

Aus der Praxis und Tagesklinik für Operative Gynäkologie und der Gynäkologischen
Belegabteilung der Klinik des Westens Magdeburg
(Leiter: Prof. Dr. med. habil. H. Donat)

**„Immunhistologische Untersuchungen an Ovarbiopsien von
Frauen mit Ovarialfunktionsstörungen“**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt

von

Uta Krell
aus Magdeburg

Magdeburg 2009

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Krell, Uta:

Immunhistologische Untersuchungen an Ovarbiopsien von Frauen mit Ovarialfunktionsstörungen. – 2009. - 80 Bl. : 33 Abb., 2 Tab., Anl.

Magdeburg, Otto-von-Guericke-Universität Med. Fakult., Diss., 2009

Kurzreferat

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 42 Ovarbiopsien von Frauen mit Ovarialzysten, Endometriose, PCO-Syndrom sowie mit normalen Ovarien immunhistologisch untersucht. Neben dem Nachweis von CD4-, CD8-, CD19-, CD25- und CD56-positiven Lymphozyten-subpopulationen wurde die Expression von Cytokeratin 1, 10, des Insulin-like Growth Factor Receptor 1 (IGF-1R), des Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGF R1), des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und der Insulin Related Aminopeptidase (IRAP) im Gewebe analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass CD4- und CD8-positive T-Zellen besonders beim PCO-Syndrom signifikant vermehrt sind, während B-Lymphozyten (CD19), NK-Zellen (CD56), und die CD25-tragenden Lymphozyten am häufigsten in normalen Ovarien festgestellt wurden. Die Cytokeratine 1, 10 und IGF-1R waren bei den pathologischen Biopsien nicht verstärkt exprimiert. Der VEGF Rezeptor 1 zeigte bei den Ovarialzysten und beim PCO-Syndrom eine stärkere Expression im Stroma als bei den normalen Ovarien. Der EGF-Rezeptor wies im Stroma und in der Tunica albuginea von Biopsien normaler Ovarien die stärkste Anfärbbarkeit auf. Die IRAP war in normalen und PCO-Biopsien am stärksten ausgeprägt. Die Untersuchungen wiesen nach, dass in benigne Ovarialveränderungen immunologische Prozesse auf zellulärer Ebene einbezogen sind. Wachstumsfaktoren spielen dabei ebenfalls eine Rolle. Beim PCO-Syndrom sind die bekannten Veränderungen des Glukosestoffwechsels auch durch die Einbeziehung der Insulin Regulated Aminopeptidase darstellbar.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	5
1.1. Ovarialfunktionsstörungen	5
1.1.1. Primäre Ovarialinsuffizienz	5
1.1.2. Hypothalamische Ovarialinsuffizienz	5
1.1.3. Hyperprolaktinämische Ovarialinsuffizienz	5
1.1.4. Hyperandrogenämische Ovarialinsuffizienz	6
1.2. Ovarialzysten	7
1.3. Endometriose	7
1.4. Problemstellung und Arbeitshypothese der Arbeit	8
2. Material und Methoden	11
2.1. Patientengut	11
2.2. Gewinnung der Ovarbiopsien	11
2.3. Prinzip und Durchführung der Immunperoxidasetechnik	11
2.4. Biostatistische Auswertung	15
3. Ergebnisse	16
3.1. Anamnestische und klinische Daten des Patientengutes	16
3.1.1. Altersverteilung des Patientengutes	16
3.1.2. Allgemeine anamnestische Angaben	17
3.1.3. Gynäkologisch-geburtshilfliche Anamnese	17
3.2. Identifizierung und Häufigkeit der Lymphozytensubpopulationen	23

3.2.1.	T-Helferzellen (CD4)	23
3.2.2.	Zytotoxische T-Zellen (CD8)	24
3.2.3.	B-Zellen (CD19)	26
3.2.4.	Aktivierte Zellen (CD25)	27
3.2.5.	Natürliche Killerzellen (CD56)	29
3.2.6.	Korrelationsanalyse	31
3.3.	Identifizierung und Häufigkeit von Cytokeratinen und Rezeptoren der Wachstumsfaktoren	32
3.3.1.	Cytokeratine 1, 10	32
3.3.2.	Insulin-like Growth Factor Receptor 1 (IGF-1R)	33
3.3.3.	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGF R1)	35
3.3.4.	Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	36
3.4.	Insulin Regulated Aminopeptidase (IRAP)	39
4.	Diskussion	42
5.	Zusammenfassung	61
6.	Literatur	64
7.	Anhang	74
7.1.	Erklärung	74
7.2.	Danksagung	75
7.3.	Lebenslauf	76
7.4.	Urliste der Primärdaten	77

1. Einleitung

1.1. Ovarialfunktionsstörungen

1.1.1. Primäre Ovarialinsuffizienz

Typisches Kennzeichen der primären Ovarialinsuffizienz ist die fehlende Anlage von Follikeln im Ovar oder deren vorzeitiger Verlust. Die häufigsten Ursachen der primären Ovarialinsuffizienz sind die Gonadendysgenesien, das Climacterium praecox und Schädigungen des Keimepithels durch exogene Einflüsse wie Bestrahlungen, Zytostatika oder andere Noxen. Auf Grund der fehlenden negativen Rückkopplung durch Estradiol mit dem hypothalamisch-hypophysären Regelkreis finden sich bei den betreffenden Frauen stark erhöhte Werte von FSH und LH im Serum (Graf 2001). Weiterführende Untersuchungen müssen in diesen Fällen abklären, ob chromosomale Aberrationen vorliegen.

1.1.2. Hypothalamische Ovarialinsuffizienz

Diese Form der Ovarialinsuffizienz ist durch eine reduzierte Aktivität des hypothalamischen Pulsgenerators, der die GnRH-Sekretion steuert, gekennzeichnet. In der Präpubertät und während der Laktation ist die pulsatile Gonadotropinsekretion als physiologischer Vorgang reduziert. Unter pathologischen Bedingungen kommt es je nach Ausmaß der hypothalamischen Funktionseinschränkung zu Amenorrhöen mit unterschiedlichem Schweregrad, der durch Gestagen-, Clomiphen- und GnRH-Teste erfasst werden kann. Nach Stauber und Weyerstahl (2005) sind organische oder funktionelle Ursachen für derartige Störungen verantwortlich. Als organische Ursachen sind Tumoren (z. B. Kraniopharyngeom), Entzündungen (z. B. Meningoenzephalitis) oder Missbildungen (z. B. Kallmann-Syndrom = olfaktogenitales Syndrom) möglich. Als funktionelle Ursachen sind besonders psycho-reaktive Störungen zu nennen, typische Beispiele sind die Anorexia nervosa und die Bulimie sowie extreme physische oder psychische Belastungen.

1.1.3. Hyperprolaktinämische Ovarialinsuffizienz

Eine Hyperprolaktinämie kann durch einen Hypophysentumor (Prolaktinom) oder durch Einnahme bestimmter Medikamente, wie zum Beispiel Dopaminantagonisten, bedingt sein. Durch die erhöhten Prolaktinspiegel kommt es zur Hemmung der pulsatischen GnRH-Ausschüttung und damit zur Reduktion der Ovarialfunktion. Gelegentlich ist eine

Galaktorrhoe feststellbar. Prolaktinwerte oberhalb von 250 ng/ml beweisen das Vorliegen eines Prolaktinoms (Goerke und Valet 2000), wobei die erweiterte Diagnostik die Abklärung der anatomischen Verhältnisse im Hypophysenbereich durch Röntgen der Sella turcica in 2 Ebenen und ein kraniales CT umfasst.

1.1.4. Hyperandrogenämische Ovarialinsuffizienz

Bei dieser Form der Ovarialinsuffizienz besteht eine gesteigerte Androgenproduktion, die zu Virilisierungserscheinungen führt. Klinisch sind gewöhnlich eine Oligomenorrhoe und ein Polyzystisches Ovarialsyndrom (PCO-Syndrom) nachweisbar, das wiederum mit Zyklus- und Fertilitätsstörungen verbunden ist. Weiterhin können durch metabolische Veränderungen eine Hyperinsulinämie und Adipositas auftreten (Göretzlehner et al. 2003). Das PCO-Syndrom, früher als Stein-Leventhal-Syndrom bezeichnet, ist mit einer Häufigkeit von 5 – 12% eine der häufigsten Endokrinopathien der Frau (Schöfl et al. 2004). Die Ursachen sind bisher nicht eindeutig geklärt, es werden allgemein genetische und hereditäre Hintergründe angenommen. Nach Geithövel (2001) ist auch die Bezeichnung PCO-Syndrom nicht mehr zeitgemäß und sollte durch den Begriff funktioneller Hyperandrogenismus (FHA) ersetzt werden. Die Pathogenese des PCO-Syndroms ist weiterhin nicht endgültig geklärt, es werden in den letzten Jahren zunehmend wieder immunologische Ursachen diskutiert.

Die Hypothese einer Autoimmunerkrankung im Sinne einer Autoimmunoophoritis konnte experimentell von Jankovic et al. 1973 im Tierversuch bei Ratten nachgewiesen werden. Beim Menschen gelang bisher nicht der eindeutige Nachweis einer immunologischen Ursache bei Ovarialfunktionsstörungen, wenn auch vermehrt gewebsgebundene Antikörper und Komplementfaktoren im Ovarialgewebe dieser Patientinnen festgestellt wurden (Donat 1987). Die in den letzten Jahren publizierten Arbeiten von Turi et al. (1988) und von Wu et al. (2007) zeigten, dass bei immunhistologischen Untersuchungen von PCO-Ovarien Veränderungen in der Verteilung der Immunzellen festzustellen waren, besonders der zytotoxischen CD8- und der Natürlichen Killerzellen. Nach Blüher (2009) besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem Metabolischen Syndrom und dem PCO-Syndrom. Als wesentlicher pathogenetischer Faktor wird bei beiden Syndromen eine Insulinresistenz angenommen, die zu einer Hyperinsulinämie führt. Dies führt am weniger insulinresistenten Ovar zu einer Stimulierung der Steroidsynthese mit erhöhter Androgensekretion.

1.2. Ovarialzysten

Die Ovarialzysten sind Flüssigkeitsansammlungen in präformierten Hohlräumen, die keine echten Tumoren mit autonomem Wachstum darstellen. In der Sonographie imponieren sie als glatt begrenzte echoleere Raumforderung mit homogener Struktur. Meistens sind sie einkammrig und stellen sog. funktionelle Zysten dar. Es lassen sich Follikel-, Corpus-luteum- und Thekazysten unterscheiden. Eine besondere Form stellen die in der Mesosalpinx liegenden Parovarialzysten dar. Die Beteiligung bestimmter Immunzellen, besonders der T-Helfer und zytotoxischen T-Lymphozyten, an der Entstehung von Ovarialzysten konnten Luchetti et al. (2004) tierexperimentell nachweisen.

1.3. Endometriose

Die Endometriose ist durch das Auftreten von endometriumartigen Zellverbänden außerhalb des Cavum uteri gekennzeichnet. Je nach der Schwere bzw. dem Ausdehnungsgrad haben die Patientinnen Unterleibsschmerzen und Dysmenorrhöen und es besteht meistens eine Sterilität. Bei Frauen im geschlechtsreifen Alter beträgt die Häufigkeit der Endometriose 2 – 4%, bei Patientinnen mit einer Sterilität 15 – 25% (Goerke und Valet 2000). Nach der Lokalisation der Endometrioseherde lassen sich eine Endometriosis genitalis interna (Adenomyosis uteri interna und Salpingitis isthmica nodosa) und eine Endometriosis genitalis externa (Befall von Ovar, Douglas'schem Raum, Ligamentum rotundum, Vagina, Vulva und Perineum) unterscheiden. Bei einer Endometriosis extragenitalis sind häufig Blase oder Darm befallen, Absiedlungen am Nabel und im Leistenkanal sowie in Lunge und Gehirn sind möglich. Die Ätiologie der Endometriose ist bisher nicht eindeutig geklärt. Der Nachweis von pathologischen Immunprozessen, sowohl systemisch als auch lokal, gelang mehrfach bei den betroffenen Patientinnen. In Ovarbiopsien von Endometriose-Patientinnen fanden Wicherek et al. (2006) Veränderungen bestimmter Immunzellen.

1.4. Problemstellung und Arbeitshypothese der Arbeit

Durch die vorliegenden Untersuchungen soll geklärt werden, ob und in welcher Form immunologische und Wachstumsprozesse in benigne Ovarialveränderungen involviert sind. Immunhistologische Analysen von Ovarbiopsien sollen zeigen, ob beim Vorliegen von Ovarialzysten, Endometriosezysten oder bei einem PCO-Syndrom immunologische Vorgänge und Veränderungen der Wachstumsfaktoren nachweisbar sind.

Die Arbeitshypothese geht davon aus, dass durch immunologische Prozesse auf zellulärer Ebene Veränderungen im Ovar hervorgerufen werden, die dann zu Veränderungen der Wachstumsfaktoren und des Glucosestoffwechsels über die Insulin Regulated Amino-peptidase (IRAP) führen. Es soll überprüft werden, inwieweit bei bestimmten gutartigen Ovarfunktionsstörungen diese biologischen Mechanismen auftreten und mit immun-histologischen Methoden nachweisbar sind.

Die immunologische Reaktivität eines Organismus wird durch die angeborene und die erworbene Immunität bestimmt. Die angeborene Immunität ist die entwicklungsgeschichtlich ältere Form der Abwehrmaßnahmen, sie ist unspezifisch, wird innerhalb von Stunden in Gang gesetzt und zu ihrer Ausprägung sind keine individuellen Zellklone erforderlich.

Unspezifische Abwehrmechanismen gegen exogene Pathogene sind neben dem Säureschutzmantel der Haut und der intakten Epidermis das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme sowie unspezifische Mediatoren wie Interferone und Interleukine (Pezzutto et al. 2007). Auf zellulärer Ebene sind besonders Granulozyten, das Monozyten-Makrophagen-System und die Natürlichen Killerzellen von Bedeutung. Für die Fragestellung in dieser Arbeit erschien der Nachweis und die Verteilung der Natürlichen Killerzellen (CD56) am sinnvollsten und wichtigsten.

Die erworbene oder adaptive Immunität ist entwicklungsgeschichtlich die jüngere Form der Abwehr. Sie ist spezifisch und basiert auf der Grundlage hochspezifischer Rezeptoren, die sowohl zellgebunden an B- und T-Lymphozyten vorhanden sind oder in Form von Antikörpern sezerniert werden. Spezifisch stimulierte B- oder T-Lymphozyten können proliferieren und zahlreiche identische Tochterzellen produzieren. Dieser Vorgang kann Tage bis Wochen dauern. Zur Bearbeitung der vorliegenden Fragestellung war deshalb die Identifizierung und Verteilung der B- und T-Zellen im Ovargewebe die logische Alternative.

Aktiviert B- und T-Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche bestimmte Aktivierungsmarker. Am besten identifiziert sind das aktivierungsinduzierende Molekül AIM (EA1, MLR, Leu 23) mit der CD69 Nominierung, das an früh aktivierten T- und B-Zellen sowie an Makrophagen

nachweisbar ist. Ein weiterer Aktivierungsmarker ist der Transferrinrezeptor (T9-Antigen, CD71), der an aktivierten T- und B-Zellen sowie an proliferierenden Zellen exprimiert wird.

Ein universeller Aktivierungsmarker ist das CD25-Antigen (Tac-Antigen), das eine Alpha-Kette des Interleukin-2-Rezeptors darstellt und sowohl an aktivierten T- und B-Zellen und an Makrophagen als auch an regulatorischen T-Zellen und an aktivierten Dendritischen Retikulumzellen nachweisbar ist. CD25 stellt den in der Immunhistologie gebräuchlichen Aktivierungsmarker dar.

Da beim PCO-Syndrom eine Verdickung der Tunica albuginea besteht, soll auch überprüft werden, ob Veränderungen der Cytokeratine im Ovar festzustellen sind. Die Cytokeratine gehören zu den Intermediärfilamenten und sind auch in Epithelien nachweisbar. Von den ca. 20 bekannten Cytokeratinen in den „weichen“ Geweben wurden Cytokeratin 1 und 10 ausgewählt, da deren Vorkommen in Filamenten und Keratinozyten am häufigsten ist.

Weiterhin wurde neben dem Auftreten und der Verteilung von Lymphozyten den Rezeptoren von Wachstumsfaktoren Beachtung geschenkt. Wachstumsfaktoren sind für Wachstum und Differenzierung unerlässliche Faktoren. Sie sind Peptide oder Proteine, die an Rezeptoren der Zelloberfläche binden. Dadurch werden intrazelluläre Ereignisse ausgelöst, die zu DNA-Replikation und Zellteilung führen (Knippers 2006).

Der Insulin-like Growth-Faktor (IGF) wird durch die Sekretion des somatotropen Hormons (STH) des Hypophysenvorderlappens reguliert. STH gelangt auf dem Blutweg in die Leber und löst dort, und auch in anderen Geweben, die Synthese der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-1 und IGF-2 aus. IGF-1 und IGF-2 sind einkettige Polypeptide aus 67 bzw. 70 Aminosäuren, die etwa 50% Homologie zu Proinsulin und in etwa 70% zueinander aufweisen (Löffler 2005). IGF-1 und IGF-2 haben unterschiedliche Zellmembranrezeptoren. Der IGF-1-Rezeptor ist ein Tetramer aus je 2 Alpha- und Beta-Untereinheiten, der große Ähnlichkeit mit dem Insulinrezeptor aufweist und durch IGF-2 aktiviert werden kann. Dagegen ist der IGF-2-Rezeptor ein einkettiges Glykoprotein und wahrscheinlich für den Abbau von IGF-2 verantwortlich. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen war lediglich der Nachweis des IGF-1-Rezeptors in den Ovarbiopsien sinnvoll.

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein Cytokin, das für das Wachstum von Blutgefäßen notwendig ist. Zur VEGF-Familie gehören mehrere Mitglieder (VEGF-A, -B, -C, -D, -E) sowie der Placenta-derived Growth factor (PlGF). Die VEGF's binden sich an die Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGF-Rezeptor 1 (VEGF R1, Flt1) und an VEGF-Rezeptor 2 (VEGF R2, KDR/Flk1) der Endothelzellen (Pezutto et al. 2007). Für jeden wachsenden Tumor ist ab

einer bestimmten Größe durch den zunehmenden Nähr- und Sauerstoffbedarf die Bildung neuer Blutgefäße erforderlich, um ein weiteres Größenwachstum zu ermöglichen. Daher war es naheliegend, in den Biopsien der gutartigen Ovarialtumoren die Rezeptoren für den VEGF zu bestimmen, wobei dem VEGF R1 die größere Bedeutung zukommt.

Der Epidermal Growth Factor (EGF) ist ein kleines lösliches Peptidhormon, das sich an Haut- und Bindegewebszellen bindet und deren Teilung stimuliert (Lodish et al. 2001). Durch proteolytische Spaltung entsteht der EGF aus einem membranständigen EGF-Vorläuferprotein, das mehrere EGF-Domänen aufweist. Sechs Cysteinreste bilden drei Disulfidbrücken, welche die native Konformation des EGF-Moleküls stabilisieren. Der EGF-Rezeptor gehört zur Familie der ErbB-Rezeptoren, die für die Signaltransduktion von neuronalen und epithelialen Zellen von Bedeutung sind und zu den Tyrosinkinasen gehören (Pezzutto et al. 2007). Es war naheliegend, diesen wichtigen Wachstumsrezeptor in die vorliegenden Untersuchungen einzubeziehen.

Die Insulin Regulated Aminopeptidase (IRAP) gehört zur Familie der zinkabhängigen Metallopeptidasen und ist in verschiedenen Geweben nachweisbar. Sie gilt u.a. als Marker zum Nachweis der GLUT4-Vesikel, die für den insulinabhängigen Glucosetransport verantwortlich sind. Im Rahmen dieser Untersuchungen soll versucht werden, die IRAP im Ovargewebe nachzuweisen, um eventuelle Zusammenhänge, besonders zum PCO-Syndrom und dessen Insulinresistenz, festzustellen.

Der Nachweis von Veränderungen im Auftreten von Lymphozyten und den genannten Faktoren bei gutartigen Veränderungen in den Ovarien ist in dieser umfassenden Form bisher nicht bekannt. Die Ergebnisse könnten Rückschlüsse über deren Ätiologie und Pathogenese erlauben und damit Hinweise auf neue Therapieansätze liefern.

2. Material und Methoden

2.1. Patientengut

In die vorliegenden Untersuchungen wurden Ovarbiopsien von 42 Patientinnen einbezogen, die sich wegen klinisch oder sonographisch auffälliger Ovarialbefunde einer Pelviskopie oder Laparotomie in der Klinik des Westens in Magdeburg in den Jahren 2005 – 2007 unterziehen mussten. Als Kontrolle dienten Ovarbiopsien von Frauen, denen auf Grund benigner Genitalerkrankungen (Uterus myomatosus, Descensus) der Uterus und die Adnexe entfernt wurden bzw. pelviskopische Ovarbiopsien, die keinen pathologischen Befund ergaben. Es wurden nur die Biopsien als Kontrolle gewertet, die auch histologisch einen Normalbefund ergaben.

Bei der präoperativen Aufklärung der Patientinnen über den bevorstehenden Eingriff wurde auch das Einverständnis der Frauen eingeholt, dass die entnommenen Gewebe eventuell für weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen genutzt werden können.

2.2. Gewinnung der Ovarbiopsien

Es wurden während der Pelviskopien mit der Endoschere ca. 5 mm breite Keilexzisionen aus dem peripheren Ovarialbereich entnommen. Bei den operativ entfernten Ovarien erfolgte die Biopsie mit dem Skalpell in gleicher Weise. Die Gewebeproben wurden eingefroren und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.3. Prinzip und Durchführung der Immunperoxidase-Technik

Von den Ovarbiopsien wurden im Kryostaten bei -20 °C Gefrierschnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und mit der Immunperoxidase-Technik weiter verarbeitet. Das Prinzip der Methode besteht darin, dass bestimmte Antigene der Zelloberfläche, die eine Identifizierung der Zelle ermöglichen, spezifisch durch monoklonale Antikörper gebunden werden. Diese Antigen-Antikörperbindung wird über einen zweiten Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet und markiert ist, nachgewiesen. Der zweite Antikörper ist mit Biotin markiert und geht mit Avidin eine Komplexbildung ein. Mit einer biotinylierten Peroxidase erfolgt über Avidin eine Bindung, die mit dem Substrat H₂O₂ und dem Chromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazol (EAC) sichtbar gemacht wird (Abbildung 1).

Avidin-Biotin-Immunoperoxidase-Technik

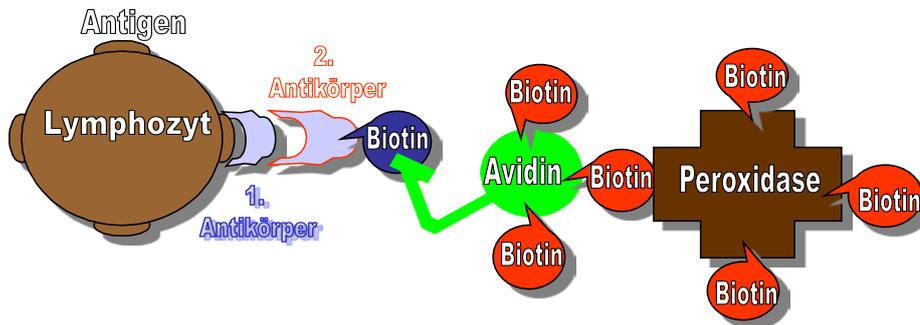


Abb. 1 Prinzip der Immunperoxidase-Technik

Die positiv angefärbten Zellen sind durch eine dunkelbraune Membranfärbung erkennbar. Zur Identifizierung der Zellen wurden kommerziell hergestellte Antikörper und Färbekits eingesetzt (DakoCytomation, Novacostra Laboratories Ltd., Serotec, Immunotech). Die Durchführung der Methode erfolgte nach den Laborrichtlinien im Handbuch für Immunperoxidase Färbemethoden (Immunochemical Staining Methods, 3rd Edition, Dako Corporation 2001). Die positiv angefärbten Lymphozyten im Gewebe wurden ausgezählt, indem eine Fläche von 3 Gesichtsfeldern berücksichtigt wurde. Die Auswertung der Wachstumsfaktoren und der Insulin Related Aminopeptidase erfolgte durch Zuordnung von Scorewerten von 0 bis 3 entsprechend der Intensität der Färbung. In Anlehnung an Logani et al. 2004 und Todorovic et al. 2006 erfolgte die Festlegung der Scorewerte in 0 = negativ, 1=schwach positiv (weak), 2= gut positiv (moderate) und 3=stark positive (strong).

Die eingesetzten Antikörper und ihre Spezifitäten sind aus Tabelle 1 ersichtlich.

Tab. 1 Spezifitäten, der für die Immunperoxidase-Technik eingesetzten monoklonalen Antikörper (DakoCytomation, Novacostra Laboratories Ltd., Serotec, Immunotech)

Art des Antikörpers	Klon	CD-Nomenklatur	Spezifität
T-Helferzellen	MT 310	CD4	T-Helfer/Inducer Zellen
Zytotox. T-Zellen	C8/144B	CD8	Zytotox. T-Zellen
Pan-B-Zellen	HD 37	CD19	Reife und frühe B-Zellen
Interleukin-2-Rezeptor	ACT-1	CD25	Aktivierte Makroph. T- u. B-Zellen
NK-Zellen	T 199	CD56	Natürliche Killer-Z.
Cytokeratin	LH 1	---	Cytokeratin 1, 10
IGF-1R	24-31	CD221	Insulin-like Growth Factor-1 Receptor
VEGF R1	CH-11	---	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1
EGFR	F 4	---	Epidermal Growth Factor Receptor
IRAP	11-A	---	Insulin Regulated Aminopeptidase

Die praktische Durchführung der Immunperoxidase-Technik ist in Abbildung 2 dargestellt.

