

Glanduläre Differenzierungsstörungen im Endometrium der Stute – Lichtmikroskopische und immunhistologische Untersuchungen

Isabell Häfner, H.-A. Schoon, Doris Schoon und Heike Aupperle

Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig

Zusammenfassung

In Anlehnung an Schoon *et al.* (1998) werden endometrialen Fehldifferenzierungen im equinen Endometrium, die bei Problemstuten mit einer Inzidenz von ca. 7% auftreten, prinzipiell zwei Erscheinungsbildern zugeordnet: "irreguläre Differenzierung" und "ungleichmäßige Differenzierung". Zur Präzisierung der verschiedenen Formen von Fehldifferenzierungen wurden 29 Stuten (33 Biopsien) als Fallbeispiele ausgewählt und mit Endometriumbiopsien klinisch-gynäkologisch gesunder, zyklischer Stuten verglichen. Der überwiegende Anteil der Stuten mit einem fehldifferenzierten Endometrium ist 10 bis 19 Jahre alt ($n = 16$) und/oder seit mindestens einem Jahr güst ($n = 22$).

Anhand der dominierenden histomorphologischen Charakteristika der H.-E.-gefärbten Schnitte erfolgte die Zuweisung der fehldifferenzierten Endometrien zu insgesamt fünf Untergruppen: "ungleichmäßig proliferative" und "ungleichmäßig inaktive", "irregulär proliferative" und "irregulär sekretorische" sowie "vollständig ungleichmäßige und irreguläre Differenzierung".

Die mittels immunhistologischer Untersuchungen (Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, Ki-67 Antigenexpression, Nachweis von Intermediärfilamenten und Laminin) erstellten charakteristischen Reaktionsprofile erlauben Rückschlüsse auf die mögliche Ätiopathogenese der Fehldifferenzierungen. Die unterschiedliche Ausstattung vor allem mit Östrogenrezeptoren und Ki-67 Antigen innerhalb der ungleichmäßig differenzierten Endometrien lässt auf eine lokal variierende Hormonwirkung infolge herdförmiger endometrialer Alterationen schließen. Unverhältnismäßig hohe Östrogenrezeptorkonzentrationen und eine erhöhte Ki-67 Antigenexpression der irregulär differenzierten Drüsen könnten die Folge einer übermäßigen Östrogenwirkung und anschließend verminderter "Downregulation" durch Progesteron sein. Die glanduläre Vimentinexpression der meisten fehldifferenzierten Endometrien wird als Indiz der Anpassung der Zellen an die veränderten Wachstumsbedingungen angesehen. Ein Kennzeichen der ausgeprägten glandulären Fehldifferenzierung ist die diskontinuierliche, teils fehlende Lamininexpression.

Weiterführende Studien, insbesondere Verlaufsuntersuchungen, sind zur näheren Evaluierung der Ätiopathogenese sowie zur Klärung der Reversibilität der Fehldifferenzierungen unverzichtbar. Unabhängig davon sprechen die eigenen Erfahrungen dafür, dass bei Stuten mit Anzeichen einer deutlichen endometrialen Fehldifferenzierung die Chancen einer Konzeption zum Zeitpunkt des Bestehens dieser Alterationen als eher ungünstig anzusehen sind.

Schlüsselwörter: Pferd, Endometrium, Fehldifferenzierung, Steroidhormonrezeptoren, Intermediärfilamente

Disorders of Differentiation in the Equine Endometrium – light microscopic and immunohistological studies

According to Schoon *et al.* (1998), disorders of differentiation in the equine endometrium (incidence-rate about 7% in routine biopsy specimens) are generally classified into two types: "irregular" and "unequal differentiation". With the aim to precisely define the various forms of these disorders, 29 mares (33 uterine biopsies) were selected as case studies and compared with biopsies from gynaecologically healthy, cycling mares. The majority of the mares with disorders of endometrial differentiation was 10 to 19 years old ($n = 29$) and/or barren for at least one year ($n = 22$). Depending on the dominant histological characteristics using the H-E stain the disorders were classified into five subgroups: "unequally proliferative", "unequally inactive", "irregularly proliferative", "irregularly secretory" and "completely unequal and irregular differentiation". The typical reaction profiles defined by means of immunohistology (estrogen and progesterone receptor status, Ki-67 antigen expression, detection of intermediate filaments and laminin) allow conclusions on the possible pathogenesis of the impaired differentiation. The varying expression, especially of estrogen receptors and Ki-67 antigen, within the unequally differentiated endometria is interpreted as a variable hormonal effect as a result of local endometrial alterations. Disproportionately high estrogen receptor concentrations and Ki-67 antigen expression of the irregularly differentiated glands are probably the sequel of an excessive estrogen effect and a reduced down regulation by progesterone. There is a glandular vimentin expression in most of the aberrantly differentiated endometria and this is regarded as an evidence for the adaptation of the cells to the altered growth conditions. The discontinuous, partly lacking laminin expression is a sign of excessive glandular faulty differentiation. Further studies evaluating the aetiopathogenesis of these disorders and clarifying possible reversibility are indispensable. Irrespective of this, the own experiences indicate that mares showing distinct signs of endometrial maldifferentiation have a poor chance for successful breeding as long as these conditions occur.

Keywords: horse, endometrium, disorders of differentiation, steroid hormone receptors, intermediate filaments

Einleitung

Eingebunden in ein umfassendes klinisches Konzept stellt die Endometriumbiopsie ein zuverlässiges Hilfsmittel zur Diagnose endometrial bedingter Fertilitätsstörungen der Stute dar. An-

hand der histopathologischen Befunderhebung erfolgt die Kategorisierung der Biopsie nach Kenney und Doig (1986). Dabei werden prognostische Aussagen über die Therapierbarkeit

der endometrialen Alterationen und die zu erwartende Abfohlrate gemacht, indem sowohl entzündliche als auch degenerative pathologische Veränderungen durch den Untersucher erfasst und beurteilt werden (*Kenney und Doig, 1986; Schoon et al. 1997*).

Darüber hinaus lassen sich, bereits in der Routinediagnostik erfassbar, morphologisch-funktionelle Variationen der endometrialen Differenzierung nachweisen. Derartige Differenzierungsstörungen betreffen entweder nahezu gleichmäßig alle Drüsen oder aber nur bestimmte, nestartige (nichtfibrotische) glanduläre Formationen (*Schoon et al., 1997*). Mit Ausnahme der "Hypoplasie" bei jungen Stuten sowie der "Atrophie" und "Hyperplasie" bei erwachsenen Stuten (*Ricketts, 1975; Kenney, 1978*) werden diese Alterationen in der Literatur nicht beachtet oder nur beiläufig erwähnt. Ausschließlich der Befund "Atrophie während der (späten) physiologischen Deckseason" infolge eines hormonrefraktären Endometriums (*Schoon et al., 1997*) wird bislang bei der Beurteilung der Biopsie im Rahmen der Kategorisierung berücksichtigt (*Kenney und Doig, 1986*).

