	22	Kolon	98
9	Rectosigmoid	99,5	23	Rectum	52
10	Rectum	93	24	Sigma	84
11	Rectosigmoid	100	25	Kolon	88,5
12	Rectum	12	26	Kolon	97
13	Ileozäkalbereich	59	27	Sigma	70,5
14	Rectum	73			

Tab.11: Immunreaktivität von PCNA in Endometrioseherden im Darm

Fall	Gewebe	Positive Zellen in %	Makroskopie/ Mikroskopie	Beurteilung
1	Vaginale Hinterwand	84	Frisch blutig gefüllte Zysten	aktiv
2	Peritoneum	32,5		
3	Blasendach	82,5	Kleine Zysten mit kubischem Epithel	inaktiv
4	Peritoneales Fettgewebe	5	Regelhaftes endometrioides Epithel, viele Kapillare	aktiv
5	Peritoneum	2	Zystisch verändertes Gewebe mit kubischem Epithel	inaktiv
6	Douglasraum	1,5	Fibrotisches Gewebe, Hämosiderinablagerungen	inaktiv
7	Blasendach	100		
8	Peritoneum Adnexe	81	Zystisch, fibrotisch mit Einblutungen	inaktiv
9	Blasenperitoneum	0	Chronisch entzündlich verändertes Gewebe mit Einblutungen	inaktiv
10	Bauchwand	78		
11	Perikolisches Fettgewebe	96	Derbes induriertes perikolisches Fettgewebe, endometrioides Epithel	aktiv
12	Zervix	18	Abgeflachtes Epithel, siderinbeladene Makrophagen	inaktiv
13	Sakrouterinband	15,5	Fibrose , Vernarbung	inaktiv
14	Uterusvorderwand	12	Weißliche Verkalkungen, kubisches Epithel	inaktiv
15	Sakrouterinband	78,5	Hoch zylindrisches, endometrioides Epithel	aktiv
16	Ovar	38	Zystisch verändert mit älteren Einblutungen	inaktiv
17	Ovar	35	Weich elastische Konsistenz mit zentraler blutiger Zystenbildung, Verwachsungen, Fibrose	inaktiv
18	Beckenperitoneum	24		
19	Beckenwand	0		
20	Beckenwand	98	Derbes Gewebe, Fibrose	inaktiv
21	Fossa ovarica	97,5	Drüsenkomplexe aus hochprismatischen Epithel	aktiv
22	Douglas/Blasendach	80	Verkalkungen, zystisch erweiterte Drüsen mit kubischem Epithel	inaktiv

Tab.12: Immunreaktivität von PCNA in Endometrioseherden im Peritoneum

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. W. Jonat danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Universitätsfrauenklinik Kiel durchführen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Christoph Mundhenke dafür, dass ich den experimentellen Teil dieser Arbeit in dem von ihm geleiteten Onkologielabor 2 der Universitätsfrauenklinik Kiel durchführen konnte, sowie für die vielen fachkundigen Ratschlägen und die Unterstützung bei der Abfassung dieser Arbeit.

Frau Dr. med. Angela Carstensen, danke ich für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die tatkräftige Unterstützung im experimentellen Teil dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Bence Sipos (damals Institut für Allgemeine Pathologie Kiel) möchte ich für die wertvolle Hilfestellung in allen immunhistochemischen und histologischen Fragen danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen MTAs, Mitarbeitern und Doktorandenkollegen des onkologischen Labor 1 und 2 für ein angenehmes und kollegiales Zusammenarbeiten. Insbesondere gilt mein Dank dabei Frau Sigrid Hamann, die mich in das Arbeitsgebiet eingewiesen hat, mich bei meinem experimentellen Teil unterstützt hat und mir immer bei jeglichen Fragen oder Problemen des Laboralltags zur Hilfe gekommen ist. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit.

Ein sehr großes Dankeschön möchte ich allen meinen Freunden und Arbeitskollegen aussprechen, die mich bis zum Schluss immer wieder ermutigt haben und mir hilfreich bis zur Vollendung dieser Arbeit zur Seite standen.

Das letzte Dankeswort gilt meiner Familie. Die vorliegende Arbeit widme ich meinem verstorbenen Vater.

10. Lebenslauf

Julia Krämer

* 02. Mai 1981 in Aachen

Familienstand:

ledig

Staatsangehörigkeit:

deutsch

Schulbildung

1991-2000 Gymnasium Zitadelle Jülich
2000 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

2000-2007 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts
Universität zu Kiel
08/2002 Physikum
08/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003-2004 Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, Spanien
Auslandsstudium im Rahmen des Erasmus
Austauschprogramms
03/2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2006 – 03/2007 Praktisches Jahr
05/2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2007 Approbation

Promotion

2005-2010 Promotion im onkologischen Labor der
Universitätsfrauenklinik zu Kiel, Thema:
„Differentielle Expressionsmuster von MMP-2, MMP-9
und PCNA in verschiedenen Endometriosestadien und
Endometriumkarzinomen“

Weiterbildung

12/2007 – 12/2009 Basischirurgie (Common Trunk) am Evangelischen
Krankenhaus, Düsseldorf

seit 07/2010 Assistenzärztin in Weiterbildung in der Allgemein- und
Viszeralchirurgischen Klinik der Kliniken Maria Hilf,
Mönchengladbach

Düsseldorf, 15.07.2010