Entnahme der Ovarbiopsie

Einfrieren bei -20° C

Anfertigung von Kryostatschnitten (5 µm)

Spülen in PBS (2 min)

Inkubation mit proteinblockierendem Reagenz (PBA, 5 min)

Abspülen des PBA

Inkubation mit Primärantikörper (30 min)

3x Waschen mit PBS (je 2 min)

Inkubation mit Sekundärantikörper (30 min)

3x Waschen mit PBS (je 2 min)

Inkubation mit Peroxidasereagenz (30 min)

3x Waschen mit PBS (je 2 min)

Inkubation mit Chromogen (45 min)

Abspülen mit Aqua dest. (2 min)

Nachfärben mit Hämatoxylin (2 min)

Bläuen mit Leitungswasser (10 min)

Einbetten mit Geltol

Mikroskopische Auswertung

Abb. 2 Durchführung der Immunperoxidase-Technik

Folgende Substanzen und Antikörper wurden eingesetzt:

PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung 0,01 M, pH = 7,2
Chromogen	5,0 ml Aqua destillata 0,01 ml Acetate concentrate 0,01 ml 3-Amino-9-Ethylcarbazol (EAC) 0,01 ml 3%iges H ₂ O ₂
Primärantikörper	monoklonale Antikörper gegen Lymphozyten und verschiedene Faktoren
Sekundärantikörper	polyvalenter biotinylierter Anti-Maus-Immunglobulin- Antikörper

Die Inkubationen erfolgten in der feuchten Kammer bei Zimmertemperatur.

2.4. Biostatistische Auswertung

Die klinischen und Labordaten wurden für die statistische Bearbeitung in einem Excel-Datenblatt erfasst, so dass sie mit dem Statistiksystem SAS (Version 9.1.2.) ausgewertet werden konnten. Die statistischen Überprüfungen erfolgten mit dem exakten Test nach Fisher, dem Dunnett-Test sowie mit dem Chi-Quadrat-Test. Zur Überprüfung von Zusammenhängen zwischen Anzahl der Lymphozyten und den klinischen Parametern wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Die statistischen Entscheidungen basierten auf einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von Alpha = 5%. Die Graphiken wurden mit Microsoft Word und Power Point sowie Origin 5.0 erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Anamnestische und klinische Daten des Patientengutes

3.1.1. Altersverteilung des Patientengutes

Nach Analyse aller Befunde konnten die Ovarialbiopsien von 42 Patientinnen in die Auswertungen einbezogen werden. Dabei wurden 11 Biopsien als normal eingestuft, d. h. es waren weder klinisch noch pathohistologisch Auffälligkeiten festzustellen. Insgesamt 14 Biopsien waren von Follikelzysten, 8 Proben von Endometriosezysten und 9 Biopsien von Frauen mit einem PCO-Syndrom.

In Abbildung 3 ist die Altersverteilung des Patientengutes graphisch dargestellt.

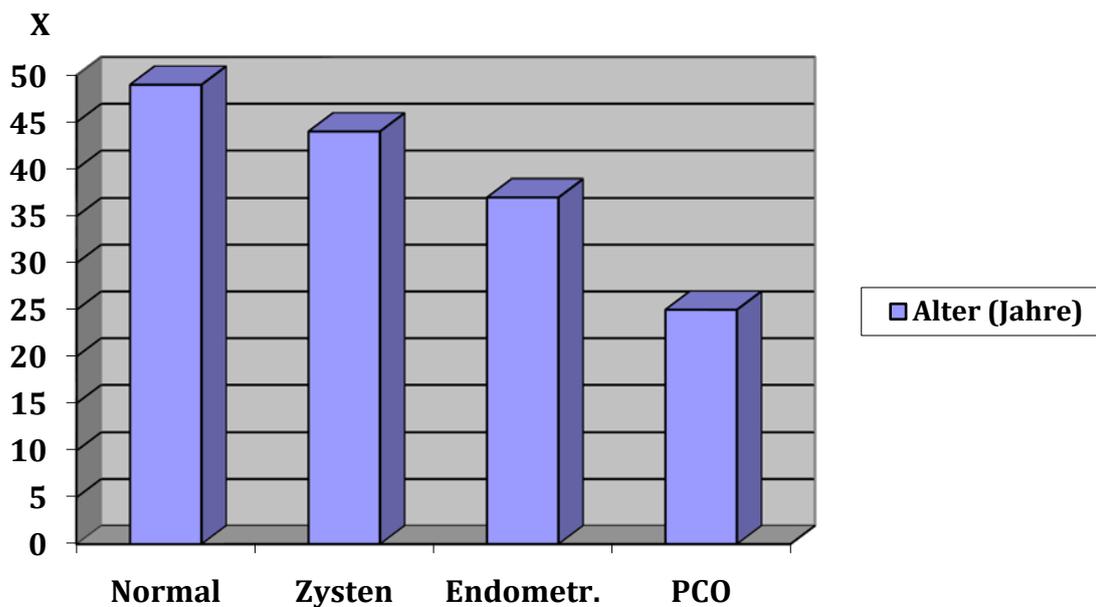


Abb. 3 Altersdurchschnitt des Patientengutes (X=arithmetrischer Mittelwert)

Aus Abbildung 3 ist zu erkennen, dass die Frauen mit normalen Ovarien mit 49 Jahren den höchsten Altersdurchschnitt hatten (42-63 Jahre), bedingt durch die medizinische Indikation zur Organentfernung. Bei den Patientinnen mit benignen Ovarialzysten betrug das durchschnittliche Alter 44,2 Jahre (37-51 Jahre), bei Frauen mit Endometriosezysten 37,3 Jahre (23-56 Jahre) und bei Frauen mit einem PCO-Syndrom 25,1 Jahre (21-28 Jahre).

3.1.2. Allgemeine anamnestische Angaben

In Abbildung 4 sind allgemeine anamnestische Erkrankungen der Patientinnen summarisch zusammengestellt.

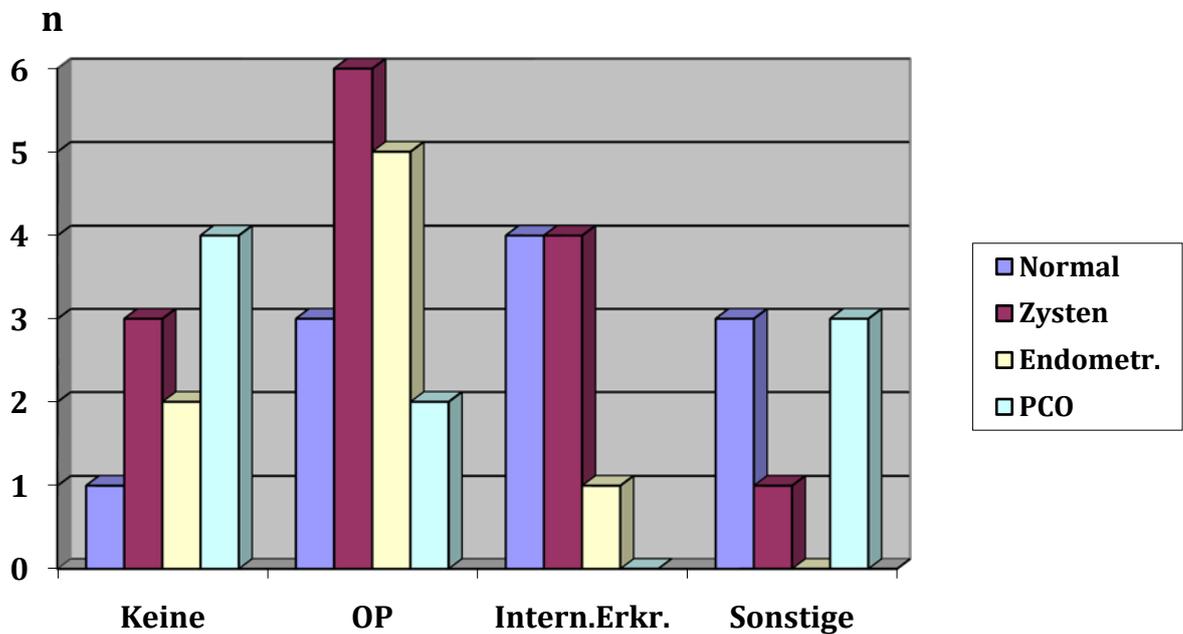


Abb. 4 Allgemeine anamnestische Angaben des Patientengutes (n=absolute Anzahl)

Abbildung 4 zeigt, dass in allen Patientengruppen Operationen am häufigsten in der Anamnese angegeben wurden, gefolgt von internistischen Erkrankungen.

3.1.3. Geburtshilflich-gynäkologische Anamnese

Die graphische Darstellung in Abbildung 5 lässt erkennen, dass sich die Patientinnen, gruppiert nach Ovarialbefund, hinsichtlich Menarchealter und Zykluslänge im Mittel nur unwesentlich unterscheiden.

X

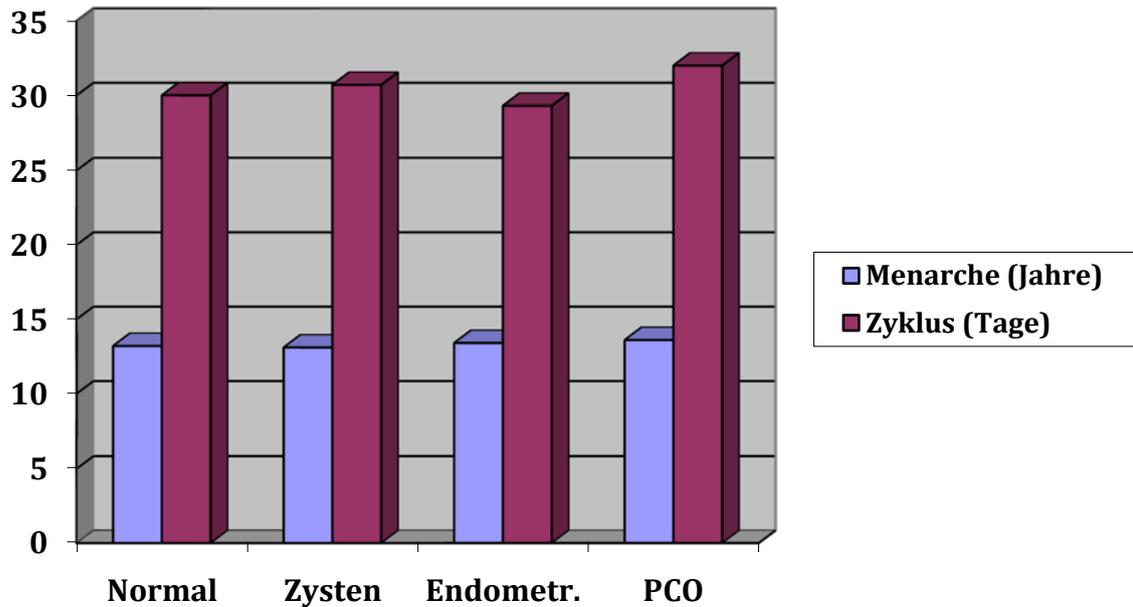


Abb. 5 Menarchealter und Zyklusdauer der Patientinnen (X=arithmetrischer Mittelwert)

Das durchschnittliche Menarchealter lag in der Normalgruppe bei 13,2 (10-17) Jahren, bei Frauen mit Ovarialzysten bei 13,1 (10-16) Jahren, bei Patientinnen mit Endometriosezysten bei 13,4 (12-16) Jahren und bei Frauen mit einem PCO-Syndrom bei 13,6 (10-16) Jahren. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Die durchschnittliche Zykluslänge betrug in der Normalgruppe 30 (28-38) Tage, bei Patientinnen mit Ovarialzysten 30,7 (28-38) Tage, bei Frauen mit Endometriosezysten 29,3 (28-32) Tage und bei Vorliegen eines PCO-Syndroms 32 (30-34) Tage. Signifikante Differenzen ließen sich nicht errechnen.

Die Häufigkeit der Geburten im Patientengut ist aus Abbildung 6 zu ersehen.

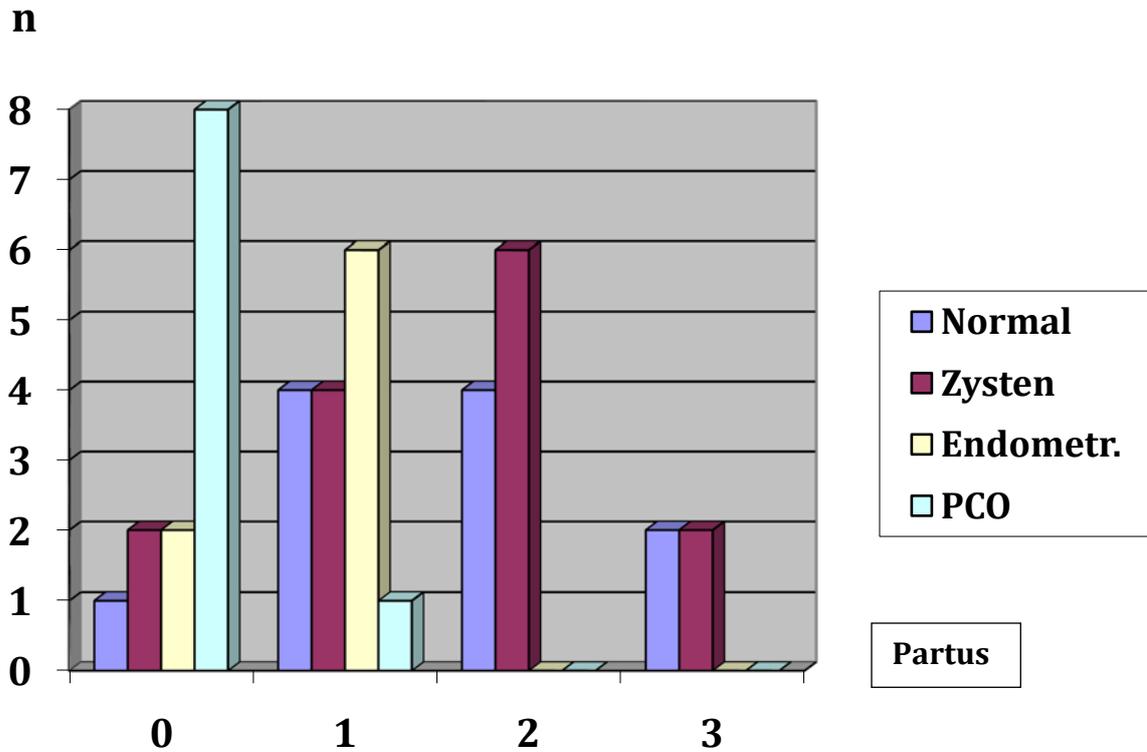


Abb. 6 Geburtsfrequenz im Patientengut (n= absolute Anzahl)

Frauen mit normalen Ovarien oder Zysten hatten eine bis 3 Geburten, während bis auf eine Ausnahme die Patientinnen mit einem PCO-Syndrom kinderlos waren. Die Patientinnen mit Endometriosezysten hatten höchstens eine Entbindung aufzuweisen.

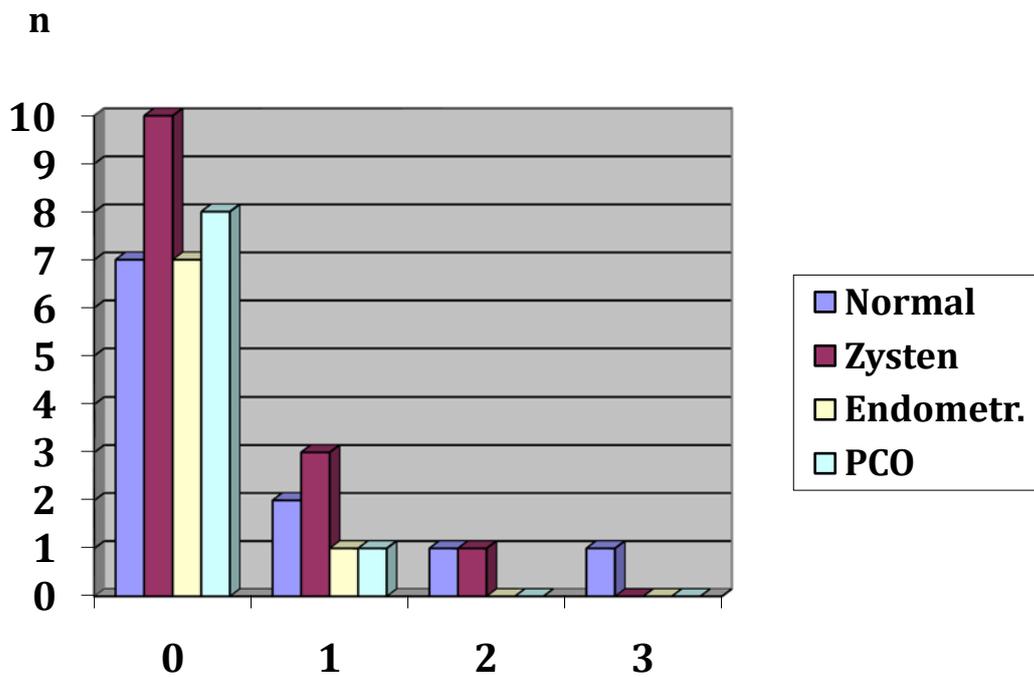


Abb. 7 Abortfrequenz im Patientengut (n= absolute Anzahl)

Abbildung 7 lässt die Häufigkeit der Aborte bei den Patientinnen erkennen.

Es zeigt sich, dass in allen Patientengruppen wenigstens eine Frau einen oder mehrere Aborte hatte, am häufigsten in der Normalgruppe und bei Frauen mit Zysten.

Die Abruptionfrequenz ist in Abb.8 dargestellt.

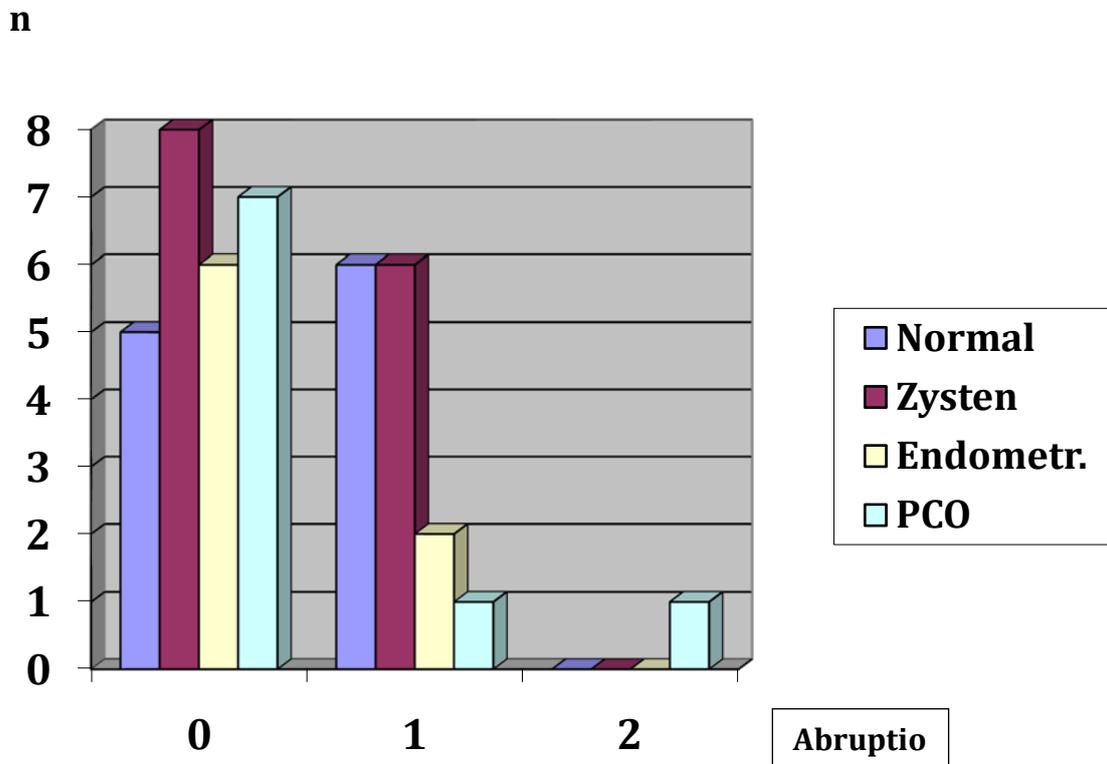


Abb.: 8 Abruptionfrequenz im Patientengut (n= absolute Anzahl)

Abbildung 8 veranschaulicht, dass auch bei der Anzahl der Abruptiones die Frauen aus der Normalgruppe und Frauen mit Zysten am häufigsten Schwangerschaftsabbrüche hatten. Die Differenz zu den beiden anderen Gruppen ist statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Die Häufigkeit der gynäkologischen Erkrankungen in der Anamnese der Patientinnen ist in Abbildung 9 dargestellt.

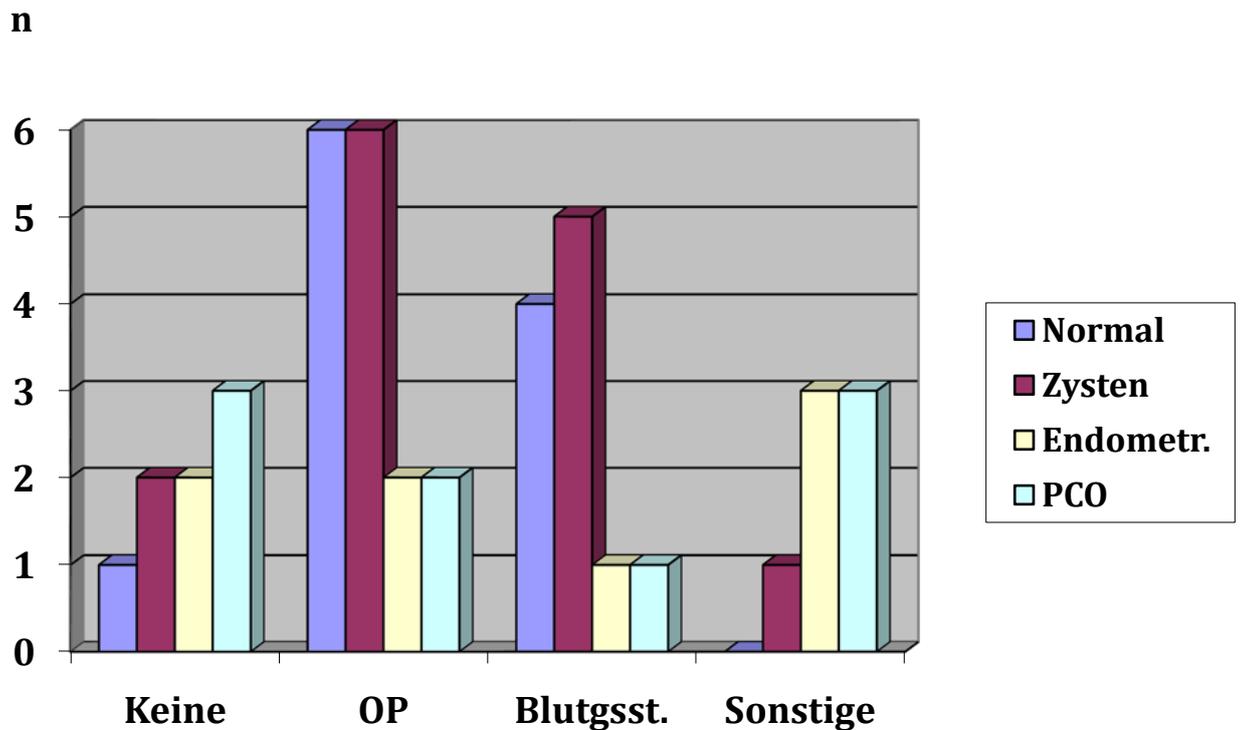


Abb. 9: Häufigkeit gynäkologischer Erkrankungen in der Anamnese der Patientinnen
(n= absolute Anzahl)

Am häufigsten wurden Operationen und Blutungsstörungen in der Anamnese angegeben, von den Frauen der Normalgruppe und den Frauen mit Zysten am häufigsten, die Differenzen waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Die Indikationen zur Durchführung der Pelviskopien bzw. der Uterusexstirpationen sind aus Abbildung 10 zu ersehen.

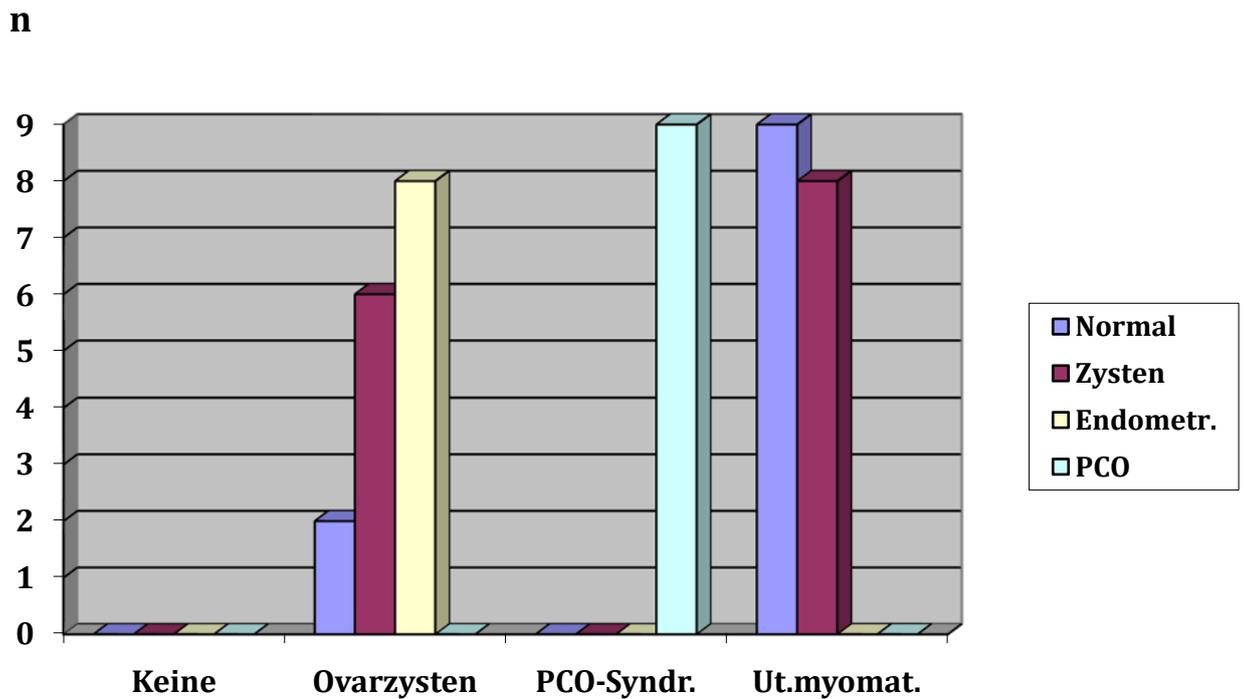


Abb. 10 Indikationen zum operativen Vorgehen (n= absolute Anzahl)

In der Normalgruppe mit fehlenden pathologischen Befunden in den Ovarbiopsien war der Eingriff vorwiegend wegen eines Uterus myomatosus vorgenommen worden. Die Gruppe mit nachgewiesenen Ovarialzysten rekrutiert sich aus Patienten, bei denen Ovarialzysten bereits sonographisch diagnostiziert worden waren. Bei Patientinnen mit einem PCO-Syndrom wurde die Diagnose präoperativ gewöhnlich schon durch die klinischen Symptome, die Erstellung eines Hormonprofils und die sonographische Untersuchung gestellt.