In der Humangynäkopathologie sind glanduläre Fehldifferenzierungen als mögliche Infertilitätsursache bei Frauen gut dokumentiert (Übersicht: *Dallenbach-Hellweg und Poulsen, 1985*). Ovariell (z.B. Follikelzysten, Corpus luteum persistens) oder zentral bedingte, hormonelle Dysregulationen (Tumoren), hormonrefraktäre Endometrien oder Hormonbehandlungen resultieren in ätiopathogenetisch hinweisenden morphologischen Veränderungen der endometrialen Konfiguration.

Die Differenzierung des Endometriums unterliegt charakteristischen physiologischen zyklischen Variationen. Jeder Zyklusabschnitt ist durch die synchrone, einheitliche Differenzierung aller endometrialen Strukturelemente gekennzeichnet (*Brunckhorst et al., 1991; Strankmeyer, 1993; Raila et al., 1997a*). Ebenso wie auf physiologische Schwankungen der Steroidhormonkonzentration (*Aupperle et al., 2000*) erfolgt die unmittelbare Reaktion des Endometriums auf hormonelle Störungen, z.B. im Zusammenhang mit Hormontherapien (*Klug et al., 1997*) oder ovariell bzw. zentral bedingten hormonellen Dysregulationen (*Bartmann et al., 1998; Özgen, 1999; Ellenberger et al., 2000*). Die Endometriumbiopsie stellt somit einen hochsensiblen Indikator dar, indem sowohl der Einfluss uteriner als auch extrauteriner hormoneller Faktoren erfasst werden können. Eine zyklussynchrone Differenzierung aller diagnostisch relevanten Strukturelemente gilt als essentielle Voraussetzung für die Konzeption und Aufrechterhaltung der Gravidität, da andernfalls Veränderungen des sekretorischen Proteinmusters zu erwarten sind (*Bader et al., 1997*).

Im Folgenden werden die glandulären Fehldifferenzierungen im equinen Endometrium mit Hilfe konventioneller histologischer Färbetechniken sowie komplementärer immunhistologischer Verfahren klassifiziert und charakterisiert. Die hieraus abgeleiteten Arbeitshypothesen sind Voraussetzung für gezielte zukünftige experimentelle und Verlaufsuntersuchungen, um letztlich eine dem Einzelfall gerecht werdende diagnostische und prognostische Bewertung vornehmen und gegebenenfalls einen für den Praktiker verwertbaren Hinweis auf die Ätiologie ableiten zu können.

Material und Methoden

Die 33 Endometriumbiopsien stammen aus den Routineeinsendungen an das Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig und sind als klinisch gut dokumentierte Fallbeispiele anzusehen, auf deren Grundlage verschiedene Arten von Fehldifferenzierungen definiert wurden. Die Art der Fixierung der Biopsien stellte eine wichtige Voraussetzung für die Einbeziehung in die Studie dar, da einige der immunhistologischen Untersuchungen ausschließlich an formalinfixiertem Material gelingen. Die fehdifferenzierten Endometrien wurden mit Biopsien klinisch-gynäkologisch gesunder Stuten, wie sie von *Aupperle et al. (2000)* beschrieben worden sind, verglichen.

Tabelle 1 enthält eine zusammenfassende Charakterisierung des Tiergutes. Die Mehrheit der Stuten war zwischen 10–19 Jahren alt, seit einem oder mehreren Jahren güst und hatte zwei oder mehr Fohlen. Es handelte sich um 22 Warmblut- und 3 Vollblutstuten, die Rasse von 4 Patientinnen wurde vorberichtlich nicht erwähnt. 21 Proben stammten aus den Monaten März bis August, 12 Biopsien aus den Monaten September bis Februar. Nach der Einbettung der Biopsien in Paraplast, der Anfertigung von 3–4µm dicken Schnitten und einer H.-E. Färbung erfolgte die histomorphologische Charakterisierung der endometrialen Differenzierung (*Brunckhorst et al., 1991*). Alle Proben wurden anschließend immunhistologisch auf die Expression der Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptoren (PR), des Proliferationsmarkers Ki-67 Antigen, der Intermediärfilamente Vimentin und Desmin als Bestandteile des Zytoskeletts sowie der Basalmembran Komponente Laminin nach der Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode (PAP) untersucht (*Häfner 1999*). Der Steroidhormonrezeptorstatus wurde semiquantitativ anhand des immunreaktiven Scores (IRS) nach *Özgen et al. (1997)* ermittelt, die Anzahl der Zellen, die Ki-67 Antigen, Vimentin oder Desmin exprimieren, geschätzt und in Prozent angegeben. Das Reaktionsmuster der glandulären Expression von Vimentin und die Intensität und Kontinuität der Lamininexpression werden beschrieben.

Ergebnisse

Histologie

Entsprechend der Einteilung nach *Schoon et al. (1998)* werden die histomorphologischen Erscheinungsbilder der fehdifferenzierten Endometrien prinzipiell zwei verschiedenen Formen zugeordnet: der ungleichmäßigen und der irregulären Differenzierung.

Ungleichmäßige Differenzierung

Bei der ungleichmäßigen Differenzierung können verschiedene Aktivitäts- und/oder Funktionscharakteristika innerhalb einer Biopsie nebeneinander beobachtet werden. Anhand der mehrheitlich vorkommenden Drüsenepithelien wird dem Endometrium ein dominierender Funktionszustand zugeordnet. Die Fallbeispiele weisen eine ungleichmäßig proliferative (Abb. 1) bzw. eine ungleichmäßig inaktive Differenzierung auf. Neben den dominierenden proliferativ aktiven bzw. inaktiven glandulären Epithelien liegen Drüsenaggregationen vor, die vermehrt aktiv sind und/

oder einen anderen, vom Grundcharakter abweichenden Funktionszustand aufweisen. Der Übergang zu diesen nichtfibrotischen, meist nestartigen Drüsenformationen ist fließend (Abb. 1).