3.2. Identifizierung und Häufigkeit der Lymphozyten

3.2.1. T-Helferzellen (CD4)

In Abbildung 11 sind T-Helferzellen (CD4) immunhistologisch im ovariellen Stroma einer Patientin mit normalen Ovarien dargestellt. Die Zellen waren überwiegend diffus verteilt, gelegentlich im Bereich von Primärfollikeln.

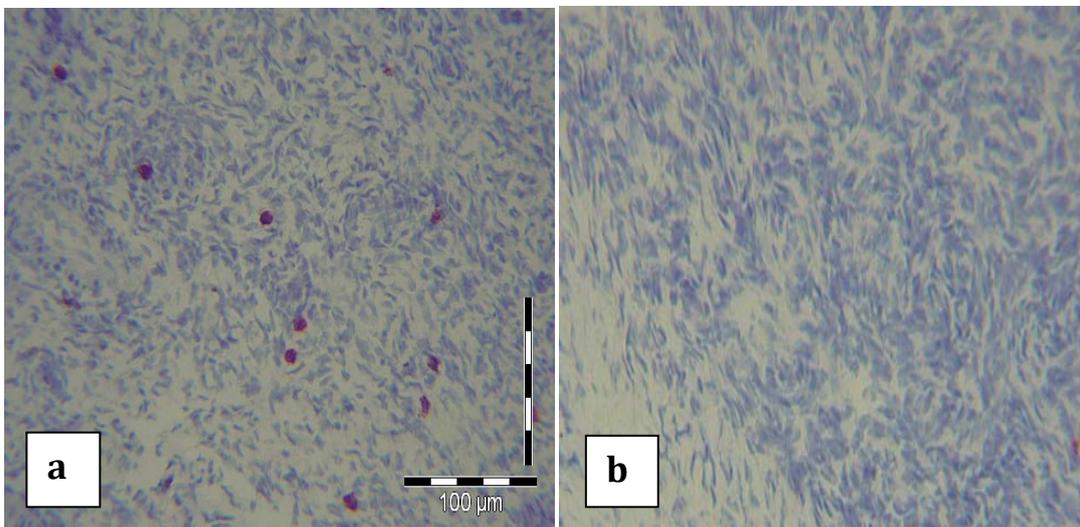


Abb. 11 Immunhistologischer Nachweis von T-Helferzellen (CD4) im Stroma des Ovars.

- a) Positiver Nachweis von diffus verteilten CD4-Zellen im follicelarmen Stroma des Ovars
- b) Negativ-Kontrolle

Die Häufigkeit der T-Helferzellen(CD4) ist in Abbildung 12 wiedergegeben.

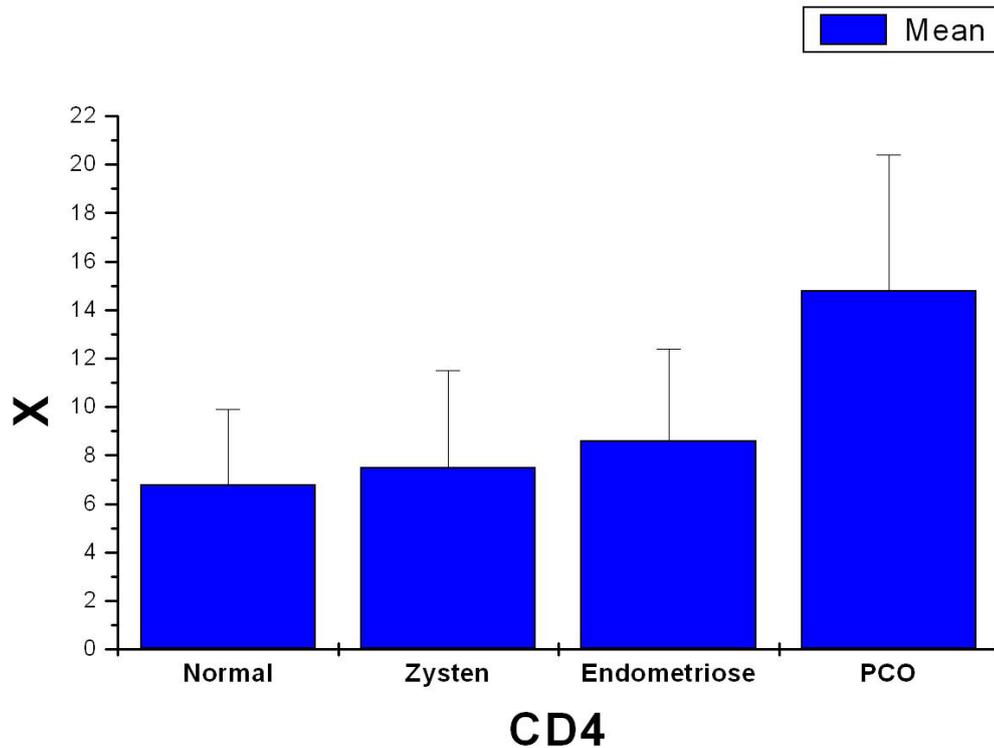


Abb. 12 Durchschnittliche Häufigkeit der T-Helferzellen (CD4) in Ovarbiopsien (x= arithmetrischer Mittelwert)

Aus Abbildung 12 ist ersichtlich, dass die Anzahl der CD4-Zellen in den Biopsien normaler Ovarien mit durchschnittlich 6,8 (SD 3,1) Zellen am niedrigsten ist. Höhere CD4-Zellzahlen waren bei den Zysten mit 7,5 (SD 4,0), den Endometriosezysten mit 8,6 (SD 3,8) und den PCO-Ovarien mit 14,8(SD 5,6) zu finden. Der statistische Vergleich ergab jedoch lediglich für PCO-Ovarien eine signifikante Differenz ($p < 0,05$) zur Normalgruppe.

3.2.2. Zytotoxische T- Zellen (CD8)

Abbildung 13 zeigt zytotoxische T-Zellen (CD8) im Stroma eines Ovars mit einer Follikelzyste. Die CD8-Zellen sind ebenfalls vorwiegend diffus im Stroma verteilt.

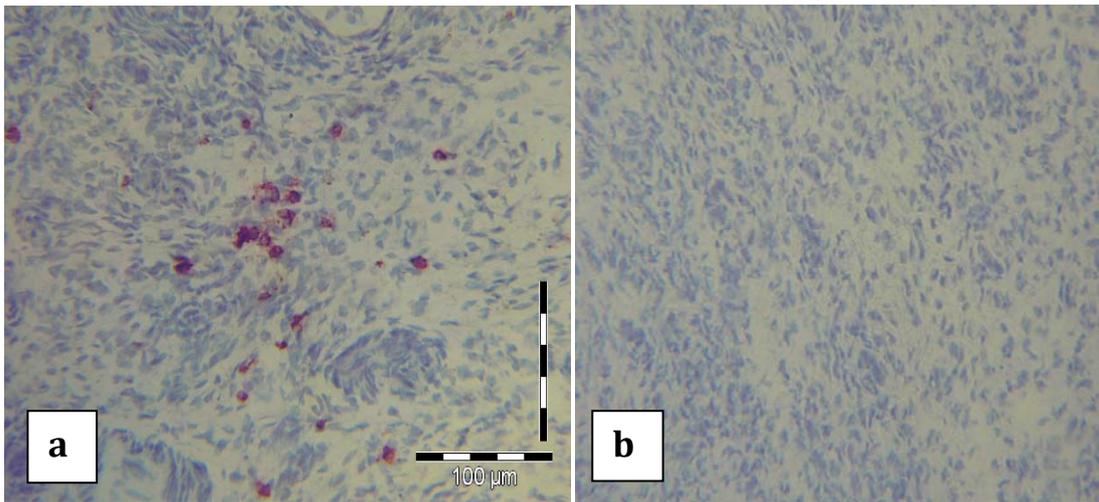


Abb. 13 Immunhistologischer Nachweis von zytotoxischen T-Zellen (CD8) im Stroma eines Ovars mit einer Follikelzyste

- a) Positiver Nachweis von CD8-Zellen, angereicht im ovariellen Stroma zwischen Primärfollikeln
- b) Negativ-Kontrolle

In Abbildung 14 ist die Häufigkeit der zytotoxischen T-Zellen (CD8) im Gruppenvergleich graphisch dargestellt.

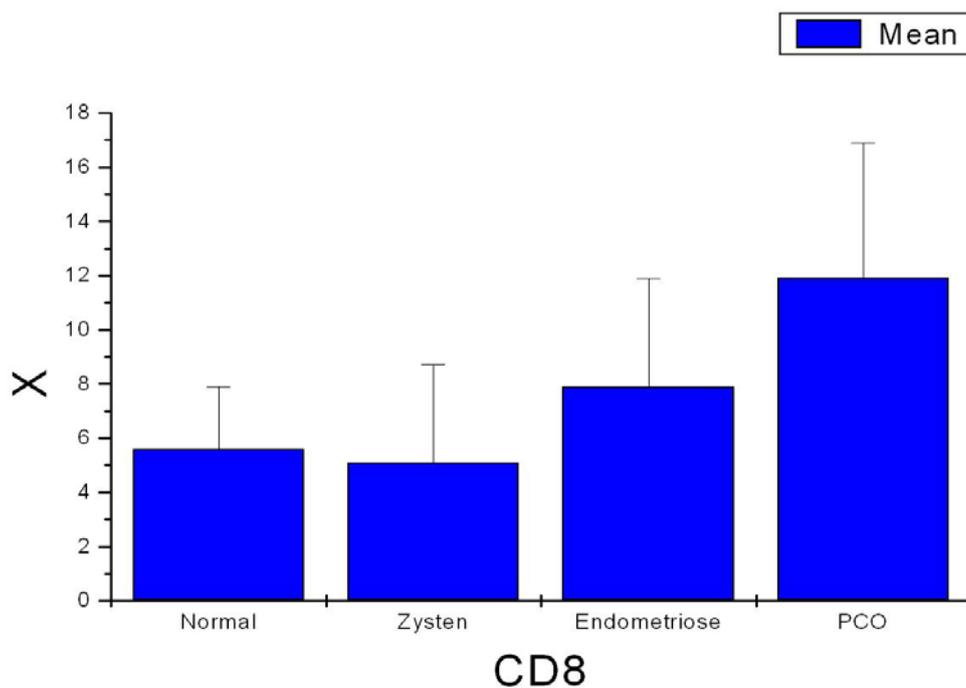


Abb. 14 Durchschnittliche Häufigkeit der zytotoxischen (CD8)-T-Zellen in Ovarbiopsien (x= arithmetrischer Mittelwert)

Auffallend im Gruppenvergleich ist auch bei den CD8-Zellen die Differenz zwischen den normalen Ovarien und den Biopsien von PCO-Patientinnen, die statistisch signifikant ist ($p < 0,05$). Die CD8-Zellen wiesen in den normalen Ovarien eine durchschnittliche Häufigkeit von 5,6 (SD 2,3) Zellen auf, in den Ovarien mit Follikelzysten waren es 5,1 (SD 3,6), in den Endometriose-Ovarien 7,9 (SD 4,0) und in den PCO-Ovarien 11,9 (SD 5,0) Zellen.

3.2.3. B-Zellen (CD19)

In Abbildung 15 sind B-Zellen (CD19) immunhistologisch im Stroma eines Ovars mit Endometriose dargestellt.

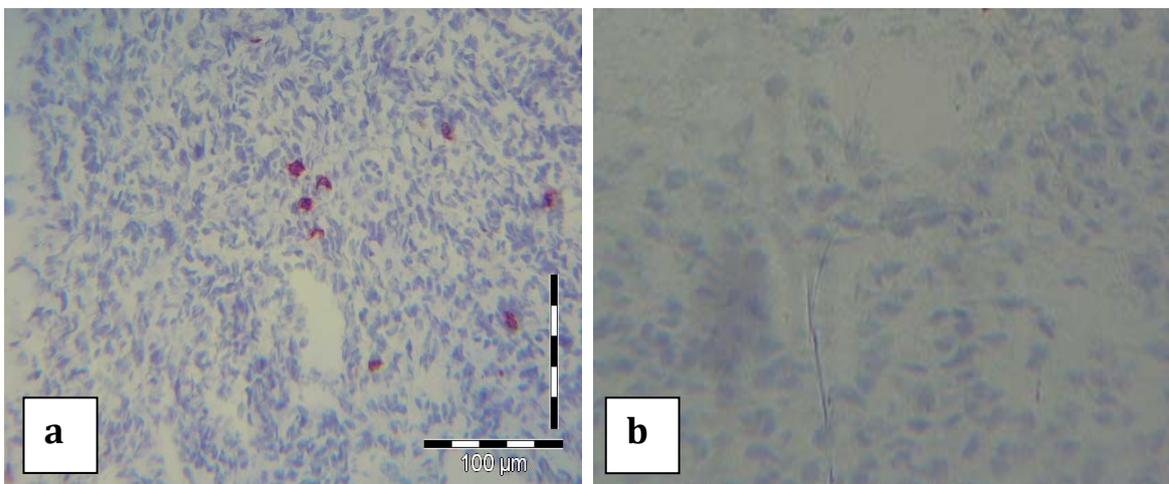


Abb. 15 Immunhistologischer Nachweis von B-Zellen (CD19) in einem Ovar mit Endometriose

- a) Positiver Nachweis von CD19-Zellen, vereinzelt im ovariellen Stroma in der Nähe von Lymphgefäßen gelegen
- b) Negativ-Kontrolle

Die Abbildung 16 zeigt die Häufigkeit der B-Zellen (CD19) in Ovarbiopsien.

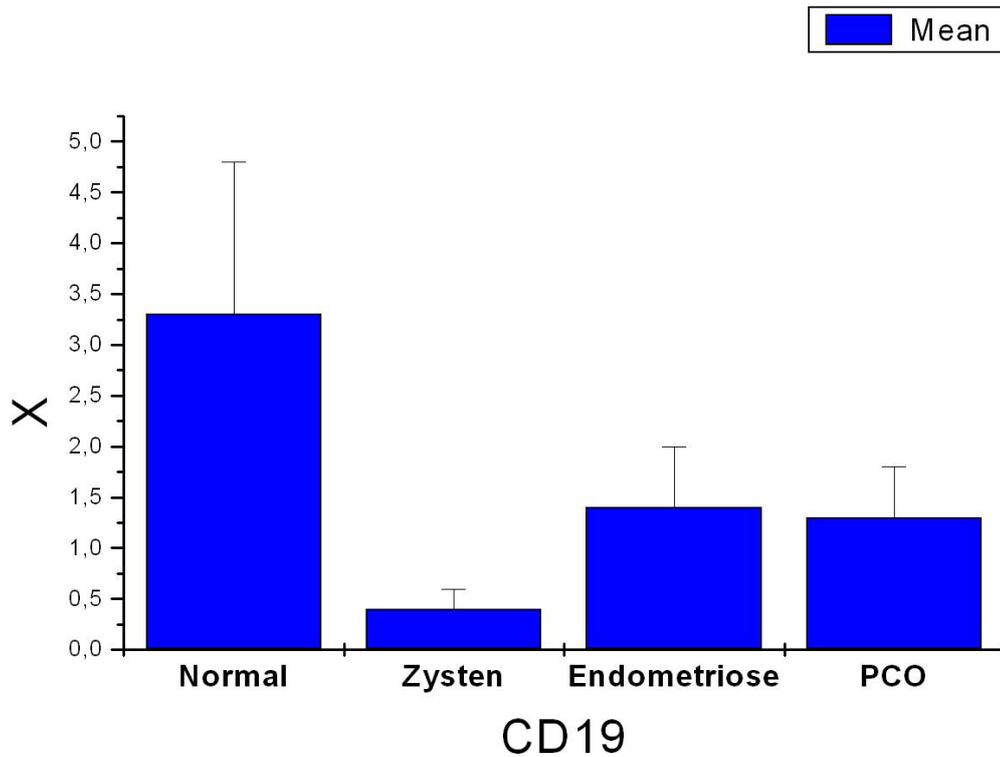


Abb. 16 Durchschnittliche Häufigkeit der B-Zellen (CD19) in Ovarbiopsien
(\bar{x} = arithmetrischer Mittelwert)

Die Häufigkeit der B-Zellen (CD19) ist aus Abbildung 16 ersichtlich. Die Anzahl der B-Zellen ist deutlich geringer als die der T-Zellen. In den Ovarien mit normaler Histologie ließen sich durchschnittlich 3,3 (SD 1,5) Zellen nachweisen, bei den Follikelzysten fanden sich nur 0,4 (SD 0,2) bei Endometriose (SD 0,6) und bei einem PCO-Syndrom 1,3 (SD 0,5) Zellen. Eine signifikante Differenz zwischen den Untersuchungsgruppen ließ sich nicht errechnen.

3.2.4. Aktivierte Zellen (CD25)

In Abbildung 17 sind aktivierte Lymphozyten (CD25) im Stroma und in Lymphgefäßen des Ovars erkennbar.

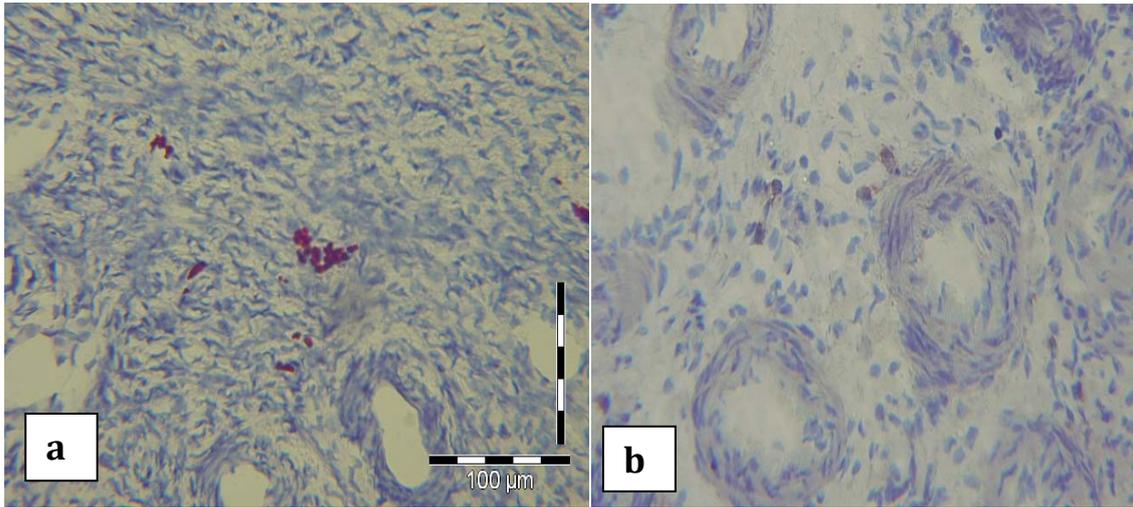


Abb. 17 Immunhistologischer Nachweis von aktivierten Lymphozyten (CD25) im Stroma eines Ovars mit Zystenbildung

- a) Positiver Nachweis von CD25-Zellen, gruppiert gelegen in der Nähe von Blut- und Lymphgefäßen
- b) Negativ-Kontrolle

Die Häufigkeit der CD25-positiven Zellen ist in Abbildung 18 dargestellt.

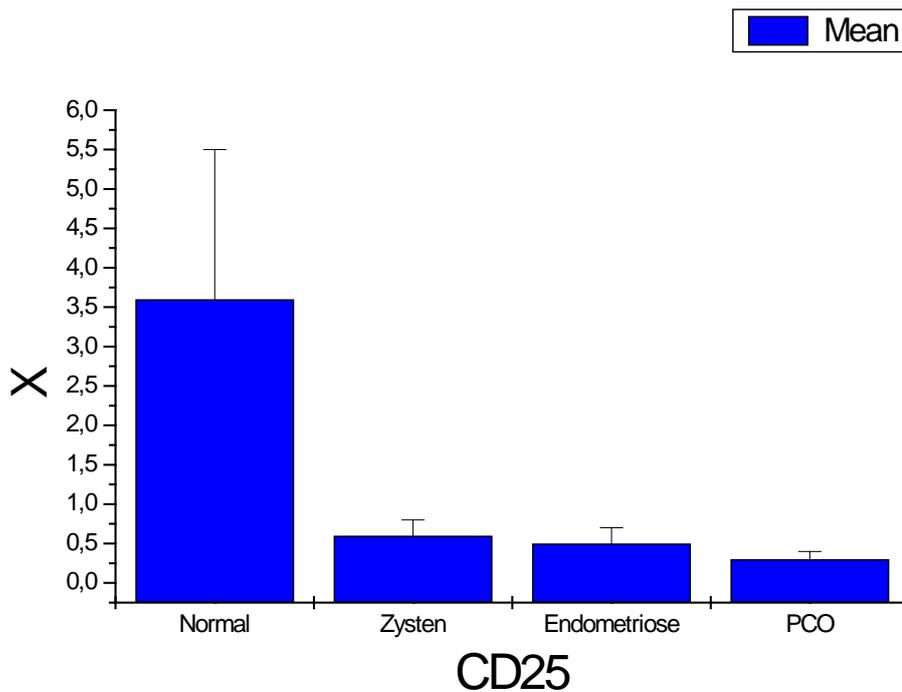


Abb. 18 Durchschnittliche Häufigkeit der CD25-positiven Zellen in Ovarbiopsien (x= arithmetrischer Mittelwert)

In den normalen Ovarien konnten durchschnittlich 3,6 (SD 1,9) aktivierte Zellen nachgewiesen werden, während in den Ovarien mit Follikelzysten nur 0,6 (SD 0,2), in den Endometriose-Ovarien 0,5 (SD 0,2) und in den PCO-Ovarien 0,3 (SD 0,1) Zellen gefunden wurden. Die Differenzen zwischen normalen und den jeweiligen pathologischen Befunden waren statistisch signifikant ($p < 0,05$).

3.2.5. Natürliche Killerzellen (CD56)

Abbildung 19 zeigt Natürliche Killer-Zellen (CD56) im Ovar.

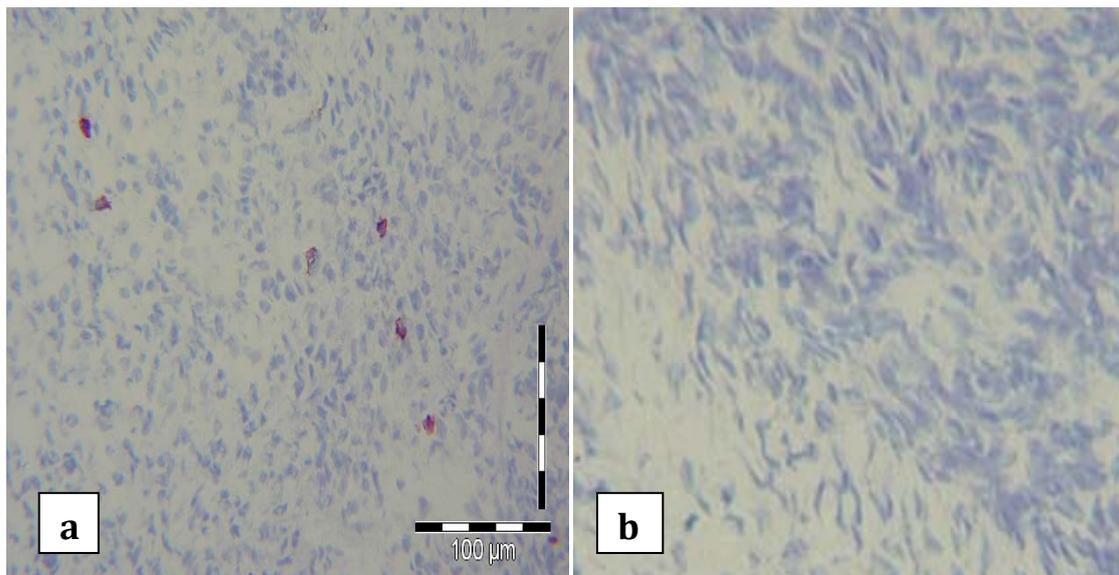


Abb. 19 Immunhistologischer Nachweis von Natürlichen Killer-Zellen (CD56) im Stroma eines Ovars mit PCO-Syndrom.

- a) Positiver Nachweis von CD56-Zellen, vereinzelt und diffus verteilt im gefäßarmen Stromabereich
- b) Negativ-Kontrolle

Die Abbildung 20 veranschaulicht die Häufigkeit der Natürlichen Killerzellen.

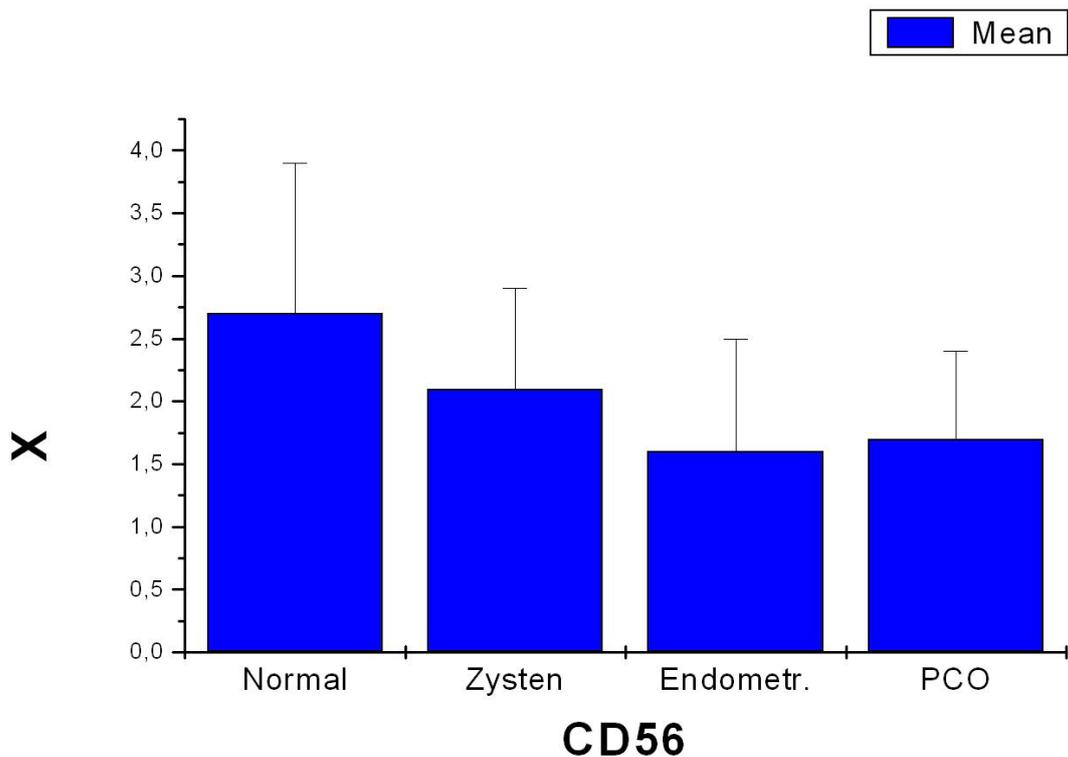


Abb. 20 Durchschnittliche Häufigkeit der Natürlichen Killer-Zellen (CD56) in Ovarbiopsien (x= arithmetrischer Mittelwert)

In Ovarien mit normaler Histologie fanden sich durchschnittlich 2,7 (SD 1,2) Natürliche Killer-Zellen. Die Biopsien mit Follikelzysten enthielten 2,1 (SD 0,8), mit Endometriose 1,6 (SD 0,9) und mit PCO-Syndrom 1,7 (SD 0,7) Zellen. Die Differenzen zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Zur besseren Veranschaulichung der Variabilität der Befunde sind in Abbildung 21 die Einzelwerte aller Lymphozytenwerte graphisch dargestellt.

Auffallend sind die relativ hohen Zellzahlen der CD4- und CD8- positiven Zellen, während CD19-, CD25- und CD56-positive Zellen in geringerer Anzahl vorkamen.

In Abbildung 21 werden die mittleren Häufigkeiten der Lymphozytensubpopulationen von normalen Ovarien den Biopsien mit pathologischen Befunden gegenübergestellt.

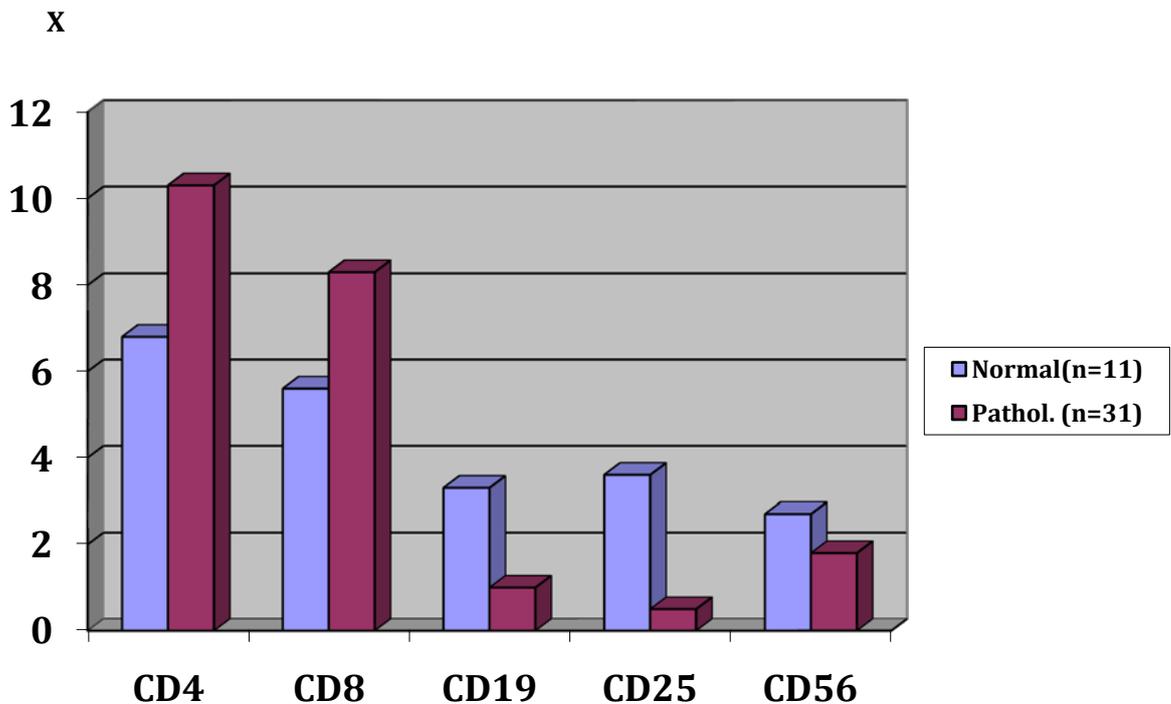


Abb. 21 Durchschnittliche Häufigkeit der Lymphozyten in normalen und pathologischen Ovarbiopsien (X= arithmetrischer Mittelwert)

Aus Abbildung 21 ist ersichtlich, dass besonders die T-Zellen (CD4 und CD8) deutlich erhöht sind gegenüber den normalen Ovarien, während bei den CD19-, CD25- und CD56-Zellen die Relation umgekehrt ist. Bis auf die CD56-Zellen waren die Differenzen bei den übrigen Zellpopulationen statistisch signifikant ($p < 0,05$).

3.2.6. Korrelationsanalyse

Die Untersuchungen zur Korrelationsstruktur erfolgten zwischen den CD4-, CD8-, CD19-, CD25- und CD56-Zellen und den klinischen Angaben. Die Auswertung der Korrelationskoeffizienten zeigte, dass die Normalgruppe eine andere Beziehung zum Alter aufweist als die Gruppen mit Zysten, Endometriose oder PCO-Syndrom. In der Normalgruppe fand sich ein Zusammenhang zwischen CD56-Zellen und dem Alter, der Menarche und dem Zyklus, nicht aber bei den CD4- und CD8-Zellen. Bei den 3 pathologischen Gruppen zeigte sich eine negative Korrelation zwischen CD4-Zellen und dem Alter der Frauen. Bei Frauen mit einer Follikelzyste fand sich eine hohe Korrelation zwischen CD8-Zellen und dem Alter. In der Normalgruppe weicht die Relation zwischen CD4- und CD8-Zellen von der in den pathologischen Gruppen ab.

3.3. Identifizierung und Häufigkeit der Cytokeratine und Rezeptoren der Wachstumsfaktoren

3.3.1. Cytokeratin 1,10

In Abbildung 22 sind Cytokeratin-positive Zellen im Ovar dargestellt.

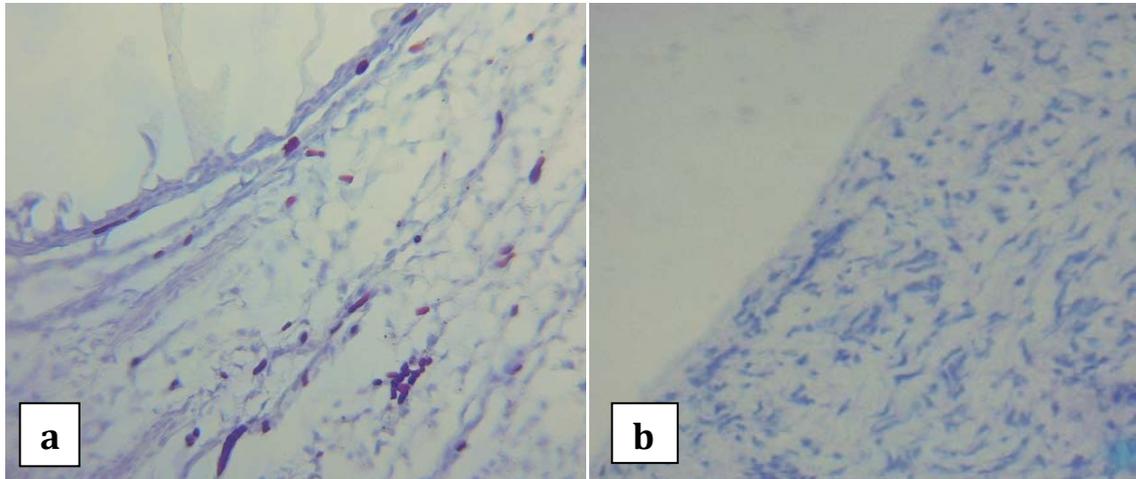


Abb. 22 Immunhistologischer Nachweis von Cytokeratin im Ovar bei Ovarialzyste

- a) Positiver Nachweis von Cytokeratin im Zytoplasma lymphozytärer Zellen und in Bindegewebsstrukturen
- b) Negativ-Kontrolle

Der Antikörper gegen Cytokeratin bewirkt bei der immunhistologischen Nachweismethode eine vorwiegend zytoplasmatische Färbung der Zellen oder von cytoke­ratinhaltigem Bindegewebe. Zur Auswertung wurde deshalb ein Scorewert von 0 bis 3 gebildet.

Die Häufigkeit der positiven Befunde ist aus Abbildung 23 zu ersehen, wobei die Gesamtzahl der Biopsien, die Anzahl der positiven Befunde und die Summe der Scorewerte (d.h. die Scorewerte wurden addiert) dargestellt wurden. In den 11 Biopsien normaler Ovarien waren 7 Cytokeratin-positive Befunde mit einem gesamten Scorewert von 18. Bei den Ovarien mit Follikelzysten (n=14) fanden sich 4 positive Befunde mit einem Scorewert von insgesamt 8.

Die Biopsien mit Endometriose (n = 8) wiesen 5 positive Befunde mit einem gesamten Scorewert von 4 auf. In den Biopsien von Ovarien mit einem PCO-Syndrom (n = 8) konnte nur in einem Fall eine schwache Anfärbung festgestellt werden. Die Differenzen waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

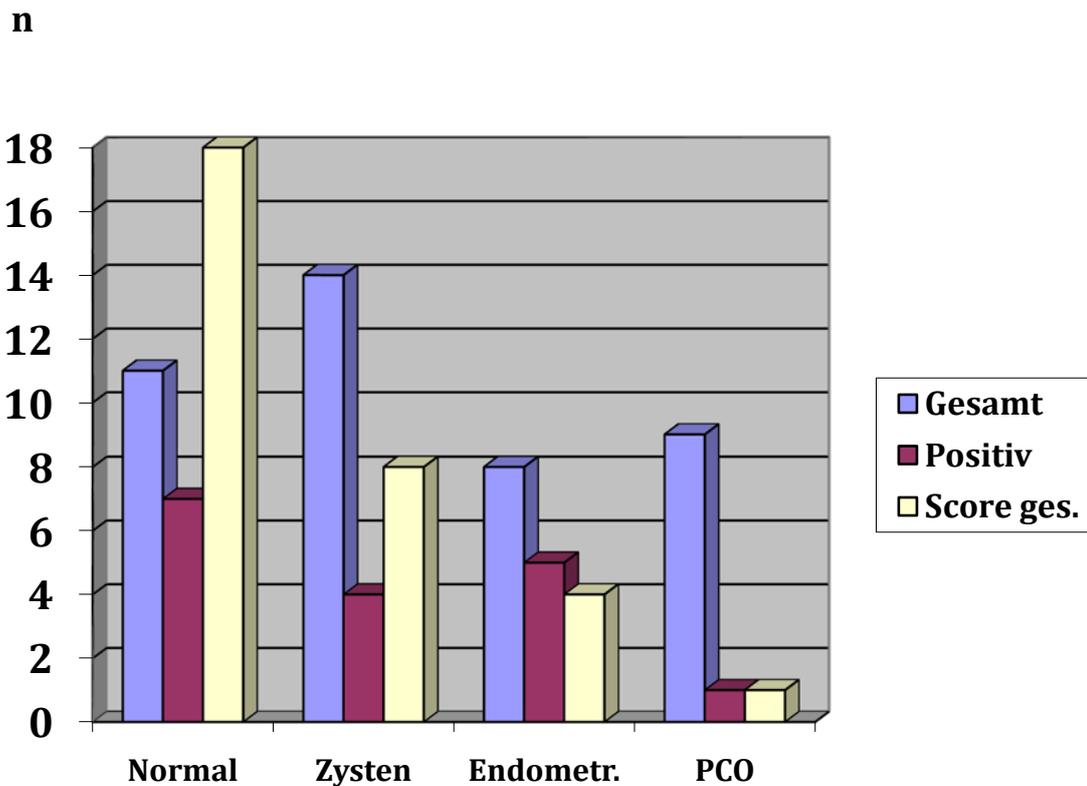


Abb. 23 Cyokeratin-positive Befunde in den Ovarbiopsien (n= absolute Anzahl)

3.3.2. Insulin-like Growth Factor Receptor 1 (IGF-1R)

Positive Färbungen mit dem Antikörper gegen den IGF-Rezeptor1 sind in der Abbildung 24 wiedergegeben.

Abbildung 25 veranschaulicht die Häufigkeit der IGF-1R-positiven Befunde. Es ist zu erkennen, dass die positiven Befunde in den normalen Ovarien den höchsten Scorewert aufweisen, während in den pathologischen Biopsien die positiven Anfärbungen nicht so häufig auftraten und auch geringere Scorewerte hatten. Die Differenzen waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

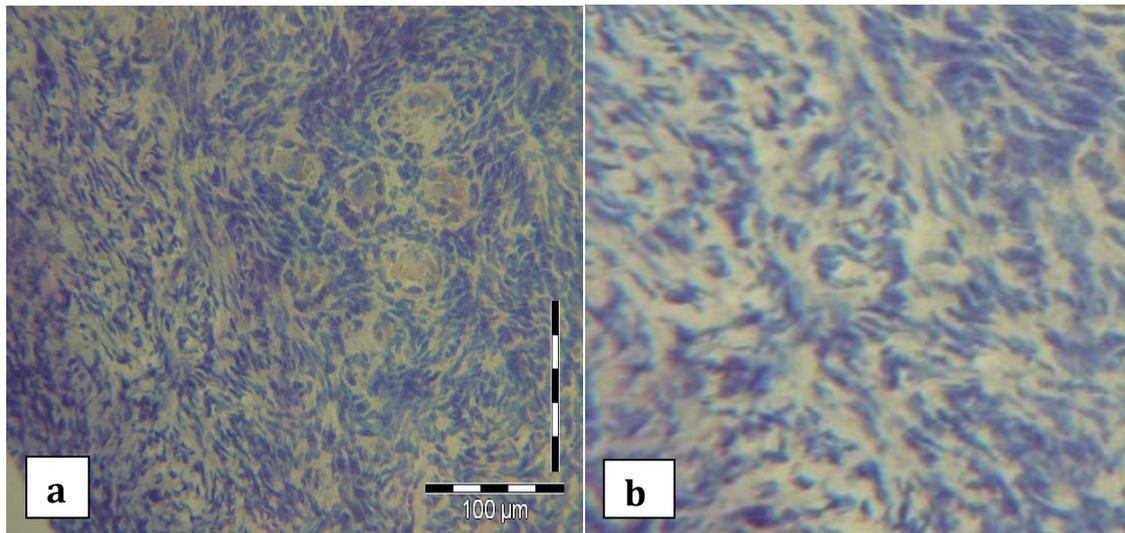


Abb. 24 IGF-Rezeptor 1 positive Zellen im Ovar

- a) Immunhistologischer Nachweis von IGF-Rezeptor 1-positiven Strukturen in Primärfollikeln
- b) Negativ-Kontrolle

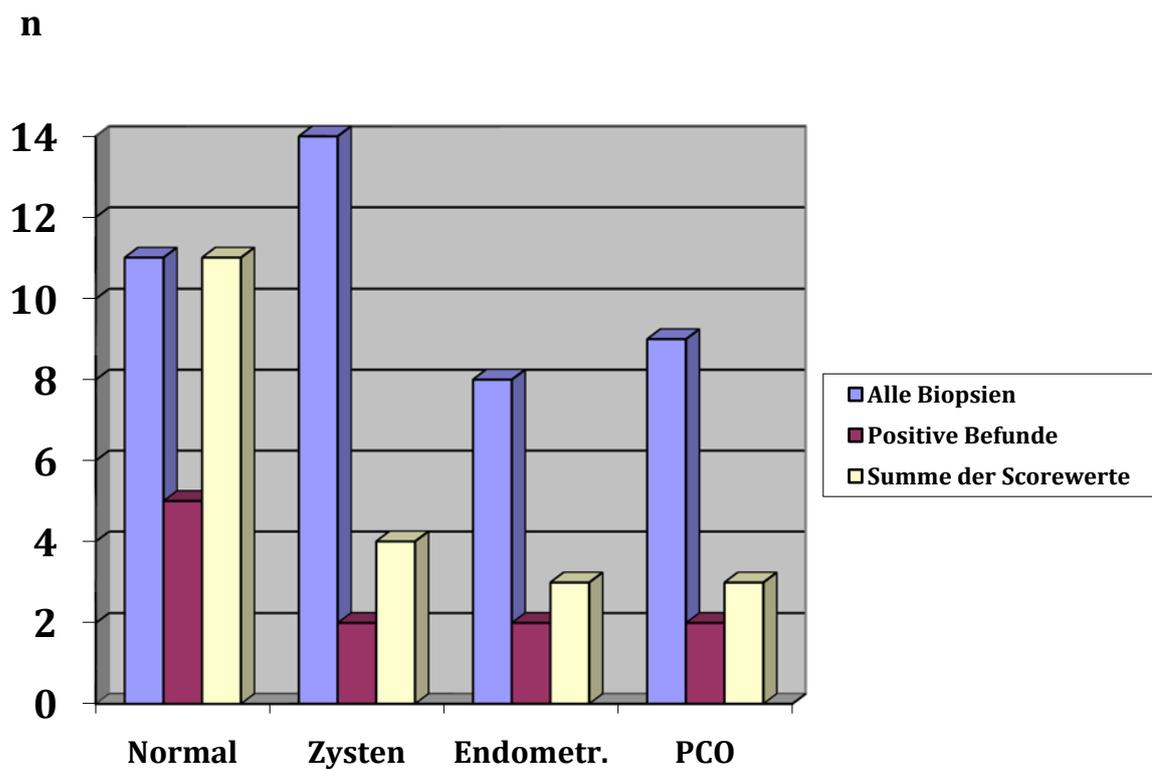


Abb. 25 IGF-1R-positive Befunde in den Ovarbiopsien (n= absolute Anzahl)

3.3.3. Vascular Epithelial Growth Factor Receptor 1 (VEGF R1))

In Abbildung 26 ist ein Gefäß im ovariellen Stroma dargestellt, das eine positive Reaktion mit dem VAGF R1-Antikörper zeigt.

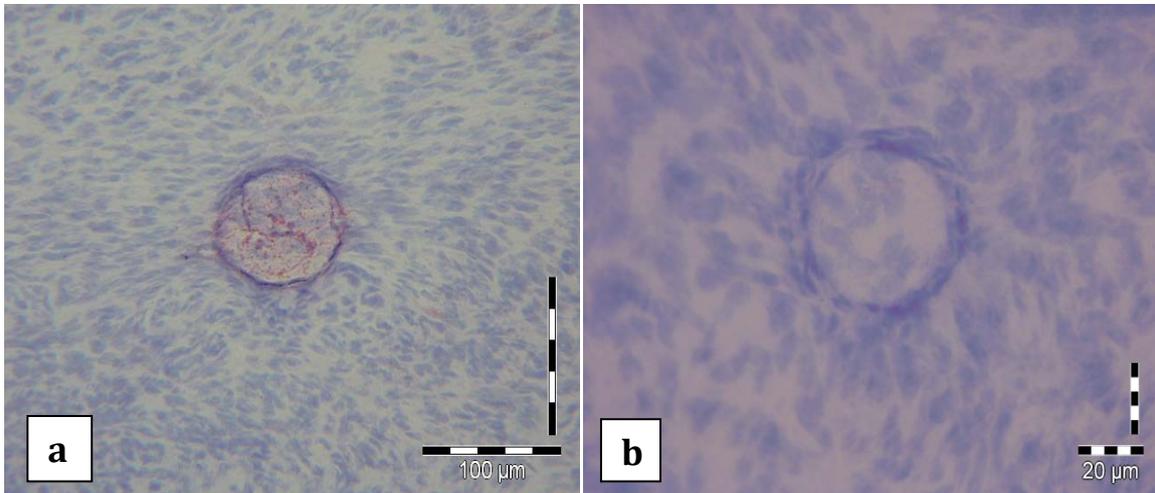


Abb. 26 VEGF R1-positives Gefäß im Stroma eines Ovars

- a) Positiver Nachweis von VEGF Rezeptor 1 in der Basalmembran eine ovariellen Gefäßes
- b) Negativ-Kontrolle

Die vorwiegend lineare Anfärbung weist auf eine Lokalisation der Rezeptoren für den VEGF in der bindegewebigen Basalmembran des Gefäßes hin. Die Endothelzellen sind durch den Gefrierprozess beim Herstellen der Kryostatschnitte und der anschließenden Färbung nicht mehr darstellbar.

Aus Abbildung 27 sind die Häufigkeiten der positiven Befunde mit dem VEGF R1-Antikörper zu ersehen.

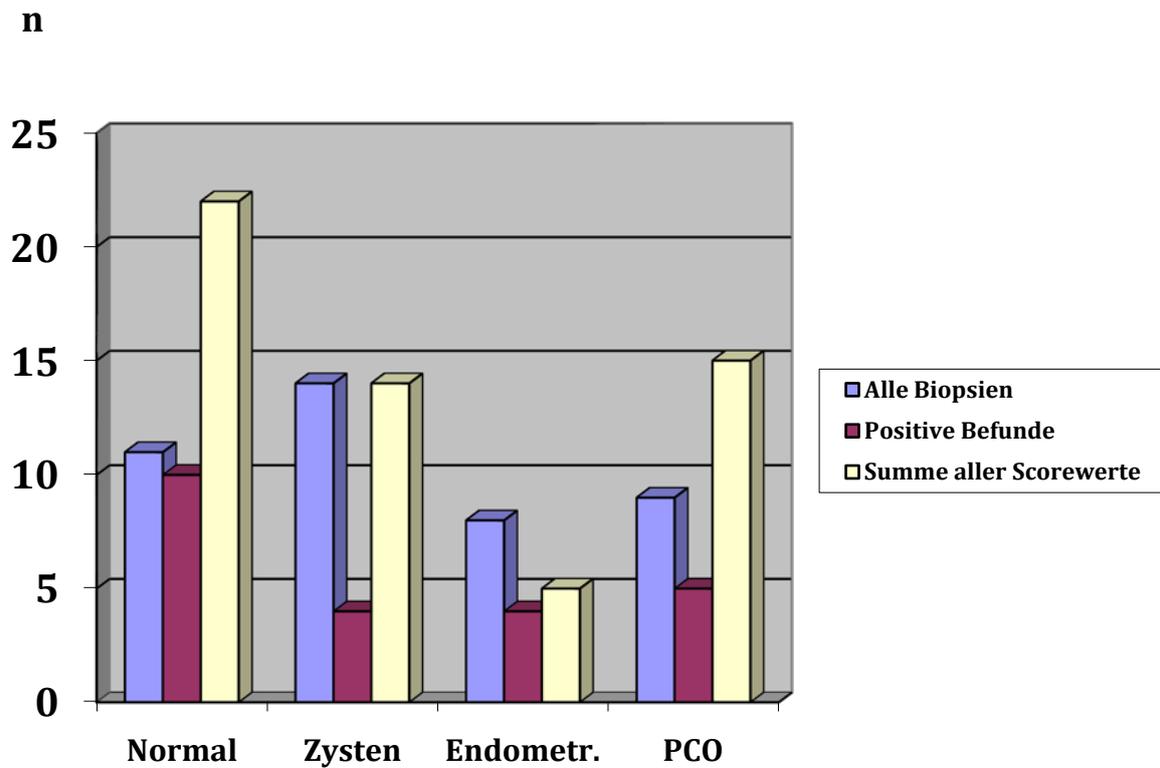


Abb. 27 VEGF R1-positive Befunde in den Ovarbiopsien (n= absolute Anzahl)

Abbildung 27 zeigt, dass in den normalen Ovarien die meisten positiven Befunde festgestellt wurden und sich die höchsten Scorewerte ermitteln ließen. In den Biopsien von Zysten und von PCOS-Ovarien waren die Scorewerte relativ hoch, die Differenzen waren jedoch alle statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.3.4. Epithelial Growth Factor Receptor (EGFR)

In Abbildung 28 sind positive Färbungen im Ovar mit dem EGFR-Antikörper dargestellt, sowohl in der Tunica albuginea als auch im Stroma.