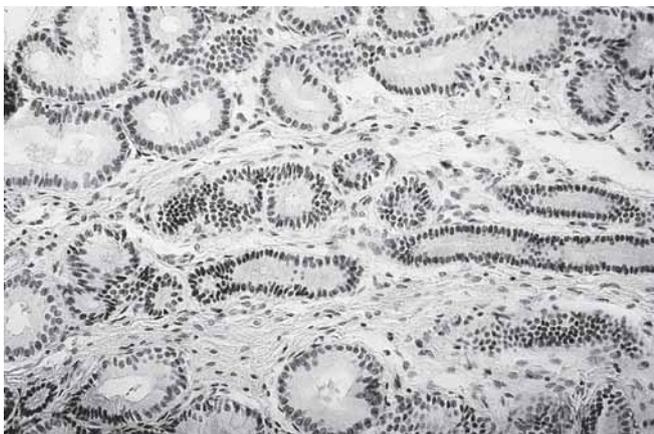


Abb. 1: Ungleichmäßig proliferative Differenzierung. Kleine enge, proliferativ aktive Drüsen liegen neben ggr. dilatierten, sekretorisch aktiven Drüsen (vakuoläres Zytoplasma, intraluminalen Sekretfäden) und nestförmig aggregierten, mdr. dilatierten Drüsen mit sekrethaltigen Lumina. H.-E. Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x

Unequal proliferative differentiation. Small narrow proliferative glands lie besides slightly dilated, secretory glands (vacuolated cytoplasm, intraluminal threads of secretion) and nest-like aggregated, moderately dilated glands with secretion – containing lumina. H.-E. stain, magnification 62,5x

Irreguläre Differenzierung

Das Hauptmerkmal der irregulären Differenzierung ist die Polymorphie aller bzw. der Mehrheit der Drüsenanschnitte einer Biopsie. Die Irregularität (Polymorphie) ist durch die Variation folgender Parameter innerhalb eines Drüsenquerschnittes gekennzeichnet: Epithelhöhe, Struktur des Lumens und des Zytoplasmas, Anzahl, Größe, Form, Lage und Chromatingehalt der Zellkerne. Ist die irreguläre Differenzierung nur gering- bis mittelgradig ausgeprägt, kann die Biopsie unter Einbeziehung anderer allgemeiner Charakteristika (z.B. Ödematisierung, Drüsensdichte und -konfiguration) anhand der dominierenden Morphologie der Drüsenepithelien einem Funktionszustand noch näherungsweise zugeordnet werden.

Irregulär proliferative Differenzierung

Die kleinen bis mittelgroßen, teils gestreckten Drüsenanschnitte der irregulär proliferativ differenzierten Endometrien besitzen meist enge Lumina (Abb. 2). Der überwiegende Anteil der sehr dicht und vornehmlich basal liegenden Zellkerne ist oval bis länglich und hyperchromatisch. Das Zytoplasma erscheint kompakt und arealweise feinvakuolär. Daneben kommen Formen vor, bei denen, vergleichbar mit der physiologischen späten Proliferationsphase, vermehrt größere Drüsenanschnitte mit teils hyperplastischen Epithelien und zahlreichen Mitosefiguren beobachtet werden.

Irregulär sekretorische Differenzierung

Die Drüsenanschnitte der irregulär sekretorisch differenzierten Endometrien haben, vergleichbar der frühen Sekretionsphase im

physiologischen endometrialen Zyklus, einen erheblichen Durchmesser und hochprismatische Epithelien. Es dominieren große, runde, hypochromatische Zellkerne neben kleineren länglichen, hyperchromatischen und sehr große rundovale, "gescheckte" Nuclei (Abb. 3). Das Zytoplasma ist nur sehr schwach eosinophil und besitzt eine feinvakuoläre Struktur. Andere Erscheinungsformen sind vom Grundcharakter her vergleichbar mit der physiologischen späten Sekretionsphase. Der Drüsenummer ist gering und die Zellkerne sind insgesamt etwas kleiner, chromatindichter und oft von einer perinukleären Vakuole umgeben. Häufig tritt ein mehr oder weniger vollständiger Verlust geordneter Epithelzellverbände auf (Abb. 4). Das Zytoplasma der glandulären Epithelien mit überwiegend hyperchromatischen ovalen, länglichen, teils auch runden, häufig von einer perinukleären Vakuole umgebenen Zellkernen in mehrheitlich basaler Lokalisation. H.-E. Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x



Abb. 2: Irregulär proliferative Differenzierung. Polymorphie des glandulären Epithels mit überwiegend hyperchromatischen ovalen, länglichen, teils auch runden, häufig von einer perinukleären Vakuole umgebenen Zellkernen in mehrheitlich basaler Lokalisation. H.-E. Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x

Irregular proliferative differentiation. Polymorphy of the glandular epithelia with predominantly hyperchromatic oval, elongated, but also partly rounded cell nuclei, which are frequently surrounded by a perinuclear vacuole, in mostly basal localization. H.-E. stain, magnification 62,5x

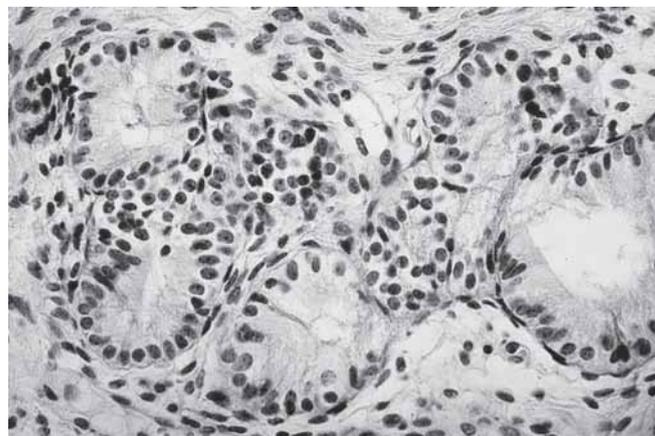


Abb. 3: Irregulär sekretorische Differenzierung. Polymorphe, sehr hohe Drüsenepithelien mit überwiegend hypochromatischen, teils gescheckten Zellkernen in basaler, mittlerer und apikaler Position. Vakuoläres Zytoplasma. H.-E. Färbung, Gerätevergrößerung 125x

Irregular secretory differentiation. Polymorphic, very tall glandular epithelia with predominantly hypochromatic, partly mottled cell nuclei in basal, middle and apical positions. Vacuolated cytoplasm. H.-E. stain, magnification 125x

dulären Epithelien ist grobvakuolär strukturiert, innerhalb der "ausgefranst" erscheinenden Lumina sind Sekretreste vorhanden.



Abb. 4: Irregulär sekretorische Differenzierung. Variierende Kerngrößen, -formen und -lokalisationen der meist isoprismatischen Epithelien. Teilweise Verlust eines geordneten Epithelzellverbandes. Grobvakuoläres Zytoplasma. H.-E. Färbung, Gerätevergrößerung 62,5x

Irregular secretory differentiation. Variable nuclear size, form and localization of the mainly isoprismatic epithelia. Partial loss of an orderly epithelial cell formation. Coarsely vacuolated cytoplasm. H.-E. stain, magnification 62,5x

Vollständig irreguläre Differenzierung

Mit zunehmender Irregularität gestaltet sich die sichere Einschätzung des Funktionszustandes schwierig, da in einem Drüsenanschnitt sekretorische, proliferative, hypertrophische, hyperplastische oder auch atrophische Differenzierungsmerkmale vereint sein können und ein dominierender Grundcharakter nicht zu ermitteln ist.