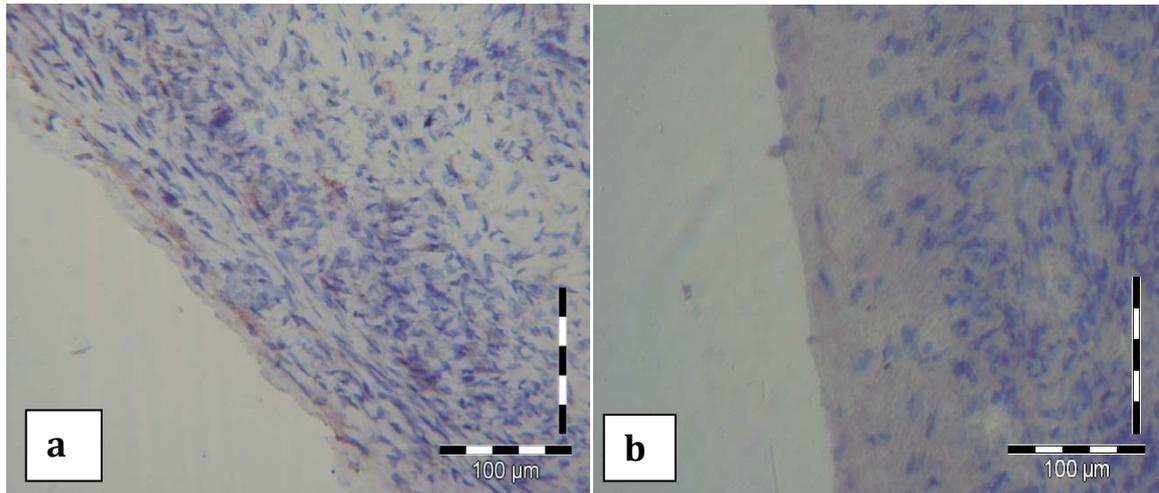


Abb. 28 EGFR-positive Färbungen im Ovar beim PCO-Syndrom

- a) Positiver Nachweis von EGF-Rezeptor in der Tunica albuginea und darunter liegenden Bindegewebsstrukturen
- b) Negativ-Kontrolle

In Abbildung 29 sind die Häufigkeiten der positiven EGFR-Färbungen wiedergegeben.

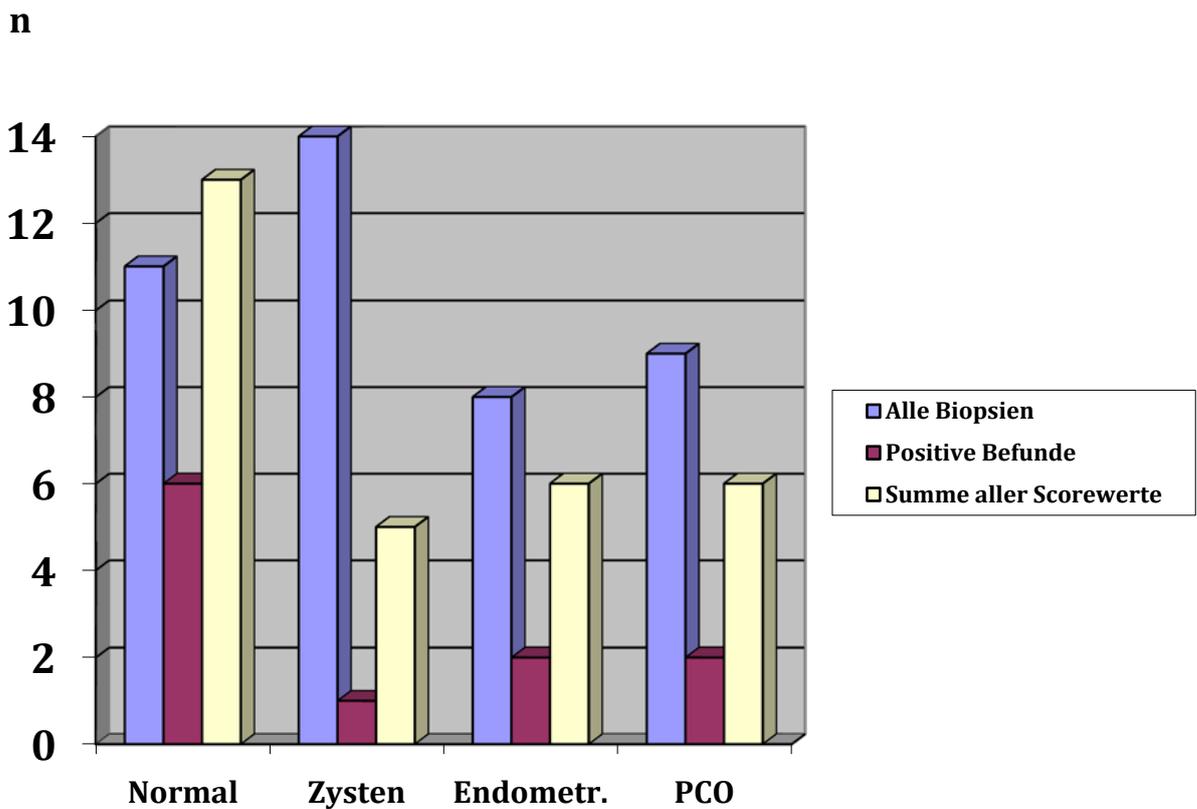


Abb. 29 EGFR-positive Befunde in den Ovarbiopsien (n= absolute Befunde)

Aus Abbildung 29 ist ersichtlich, dass die Biopsien normaler Ovarien die meisten positiven Befunde und die höchsten Scorewerte aufweisen gegenüber den pathologischen Ovarien. Eine statistische Signifikanz ließ sich lediglich zwischen normalen Ovarien und den Follikelzysten errechnen ($p < 0,05$).

In Abbildung 30 wurden Anzahl und Scores für die Zytokeratine und Wachstumsfaktoren bei normalen Ovarien denen mit pathologischen Befunden gegenübergestellt.

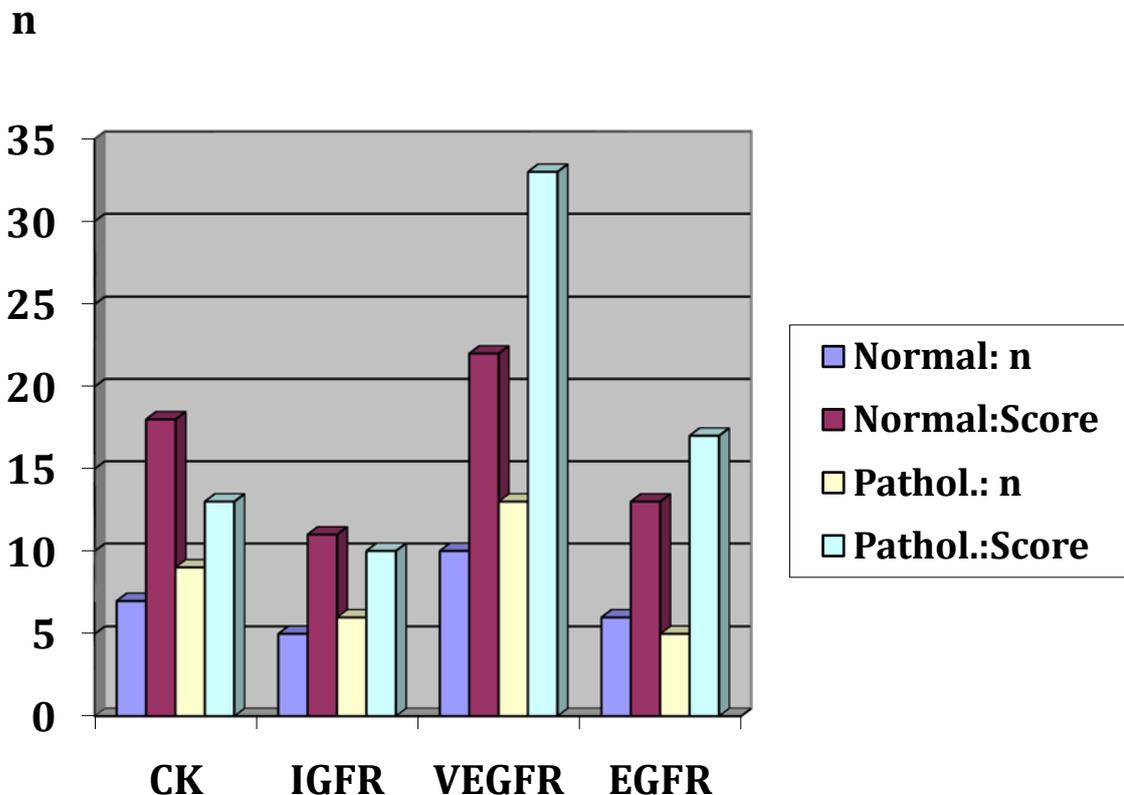


Abb. 30 Absolute und Scorewerte der normalen und pathologischen Ovarbiopsien (n= absolute Werte)

Abbildung 30 zeigt, dass die Scorewerte von VEGFR und EGFR bei den pathologischen Biopsien eindeutig erhöht sind gegenüber den normalen Ovarien. Für diese Differenzen konnte eine statistische Signifikanz errechnet werden ($p < 0,05$).

3.4. Insulin Regulated Aminopeptidase

In Abbildung 31 sind positive Anfärbungen im ovariellen Stroma mit dem IRAP-Antikörper dargestellt. Bei der Auswertung der immunhistologischen Schnitte stellten sich positive Bereiche sowohl in den Stromazellen als auch in Zellen der Primärfollikel dar.

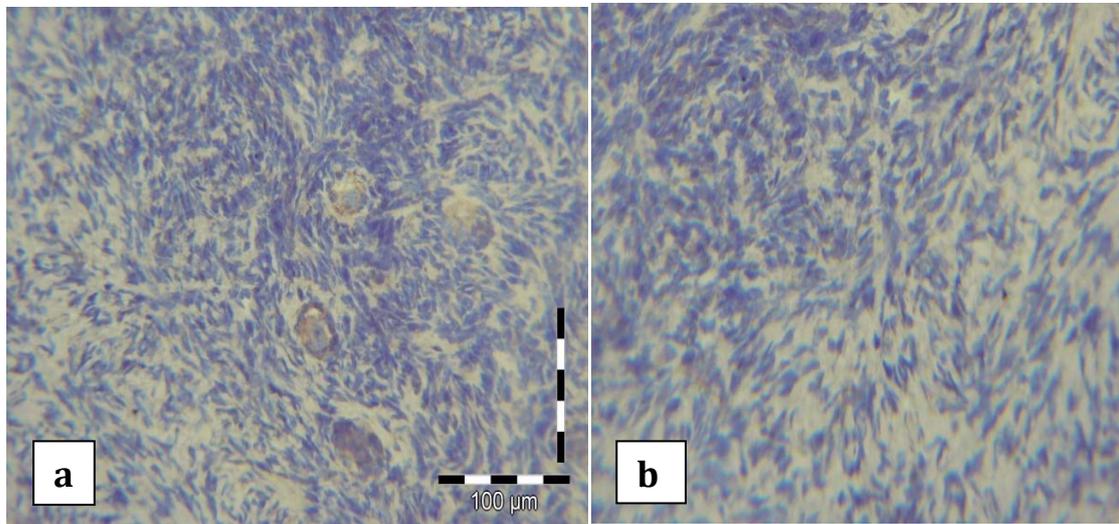


Abb. 31 IRAP-positive Befunde im ovariellen Stroma

- a) Positiver Nachweis der Insulin Regulated Aminoperoxidase in den Epithelzellen von Primärfollikeln
- b) Negativ-Kontrolle

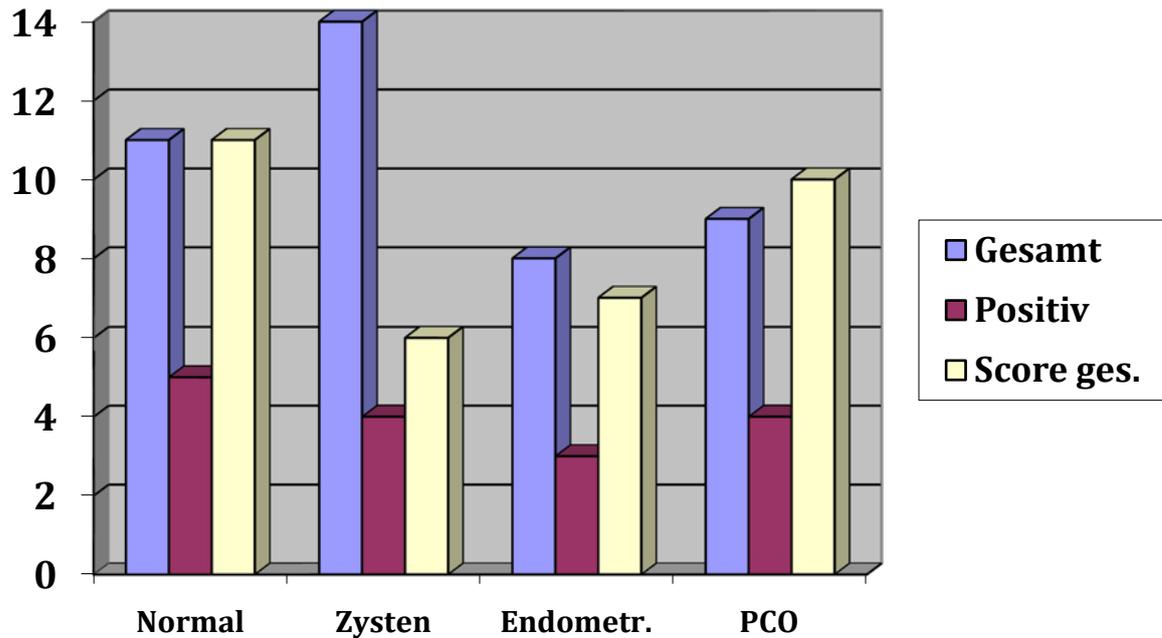


Abb. 32 Anteil und Scoresumme IRAP-positiver Fälle in den Befundgruppen

Aus Abbildung 32 ist zu ersehen, dass in den normalen und in den PCOS-Ovarien in der Hälfte der Fälle positive Anfärbungen nachgewiesen werden konnten mit relativ hohen Scorewerten.

In den Biopsien von Follikel- und Endometriosezysten waren die positiven Befunde und Scorewerte relativ geringer. Die statistische Auswertung der Befunde ergab zwischen den einzelnen Gruppen und auch im Vergleich zu den normalen Biopsien keine signifikanten Differenzen ($p > 0,05$), wenn auch in den normalen Proben die Scorewerte höher waren als bei den pathologischen Biopsien.

Weiterhin wurde überprüft, ob bei einer Summierung aller positiven Befunde der Wachstumsfaktoren und der IRAP Zusammenhänge zu erkennen sind.

In Abbildung 33 sind die absoluten Fallzahlen jeder Gruppe sowie die Summe der positiven Befunde und der Scorewerte graphisch dargestellt.

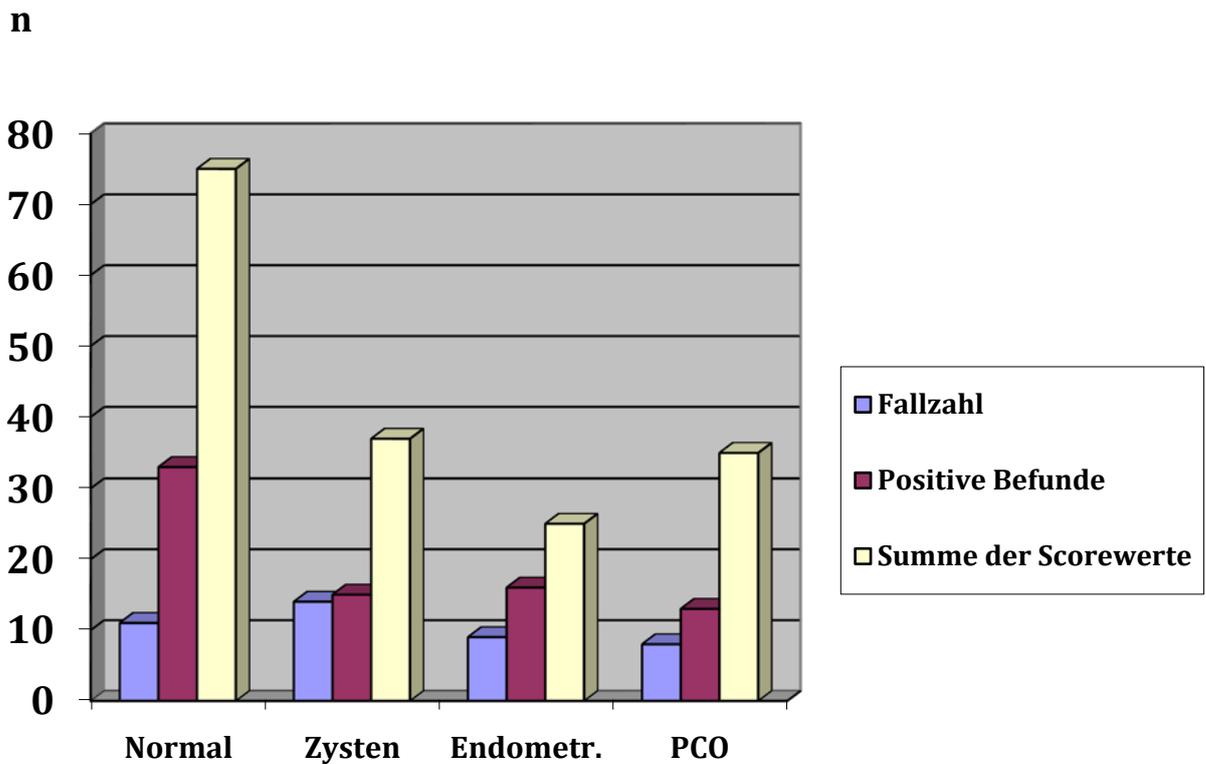


Abb. 33 Summe aller positiven Befunde und Scorewerte der Wachstumsfaktoren und der Insulin Regulated Aminopeptidase (n= absolute Werte)

Die normalen Ovarialbiopsien weisen gegenüber den pathologischen Ovarbefunden sowohl hinsichtlich der positiven Befunde als auch der Summe aus allen Scorewerten statistisch signifikant höhere Werte auf ($p < 0,05$).

4. Diskussion

Die Ovarien haben sowohl eine inkretorische als auch eine generative Funktion, denn in ihnen werden die weiblichen Geschlechtshormone gebildet und die Reifung der Eizellen wird ermöglicht. Dieser Funktionen entspricht auch der anatomische Aufbau. Am Ovar unterscheidet man eine äußere Hülle, die Tunica albuginea, die aus mehreren Bindegewebslagen besteht, eine äußere Rindenzone, Cortex ovarii, und eine innere Markzone, Medulla ovarii (Zona vasculosa). Im Stroma der Rindenzone lassen sich verschiedene Reifungsstadien der Follikel nachweisen, während in der Markzone Bindegewebs- und glatte Muskelzellen, elastische und retikuläre Fasern sowie Gefäße enthalten sind (Kühnel 1999). Die Primordialfollikel im Stroma ovarii enthalten eine Eizelle (Oozyt, Ovozyt) mit großem Kern und prominentem Nukleolus und sind von einer Schicht platter Follikelepithelzellen ausgekleidet. Die Primärfollikel weisen ein einschichtiges kubisches bis prismatisches Epithel auf.

Bei der weiteren Follikelreifung entsteht ein mehrschichtiges Epithel, das den Sekundärfollikel charakterisiert. Dieses mehrschichtige Epithel wird auch als Granulosazellepithel (Stratum granulosum) bezeichnet. Es kommt zur Bildung der Zona pellucida, einer homogenen Schicht aus Glykoproteinen zwischen Oolemm und Granulosazellschicht. Die Zona pellucida gewährleistet den spezie-spezifischen Kontakt der Spermien und induziert die akrosomale Reaktionen der Spermien (Gupta 1999).

Zum Stroma hin wird die Granulosazellschicht von der Theca folliculi umgeben, einer bindegewebigen Hüllschicht mit einer Basalmembran. Durch die Sekretion des Liquor folliculi werden die Granulosazellen auseinandergedrängt und es entsteht ein Hohlraum, das Antrum folliculi. Der im weiteren Verlauf der Eizellreifung entstehende Tertiärfollikel (antraler oder Bläschenfollikel) weist ein großes Antrum auf und das Granulosazellepithel wölbt sich an einer Stelle in Form eines Hügels (Cumulus oopherus) in die Follikelhöhle vor. Der Cumulus enthält die Eizelle, die jetzt von einer kräftigen Zona pellucida umgeben ist. Der sprungreife, präovulatorische oder Graaf'sche Follikel erreicht kurz vor der Ovulation einen Durchmesser von 20 – 25 mm.

Nach Findlay und Drummond (1996) sind in die Vorgänge der Proliferation und Differenzierung der Theka- und Granulosazellen verschiedene lokale Regulatoren einbezogen, wie zum Beispiel TGF-beta, IGF-1 und EGF/TGF-alpha.

Die zyklisch ablaufenden Vorgänge der ständigen Proliferation und Apoptose von Zellen im Ovar können durch innere oder äußere Einflüsse häufig auch zu Fehlsteuerungen oder

Tumorbildungen führen. Zystische und solide Tumoren der Ovarien sind im klinischen Ablauf nicht selten und oft auch problematisch.

Die Aufgabe dieser Arbeit war es, durch immunhistologische Untersuchungen an Ovarbiopsien neue Erkenntnisse über Immunreaktionen bei benignen Ovarialveränderungen zu erhalten. Als Methode wurde die Technik der Immunperoxidase-Reaktion eingesetzt, die ein international etabliertes Verfahren darstellt. Die eingesetzten monoklonalen Antikörper zur Antigenidentifizierung waren kommerziell hergestellt und sind von allgemein anerkannter und überprüfter Qualität und Standardisierung. Die Quantifizierung der positiven Färbungen ist für zelluläre Elemente wie die Immunzellen relativ unkompliziert, da die positiven Zellen sich durch eine dunkelbraune Membranfärbung gut differenzieren und damit auch auszählen lassen. Entscheidend ist nur, dass immer eine gleichgroße Fläche bei gleicher Vergrößerung ausgezählt wird, so dass der subjektive Fehler sich relativiert beim Vergleich zwischen normalen und pathologischen Befunden. Ob dabei ein oder 10 Gesichtsfelder oder das durch die Olympus DP10-Software vorgegebene Fläche von 50 Mikrometer Anwendung finden, ist für die Ergebnisse nicht entscheidend. Wichtig sind konstante Versuchsbedingungen.

Bei den vorliegenden Analysen wurden wie weiterhin allgemein üblich 3 Gesichtsfelder gewählt, weil dadurch ca. 80% der zur Verfügung stehenden Präparatfläche des Kryostatschnittes durchgemustert und bewertet werden konnten. Bei immunhistologischen Untersuchungen an Epithelien von Haut oder Schleimhäuten kann ein prozentuales Verhältnis zwischen positiv angefärbten Zellen zu negativen Zellen errechnet werden, um eine weitere quantitative Aussage zu machen, es sollte aber immer angegeben werden, welche Fläche ausgewertet wurde. Bei immunhistologischen Untersuchungen an Tumorgewebe kann die Anzahl positiver Anfärbungen in Relation zur Anzahl der Mitosen gewertet werden, wie es zum Beispiel bei der Bestimmung der Hormonrezeptoren beim Mammakarzinom möglich ist. Es bleibt jedoch stets auch ein subjektiver Faktor dabei zu berücksichtigen.

Da viele Antigene durch Formalinfixierung zerstört werden können, wurden bei den Untersuchungen native unfixierte Biopsien eingesetzt, von denen nach Einfrieren bei -20° Celsius im Kryostaten Gefrierschnitte hergestellt wurden. Da eine Hälfte der Biopsien der normalen pathohistologischen Analyse zugeführt wurde, stand nach dem Anfertigen von 20 Kryostatschnitten kein verwertbares Biopsiematerial mehr zur Verfügung. Der Nachteil der immunhistologischen Studien mit Kryostatschnitten ist deren geringe Haltbarkeit und nach Abschluss des Färbeprozesses und dem Eindecken der Schnitte ist keine weitere Analyse zum

Beispiel als Doppelfärbung zum Nachweis von CD45-Antigenen mehr möglich. Wenn Biopsien formalinfixiert und in Paraffin eingebettet wurden, lassen sich sogar nach dem Einbetten die Deckgläser entfernen und mit paraffingängigen Antikörpern weitere Untersuchungen durchführen. Bisher gibt es aber nur eine geringe Anzahl paraffingängiger Antikörper, so dass auch im internationalen Forschungsbereich weiterhin preiswertere Antikörper Verwendung finden, die an nativem Gewebe eingesetzt werden können.

In den Ovarialbiopsien wurden die T- und B-Lymphozyten vorwiegend im Stroma des Ovars nachgewiesen, eine Auszählung der Stromazellen des Ovars ist nicht möglich, da die Zellgrenzen lichtmikroskopisch nicht feststellbar sind. Ein Vergleich zum Beispiel mit CD45-positiven Zellen wäre nur sinnvoll, wenn am gleichen Schnitt Doppelfärbungen durchgeführt werden.

Die Analyse der klinischen Daten der Patientinnen ließ erkennen, dass die Frauen mit einem PCO-Syndrom mit durchschnittlich 25 Jahren am jüngsten waren, während in der Gruppe mit normalen Ovarien das Durchschnittsalter 49 Jahre betrug. Das Durchschnittsalter der Frauen mit Zysten oder Endometriose lag zwischen den beiden zuerst genannten Gruppen. Bei der Auswertung der Erkrankungen in der Anamnese der Patientinnen waren Operationen und internistische Erkrankungen am häufigsten festzustellen, wesentliche Differenzen zwischen den Gruppen waren nicht erkennbar.