Einige Fallbeispiele fehdifferenzierter Endometrien sind durch eine vollständig ungleichmäßige und irreguläre Differenzierung gekennzeichnet.

Die Tabelle 2 enthält eine zusammenfassende Darstellung der verschiedenen Erscheinungsbilder glandulärer Differenzierungsstörungen im equinen Endometrium (n=33).

Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, Ki-67 Antigenexpression

Für unveränderte Endometrien klinisch-gynäkologisch gesunder Stuten ist eine einheitliche glanduläre und stromale Expression der Hormonrezeptoren und des Proliferationsmarkers Ki-67 Antigen kennzeichnend, die folgende zyklusabhängige Variationen erkennen lassen:

Im frühen Interöstrus weisen die Proben die maximale glanduläre Expression der Hormonrezeptoren auf, wobei die Reaktionsintensität der ER und der PR miteinander vergleichbar ist. Zu diesem Zeitpunkt ist auch die Ki-67 Antigenexpression der Epithelien am höchsten. Im mittleren Interöstrus nehmen die glandulären Reaktionsintensitäten der Hormonrezeptoren und von Ki-67 Antigen ab, erreichen in der späten Sekretionsphase ihr Minimum, um dann, mit dem Beginn der Proliferationsphase, wieder allmählich anzusteigen (Aupperle et al., 2000).

Ungleichmäßige Differenzierung

Innerhalb der ungleichmäßig differenzierten Endometrien unterliegt das Antigenexpressionsmuster deutlichen Modifikationen. Die nestartig angeordneten Drüsenformationen der Fallbeispiele verfügen meist über einen höheren IRS der ER (Abb. 5) und eine vermehrte Ki-67 Antigenexpression im Vergleich zu den umgebenden Drüsen, die insgesamt schwache Reaktionsintensität der PR variiert kaum.



Abb. 5: Ungleichmäßig proliferative Differenzierung. Deutlich intensivere Expression der Östrogenrezeptoren in Epithelien des sekretorischen Drüsennestes in Lagebeziehung zu den dominierenden, proliferativ aktiven Drüsen. Immunhistologie, Östrogenrezeptornachweis, Nomarski Interferenz Kontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

Unequal proliferative differentiation. Markedly intense expression of estrogen receptors within the epithelia of secretory gland nests beside the dominant actively proliferating glands. Immunohistology, estrogen receptor expression, Nomarski-interference-contrast, magnification 62,5x

Irreguläre Differenzierung

Kennzeichnend für die irregulär differenzierten Endometrien ist eine relativ einheitliche Expression der Hormonrezeptoren und des Proliferationsmarkers Ki-67 Antigen im Bereich aller Strukturelemente. Im Vergleich zu regulär differenzierten Endometrien besitzen diese Fallbeispiele jedoch ein deutliches Defizit an PR sowie einen erheblich höheren IRS der ER. Besonders intensiv ist die Reaktionsintensität der ER irregulär sekretorisch differenzierter Endometrien. Die Ki-67 Antigen Expression der Drüsenepithelien ist außerordentlich hoch und korreliert diesbezüglich mit der Expression der ER (Abb. 6).

Tab. 1: Charakterisierung des Tiergutes (n=29)

Characterization of the mares (n=29)

| Alter | n | Güstzeit | n | Fohlenanzahl | n |
|-------------|---|------------|---|--------------|---|
| 4–9 Jahre | 6 | nicht güst | 2 | Maidenstute | 4 |
| 10–14 Jahre | 8 | ≤ 1 Jahr | 7 | 1 Fohlen | 6 |
| 15–19 Jahre | 8 | 2 Jahre | 7 | 2–3 Fohlen | 7 |
| 20–26 Jahre | 5 | > 2Jahre | 8 | 5–8 Fohlen | 3 |
| unbekannt | 2 | unbekannt | 5 | 10–12 Fohlen | 3 |
| | | | | unbekannt | 6 |

Das Antigenexpressionsmuster der vollständig ungleichmäßig und irregulär differenzierten Endometrien unterliegt erheblichen Variationen. Eine einheitliche Tendenz ist, in Übereinstimmung mit den histopathologischen Befunden (keine Zuweisung zu einem bestimmten Funktionszustand möglich), nicht zu ermitteln.

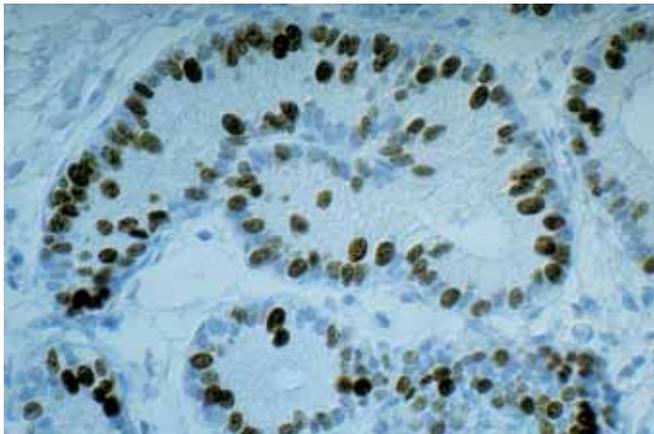


Abb. 6: Irregulär sekretorische Differenzierung. Zu erkennen ist eine intensive Expression von Ki-67 Antigen des Drüsenepithels. Immunhistologie, Ki-67 Antigennachweis, Nomarski Interferenz Kontrast, Gerätevergrößerung 125x

Irregular secretory differentiation. The glandular epithelia are characterized by the intense expression of the Ki-67 antigen. Immunohistology, Ki-67 antigen expression, Nomarski-interference-contrast, magnification 125x

Expression der Intermediärfilamente Vimentin und Desmin

Das unveränderte Endometrium exprimiert Vimentin in den Stromazellen, den vaskulären Endothelzellen und den Fibrozyten der Adventitia. Die glatten Muskelzellen der Gefäßmedia und des Myometriums koexprimieren neben Vimentin auch Desmin (Aupperle, 1997). Abweichend dazu wird in den meisten fehdifferenzierten Endometrien eine Vimentinexpression auch in den Drüsenepithelien beobachtet. In einigen ungleichmäßig differenzierten Endometrien (3 von 10 Proben) zeigen lediglich einzelne Drüsen (weniger als 5%) eine Vimentinexpression, in irregulär differenzierten Endometrien (10 von 18 Proben) hingegen weisen ca. 20% der Drüsen eine Vimentinexpression auf. In allen vollständig ungleichmäßig und irregulär differenzierten Endometrien lassen sich vimentinexprimierende Einzeldrüsen und Drüsennester beobachten.

Darüber hinaus reagieren die Stromazellen aller fehdifferenzierter Endometrien mit einem variierenden Anteil (10% bis 100% aller Stromazellen) mit dem Antikörper gegen Desmin.

Lamininexpression

Die Basalmembranen der glandulären Epithelien unveränderter Endometrien sind durch eine kräftige und kontinuierliche Lamininexpression gekennzeichnet. Auch die Basalmembranen der regulären oder nur geringgradig irregulären Drüsenanschnitte der fehdifferenzierten Endometrien exprimieren Laminin kontinuierlich. Mit zunehmender Irregularität sowie in den Arealen vermehrter Drüsendichte erscheint die glanduläre Basalmem-

bran infolge der teils "verwaschenen" oder auch fehlenden Lamininexpression diskontinuierlich. Innerhalb der nestförmigen Drüsenaggregationen (ungleichmäßige Differenzierung) ist meist kein Laminin nachweisbar. Sehr variabel und oftmals ohne erkennbares histomorphologisches Äquivalent ist die Lamininexpression der vollständig ungleichmäßig und irregulär differenzierten Endometrien (Abb. 7).

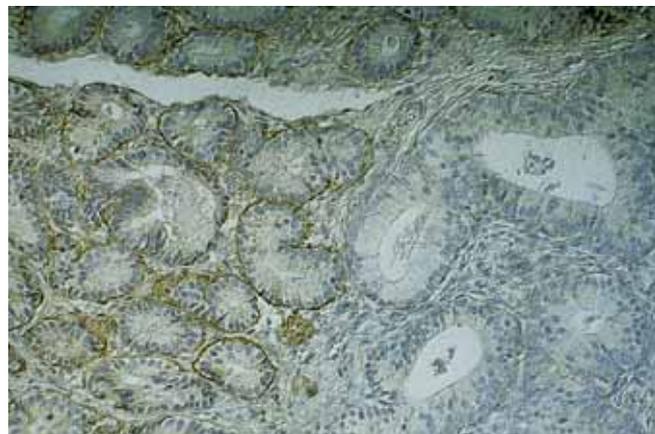


Abb. 7: Vollständig ungleichmäßige und irreguläre Differenzierung. Die Basalmembranen der irregulären, hypertrophischen und teils hyperplastischen Epithelien exprimieren kein Laminin. Überwiegend kontinuierliche, teils verwaschene Lamininexpression der benachbarten, irregulär differenzierten Drüsen. Immunhistologie, Lamininnachweis, Nomarski Interferenz Kontrast, Gerätevergrößerung 62,5x

Completely unequal and irregular differentiation. The basal membrane of the irregular, hypertrophic and partly hyperplastic epithelia does not express laminin. Predominantly continuous, partly faded laminin expression in the neighboring irregularly differentiated glands. Immunohistology, laminin expression, Nomarski-interference-contrast, magnification 62,5x

Diskussion

Im Rahmen der Routinediagnostik zu erfassende, morphologisch funktionelle Variationen der glandulären Differenzierung spielen bislang nur eine untergeordnete Rolle in der Diagnostik und Erforschung von Fertilitätsstörungen der Stute und werden erstmals von Schoon et al. (1998) beim Pferd definiert. Im Gegensatz dazu sind in der Humangynäköpathologie glanduläre Fehdifferenzierungen ausführlich beschrieben (Übersicht: Dalenbach-Hellweg und Poulsen, 1985).

Das unveränderte Endometrium fertiler Stuten ist physiologischerweise durch eine vollkommen einheitliche, zyklussynchrone, d.h. "reguläre" Differenzierung aller endometrialen Strukturelemente als eine uterine Voraussetzung für den Reproduktionserfolg gekennzeichnet (Brunckhorst et al., 1991; Strankmeyer, 1993; Raila et al., 1997a; Aupperle et al., 2000). Diese ist so ausgeprägt, dass es mit Hilfe morphometrischer Verfahren sogar gelingt, den Zyklustag anhand einer einzigen Biopsie mit hoher Sicherheit zu bestimmen (Strankmeyer, 1993).

Die in Anlehnung an Schoon et al. (1998) definierte irreguläre und ungleichmäßige glanduläre Differenzierung wurde in dieser Studie anhand konventioneller Techniken in Kombination mit der Immunhistologie konkretisiert und in weitere Untergruppen unterteilt. Auf der Basis dieser Resultate lassen sich folgende Arbeitshypothesen zur Ätiopathogenese aufstellen, deren

Bestätigung jedoch zukünftigen Verlaufsuntersuchungen bzw. experimentellen Versuchsansätzen vorbehalten bleibt.

Ungleichmäßige Differenzierung

In Übereinstimmung mit Schoon *et al.* (1999) wird vermutet, dass die Ursache der ungleichmäßigen Differenzierung in einem endometrial lokalisierten Defekt der Ausstattung mit Hormonrezeptoren und einer daraus resultierenden Beeinflussung der lokalen Hormonwirkung besteht (Abb. 8). Die nestförmigen Drüsenaggregationen der ungleichmäßig proliferativ differen-

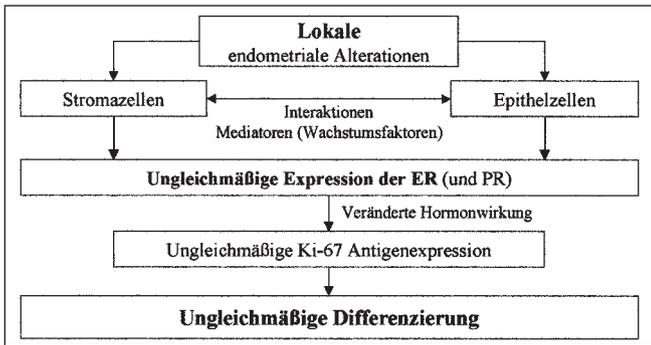


Abb. 8: Arbeitshypothese zur Pathogenese der ungleichmäßigen endometrialen Differenzierung

Hypothetic pathogenesis of the unequal endometrial differentiation.

zierten Endometrien verfügen über einen deutlich höheren IRS der ER im Vergleich zu den umgebenden Drüsen. Dies könnte die veränderte funktionelle und teils auch vermehrte mitotische Aktivität dieser Drüsenepithelien erklären, da die Wirkung der Östrogene an das Vorhandensein der ER gekoppelt ist (Landers und Spelsberg, 1992; Tsai und O'Malley, 1994). Fraglich ist jedoch die Ursache dieser unterschiedlichen Ausstattung mit Hormonrezeptoren. An Endometrien von Affen und Menschen erfolgte der Nachweis, dass die Östrogenwirkung durch Interaktionen von Stroma- und Epithelzellen beeinflusst wird (Brenner *et al.*, 1990; McClellan *et al.*, 1990). Brenner *et al.* (1990)

Tab. 2: Anteil der verschiedenen Drüsendifferenzierungsmuster (33 Endometriumbiopsien)