Der Vergleich des Menarchealters zwischen den einzelnen Patientengruppen wies nur geringe Differenzen auf. Lediglich bei den Frauen mit einem PCO-Syndrom war der Eintritt der Menarche mit durchschnittlich 13,6 Jahren etwas später als bei den Frauen der Vergleichsgruppe mit 13,2 Jahren. Auch der Vergleich der Zykluslänge bei den Patientinnen ließ keine wesentlichen Differenzen erkennen. Bei Patientinnen mit einem PCO-Syndrom betrug die Zykluslänge durchschnittlich 32 Tage, in der Normalgruppe 30 Tage.

Die Analyse der Geburtsfrequenz im Patientengut zeigte, dass mit Ausnahme der Frauen mit einem PCO-Syndrom die überwiegende Anzahl ein bis zwei Geburten angegeben hatten. In der Gruppe mit einem PCO-Syndrom war lediglich bei einer Frau von den 9 Patientinnen eine Geburt zu verzeichnen. Die Abortfrequenz war in allen Gruppen relativ niedrig, ein Abort wurde in jeder Gruppe wenigstens von einer Patientin angegeben. Mehr als ein Abort konnte bei Frauen der Normalgruppe und bei Patientinnen mit einer Ovarialzyste festgestellt werden. Die Häufigkeit der Abruptiones im Patientengut war im Vergleich zu den Aborten auffallend höher. Sowohl in der Normalgruppe als auch bei den Frauen mit einer Ovarialzyste

wurde jeweils von 6 Patientinnen ein Schwangerschaftsabbruch angegeben. Auch bei den Frauen mit einem PCO-Syndrom ließen sich ein bzw. 2 Abruptiones nachweisen.

Die Überprüfung der gynäkologischen Erkrankungen in der Anamnese der Patientinnen zeigte, dass Operationen und Blutungsstörungen am häufigsten vorkamen, wesentliche Differenzen zwischen den Gruppen konnten nicht ermittelt werden. Die Indikationen für das operative Vorgehen waren überwiegend Ovarialzysten und ein Uterus myomatosus. In der Gruppe der Frauen mit einem PCO-Syndrom war die Indikation für eine Pelviskopie stets der sonographische Verdacht auf ein PCO-Syndrom.

Die Auswertung aller klinischen Daten lässt erkennen, dass die verschiedenen Patientengruppen im Prinzip vergleichbar sind, lediglich die Frauen der Normalgruppe wiesen ein höheres Alter auf.

Die Überprüfung der klinischen Daten mit den Laborergebnissen durch die Korrelationsanalyse zeigte mehrfache Zusammenhänge der CD4-, CD8- und CD56-Zellen mit dem Alter der Patientinnen. In der Normalgruppe korrelierte die Anzahl der CD56-Zellen zusätzlich auch mit der Menarche und dem Zyklus. Diese Ergebnisse unterstreichen die bekannte Tatsache, dass im Verlauf des Lebens das Immunsystem auf zellulärer Ebene sich verändert und auch von hormonellen Faktoren beeinflusst wird.

Die Fortschritte der Wissenschaft auf dem Gebiet der Immunologie konnten in den letzten Jahrzehnten belegen, dass in dem überwiegenden Anteil aller Erkrankungen das Immunsystem involviert ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass auch bei benignen Erkrankungen der Ovarien Immunvorgänge eine Rolle spielen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte in erster Linie untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß eine Beteiligung des zellulären Immunsystems bei zystischen Veränderungen der Ovarien vorliegt.

Die wichtigsten Immunzellen sind in diesem Zusammenhang die T- und B-Zellen sowie die Natürlichen Killerzellen. Bei den T-Zellen lassen sich die T-Helfer- oder CD4- und die zytotoxischen oder CD8-Zellen unterscheiden (Holländer 2006). Durch den Einsatz der Immunperoxidasetechnik mit monoklonalen Antikörpern lassen sich die Immunzellen auf Grund ihrer Differenzierungsantigene nachweisen, d. h. exakt identifizieren. So ermöglicht der CD45-Marker (Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 180-220 kD, die eine Familie von acht Leukozyten-spezifischen Molekülen bilden), ein allgemeines Leukozytenantigen, auch als common leukocyte antigen (LCA) bezeichnet, die Identifizierung aller Leukozyten im Gewebe. Die leukozytäre Infiltration lässt sich jedoch bereits im einfachen HE-Schnitt nachweisen und führt bei immunologischen Fragestellungen zu keinen

weiteren Erkenntnissen. Für die vorliegende Fragestellung waren die unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften der Immunzellen von Interesse.

Die Charakterisierung der T-Helferzellen ist möglich durch deren CD4-Antigen, das ein einfaches Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 59 kD ist und sich auf ca. 60% der zirkulierenden T-Zellen nachweisen lässt. Auch auf Monozyten kann das CD4-Antigen schwach ausgeprägt sein (Janeway et al. 2002). Nach Kontakt der Helferzellen mit einem Antigen erfolgt eine Differenzierung der ursprünglich nicht determinierten T-Helfer-0-Zellen in TH1- oder TH2-Zellen. Die TH1-Zellen sezernieren Interleukin-2, Interferon-gamma, TNF-beta sowie GM-CSF und führen über Makrophagen-Aktivierung zu ausgeprägten Entzündungsreaktionen. Die TH2-Zellen bilden Interleukin-4 und -5 und aktivieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern (Abbas und Lichtman 2004).

Die Charakterisierung der zytotoxischen T-Zellen ist möglich durch das CD8-Antigen, das aus 2 Polypeptidketten besteht und ein Molekulargewicht von 32-33 kD hat. Die CD8-Lymphozyten haben die Aufgabe, mit Viren oder Bakterien infizierte Zellen in Koordination mit den MHC-I-Molekülen abzutöten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen wiesen nach, dass sowohl CD4- als auch CD8-Zellen in den Ovarialbiopsien nachweisbar waren. Die arithmetischen Mittelwerte der CD4-Zellzahl waren in den normalen Ovarien am geringsten und mit statistischer Signifikanz in der Gruppe der PCO-Patientinnen am höchsten. In den Biopsien von Ovarial- und Endometriosezysten waren die CD4-Zellen gegenüber den normalen Proben nur gering erhöht. In den Endometriosezysten ließ sich auch eine erhöhte Anzahl von CD8-Zellen feststellen.

Immunhistologische Untersuchungen zum Nachweis von Immunzellen im Ovar führten Brännström et al. (1994) an Ovarialbiopsien von 18 Frauen durch. In den durch eine Laparoskopie gewonnenen Biopsien konnten sie Makrophagen und neutrophile Granulozyten in der Follikelwand und im Gelbkörper nachweisen, deren Zahl sich im Verlauf des Zyklus veränderte.

Etwas umfangreichere Untersuchungen an Ovarbiopsien führten Suzuki et al. (1998) durch. Die Autoren konnten mit immunhistologischen Untersuchungen an 30 Biopsien CD3-, CD4- und CD8-Zellen im ovariellen Stroma und in der Thekazellschicht nachweisen. Sie stellten die Hypothese auf, dass T-Lymphozyten und Makrophagen eine wesentliche Rolle bei der Follikelatresie und der Gelbkörperbildung spielen.

Bukulmez und Arici (2000) betrachten die Follikelruptur während der Ovulation als Entzündungsreaktion. Es erfolgt eine Mobilisation thekaler Fibroblasten, eine erhöhte Leukozytenmigration, das Freisetzen bestimmter Mediatoren und der Verlust von Bindegewebeelementen in der Follikelwand. Die Bildung und Rückbildung des Gelbkörpers ist verbunden mit einer fortschreitenden Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen sowie der Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen.

Die immunhistologischen Untersuchungen an 40 Ovarien prae- und postmenopausaler Frauen durch Flor (1999) wiesen CD4-, CD8- und B-Zellen sowie CD25-positive Zellen, Natürliche Killerzellen und Granulozyten nach. Bei praemenopausalen Frauen waren insgesamt die Zellzahlen höher als in den Ovarien postmenopausaler Frauen. Die Ergebnisse wiesen auf den Zusammenhang zwischen Endokriniem und Immunsystem hin.

Durch experimentelle Studien an Mäusen, die über 20 Tage mit Dehydroepiandrosteron (DHEA) zur Bildung von Ovarialzysten behandelt wurden, stellten Luchetti et al. (2004) immunhistologisch und mit der Flowzytometrie fest, dass die Anzahl der infiltrierten T-Lymphozyten im Ovar angestiegen war. Es kam zu einer Erhöhung der CD8-Zellen und einer Reduzierung der CD4-Zellen, die nach Meinung der Autoren auf eine Störung der Ovarialfunktion bei der Entwicklung von Zysten hinweisen.

Die vorliegenden Untersuchungen lassen erkennen, dass bei den pathologischen Ovarbefunden sowohl die T-Helfer- als auch die zytotoxischen T-Zellen vermehrt nachweisbar sind. Damit zeigt sich, dass bei benignen Veränderungen der Ovarien die adaptive Immunität auf zellulärer Ebene stark involviert ist und eine regulatorische Funktion ausübt, die hormonabhängig ist.

Die Identifizierung der B-Zellen ist möglich durch das CD19-Antigen, ein transmembranes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 95 kD. Das CD19-Antigen ist in allen Stadien der B-Zelldifferenzierung nachweisbar, vom Pro-B-Zellstadium bis kurz vor der Differenzierung zur Plasmazelle. Die CD19- und CD22-Antigene sind die frühesten B-Zell-spezifischen Marker, letztere werden zunächst nur im Zytoplasma und erst im Laufe der B-Zell-Reifung auf der Oberfläche exprimiert. Weitere Marker für reife B-Zellen sind die CD21- und CD23-Antigene, die aber wegen geringerer Affinität bzw. möglicher Kreuzreaktionen mit dem Epstein-Barr-Virus oder dem C3d-Fragment des Komplements für immunhistologische Untersuchungen nicht gut geeignet sind.

Die Aufgabe der B-Zellen besteht in der Bildung von Antikörpern und sie sind damit von Bedeutung für die sog. humorale Immunität. Bereits auf der Oberfläche reifer B-Zellen

werden Immunglobuline exprimiert, die dann von den Plasmazellen in größeren Mengen sezerniert werden (Pezzutto et al. 2007). Die Antigenbindung an B-Zellen führt innerhalb weniger Sekunden zu einer messbaren Steigerung der intrazytoplasmatischen Kalziumkonzentration und binnen weniger Stunden zu einer Überexpression der Antigene CD69 und CD71. Die Antigene CD25 werden nach 2-3 Tagen auf der Zellmembran hochreguliert.

Die Aminosäuresequenzen als Bausteine für die fertigen Immunglobuline werden bereits in Vorläuferzellen der B-Zell-Ontogenese festgelegt (Löffler 2004). Unsere immunhistologischen Untersuchungen zeigten, dass die Anzahl der B-Zellen im normalen Gewebe höher war gegenüber den Zysten und dem PCO-Syndrom. Daraus ist ersichtlich, dass die Antikörpervermittelte Immunität bei diesen pathologischen Ovarveränderungen entweder nicht wesentlich involviert ist oder bereits abgelaufen war und deshalb nur noch wenige infiltrierte B-Zellen im Gewebe vorhanden waren.

Der Nachweis aktivierter Immunzellen ist u.a. durch Identifizierung des CD25-Antigens an der Zelloberfläche möglich. Das CD25-Antigen besteht aus einer einfachen Glykoproteinkette und hat ein Molekulargewicht von 55 kD. Es wird bei Aktivierung einer Zelle exprimiert und lässt sich an aktivierten T- und B-Zellen, Makrophagen und regulatorischen T-Zellen feststellen. Bei den vorliegenden Untersuchungen waren die CD25-positiven Zellen in den Biopsien von pathologischen Ovarveränderungen mit statistischer Signifikanz geringer als im normalen Ovarialgewebe. Diese Befunde lassen die Schlussfolgerung zu, dass bei diesen benignen Ovarialveränderungen keine akuten Immunreaktionen zum Zeitpunkt der Analysen mehr nachweisbar waren.

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine bestimmte Population der T-Zellen eine regulatorische Funktion hat, dabei handelt es sich um CD4+CD25+ Zellen. Diese Zellen haben eine große Bedeutung für die Regulation der Immunantwort und die Inhibition von immunpathologischen Prozessen (Shevach et al.2003, O`Garra und Vieira 2004). Mehrere Autoimmunkrankheiten, wie Colitis ulcerosa, rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose und die autoimmune Enzephalomyelitis werden im Verlauf von den regulatorischen T-Zellen beeinflusst (Singh et al.2001).

Bei unseren Untersuchungen waren die CD4-Zellen bei den pathologischen Ovarbiopsien zum Teil mit statistischer Signifikanz gegenüber dem normalen Ovarialgewebe erhöht, da aber die CD25-positiven Zellen bei den pathologischen Biopsien deutlich verringert waren, können

diese regulatorischen T-Zellen zum Zeitpunkt der Gewebsentnahme keine Bedeutung gehabt haben.

Die Natürlichen Killerzellen (CD56) lassen sich durch das CD56-Antigen identifizieren, das auch als nervales Adhäsionsmolekül N-CAM bezeichnet wird und ein Molekulargewicht von 220/135 kD hat. Die CD56- oder NK-Zellen sind für die unspezifische zelluläre Immunität verantwortlich. Die durchschnittliche Anzahl der NK-Zellen bei den vorliegenden Untersuchungen war nicht sehr hoch, 2,7 Zellen in den normalen Ovarien. In den pathologischen Biopsien war die Anzahl der NK-Zellen etwas geringer als in den normalen Proben, aber statistisch nicht signifikant. Die natürliche zellvermittelte Immunität spielt nach unseren Analysen erwartungsgemäß keine wesentliche Rolle in der Pathogenese benigner Ovarialveränderungen, da diese Zellen keine regulatorischen Funktionen besitzen.

Die Gegenüberstellung der Lymphozytenwerte von normalen und pathologischen Ovarbiopsien zeigte deutlich, dass es besonders die T-Zellen (CD4- und CD8-Zellen) sind, die bei benignen Ovarialprozessen eine Rolle spielen, d.h. es kommt zu einer nachweisbaren zellulären Reaktion des Gewebes.

Nach den immunhistologischen Untersuchungen von Wu et al. (2007) spielen die T-Lymphozyten eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des PCO-Syndroms, das erstmals von Stein und Leventhal (1935) beschrieben wurde und durch Amenorrhoe, Hirsutismus und Adipositas charakterisiert war. Die Kriterien für die Diagnose des PCO-Syndroms wurden mehrfach überarbeitet und verändert. Hauptsymptome sind weiterhin Hyperandrogenämie und Ovarialinsuffizienz; andere Ursachen, wie Cushing-Syndrom, 21-Hydroxylase-Mangel, Hyperprolaktinämie, androgenbildende Tumoren des Ovars oder der Nebennieren, pharmakologische Androgenisierung (z.B. Einnahme von Anabolika) sollten ausgeschlossen sein (Weiss et al. 2008). Nach dem aktuellen Konsensus von ESHRE und ASRM von 2003 wurden die Rotterdam-Kriterien aufgestellt; danach sollten wenigstens 2 von den 3 Hauptkriterien wie Zyklusstörungen (Oligo- oder Amenorrhoe), klinische und/oder biochemische Zeichen der Hyperandrogenämie und polyzystische Ovarien vorliegen.

Bei der sonographischen Diagnostik von polyzystischen Ovarien sollten jeweils mindestens 12 Follikel mit einer Größe zwischen 2 - 9 mm oder einem Ovarvolumen von >10 ml vorliegen. Typische klinische Symptome sind weiterhin neben der Infertilität noch Akne und Adipositas (Seifert und Bals-Pratsch 2006). Es wurden allerdings auch polyzystische Ovarien bei endokrinologisch unauffälligen Patientinnen beobachtet (Polson et al. 1988).

Wu et al. (2007) analysierten verschiedene Lymphozytensubpopulationen in Ovarialbiopsien und in der Follikelflüssigkeit von PCO-Patientinnen. Sie stellten fest, dass besonders CD45-positive Zellen bis zu 60% in der Thekazellschicht vermindert sind. Diese Befunde korrelieren mit den Ergebnissen von Turi et al. (1988), die im Serum von Frauen mit einem PCO-Syndrom eine Reduzierung der CD8-Zellen um 64% und der Natürlichen Killerzellen (CD56) um 60% feststellten. Weiterhin fanden sie eine positive Korrelation zwischen den verminderten Immunzellen und den erhöhten Testosteronwerten im Serum. Damit wiesen sie einen Zusammenhang zwischen endokrinem und Immunsystem nach und dass die Androgene die Lymphozytensubpopulationen beeinflussen.

Wicherek et al. (2006) untersuchten immunhistologisch Ovarialbiopsien von 33 Frauen mit Endometriose am Ovar. Die Autoren wiesen nach, dass CD25-positive Zellen bei Endometriose vermehrt waren gegenüber einer Kontrollgruppe, während CD56-positive Zellen in geringerer Anzahl festgestellt wurden.

In der Follikelflüssigkeit von Frauen mit einer Endometriose konnten Lachapelle et al. (1996) dagegen eine höhere Anzahl von NK-Zellen, B-Zellen und Makrophagen nachweisen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Die Autoren sehen in diesen Veränderungen einen Grund für die gestörte Follikulogenese und Oozytenreifung.

Die Cytokeratine gehören zur großen Gruppe der Intermediärfilamente, von denen z. B. ca. 10 Keratine für „harte“ Epithelschichten spezifisch sind und Nägel und Haare bilden. Etwa 20 weitere Keratine lassen sich in Epithelgeweben nachweisen und werden als Cytokeratine bezeichnet (Lodish et al. 2001). Zum Nachweis Cytokeratin-positiver Zellen bzw. Gewebsbestandteile wurde ein monoklonaler Antikörper eingesetzt, der mit Cytokeratin 1 und 10 reagiert. Die Gewebsreaktivität dieses Antikörpers bezieht sich auf alle epitheliale Zellen und Keratinozyten in vorwiegend suprabasalen Schichten von verhornenden und nichtverhornenden Plattenepithelien und Drüsenepithel.

Das Anfärbungsmuster ist meistens zytoplasmatisch. Die Auswertung der Befunde der vorliegenden Arbeit wies keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen nach. Es zeigte sich lediglich bei den normalen Biopsien, dass die Summe der Scorewerte auffallend hoch war. Bei den Zysten und beim PCO-Syndrom waren die positiven Befunde und die Scorewerte meistens geringer. Die Hypothese, dass beim PCO-Syndrom eine verstärkte Keratinisierung vorliegt, besonders im Bereich der Tunica albuginea, konnte nicht bestätigt werden. Da aus der Literatur (Donat 1987) bekannt ist, dass in Ovarbiopsien infertiler Patientinnen Fibrinogen nachweisbar ist, könnte nach der Vernetzung zu Fibrin eine

Kollagenisierung der Tunica erfolgen, die dann zunehmend kapselartig das Ovar umgibt und damit die Ovulationen unterdrückt.

Salvetti et al. (2004) untersuchten die Expression von Zytoskelettproteinen in der Wand von induzierten Ovarialzysten und stellten fest, dass in den Granulosazellen von atretischen und zystischen Follikeln Vimentin und Cytokeratine signifikant stärker exprimiert werden als in einer Kontrollgruppe. Die Autoren sehen darin eine notwendige Anpassung der Struktur an die Zellfunktionen.

Der Nachweis des Rezeptors für den Insulin-like Growth Factor (IGF-1R, CD221) ist möglich durch einen Antikörper, der gegen die Alpha-Untereinheit des Rezeptors Typ I gerichtet ist und nicht mit dem Insulinrezeptor reagiert.

Die vorliegenden Untersuchungen wiesen keine signifikanten Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen auf. Es war jedoch ersichtlich, dass die meisten positiven Befunde und höchsten Scorewerte bei den normalen Ovarien festzustellen waren.

Für die Ovarialfunktion sind die Gonadotropine und Sexualsteroiden die dominanten Regulatoren, es sind aber auch verschiedene Wachstums- und Differenzierungsfaktoren von Bedeutung. Das IGF-System nimmt dabei eine zentrale Stellung ein (Geisthövel et al. 1991). Das IGF-1 wirkt als Ko-Gonadotropin, indem es rezeptorvermittelt alle gonadotropinabhängigen Effekte unterstützt, und dessen Funktionen von 6 verschiedenen IGF-Bindungsproteinen (BP) reguliert werden.

Nach Giudice (1999) sind sowohl für die normale wie auch die gestörte Entwicklung der Ovarialfollikel IGF-1, seine Rezeptoren und Bindungsproteine und die Proteasen von Bedeutung. Die IGFs stimulieren im Ovar die Zellmitose und Steroidgenese und sie inhibieren die Apoptose. Die Expression bestimmter IGF-Muster bestimmen, ob ein Follikel estrogen- oder androgendominant wird. Die Follikel von PCO-Patientinnen sind androgendominant und werden nicht atretisch, was auf einen streng intraovariellen Prozess beim PCO-Syndrom hinweist.

Beim PCO-Syndrom gibt es eine Reihe von Abweichungen innerhalb dieses Regulationssystems (Giudice et al. 1996). Im Serum von PCO-Patientinnen finden sich normale IGF-1-Werte (Homburg et al. 1992), häufig ist allerdings das IGF-BP-1 erniedrigt. Bei unseren Untersuchungen waren die IGF-1-Rezeptoren im Ovargewebe auch bei PCO-Patientinnen erniedrigt. Dadurch könnte eine gewisse FSH-Resistenz in diesen Fällen erklärt werden, so dass die hypophysäre Stimulation der Ovarien erfolglos ist.

Die Klärung der Pathogenese des PCO-Syndroms bleibt weiterhin von wissenschaftlichem und klinischem Interesse, auch wenn zahlreiche Untersuchungen vorliegen. So analysierten Urdl und Desoye (1995) die Seren von 28 Frauen mit einem PCO-Syndrom und stellten fest, dass bei diesen Frauen neben einem erhöhten Androgenspiegel auch IGF-1 und Insulin erhöht sind sowie ein erhöhter Body-Mass-Index vorliegt. Im Gegensatz dazu waren die Wachstumsfaktoren (HGH), die HGH/IGF-1-Ratio und die Anzahl der Insulinrezeptoren an den Erythrozyten bei Patientinnen mit einem PCO-Syndrom signifikant vermindert.

Die Insulin-Rezeptor-Affinität, die maximale Bindungskapazität und der Insulin-Rezeptor-Komplex waren wiederum erhöht bei diesen Frauen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. In diesen Veränderungen sehen die Verfasser einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese des PCO-Syndroms. Die Untersuchungen zeigen u.a., welche Bedeutung dem Übergewicht zukommt; so sollte schon bei jungen Mädchen mit Übergewicht und Zyklusstörungen auf die Folgen für die spätere Fertilität hingewiesen werden und eine entsprechende Gesundheitserziehung erfolgen (Norman 2004). Nach Blüher (2009) stellt das PCO-Syndrom mit einer Prävalenz von 5-7% die häufigste gynäkologisch-endokrinologische Erkrankung in Deutschland dar. Häufig weisen diese Patientinnen eine gestörte Glukosetoleranz oder einen Diabetes mellitus Typ 2 und eine Adipositas auf. Es sind 16-85% dieser Frauen übergewichtig und haben eine abdominale Fettverteilung (Escobar und San Millan 2007). Dem PCO-Syndrom liegen die gleichen Pathomechanismen zugrunde wie dem Metabolischen Syndrom. In beiden Krankheitsbildern ist ein wesentlicher pathogenetischer Faktor eine periphere Insulinresistenz. Die dadurch bedingte Hyperinsulinämie stimuliert am weniger insulinresistenten Ovar die Steroidsynthese und die Androgensekretion. Nach Auernhammer et al. (2002) stimuliert Insulin direkt an den Thekazellen des Ovars das Enzym P450c17Alpha, das ein Schlüsselenzym zur Umwandlung von Progesteron zu Androstendion darstellt, das zu Testosteron konvertiert werden kann. Insulin kann außerdem die LH-Sekretion der Hypophyse stimulieren und damit indirekt die Androgenproduktion der Thekazellen.

Auch nach Franks et al. (1999) hat Insulin eine Wirkung zur Verstärkung der LH-induzierten Androgenproduktion in den Thekazellen, wodurch die Hyperandrogenämie bei adipösen Frauen mit einem PCO-Syndrom erklärt wird. Die Hyperinsulinämie trägt zum vorzeitigen Wachstumsstillstand der Follikel bei, wodurch es zur Anovulation bei PCO-Patientinnen kommt. Die Behandlung mit Metformin führt zur Senkung des Insulinspiegels und damit zur Besserung der Symptomatik.

Keck und Tempfer (2008) empfehlen auch Rosiglitazon zur Therapie des PCO-Syndroms; das Präparat kann allerdings auch zur Gewichtszunahme führen. Auch die Autoren Aquino Carlos et al. (1999) unterstützen die Hypothese, dass in der Pathogenese des PCO-Syndroms ein Synergismus besteht zwischen IGF-1, Insulin, LH-Sekretion und Androgenproduktion.

Liang et al. (1997) untersuchten mit der PCR-Methode die IGF-I-Rezeptor-Genexpression in den Ovarien von 35 Frauen mit einem PCO-Syndrom. Dabei zeigte sich, dass die IGF-I-Rezeptor-Expression im Stroma der PCO-Ovarien exzessiv erhöht war im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Da in den vorliegenden Analysen der gewebsgebundene IGF-1-Rezeptor vermindert war, kann gefolgert werden, dass die Genexpression für diesen Rezeptor zwar stimuliert ist, der Rezeptor sich aber nicht an der Zelloberfläche genügend manifestieren kann. Es ist auch ein verstärkter Abbau des Rezeptors beim PCO-Syndrom denkbar.

Qin und Rosenfield (1998) stellten fest, dass das Insulin/IGF-System die Expression von P450c17-mRNA in den Ovarien und Nebennieren stimuliert, wodurch die Steroidgenese gestört und ein Hyperandrogenismus entsteht.