Number of the various differentiation patterns (33 endometrial biopsies)

| | | |
|--|----------------------------|---------------|
| ungleichmäßige Differenzierung | | n = 10 |
| | ungleichmäßig proliferativ | n = 8 |
| | ungleichmäßig inaktiv | n = 2 |
| irreguläre Differenzierung | | n = 17 |
| | irregulär proliferativ | n = 5 |
| | irregulär sekretorisch | n = 12 |
| vollständig ungleichmäßige und irreguläre Differenzierung | | n = 6 |

vermuten, dass Stromazellen mittels der Sekretion von Mitogenen die epitheliale Proliferation manipulieren können. Sollten auch im equinen Endometrium derartige Wechselwirkungen existieren, wäre es denkbar, dass es infolge einer veränderten Differenzierung der Stromazellen in der unmittelbaren Umgebung der Drüsennester zur Beeinflussung des glandulären Funktionszustandes kommt. Als Auslöser der veränderten Differenzierung und Syntheseleistung der Stromazellen kommen neben entzündlichen vor allem degenerative, lichtmikroskopisch (noch) nicht erfassbare, endometriale Alterationen ungeklärter Ätiologie in Betracht, wie sie von Raila *et al.* (1997b) im Rahmen der Endometrose beobachtet werden.

Irreguläre Differenzierung

Den Fallbeispielen der irregulären Differenzierung ist, im Gegensatz zur ungleichmäßigen Differenzierung, eine relativ einheitliche, gruppenspezifische glanduläre Hormonrezeptorexpression innerhalb der jeweiligen Biopsie eigen. Demzufolge wird, wie bereits von Schoon *et al.* (1999) vermutet, die irreguläre Differenzierung am ehesten als Folge einer hormonellen Dysregulation zu interpretieren sein (Abb. 9). Ellenberger *et al.* (2000) beobachten ein gehäuftes Auftreten irregulärer Differenzierungsvorgänge bei ovariellen Dysfunktionen (z.B. Granulosazelltumore, Ovarzysten). Die Drüsen der irregulär differenzierten Fallbeispiele des eigenen Materials sind durch eine übermäßig hohe Expression der ER und von Ki-67 Antigen gekennzeichnet. Östrogene induzieren die Synthese ihrer eigenen Rezeptoren (Bergman *et al.*, 1992; Wathes *et al.*, 1996), so dass auch eine hinsichtlich Dauer und Intensität übermäßige endometriale Östrogeneinwirkung eine vermehrte Expression von ER nach sich ziehen kann. Dallenbach-Hellweg (1980) weist am humanen Endometrium nach, dass die Verabreichung von Östrogenen in der Follikelphase zu einer Verstärkung der Proliferation

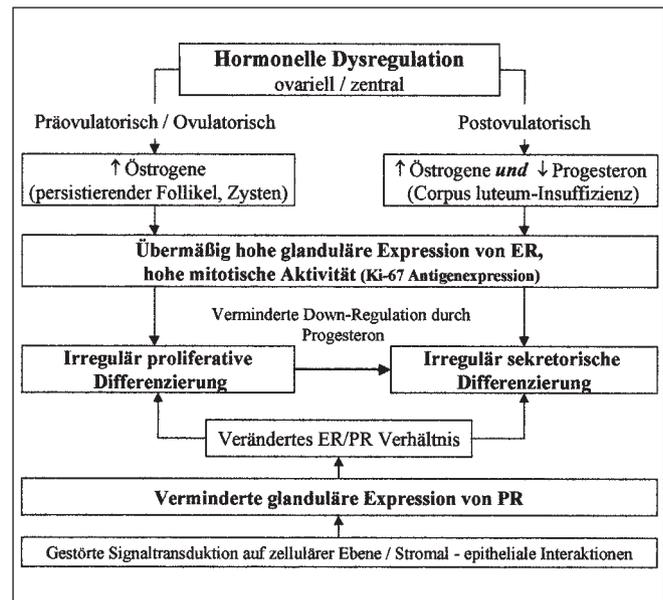


Abb. 9: Arbeitshypothese zur Pathogenese der irregulären endometrialen Differenzierung

Hypothetic pathogenesis of the irregular endometrial differentiation.

feration (Hyperproliferation) mit dem Bild einer irregulären Differenzierung im Anfangsstadium führt. Die intensive Expression der ER in Verbindung mit der teils hochgradigen Ki-67 Antigenexpression der irregulär differenzierten Drüsen könnte somit als Hinweis einer übermäßigen Östrogenwirkung angesehen werden. Eine zusätzliche Bestimmung der Östrogenwerte im Serum zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme bzw. Verlaufuntersuchungen über den Zyklus der betroffenen Stuten dürften zur Klärung dieser These beitragen.

In der Phase der Sekretion liegt vermutlich zudem eine insuffiziente "Downregulation" der Steroidhormonrezeptoren durch Progesteron vor (West et al., 1987; Okulicz, 1988; Wathes et al., 1996), möglicherweise bedingt durch eine verminderte oder verkürzte Progesteronwirkung (reduzierte Progesteronsynthese, Corpus luteum-Insuffizienz).

Özgen (1999) sieht die Ursache der Hydromukometra der Stute (endometriale Flüssigkeitsakkumulation durch hypersekretorische Aktivität der Drüsen) in einer Störung während der Lutealphase. Die Autorin macht eine inadäquate Progesteronwirkung als Ursache für die verminderte "Downregulation" und eine damit verbundene exzessive ER- und PR-Expression verantwortlich. Im Gegensatz zu den von Özgen (1999) beschriebenen Befunden besitzen die irregulär sekretorisch differenzierten Fallbeispiele des eigenen Materials jedoch eine geringere Progesteronrezeptorexpression, verglichen mit den Befunden des physiologischen endometrialen Zyklus. Demzufolge nehmen wir an, dass eine unzureichende Progesteronwirkung auch als Resultat einer ungenügenden endometrialen Ausstattung mit PR auftreten kann, die ursächlich auf eine endometriale Insuffizienz (gestörte Signaltransduktion) oder stromal-epitheliale Interaktionen zurückzuführen wäre. Letztendlich ist zu diskutieren, ob möglicherweise auch ein gestörtes Verhältnis von ER und PR eine Rolle bei der Entstehung der irregulären Differenzierung spielen könnte (Abb. 9).

Im Gegensatz zu regulär differenzierten Endometrien exprimieren in den fehdifferenzierten Endometrien einige Drüsen Vimentin. Aupperle (1997) beobachtet eine glanduläre Vimentinexpression bei der equinen Endometrose (periglanduläre Fibrose). Die von ihr beschriebenen Drüsen sind überwiegend „zyklusasynchron“ differenziert, bezogen auf nicht veränderte Areale der Biopsie. Stromal-epitheliale Interaktionen (Baribault et al., 1989), eine vermehrte proliferative Aktivität der Drüsenepithelien (Franke et al., 1979; Virtanen et al., 1981; Aupperle, 1997) und/oder die Störung der Zellkontakte (Ramaekers et al., 1982, 1984) kommen als auslösende Faktoren der glandulären Vimentinexpression in Betracht. Diese pathologische Zusammensetzung des Zytoskeletts der Drüsenepithelien ist als Ausdruck der Adaptation an die veränderten Wachstumsbedingungen zu interpretieren.

Auch die stromale Koexpression von Vimentin und Desmin innerhalb der fehdifferenzierten Endometrien stellt vermutlich einen Kompensationsmechanismus der Zellfunktion dar. Fraglich ist jedoch, ob es sich dabei um eine, durch verschiedene Einflüsse initiierte, myogene (Bird und Willis, 1965; Raila et al., 1999) oder nicht myogene (Fehl-)Differenzierung (Glasser et al., 1987) der Stromazellen handelt.

Für das unveränderte Endometrium der Stute (Raila et al., 1998), der Frau (Bullelli et al., 1988) und der Ratte (Karkavelas et al., 1988) ist eine einheitlich lineare und kontinuierliche glanduläre

re Lamininexpression charakteristisch. Variationen bzw. Defizite der Expression werden im equinen Endometrium im Zusammenhang mit der Endometrose (Raila et al., 1998) und bei der Frau in Kombination mit entzündlichen, hyper- und neoplastischen endometrialen Alterationen beschrieben (Bullelli et al., 1988; Bilalis et al., 1996). Es ergibt sich schlussfolgernd, dass die diskontinuierliche, teils fehlende Reaktion der glandulären Basalmembran mit dem Lamininantikörper als ein Kennzeichen der ausgeprägten irregulären und ungleichmäßigen Differenzierung (nicht fibrotische Drüsennester) im equinen Endometrium anzusehen ist. Die fehlende Nachweisbarkeit von Laminin kann durch die verminderte Synthese (Bilalis et al., 1996), den erhöhten Abbau (Schmidt und Burkhardt, 1994) oder eine veränderte Konfiguration der Lamininmoleküle (Timpl und Dzidek, 1986; Beck et al., 1990; Kosmehl et al., 1996) bedingt sein. Durch die Veränderung von Struktur und Funktion, wie beispielsweise der Permeabilität der Basalmembran (Martinez-Hernandez und Amenta, 1983), kann es wiederum sekundär zur Beeinflussung der glandulären Zelldifferenzierung kommen (Bullelli et al., 1988).

Ziel dieser Arbeit war es, das Phänomen der equinen endometrialen Fehdifferenzierung mit konventionellen und komplementären immunhistologischen Verfahren präzise zu charakterisieren. Auf der Basis der erzielten Resultate lassen sich die beschriebenen Arbeitshypothesen ableiten. Zur definitiven Klärung der Ätiopathogenese im Einzelfall und zur Beurteilung einer möglichen Reversibilität einschließlich der definitiven aktuellen und prospektiven Fertilitätsrelevanz sind nun interdisziplinäre Verlaufsuntersuchungen (Klinik-Pathologie) in Verbindung mit laborchemischen (Endokrinologie), (immun-)histologischen und ultrastrukturellen Analysen an einem größeren Patientengut mit umfassenden anamnestischen Daten unabdingbar. Nach unseren Erfahrungen jedoch dürfte ein deutlich fehdifferenziertes Endometrium nicht in der Lage sein, das für eine Konzeption und Aufrechterhaltung der Gravidität erforderliche uterine Milieu bereitzustellen, z.B. infolge Veränderungen des sekretorischen Proteinmusters, wie durch Untersuchungen von Bader et al. (1997) im Rahmen einer Endometritis bzw. einer Endometrose nachgewiesen wurde.

Literatur.

- Aupperle, H., S. Özgen, H.-A. Schoon, D. Schoon, H.-O. Hoppen, H. Sieme and A. Tannapfel (2000): Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equ. Vet. J.* 32, 228-232
- Bader, H., H. Kremer, C. Vogt, H.-A. Schoon and K. Beier-Hellwig (1997): Investigations of the protein patterns of the equine uterine secretions as functional parameter of the endometrium. *Pferdeheilkunde* 13, 544
- Baribault, H., R. Blouin, L. Bourgon and N. Marceau (1989): Epidermal growth factor-induced selective phosphorylation of cultured rat hepatocyte 55-kDa cytokeratin before filament reorganization and DNA synthesis. *J. Cell Biol.* 109, 1665-1676
- Bartmann, C.P., I. Brickwedel, B. Frühauf, M. Wachholz, H.-A. Schoon und E. Klug (1998): Ovarialtumoren bei der Stute – Diagnose und chirurgische Behandlung. DVG-Tagungsbericht, 15. Arbeitstagung "Fachgruppe Pferdekrankheiten", Wiesbaden
- Beck, K., I. Hunter and J. Engel (1990): Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* 4, 148-160
- Bergman, M.D., B.S. Schachter, K. Karels, E.P. Combatsiaris, T. Garcia and J.F. Nelson (1992): Up-regulation of the uterine estrogen receptor