Die Therapie des PCO-Syndroms sollte nach Weiss et al. (2008) umfassend erfolgen, um auch gesundheitliche Spätschäden zu vermeiden. Die Autoren empfehlen eine Veränderung der Lebensgewohnheiten mit mehr Hinwendung zu Sport, gesunder Ernährung und Gewichtsreduktion. Durch eine medikamentöse Therapie mit Clomifen kann in ca. 70% der Fälle eine Ovulation erreicht werden. Als Antidiabetika werden neben Metformin auch Glitazone, Troglitazon, Rosiglitazon, Pioglitazon und Acarbose diskutiert. Eine Low-dose-FSH-Stimulation, eine Kombination von Metformin mit Gonadotropinen, die Medikation von Aromatasehemmern (z.B. Letrozol) oder das Drilling der Ovarien kann zum Erfolg führen.

Ein erhöhtes Karzinomrisiko nach ovarieller Stimulation ist nach Juhasz-Böss et al. (2008) nicht eindeutig zu belegen, obwohl einige Hinweise in der Literatur vorliegen (Althuis et al. 2005; Brinton et al. 2004; Cusido et al. 2007).

Der Zusammenhang zwischen einer Störung der Wachstumshormone und dem PCO-Syndrom wird von mehreren Autoren durch klinische und experimentelle Studien belegt (Piaditis et al. 1995; Spiliotis 2003; Premoli et al. 2005). Piaditis et al. (1995) bestimmten Wachstumshormone und IGF-I bei Frauen mit einem PCO-Syndrom vor und nach einer Stimulierung der Hypophyse mit Dopamin und GnRH. Sie stellten fest, dass Frauen mit einem PCO-Syndrom nach der Stimulierung eine geringere Sekretion der Wachstumshormone hatten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Die Autoren vermuten bei diesen Patientinnen eine Störung im Hypothalamus.

Die experimentellen Untersuchungen von Stubbs et al. (2007) an den Ovarbiopsien von 5 Frauen mit einem anovulatorischem PCO-Syndrom wiesen nach, dass in der Pathogenese dieser Erkrankung eine Störung in der präantralen Follikulogenese vorliegt. Die Autoren analysierten das minichromosomale Stabilitätsprotein2(MCM2), das für die Teilung der Granulosazellen verantwortlich ist, und stellten fest, dass bei einem PCO-Syndrom die Proliferation der Granulosazellen erhöht ist mit einem erhöhten Anteil präantraler Follikel. Diese Ergebnisse stellen einen weiteren Beitrag zur Erforschung der Pathogenese des PCO-Syndroms dar und würden die erhöhte Anzahl von Primärfollikeln in den PCOS-Ovarien erklären.

Von Interesse sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der immunhistologischen Studien von Takayama et al. (1996), die nachwiesen, dass die Follikel in PCOS-Ovarien nicht atretisch sind, sondern aktiv in die Steroidgenese und Zellproliferation eingebunden sind. Das Fehlen von Estrogenrezeptoren und der Aromatase-Expression in den Granulosazellen dieser Ovarien ist von wesentlicher Bedeutung für die abnormale Follikelentwicklung.

Der Nachweis des Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-1 (VEGF R1) erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper, der sich vorwiegend an die endotheliale Basalmembran bindet. Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein pro-angiogenetischer Wachstumsfaktor, der in proliferierendem Gewebe die Gefäßneubildung bewirkt. Zur VEGF-Familie gehören die Mitglieder VEGF-A, -B, -C, -D und -E sowie der Placenta-derived Growth factor (PlGF), die sich an die Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGF R1 und R2 auf den Endothelzellen binden.

Klinische Bedeutung hat die Therapie mit VEGF-Antikörpern (z.B. Bevacizumab, Avastin) in Kombination mit einer Chemotherapie bei Kolon- und Mammakarzinomen erlangt. Die Antikörper binden VEGF und hemmen dadurch die biologische Aktivität von VEGF, das in Tumoren oft überexprimiert ist und mit einer ungünstigen Prognose korreliert (Pezutto et al. 2007). Es wird so die Interaktion von VEGF mit seinen Rezeptoren VEGF-R1 und -R2 auf den Endothelzellen verhindert.

Den immunhistochemischen Nachweis von VEGF im Ovar erbrachten Gordon et al. (1996) an Biopsien von 10 prämenopausalen und 4 postmenopausalen Frauen. In den normalen Ovarien von prämenopausalen Frauen konnten sie VEGF vorwiegend in der Thekazellschicht und in geringen Mengen in der Granulosazellschicht feststellen. VEGF fand sich nicht in atretischen Follikeln oder in degenerierten Gelbkörpern. Eine intensive VEGF-Expression konnte in den stark vaskularisierten Corpora lutea nachgewiesen werden. In den Ovarien

postmenopausaler Frauen ließ sich nur in epithelialen Okklusionszysten und in Zystadenomen VEGF feststellen. VEGF soll während der Reproduktionsphase der Frau besonders von Bedeutung sein für das Wachstum und den Erhalt der Follikel und Gelbkörper.

Nach den Untersuchungen von Agrawal et al. (1998A) spielt der VEGF auch eine Rolle beim PCO-Syndrom. Die Verfasser stellten fest, dass bei Frauen mit einem PCO-Syndrom die Serum-VEGF-Konzentrationen signifikant höher sind als bei Frauen mit normaler Ovarialfunktion. Sie interpretieren das Ergebnis im Zusammenhang mit einer erhöhten Vascularisation der Ovarien, die sie mit der Doppler-Flow-Messung nachwiesen.

Diese Ergebnisse werden durch die Studien von Ab del Aal et al. (2005) unterstützt, die bei PCO-Patientinnen sowohl eine Erhöhung der Serum-VEGF- als auch der IGF-Konzentrationen feststellten, die mit der Ovarialdurchblutung korrelierten. Im Vergleich mit den vorliegenden Untersuchungen ist die Schlussfolgerung naheliegend, dass durch die verminderte Anzahl der VEGF- und IGF-Rezeptoren in den Ovarbiopsien von PCO-Patientinnen nicht genügend VEGF und IGF gebunden werden können, so dass notwendigerweise ihr Serumspiegel ansteigt.

Bei einer ovariellen Stimulation mit HCG-Präparaten kommt es nach Agrawal et al. (1998B) zu einer Erhöhung der VEGF-Konzentration im Serum der Frauen, die bei Patientinnen mit einem Überstimulationssyndrom weiter steigt. Die Verfasser sehen im VEGF einen Mediator, der sowohl im Zusammenhang mit dem PCO-Syndrom als auch mit einer Überstimulierung steht.

Artini et al.(2006) bestimmten neben VEGF auch den basalen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) im Serum und in der Follikelflüssigkeit von Frauen mit einem PCO-Syndrom. Beide Wachstumsfaktoren waren im Serum und in der Follikelflüssigkeit dieser Patientinnen höher als bei einer Kontrollgruppe. Nach einer HCG-Stimulation stiegen die Serum-VEGF-Spiegel an. Die bFGF-Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit korrelierten mit der Anzahl der reifen Oozyten, so dass diese Werte bei der IVF-Strategie von Bedeutung sein könnten.

Ferrara et al. (2003) wiesen u.a. auch VEGF-mRNA in den Ovarien nach, besonders in den Granulosazellen, gelegentlich auch in den Thekazellen. Die verstärkte Expression in PCOS-Ovarien sehen sie im Zusammenhang mit der erhöhten Angiogenese und der Zystenbildung. Wenn auch die mRNA für VEGF bei diesen Studien erhöht war, die vorliegenden Ergebnisse konnten jedoch keinen erhöhten Rezeptorstatus für VEGF nachweisen. So ist wohl in Analogie zum IGF-Rezeptor auch die intrazelluläre Genexpression für den VEGF-Rezeptor erhöht, der Rezeptor an der Zellmembran aber nur vermindert nachweisbar. Diese Resultate können

einen weiteren Einblick in die Pathogenese des PCO-Syndroms ermöglichen, geben aber keine weiteren Hinweise über die Ätiologie der Erkrankung.

Nach den Untersuchungen von Stanek et al. (2007) sind luteinisierte Granulosazellen von Frauen mit einem PCO-Syndrom sensitiver gegenüber Insulin. IGF und Insulin sollen die Produktion von VEGF-A in den luteinisierten Granulosazellen verstärken.

Nach Druckmann und Rohr (2002) haben Patientinnen mit einem PCO-Syndrom eine Insulinresistenz in Verbindung mit einem erhöhten IGF-1-Plasmaspiegel.

Auch im Zusammenhang mit der Endometriose spielen Wachstumsfaktoren eine Rolle. Es wurde nachgewiesen, dass Makrophagen der Peritonealflüssigkeit EGF und TGF-Beta sowie VEGF produzieren. VEGF ist dabei von Bedeutung für die Angiogenese im Rahmen der Pathophysiologie der Endometriose (McLaren et al.1996). Sowohl die VEGF-Konzentrationen als auch die entsprechenden Rezeptoren sollen bei Patientinnen mit Endometriose erhöht sein. Goteri et al. (2004) analysierten immunhistologisch die Endometriosezysten von 32 Patientinnen auf das Vorhandensein von VEGF. Sie wiesen den Wachstumsfaktor in den Epithelzellen, in den Kapsel-fibroblasten und in den Gefäßen der Zysten nach. Es wurde vermutet, dass die Neoangiogenese besonders an der äußeren Zystenwand für den Fibrosierungsprozess von Bedeutung ist.

Untersuchungen über einen möglichen Zusammenhang zwischen Zytokinen und VEGF mit der Endometriose führten Pellicer et al. (1998) durch. Sie stellten fest, dass die Interleukin-6-Spiegel im Serum und in der Follikelflüssigkeit von Frauen mit Endometriose und normalem Zyklus erhöht waren, die VEGF-Werte dagegen verringerten sich. In diesen Veränderungen sehen sie eine Ursache für die reduzierte Implantationsrate bei Patientinnen mit einer Endometriose.

Die experimentellen Untersuchungen von Garrido et al. (2001) wiesen jedoch keinen Zusammenhang zwischen VEGF und Endometriose nach. Die Autoren analysierten die Produktion und Sekretion von VEGF- und Interleukin(IL)-6-mRNA von Granulosazellen in vivo und in vitro von 6 Frauen mit Endometriose und von 14 gesunden Frauen. Es konnten keine wesentlichen Differenzen zwischen den Gruppen festgestellt werden.

In den von uns untersuchten Biopsien von Endometriosezysten fanden sich keine verstärkten Anfärbungen der VEGF-Rezeptoren. Diese Ergebnisse stehen damit im Widerspruch zu den Analysen von McLaren et al. 1996 und von Goteri et al. 2004, die eine erhöhte VEGF-Konzentration im Serum und auch vermehrte IGF-Rezeptoren bei Patientinnen mit

Endometriosezysten feststellten. Aus der klinischen Erfahrung ist bekannt, dass Endometriosezysten im Verlauf der Zeit eine verstärkte Zystenwand bilden, die dann auch stärker vaskularisiert ist. Es ist anzunehmen, dass durch das unterschiedliche Alter der Zysten auch die veränderte Vaskularisierung zu erklären ist und damit der Nachweis der Rezeptoren unterschiedlich ausfallen kann.

Eine Hemmung der Neoangiogenese bei Endometriosepatientinnen könnte in Zukunft eine Therapiemöglichkeit darstellen.

Von Interesse sind in diesem Zusammenhang die klinischen und Laboruntersuchungen von Amin et al. (2003) an 25 Frauen mit einem Clomifen-resistenten PCO-Syndrom. Die Verfasser stellten fest, dass nach einem laparoskopischen Drilling der Ovarien dieser Patientinnen die Serumspiegel von VEGF, IGF-1 und LH sich reduzierten und der Doppler-Flow der Ovarien sich erhöhte. Sie erklären die reduzierte Durchblutung der Ovarien beim PCO-Syndrom mit den erhöhten VEGF- und IGF-1-Serumspiegel.

Ein weiterer bedeutender Wachstumsfaktor ist der Epidermal Growth Factor (EGF), der ein kleines lösliches Peptidhormon darstellt, das sich an Haut- und Bindegewebszellen bindet und deren Teilung stimuliert (Lodish et al. 2001). Es entsteht durch proteolytische Spaltung aus einem membranständigen EGF-Vorläuferprotein, das mehrere EGF-Domänen aufweist. Für den Nachweis des EGF-Rezeptors setzten wir einen Antikörper ein, der mit einem 175 kD Zelloberflächenmarker reagiert, der eine extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors darstellt. Die EGF-Rezeptoren gehören zur Familie der ErbB-Rezeptoren, die als Tyrosinkinase eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von neuronalen und epithelialen Zellen spielen (Pezzutto et al. 2007).

Der EGF-Rezeptor wird auch als ErbB-1 bezeichnet, weiterhin gibt es den ErbB-2-Rezeptor HER2. Da der humane HER2-Rezeptor dem Rattenprotein „neu“ homolog ist, wählte man die Bezeichnung HER2/neu. Eine Aktivierung des HER2/neu fördert das Zellwachstum und eine Tumorentstehung. HER2/neu ist ein Proto-Onkogen, das auch in normalen Zellen vorkommt, in Tumorzellen kommt es aber zur Genamplifikation. Eine Überexprimierung von HER2/neu wird bei etwa 20-30% aller Mammakarzinome beobachtet und geht mit einer reduzierten Lebenserwartung einher. Eine Therapieoption ist bei diesen Patientinnen eine Behandlung mit Trastuzumab (Herceptin), eine humanisierte Form des monoklonalen HER2-Antikörpers, der sich spezifisch an die extrazelluläre Domäne von HER2/neu bindet. Durch Blockierung des Rezeptors wird die Übermittlung von Wachstumssignalen verhindert. Wang et al. (1992) untersuchten 16 gutartige Ovarialtumoren auf das Vorhandensein von

EGFR. Es zeigte sich, dass normales Oberflächenepithel dieser Tumoren schwach positiv reagierte mit dem entsprechenden Antikörper, nicht aber die Oberfläche von Inklusionszysten.

Bei den vorliegenden Untersuchungen konnte in verschiedenen Ovarbiopsien der Rezeptor für den Epidermalen Growth Factor (EGFR) nachgewiesen werden. Es zeigten sich in einigen Biopsien positive Anfärbungen im Stroma und in der Tunica albuginea. Die entsprechend der Intensität der Anfärbungen gebildeten Scorewerte waren in den normalen Biopsien erhöht gegenüber den pathologischen Befundgruppen, die Differenzen waren zwischen normalen Ovarien und Zystenbiopsien signifikant. Diese Ergebnisse lassen sich mit den Resultaten der Analysen von Wang et al. 1992 vergleichen, da sie ebenfalls keine starke Expression des EGFR fanden. Damit ist die Schlussfolgerung zu postulieren, dass der für die Differenzierung und Proliferation von Haut-, Bindegewebs- und Tumorzellen verantwortliche EGF für die Bildung von Follikel- und Endometriosezysten sowie für das PCO-Syndrom keine Bedeutung hat. In die Pathogenese dieser benignen Ovarveränderungen ist er nicht involviert.

Zur Identifizierung der Insulin Regulated Aminopeptidase (IRAP) in den Ovarbiopsien wurde ein polyklonaler Antikörper eingesetzt, der gegen die 17-aa-Peptide der IRAP gerichtet war. IRAP ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 165 kD und weit verbreitet in vielen Geweben wie zum Beispiel in Fett- und Muskelgewebe, Drüsen, Lungen, Herz und Gehirn. Es handelt sich um eine Zink-abhängige Metallopeptidase mit einem langen C-terminalen extrazellulären Anteil, einer einfachen transmembranen Domäne und einer kleineren N-terminalen intrazellulären Domäne (Rogi et al. 1996, Hooper und Lendeckel 2004).

Der insulinabhängige Glucosetransporter GLUT4 ist verantwortlich für den Glucose-Influx in Fett- und Muskelzellen nach Insulinstimulation. GLUT4 ist entweder zwischen intrazellulären Kompartimenten oder zusammen mit der IRAP in kleinen Vesikeln. Beide Proteine regulieren den Glucosetransport in die Zelle.

Es konnte auch in der Plazenta und im Gewebe des weiblichen Genitaltrakts IRAP nachgewiesen werden. In der Plazenta ist die IRAP mit der Oxytozinase identisch, findet sich in der apikalen Membran des Synzytiotrophoblasten und im maternalen Serum und steigt vom 1. Trimester bis zum Geburtstermin an (Ito et al. 2003).

Weiterhin konnte IRAP auch im menschlichen Uterus nachgewiesen werden, besonders in den endometrialen Zellen (Toda et al. 2002). Es zeigte sich ein Konzentrationsanstieg zur

Ovulation hin und eine Korrelation zum Estrogenanstieg. Lew et al. (2003) stellten fest, dass Angiotensin AT4 als Inhibitor der IRAP wirken kann.

Die vorliegenden Untersuchungen konnten in einigen normalen und pathologischen Biopsien positive Anfärbungen mit dem IRAP-Antikörper nachweisen, jedoch fand sich keine statistisch signifikante Differenz zwischen den einzelnen Gruppen. Mustafa et al. (2004) wiesen mit der Autoradiographie im Myometrium, in den Tuben und im Ovar IRAP nach. In den Ovarien fanden sie die höchsten Werte in den Corpora albicantia und die geringsten Konzentrationen im ovariellen Cortex und im umgebenden Bindegewebe. Diese Analysen sind mit unseren Untersuchungen nicht direkt vergleichbar, da unterschiedliche Methoden eingesetzt wurden, zeigen aber, dass in den Ovarien IRAP vorhanden ist und sicher eine wesentliche Rolle in der reproduktiven Physiologie spielt, besonders in der Regulation der Sexualsteroiden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich mit der Immunperoxidase-Technik in Ovarialbiopsien sowohl Immunzellen als auch Cytokeratine, verschiedene Wachstumsfaktoren und die Regulated Aminopeptidase nachweisen ließen.

Die kritische Bewertung der Ergebnisse unter Berücksichtigung der Arbeitshypothese zeigt, dass in den benignen Ovarialzysten durch Erhöhung der T-Helferzellen bei Reduzierung der B-Zellen und keiner verstärkten Aktivierung der Immunzellen (CD-25 positive Zellen sind verringert), es vorwiegend TH1-Zellen sind. Diese Subgruppe der CD4-Zellen kann durch Sezernierung von Zytokinen die Makrophagen aktivieren, die ihrerseits den Abbau von apoptotischen Zellen in den Zysten ermöglichen. Der Nachweis einer geringen Anzahl von Immunzellen der untersuchten Subtypen zeigt, dass keine aktiven Immunprozesse stattfinden. Die Cytokeratine und die IRAP sind ebenso wie die Wachstumsfaktoren in den Prozess der Zystenbildung zum Zeitpunkt der Biopsie nicht mit einbezogen, da die Rezeptoren der Faktoren verringert waren. Wahrscheinlich waren die Wachstumsprozesse bereits abgeschlossen.

Bei den Patientinnen mit einer Endometriose waren die T-Helfer und zytotoxischen T-Zellen vermehrt nachweisbar. Es ist somit die Schlussfolgerung naheliegend, dass noch immunologische Prozesse auf zellulärer Ebene ablaufen, aber keine Antikörperbildung erfolgt, da die B-Zellen nicht vermehrt sind. Die CD8-Zellen versuchen, die ortsfremden Endometriosezellen anzugreifen und zu lysieren. Dabei sind die Cytokeratine und die IRAP sowie die Wachstumsfaktoren nicht beteiligt.

In den Biopsien beim PCO-Syndrom ließen sich signifikant vermehrt T-Helfer und zytotoxische T-Zellen feststellen. Somit ist anzunehmen, dass neben einer verstärkten Makrophagenaktivierung durch die TH1-Zellen auch eine erhöhte Zytolyse der atretischen Follikel im Ovar erfolgt. Eine verstärkte Cytokeratinbildung in der Tunica albuginea war nicht feststellbar, so dass ihre Verdickung sicher vorwiegend durch eine verstärkte Fibrinogenbildung erfolgte, wie in der Literatur auch beschrieben (Donat 1987). Die Rezeptoren der Wachstumsfaktoren waren nicht so häufig nachweisbar wie in der Normalgruppe, lediglich bei VEGF R1 war eine verstärkte Intensität vorhanden. Es ist denkbar, dass beim PCO-Syndrom durch die zahlreiche Follikelbildung auch eine verstärkte Durchblutung erforderlich ist. Die Insulin Related Aminopeptidase (IRAP) wies ebenfalls eine intensivere Anfärbung nach, so dass sie in den gestörten Glucosestoffwechsel im Ovar beim PCO-Syndrom einbezogen ist und im Zusammenhang mit der Insulinresistenz des Ovars stehen könnte. Aus ätiologischer Sicht ist denkbar, dass bei Frauen mit einem PCO-Syndrom eine genetisch bedingte Störung der IRAP-Bildung im Ovar vorliegt. Vielleicht könnte durch Beeinflussung von GLUT4 und der IRAP eine kausale und damit effektivere Therapie des PCO-Syndroms entwickelt werden.

Es sind sowohl immunologische als auch Wachstumsprozesse in die pathologischen Ovarveränderungen einbezogen, die aber zeitlich schon länger zurückliegen und deshalb nicht immer stark ausgeprägt sind. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass es sich bei den untersuchten Biopsien nur um periphere Gewebsentnahmen handelte, die nur bedingt Rückschlüsse über Vorgänge in der inneren Markzone der Ovarien erlauben. Weiterführende Untersuchungen könnten an, bei Ovariectomien anfallende Proben, über einen größeren Bereich des Ovars erfolgen und dabei auch die Markzone miteinbeziehen. Sicher kann es auch von klinischem Interesse sein, ähnliche Untersuchungen an soliden benignen und malignen Ovarialtumoren durchzuführen, um weitere Aufschlüsse über die biologischen Vorgänge im Ovar zu erhalten.

5. Zusammenfassung

Bei Ovarialfunktionsstörungen lassen sich neben der primären Ovarialinsuffizienz eine hypothalamische, eine hyperprolaktinämische und eine hyperandrogenämische Form unterscheiden. Bei der letzteren ist das PCO-Syndrom das häufigste Erscheinungsbild. Auch benigne Ovarialzysten und die Zysten bei einer Endometriose sind im Zusammenhang mit Störungen der Ovarialfunktion zu betrachten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden von 42 Frauen Ovarialbiopsien immunhistologisch mit der Immunperoxidase-Technik untersucht, wobei kommerziell hergestellte monoklonale Antikörper eingesetzt wurden. Neben der Identifizierung und Quantifizierung von Lymphozytensubpopulationen im Gewebe sollten Cytokeratine, die Rezeptoren der Wachstumshormone IGF, VEGF und EGF sowie die Insulin Related Aminopeptidase (IRAP) nachgewiesen werden. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden die Biopsien entsprechend dem histologischen Ergebnis in eine Normalgruppe (n=11), in eine Gruppe mit benignen Zysten (n=14), in eine Endometriosegruppe (n=8) und in eine PCO-Gruppe (n=9) unterteilt. Zur Charakterisierung und Vergleichbarkeit des Patientengutes wurden die klinischen Daten wie Alter, Menarche, Zyklusdauer, Anzahl der Geburten, Aborte und Abruptiones, die OP-Indikationen sowie die allgemeinen und gynäkologischen Erkrankungen in der Anamnese der Patientinnen erfasst und ausgewertet.

Es konnte festgestellt werden, dass die T-Helferzellen (CD4) in den normalen Biopsien die geringste Anzahl aufwiesen (durchschnittlich 6,8), während sich in den pathologischen Proben erhöhte Werte fanden, am höchsten beim PCO-Syndrom (14,8). Die CD4-Zellen waren im ovariellen Stroma nachweisbar, eine signifikante Differenz ($p < 0,05$) bestand zwischen den Proben von normalen und PCO-Ovarien. Zytotoxische T-Zellen (CD8) waren ebenfalls im Ovarstroma zu identifizieren mit der geringsten Anzahl (5,6) in den normalen Biopsien und mit der größten Häufigkeit (11,9) in den Biopsien von PCO-Patientinnen, die Differenz war statistisch signifikant ($p = 0,05$). Die im Stroma nachgewiesenen B-Zellen (CD19) hatten mit durchschnittlich 3,3 Zellen die größte Häufigkeit bei den normalen Ovarien, während in den Zysten und beim PCO-Syndrom deutlich weniger Zellen festzustellen waren. Ähnlich verhielt es sich bei den CD25-positiven Zellen, die mit 3,6 Zellen am häufigsten in den normalen Ovarien vorkamen, in den pathologischen Biopsien mit statistischer Signifikanz geringer auftraten. Auch die Natürlichen Killerzellen (CD56) waren mit durchschnittlich 2,7 Zellen am häufigsten in den normalen Ovarien nachzuweisen, während in den pathologischen Biopsien ihre Anzahl geringer war, eine statistische Signifikanz ließ sich nicht errechnen.

Die Ergebnisse weisen nach, dass besonders die T-Zellen in die pathologischen Prozesse am Ovar einbezogen sind, die aber keinen besonderen Aktivierungsgrad erkennen ließen. Die natürliche Immunität auf zellulärer Ebene hat im Zusammenhang mit den untersuchten benignen Ovarveränderungen keine Bedeutung.

Mit der Immunperoxidase-Technik ließen sich Cytokeratine (1 und 10) in Zellen und im Bindegewebe des ovariellen Stromas identifizieren. Zur Auswertung der positiven Befunde wurde entsprechend der Intensität der immunhistologischen Anfärbung ein Scorewert gebildet. Die häufigsten positiven Befunde mit dem höchsten Scorewert ließen sich in den Biopsien von normalen Ovarien feststellen. Damit konnte keine verstärkte Keratinisierung - weder in den zystischen noch in den PCOS-Ovarien - nachgewiesen werden.