- and its messenger ribonucleic acid during the mouse estrus cycle: the role of estradiol. *Endocrinology* 130, 1923–1930
- Bilalis, D.A., L.D. Klenzler and S. Fleming (1996): Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in luteal phase endometrium of fertile and infertile patients. *Hum. Reprod.* 11, 2713–2718
- Bird, C.C. and R.A. Willis (1965): The production of smooth muscle by the endometrial stroma of the adult human uterus. *J. Pathol. Bacteriol.* 90, 75–81
- Brenner, R.M., N.B. West and M.C. McClellan (1990): Estrogen and progesterin receptors in the reproductive tract of male and female primates. *Biol. Reprod.* 42, 11–19
- Brunckhorst, D., H.-A. Schoon, H. Bader und H. Sieme (1991): Morphologische, enzym- und immunhisto-chemische Charakteristika des endometrialen Zyklus bei der Stute. *Fertilität* 7, 44–51
- Bulletti, C., A. Galassi, V.M. Jasonni, G. Martinelli, S. Tabanelli and C. Flamigni (1988): Basement membrane components in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *Cancer* 62, 142–149
- Dallenbach-Hellweg, G. (1980): Functional morphologic changes in female sex organs induced by exogenous hormones. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Dallenbach-Hellweg, G. und H. Poulsen (1985): Atlas der Histopathologie des Endometriums. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Ellenberger, C., H. Aupperle, C.P. Bartmann, D. Schoon und H.-A. Schoon (2000): Ovarielle Störungen – eine Ursache für endometriale Fehldifferenzierungen bei der Stute. *Reprod. Dom. Anim.* 35, 41
- Franke, W.W., E. Schmid, S. Winter, M. Osborn and K. Weber (1979): Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp. Cell Res.* 123, 25–46
- Glasser, S.R., S. Lampelo, M.I. Munir and J. Julian (1987): Expression of desmin, laminin and fibronectin during in situ differentiation (decidualization) of rat uterine stromal cells. *Differentiation* 35, 132–142
- Häfner, I. (1999): Differenzierungsstörungen im Endometrium der Stute – Lichtmikroskopische und immunhistologische Untersuchungen. Leipzig, Univ., Vet. med. Fakul., Diss
- Karkavelas, G., N.A. Kefalides, P.S. Amenta and A. Martinez-Hernandez (1988): Comparative ultrastructural localization of collagen types III, IV, VI and laminin in rat uterus and kidney. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 100, 137–155
- Kenney, R.M. (1978): Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on embryonic death. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172, 241–262
- Kenney, R.M. and P.A. Doig (1986): Equine endometrial biopsy. in: D.A. Morrow (Hrsg.): *Current therapy in Theriogenology*. W.B. Saunders Comp., S. 723–729
- Klug, E., C.P. Bartmann, A. Schöning, D. Schoon und H.-A. Schoon (1997): Auswirkung einer Progestagen-Langzeit-Applikation auf Sexualzyklus und Endometrium des Pferdes – Zwei Seiten einer therapeutischen Medaille. *Pferdeheilkunde* 13, 490–498
- Kosmehl, H., A. Berndt and D. Katenkamp (1996): Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch.* 429, 311–322
- Landers, J.P. and T.C. Spelsberg (1992): New concepts in steroid hormone action: transcription factors, protooncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2, 19–63
- Martinez-Hernandez, A. and P.S. Amenta (1983): The basement membrane in pathology. *Lab. Invest.* 48, 656–677
- McClellan, M.C., S. Rankin, N.B. West and R.M. Brenner (1990): Estrogen receptors, progesterin receptors and DNA synthesis in the macaque endometrium during the luteal-follicular transition. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37, 631–641
- Okulicz, W.C. (1988): Temporal effects of progesterone inhibition of occupied nuclear oestrogen receptor retention in the rat uterus. *J. Endocrinol.* 121, 101–107
- Özgen, S., K. Rasch, G. Kropp, H.-A. Schoon, H. Aupperle, H. Sieme und E. Klug (1997): Aetiopathogenese und therapy of equine hydromucometra: preliminary data. *Pferdeheilkunde* 13, 533–534
- Özgen, S. (1999): Die Hydromukometra bei der Stute - Untersuchungen zur Ätiopathogenese, diagnostischen Differenzierung und therapeutischen Beeinflussbarkeit -. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- Raila, G., H.-A. Schoon, D. Schoon, S. Özgen, H. Aupperle, E. Klug and O. Strankmeyer (1997a): The equine endometrial cycle: a morphometrial, ultrastructural, enzyme- and immuno-histological investigation. *J. Anim. Sci.* 75, 231
- Raila, G., H.-A. Schoon, S. Wrede and E. Klug (1997b): Pathogenesis of equine endometrosis – an ultrastructural investigation. *Pferdeheilkunde* 13, 550–551
- Raila, G., H. Aupperle, H.-A. Schoon, S. Menger, D. Schoon, C. Mülling, H. Sieme und E. Klug (1998): Endometrosis in the mare: immunohistological and ultrastructural investigation. *Reprod. Dom. Anim., Suppl.* 5, 115
- Raila, G., H. Aupperle, S. Menger, D. Schoon und H.-A. Schoon (1999): Stromale Differenzierung und Fehldifferenzierung im equinen Endometrium – immunhistologische und ultrastrukturelle Charakteristika. in: *Dtsch. Vet. Med. Ges. (Hrsg.): 42. Tagung der Fachgruppe Allgemeine und spezielle Pathologie, Jena, Zusammenfassung: BMTW.* 113, 32–33
- Ramaekers, F.C.S., J.J.G. Puts, A. Kant, O. Moesker, P.H.K. Jap and G.P. Vooijs (1982): Differential diagnosis of human carcinomas, sarcomas and their metastases using antibodies to intermediate-sized filaments. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 18, 1251–1257
- Ramaekers, F.C.S., D. Haag, P.H.K. Jap and G.P. Vooijs (1984): Immunohistochemical demonstration of keratin and vimentin in cytologic aspirates. *Acta Cytol.* 28, 385–392
- Ricketts, S.W. (1975): Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. *J. Reprod. Fert.* 23, 341–345
- Schmidt, R.E. und H. Burkhardt (1994): Bindegewebe. in: W. Siegenthaler (Hrsg.): *Klinische Pathophysiologie*. 7. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 788–824
- Schoon, H.-A., D. Schoon und E. Klug (1997): Die Endometriumbiopsie bei der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. *Pferdeheilkunde* 13, 453–464
- Schoon, H.-A., I. Wiegandt, D. Schoon, H. Aupperle und C.P. Bartmann (1998): Functional disturbances of the equine endometrium. *Proc. 7th Int. Symp. Equ. Repr., Pretoria* 12-17 July 98, 103–104
- Schoon, H.-A., D. Schoon, I. Wiegandt, C.-P. Bartmann und H. Aupperle (1999): "Endometrial maldifferentiation" – A clinically significant diagnosis in equine reproduction? *Pferdeheilkunde* 15, 555–559
- Strankmeyer, O. (1993): Morphometrische Untersuchungen am Endometrium zyklischer und ovariektomierter, hormonbehandelter Stuten. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- Timpl, R. and M. Dziadek (1986): Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 29, 1–112
- Tsai, M.-J. und B.W. O'Malley (1994): Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 451–486
- Virtanen, I., V.-P. Letho, E. Lehtonen, T. Vartio, S. Stenman, P. Kurki, O. Wager, J.V. Small, D. Dahl and R.A. Badley (1981): Expression of intermediate filaments in cultured cells. *J. Cell Sci.* 50, 45–63
- Wathes, D.C., G.E. Mann, J.H. Payne, P.R. Riley, K.R. Stevenson and G.E. Lamming (1996): Regulation of oxytocin, estradiol and progesterone-receptor concentrations in different uterine regions by estradiol, progesterone and oxytocin in ovariectomized ewes. *J. Endocrinol.* 151, 375–393
- West, N.B., M.C. McClellan, M.D. Sternfeld and R.M. Brenner (1987): Immunocytochemistry versus binding assays of the estrogen receptor in the reproductive tract of spayed and hormone-treated mares. *Endocrinology* 121, 1789–1800

Dr. Isabell Häfner
Prof. Dr. H.-A. Schoon
Dr. Doris Schoon
Dr. Heike Aupperle

Institut für Veterinär-Pathologie
An den Tierkliniken 33
04103 Leipzig

Tel. 0341/9738270
e-mail: schoon@rz.uni-leipzig.de