Es gelang in den vorliegenden Untersuchungen der Nachweis des Insulin-like Growth Factor Rezeptors (IGF –1R, CD 221) in den Ovarialbiopsien. Das IGF-System spielt eine dominante Rolle bei der Wirkung der Gonadotropine und Sexualsteroiden auf die Ovarialfunktion, so dass es auch als Ko-Gonadotropin bezeichnet wird. Es ließ sich zwischen den verschiedenen Gruppen keine statistische Signifikanz errechnen, wobei aber in den normalen Ovarien die stärksten Reaktionen festzustellen waren.

Weiterhin wurde der Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor 1 (VEGF R1) immunhistologisch in den Ovarproben identifiziert, der einen pro-angiogenetischen Wachstumsfaktor darstellt. Die meisten positiven Befunde und stärksten Anfärbungen ließen sich in den normalen Ovarien nachweisen, in den Proben von Zysten und PCOS-Ovarien fanden sich erhöhte Scorewerte, die Differenzen waren aber statistisch nicht signifikant.

Ein weiterer wichtiger Wachstumsfaktor ist der Epidermal Growth Factor (EGF), der sich an Haut- und Bindegewebszellen bindet. Dessen Rezeptor konnte ebenfalls in Ovarialbiopsien im Stroma und in der Tunica albuginea nachgewiesen werden. Die häufigsten positiven Befunde und die höchsten Scorewerte fanden sich in normalen Ovarien. Die Differenzen zu den pathologischen Befunden waren zu den Biopsien von Zysten signifikant.

Bei einer summarischen Gegenüberstellung aller positiven Befunde und Scorewerte der Zytokeratine, der IGF-1R, VEGF-R1 und EGFR von normalen Ovarien gegenüber den pathologischen Befunden zeigte sich, dass VEGF-R1 und EGFR bei krankhaften Ovarialbiopsien statistisch signifikant erhöht waren gegenüber normalen Ovarien.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen gelang auch der immunhistologische Nachweis der Insulin Regulated Aminopeptidase (IRAP) in den Ovarialbiopsien. Die IRAP reguliert

zusammen mit der GLUT4 den Glucosetransport in die Zelle. Es konnte festgestellt werden, dass die IRAP in den Biopsien normaler Ovarien und in den Proben von PCO-Patientinnen am häufigsten nachweisbar war und auch die höchsten Scorewerte aufwies. Die Differenzen waren statistisch nicht signifikant.

Bei einem Vergleich aller positiven Befunde und aller Scorewerte der Zytokeratine, von IGF-1R, VEGF-R1, EGFR und IRAP konnte festgestellt werden, dass bei normalen Ovarien sowohl die Häufigkeit der positiven Befunde als auch die Scorewerte statistisch signifikant höhere Werte aufweisen. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass bei den analysierten benignen Ovarveränderungen diese Faktoren in die Pathogenese der Erkrankungen einbezogen sind. Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Ätiologie des PCO-Syndroms müssten neben den gewebsgebunden Rezeptoren auch die Faktoren im Serum bestimmen und dies im Vergleich zum Blutzucker und zum Insulinspiegel betrachten.

6. Literatur

Abd El Aal DE, Mohamed SA, Amine AF, Meki AR (2005)

Vascular endothelial growth factor and insulin-like growth factor-1 in polycystic ovary syndrome and their relation to ovarian blood flow.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 118, 219-224

Abbas AK, Lichtman AH (2004)

Basic Immunology. Functions and Disorders of the Immune System.

Saunders, Philadelphia, 30-32, 66-74, 92-118

Agrawal R, Sladkevicius P, Engmann L, Conway GS, Payne NN, Bekis J, Tan SL, Campbell S, Jacobs HS (1998A)

Serum vascular endothelial growth factor concentrations and ovarian stromal blood flow are increased in women with polycystic ovaries.

Human Reprod 13, 651-655

Agrawal R, Conway G, Sladkevicius P, Tan SL, Engmann L, Payne N, Bekir J, Campbell S, Jacobs H (1998B)

Serum vascular endothelial growth factor and Doppler blood flow velocities in in vitro fertilization: relevance to ovarian hyperstimulation syndrome and polycystic ovaries.

Fertil Steril 70, 651-658

Althuis MD, Moghissi KS, Westhoff CL (2005)

Uterine cancer after use of clomiphene citrate to induce ovulation.

Am J Epidemiol 161, 607-615

Amin AF, Abd el-Aal DE, Darwish AM, Meki AR (2003)

Evaluation of the impact of laparoscopic ovarian drilling on Doppler indices of ovarian stromal blood flow, serum vascular endothelial growth factor, and insulin-like growth factor-1 in women with polycystic ovary syndrome.

Fertil Steril 79, 938-941

Aquino Carlos P, Hernandez Valencia M, Hicks Gomez JJ, Fonseca Yerena ME (1999)

The role of insulin-like growth factor in polycystic ovary syndrome.

Ginecol Obstet Mex 67, 267-271

Artini PG, Monti M, Matteucci C, Valentino V, Cristello F, Genazini AR (2006) Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in polycystic ovary syndrome during controlled ovarian hyperstimulation. *Gynecol Endocrinol* 22, 465-470

Auernhammer CJ, Engelhardt D, Parhofer KG (2002)
Polycystic ovary syndrome and metabolic syndrome.
Dtsch Med Wochenschr 127, 971-977

Blüher M (2009)
Das Metabolische Syndrom und die Eizelle.
J Reproduktionsmed Endokrinol 6, 4-9

Brännström M, Pascoe V, Norman RJ, McClure N (1994)
Localization of leukocyte subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual cycle.
Fertil Steril 61, 488-495

Brinton LA, Scoccia B, Moghissi KS (2004)
Breast cancer risk associated with ovulation-stimulating drugs.
Hum Reprod 19, 2005-2013

Bukulmez O, Arici A (2000)
Leukocytes in ovarian function.
Hum Reprod Update 6, 1-4

Cusido M, Fabregas R, Pere BS (2007)
Ovulation induction treatment and risk of borderline ovarian tumors.
Gynecol Endocrinol 23, 373-376

Donat H (1987)
Immunologie der menschlichen Reproduktion.
Georg Thieme, Leipzig, 30-33

Druckmann R, Rohr UD (2002)
IGF-1 in gynaecology and obstetrics: update 2002.
Maturitas 15, 565-583

Escobar M, San Millan JL (2007)
Abdominal obesity and the polycystic ovary syndrome.
Trends Endocrinol Metab 18, 266-272

Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T, Peale F. (2003)

Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries.
Am J Pathol 162, 1881-1893

Findlay JK, Drummond AE (1996)

Control of follicular growth.

In: The Ovary: Regulation, Dysfunction and Treatment. Eds. Filicor M, Flamigni C; Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Dhannon, Tokyo, 13-21

Flor U (1999)

Nachweis und Charakterisierung von Lymphozytensubpopulationen im Ovar prae- und postmenopausaler Frauen.

Med. Dissert. Leipzig, 16-41

Franks S, Gilling-Smith C, Watson H, Willis D. (1999)

Insulinaction in the normal and polycystic ovary.

Endocrinol Metab Clin North Am 28, 361-378

Garrido N, Albert C, Krüssel JS, O'Connor JE, Remohi J, Simon C, Pellicer A. (2001)

Expression, production, and secretion of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 by granulosa cells is comparable in women with and without endometriosis.

Fertil Steril 76, 568-575

Geisthövel F (2001)

Funktioneller Hyperandrogenismus (sog. polyzystisches Ovarsyndrom)

In: Molekulare Medizin in der Frauenheilkunde, Hrsg. Beckmann MW, Dall P, Fasching PA, Krüssel JS, Niederacher D, Tutschek B; Steinkopf-Verlag, Darmstadt, 197-202

Geisthövel F, Moretti-Rojas I, Rojas FJ, Asch RH (1991)

Insulin-like growth factors and thecal granulosa cell function.

Human Reprod 5, 785-788

Giudice LC (1999)

Growth factor action on ovarian function in polycystic ovary syndrome.

Endocrinol Metab Clin North Am 28, 325-339

- Giudice LC, van Dessel HJHM, Cataldo NA, Chandrasekher YA (1996)
The insulin-like growth factor (IGF) system in human ovary and its relevance to polycystic ovarian syndrome.
In: Chang J (ed) Polycystic ovary syndrome. Serono Symposia USA, Norwell, Massachusetts. Springer, New York, 223-244
- Göretzlehner G, Laurutzen C, Göretzlehner U (2003)
Praktische Hormontherapie in der Gynäkologie.
Walter de Gruyter, Berlin, New York, 119-123
- Goerke K, Valet A (2000)
Gynäkologie und Geburtshilfe.
Urban & Fischer, München, Jena, 19-25, 147-180
- Gordon JD, Mesiano S, Zaloudek CJ, Jaffe RB (1996)
Vascular endothelial growth factor localization in human ovary and fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovarian cyst formation.
Clin Endocrinol Metab 81, 353-359
- Goteri G, Lucarini G, Filosa A, Pierantoni A, Montik N, Biagini G, Fabris G, Ciavattini A (2004)
Immunohistochemical analysis of vascular endothelial growth factor cellular expression in ovarian endometriomata.
Fertil Steril 81, 1528-1533
- Graf M (2001)
Ovarialinsuffizienz (Pathogenese, Diagnostik, Therapieoptionen)
In: Molekulare Medizin in der Frauenheilkunde, Hrsg. Beckmann MW, Dall P, Fasching PA, Krüssel JS, Niederacher D, Tutschek B; Steinkopf-Verlag, Darmstadt, 210-222
- Gupta SK (1999)
Reproductive Immunology.
Narosa Publishing House New Delhi, 33-44
- Holländer GA (2006)
Immunologie. Grundlagen für Klinik und Praxis.
Urban & Fischer, München, Jena, 82-133

- Homburg R, Pariente C, Lunenfeld B, Jacobs HS (1992)
The role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome.
Hum Reprod 7, 1379-1383
- Hooper NM, Lendeckel U (2004)
Aminopeptidases in Biology and Disease.
Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 61-81
- Ito N, Nomura S, Iwase A, Ito T, Ino K, Nagasaka T, Tsujimoto M, Koboyashi M, Mizutani S (2003)
Ultrastructural localization of aminopeptidase A/angiotensinase and placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in chorionic villi of human placenta.
Early Human Development 71, 29-37
- Jancovic BD, Markovic BM, Petrovic S, Isacovic K (1973)
Experimental autoimmuno-oophoritis in the rat.
Europ J Immunol. 3, 375-377
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002)
Immunologie.
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 88-90, 340-343
- Juhasz-Böss I, Lattrich C, Kerl S, Görse R, Ortman O (2008)
Ovarielle Stimulation und Karzinomrisiko.
Gynäkologie 41, 189-193
- Keck C, Tempfer C (2008)
Strategien für eine Schwangerschaft.
Gyn Gebh 7,28-32
- Knippers R (2006)
Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 240-241
- Kühnel W (1999)
Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 388-404

Lachapelle MH, Hemmings R, Roy DC, Falcone T, Miron P (1996) Flow cytometric evaluation of leukocyte subpopulations in the follicular fluid of infertile patients.

Fertil Steril 65, 1135-1140

Lew RA, Mustafa T, Ye S, McDowall SG, Chai SY, Albiston AL (2003)

Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP).

J Neurochem 86, 344-350

Liang X, Zhuang G, Fang Q (1997) The secretion and receptor gene of insulin-like growth factor-I quantitative expression in ovarian stroma in polycystic ovarian syndrome patients.

Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 32, 582-585

Lodish H, Berk A, Zipurski SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (2001)

Molekulare Zellbiologie.

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 65-66

Löffler G (2004)

Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.

Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 486-489, 573-577

Luchetti CG, Solano ME, Sander V, Arcos ML, Gonzalez C, Di Girolamo G, Chiochio S, Cremaschi G, Motta AB (2004) Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. J Reprod Immunol 64, 59-74

Logani S, Oliva E, Arnell PM, Amin MB, Young RH (2004)

Use of novel immunohistochemical markers expressed in colonic adenocarcinoma to distinguish primary ovarian tumors from metastatic colorectal carcinoma.

Modern Pathology 1-7

McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA, Muller KH, Sharkey AM, Smith SK (1996)

Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids.

J Clin Invest 98, 482-489

Mustafa T, Chai SY, May CN, Mendelsohn FA, Albiston AL (2004)

Oxytocinase/insulin-regulated aminopeptidase is distributed throughout the sheep, female reproductive tract and is regulated by oestrogen in the uterus.

Regul Peptides 122, 85-89

Norman RJ (2004)

Improving reproductive performance in overweight/obese women with effective weight management.

Human Reproduction Update 10, 267-280

O`Gara A, Vieira P (2004)

Regulatory T cells and mechanisms of immune system control.

Nature Medicine 10, 801-805

Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simon C (1998) The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. Fertil Steril 70, 425-431

Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G-R (2007)

Taschenatlas der Immunologie.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1-2, 110-112, 296-300,

Piaditis GP, Kounadi TG, Rangou DB, Trovas GP, Kaklas NA, Tzonou AJ, Chlouverakis CS (1995)

Dysfunction of the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in women with polycystic ovarian syndrome.

Clin Endocrinol 42, 635-640

Polson DW, Adams J, Wadsworth J, Franks S (1988)

Polycystic ovaries- a common finding in normal women.

Lancet 1, 870-872

Premoli AC, Santana LF, Ferriani RA, Moura MD, De Sa MF, Reis RM (2005)

Growth hormone secretion and insulin-like growth factor-1 are related to hyperandrogenism in nonobese patients with polycystic ovary syndrome.

Fertil Steril 83, 1852-1855

Qin KN und Rosenfield RL (1998)

Role of cytochrome P450c17 in polycystic ovary syndrome.

Mol Cell Endocrinol 25, 111-121

Rogi T, Tsujimoto M, Nakazato H, Mizutani S, Tomoda Y (1996)

Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. A new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family.

J Biol Chem 271, 56-61

Salvetti NR, Gimeno EJ, Lorente JA, Ortega HH (2004)

Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts.

Cells Tissues Organs 178, 117-125

Seifert B, Bals-Pratsch M (2006)

Die Bedeutung von Hyperandrogenämie und Insulinresistenz für die

Kinderwunschbehandlung. Gyn 11, 138-141

Schöfl C, Schill T, Geisthövel F, Brabant G (2004) Polyzystisches Ovarialsyndrom und

Insulinresistenz. Dtsch Ärztebl 101, 346-351

Shevach EM, Piccirillo CA, Thornton AM, McHugh RS (2003)

Control of T cell activation by CD4+CD25+ suppressor cells.

In: Generation and effector functions of regulatory lymphocytes. Novartis Foundation Symposium 252, publ. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 24-36

Singh B, Read S, Asseman C (2001)

Control of intestinal inflammation by regulatory T cells.

Immunol Rev 182, 190-200

Spiliotis BE (2003)

Growth hormone insufficiency and its impact on ovarian function.

Ann N Y Acad Sci 997, 77-84

Stanek MB, Borman SM, Molskness TA, Larson JM, Stouffer RL, Patton PE (2007)

Insulin and insulin-like growth factor stimulation of vascular endothelial growth factor production by luteinized granulosa cells: comparison between polycystic ovarian syndrome (PCOS) and non-PCOS women.

Clin Endocrinol Metab 92, 2726-2733

- Stauber M, Weyerstahl T (2005)
Gynäkologie und Geburtshilfe. Duale Reihe.
Georg Thieme KG, Stuttgart, 124-132, 432-436
- Stein IF, Leventhal ML (1935) Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 29, 181-191
- Stubbs SA, Stark J, Dilworth SM, Franks S, Hardy K (2007)
Abnormal preantral folliculogenesis in polycystic ovaries is associated with increased granulosa cell division.
Clin Endocrinol Metab 92, 4418-4426
- Suzuki T, Sasano H, Takaya R, Fukaya T, Yalima A, Date F, Nagura H (1998)
Leukocytes in normal-cycling human ovaries: immunohistochemical distribution and characterization.
Hum Reprod 13, 2186-2191
- Takayama K, Fukaya T, Sasano H, Funayama Y, Suzuki T, Takaya R, Wada Y, Yajima A (1996)
Immunohistochemical study of steroidogenesis and cell proliferation in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 11, 1387-1392
- Toda S, Andro H, Nagasaka T, Tsukahara S, Numura M, Kotani Y, Nomura S, Kikkawa S, Tsujimoto M, Mizutani S (2002)
Existence of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase/insulin-regulated membrane aminopeptidase in human endometrial epithelial cells.
J Clin Endocrinol Metab 87, 1384-1389
- Todorovic V, Sokic-Milutinovic A, Drndarevic N, Micev M, Mitrovic O, Nikolic I, Wex T, Milosavljevic T, Malfertheiner P (2006)
Expression of cytokeratins in Helicobacter pylori-associated chronic gastritis of adult patients infected with cagA-strains: An immunohistochemical study.
World J Gastroenterol 28, 1865-1873
- Turi A, Di Prospero F, Mazzarini A, Costa M, Cignitti M, Garzetti GG, Romanini C (1988)
Lymphocytes subset in hyperandrogenic women with polycystic ovarian disease.
Acta Eur Fertil 19, 155-157

Urdl W und Desoye G (1995)

Pathogenesis and diagnosis of polycystic ovary syndrome.

Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch 35, 12-15

Wang DP, Konishi I, Koshiyama M, Nanbu Y, Iwai T, Nonogaki H, Mori T, Fujii S (1992)

Immunohistochemical localization of c-erbB-2 protein and epidermal growth factor receptor in normal surface epithelium, surface inclusion cysts, and common epithelial tumours of the ovary. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 421, 393-400

Weiss JM, Hadziomerovic D, Kreienberg R (2008)

Syndrom der polyzystischen Ovarien (PCOS).

Gynäkologe 41, 179-188

Wicherek L, Dutsch-Wicherek M, Galazka K, Banas T, Popiela T, Lazar A, Kleinrok-Podsiadlo B (2006) Comparison of RCAS1 and metallothionein expression and the presence and activity of immune cells in human ovarian and endometrial wall endometriomas.

Reprod Biol Endocrinol 14, 4-41

Wu R, Fujii S, Ryan NK, Van der Hoek KH, Jasper MJ, Sini I, Robertson SA, Robker RL, Norman RJ (2007)

Ovarian leukocyte distribution and cytokine/chemokine mRNA expression in follicular fluid cells in women with polycystic ovary syndrome.

Hum Reprod 22, 527-535

7. Anhang

7.1. Erklärung

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Immunhistologische Untersuchungen an Ovarbiopsien von Frauen mit Ovarialfunktionsstörungen“

in der Praxis und Tagesklinik für Operative Gynäkologie und der Gynäkologischen Belegabteilung der Klinik des Westens Magdeburg mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. habil. H. Donat und Herrn Dr. rer. nat. F.-W. Röhl ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden. Ich habe die Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien herzustellen und zu vertreiben.

7.2. Danksagung

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. habil. H. Donat, Praxis und Tagesklinik für Operative Gynäkologie Magdeburg, für die Überlassung des Themas und die Betreuung bei der Erstellung der Arbeit. Weiterhin danke ich Herrn Dr. rer. nat. F.-W. Röhl, Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Laborergebnisse und der klinischen Daten. Außerdem danke ich der MTLA Frau Elke Fenkl für die Unterstützung bei der Durchführung der labortechnischen Arbeiten. Bei Herrn Dr. med. E. Lenz, Gemeinschaftspraxis für Pathologie Magdeburg, bedanke ich mich für die Überlassung der histologischen Befunde.

7.3. Lebenslauf

Lebenslauf

13.04.1961	geboren in Potsdam
1967-1975	Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule, Bergholz-Rehbrücke
1975-1979	Erweiterte Oberschule „Humboldt“, Potsdam, Abschluss mit dem Abitur
1979-1980	Vorpraktikum Medizin, Bezirkskrankenhaus Potsdam
1980-1986	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Akademie Magdeburg
1986	Pflichtassistenz (6. Studienjahr) am Bezirkskrankenhaus Magdeburg
1986	Studiumabschluss mit dem Staatsexamen
1986	Diplomarbeit mit dem Titel „Die membranoproliferative Glomerulonephritis im Biopsiematerial des Institutes für Pathologie der Medizinischen Akademie Magdeburg, licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Frage des Typs III“
1986	Erteilung der Approbation
1987-1992	Assistenzärztin an der Frauenklinik der Medizinischen Akademie Magdeburg
1993	Anerkennung als Fachärztin für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Seit 1993	Niederlassung als Frauenärztin in Magdeburg
Familienstand:	verheiratet, 2 Kinder

Magdeburg, April 2009

7.4 Urliste der Primärdaten

Tabelle 2 Primärdaten des Patientengutes

Name	Alter	Menarche	Zyklus	Partus	Abortus	Abruptio	
H.H.		51	13	30	1	0	0
B.M.		29	12	28	1	0	0
K.E.		29	12	28	0	0	0
G.D.		50	12	36	1	1	1
K.U.		56	12	30	1	0	0
P.I.		48	14	30	3	1	0
H.S.		48	12	32	2	0	1
W.N.		27	16	34	0	0	0
R.H.		37	14	30	1	0	0
S.S.		44	15	29	1	0	0
P.S.		26	14	30	1	0	1
Lü.A.		53	14	28	2	0	1
La.A.		50	17	28	1	1	1
K.I.		43	15	28	2	1	1
K.M.		44	16	30	1	0	0
H.R.		50	14	32	2	1	0
D.P.		48	10	30	2	0	1
H.S.		46	12	28	2	0	1
B.B.		38	12	28	0	0	1
P.I.		42	13	28	4	0	1
A.P.		27	14	32	0	0	0
R.K.		42	12	28	1	0	0
F.A.		54	15	28	1	0	0
S.I.		63	12	29	2	0	1
D.B.		44	14	30	1	0	0
R.S.		43	10	38	0	0	0
S.R.		43	10	38	0	0	0
H.S.		23	10	32	0	1	0
S.E.		39	14	28	3	0	0
S.A.		25	15	30	1	0	3
G.B.		41	13	32	2	0	1
D.G.		52	12	28	1	3	0
W.S.		28	13	32	0	0	0
F.S.		26	12	30	0	0	0
K.M.		45	13	30	2	2	0
M.J.		26	14	32	0	0	0
S.B.		51	14	30	3	0	1
J.G.		23	12	32	0	0	1
B.K.		46	13	30	2	0	0
B.H.		39	16	32	1	1	1
M.S.		23	14	30	0	0	0
G.J.		21	16	34	0	0	0
X	40,0714286	13,2619048	30,5238095	1,14285714	0,28571429	0,42857143	
Max		63	17	38	4	3	3
Min		21	10	28	0	0	0

Fortsetzung
Tabelle 2

Allg.Erkr.	Gyn.Erkr.	Kln.Bfd.	Histologie
1	1	3	1
0	3	1	4
1	3	1	4
2	1	1	1
1	1	1	4
1	1	1	1
2	0	1	1
0	0	2	2
1	1	1	1
3	1	3	3
0	0	1	4
1	1	3	3
3	1	3	3
3	0	3	1
1	2	3	1
2	2	3	3
0	2	3	3
0	2	3	1
0	1	3	1
3	1	3	3
0	0	2	2
2	3	1	4
1	1	1	4
2	1	3	3
1	2	1	3
2	2	1	3
2	2	1	1
0	1	2	2
2	2	3	1
0	2	2	2
1	2	3	1
2	0	3	3
3	3	2	2
3	3	2	2
1	3	1	1
1	0	2	2
1	1	3	3
3	1	2	2
0	1	3	1
1	2	1	4
1	0	1	4
1	3	2	2

1=OP
2=Intern.Erkr.
3=Sonstige

1=OP
2=Blutgst.
3=Sonstige

1=Ovarialzyste
2=PCO-Syndrom
3=Ut.myomat.u.a.

1=Follikelzyste
2=PCO-Syndrom
3=Normales Ovar
4=Endometriose

Fortsetzung Tabelle 2

CD4	CD8	CD19	CD25	CD56	
	0	0	0	1	3
	5	1	1	1	3
	4	9	0	0	0
	0	0	0	0	0
	1	1	0	0	2
	3	2	1	0	4
	2	3	0	0	1
	4	5	0	0	3
	5	19	0	0	3
	6	5	8	8	3
	3	3	2	0	2
	3	3	0	2	1
	3	2	3	2	2
	0	2	1	3	0
	0	1	1	0	2
	12	2	1	0	2
	13	15	8	11	12
	2	1	1	0	1
	2	3	1	1	2
	3	7	2	1	2
	4	9	5	0	2
	5	15	1	3	2
	3	8	0	0	2
	8	7	8	12	2
	16	3	0	0	2
	3	10	0	0	0
	24	6	0	0	2
	19	17	1	2	1
	24	17	0	0	10
	24	10	5	0	0
	11	5	0	2	2
	4	6	3	2	2
	25	26	1	0	3
	8	14	0	1	2
	0	0	0	0	0
	4	10	0	0	2
	4	2	3	2	2
	14	5	0	0	0
	32	12	0	2	0
	29	23	7	0	2
	19	3	0	0	0
	31	11	0	0	2

Fortsetzung Tabelle 2 (Score: 0=negativ; 1=schwach positiv; 2=gut positiv; 3=stark positiv)

CK1,10	IGF1	VEGF	EGFR	IRAP	
1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1
0	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
1	1	2	0	0	0
3	3	3	3	2	3
2	0	0	0	3	3
0	0	2	2	3	1
1	2	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0
3	1	2	2	2	0
0	0	2	0	0	2
3	0	1	0	0	1
0	0	2	0	0	0
3	3	1	3	3	5
0	0	0	0	0	0
2	3	2	2	3	3
0	0	0	0	0	0
3	0	3	0	0	0
2	0	3	0	0	0
0	0	2	0	0	0
0	0	3	0	0	0
0	1	3	2	2	3
1	2	3	3	3	1
0	2	3	2	2	2
3	0	3	2	2	2
0	0	0	0	0	0
0	0	3	0	0	0
0	0	3	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
3	2	2	2	2	2
0	0	0	2	2	2
2	0	3	0	0	2
0	0	2	0	0	0
0	0	0	0	0	0
1	0	3	0	0	3