

Pathogenese der equinen Endometrose: Bedeutung der Wachstumsfaktoren Transforming growth factor- α , - β 1, - β 2 und - β 3 sowie des Enzyms Matrixmetalloproteinase-2

Claudia Kiesow, Christin Ellenberger und Heinz-Adolf Schoon

Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig

Zusammenfassung

Die Endometrose ist eine irreversible degenerative Erkrankung der Stute und stellt einen Hauptgrund für equine Infertilität dar. Die Ätiopathogenese der Endometrose ist bisher nicht eindeutig geklärt. Daher war das Ziel der Untersuchungen die immunhistologische Charakterisierung der glandulären und stromalen Expression der Wachstumsfaktoren Transforming growth factor- α , - β 1, - β 2, - β 3 (TGF- α , TGF- β 1, - β 2, - β 3) und des Enzyms Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) innerhalb verschieden differenzierter Endometroseherde. Zudem wurde der Einfluss einer gleichzeitig auftretenden Endometritis auf das Expressionsverhalten der uterinen Zellen mittels der genannten Marker innerhalb der Endometroseherde überprüft. Als Material für Histologie und Immunhistologie standen Endometriumbiopsate von 82 Stuten mit Endometrose, variabel in Grad und Erscheinungsform, zur Verfügung. Die Stromazellen innerhalb der verschiedenen Endometroseherde zeigen im Vergleich zum unveränderten Endometrium vor allem eine verminderte Expression von TGF- α . Das Expressionsmuster der TGF- β -Wachstumsfaktoren ist grundsätzlich variabel. Es fällt jedoch auf, dass die Stromazellen, insbesondere in inaktiven Endometrosen, eine geringere Expression von der TGF- β -Isoformen aufweisen. Ursache der verminderten TGF-Wachstumsfaktorexpression ist möglicherweise eine gestörte hormonelle Stimulation bzw. eine stromale Synthesestörung in Folge veränderter epithelial/stromaler Wechselwirkungen. Das Enzym MMP-2 wird dagegen in den Stromazellen aller Endometroseherde deutlich vermehrt nachgewiesen. Dies ist sehr wahrscheinlich Folge der Extrazellulärmatrix-Akkumulation innerhalb von Endometrosen und für die fortschreitende Zerstörung der glandulären Basallamina verantwortlich. Die glanduläre Expression von den Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie innerhalb der Endometroseherde gleicht weitgehend der der unveränderten Drüsenzellen. Lediglich in destruierenden Endometrosen werden TGF- β 2 und sogar die, im unveränderten Endometrium nur von den Stromazellen exprimierten, Marker TGF- α und MMP-2 in den involvierten Drüsenzellen vermehrt nachgewiesen. Mögliche Ursachen wären eine Diffusion durch die geschädigte glanduläre Basallamina bzw. eine Anregung der Synthese im Rahmen der epithelialen Wundheilung. Eine Stimulation der glandulären und stromalen Expression der untersuchten Wachstumsfaktoren und des Enzyms MMP-2 im Rahmen der Endometrose durch die Anwesenheit von Entzündungszellen konnte nicht nachgewiesen werden. Eine mit der Leber- und Lungenfibrose vergleichbare Schlüsselrolle der TGF-Wachstumsfaktoren in der Pathogenese der equinen Endometrose konnte nicht eindeutig belegt werden. Da vor allem die Stromazellen in der Endometrose eine veränderte Expression der Wachstumsfaktoren aufweisen, ist möglicherweise eine primäre stromale Fehldifferenzierung der Ausgangspunkt für die Entstehung der Endometrose.

Schlüsselwörter: Stute, equine Endometrose, Transforming growth factor- α und - β , Matrixmetalloproteinase-2, Reproduktion

Pathogenesis of equine endometrosis: Relevance of the growth factors transforming growth factor- α , - β 1, - β 2 and - β 3 and matrixmetalloproteinase-2

Endometrosis is a irreversible degenerative disease of mares and one major cause for equine infertility. Until now the etio-pathogenesis of endometrosis is not clarified. The aim of the study was the immunohistochemical characterization of the glandular and stromal expression of the growth factors Transforming growth factor- α , - β 1, - β 2 and - β 3 (TGF- α , TGF- β 1, - β 2 and - β 3) and the enzyme matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) in phenotypical variations of endometrosis. Additionally, the potential effect of a concomitant endometritis on glandular and stromal growth factor- and enzyme- expression was investigated. For the histomorphological and immunohistochemical examination 82 endometrial biopsies from 82 mares with endometrosis, variable in degree and phenotype, were used. The stromal cells within the different foci of endometrosis reveal a particularly clearly reduced expression of TGF- α compared to the unaltered, surrounding endometrium. Basically, expression patterns of TGF- β -isoforms are variable, however it becomes evident that particularly stroma cells of inactive endometrotic foci show a lower expression of TGF- β -isoforms. The possible cause of the decreased expression of TGF-growth factors is a disturbed hormonal stimulation or rather a disturbance of synthesis as a consequence of altered epithelial/stromal interactions. In contrast, the enzyme MMP-2 appears markedly higher concentrated in stroma cells of all foci of endometrosis. This can probably be attributed to an accumulation of extracellular matrix within the foci of endometrosis and is responsible for the progressive destruction of the glandular basal lamina. The glandular expression of the growth factors of the TGF- β -family within the foci of endometrosis resembles to a large extent the one seen in unaltered gland cells. Elevated concentrations of TGF- β 2 and even TGF- α and MMP-2 markers only being expressed by stroma cells in unaltered endometrium, are solely detected in the involved glands of destructive endometrosis. Diffusion through damaged basal lamina of the gland cells or a stimulation of synthesis within epithelial wound healing might be possible reasons. Regarding endometrosis a stimulation of the glandular and stromal expression of the studied growth factors and the enzyme MMP-2 by presence of inflammatory cells could not be demonstrated. A definite statement if TGF growth factors have a key role in the pathogenesis of equine endometrosis comparable as the one they have in liver and lung fibrosis could not be made. Since particularly stroma cells have demonstrated an altered expression of growth factors in endometrosis a primarily stromal maldifferentiation might be the starting point in the development of endometrosis.

Keywords: mare, equine endometrosis, transforming growth factor- α and - β , matrixmetalloproteinase-2, reproduction

Einleitung

Die equine Endometrose ist als eine periglanduläre und/oder stromale endometriale Fibrose einschließlich der glandulären Alterationen innerhalb der fibrotischen Arealen definiert (Schoon et al. 1995) und stellt eine der Hauptursachen equiner Fertilitätsstörungen dar (Kenney und Doig 1986). Die periglanduläre Fibrose kann Einzeldrüsen betreffen oder sogenannte Drüsennester bilden (Kenney 1978, Schoon et al. 1995). Eine Quantifizierung des Fibrosegrades ist anhand der Anzahl periglandulärer Bindegewebsschichten unter Einbeziehung der Anzahl fibrotischer Herde pro definierter Fläche (Tab. 1) im Endometrium möglich (Kenney 1978). Nach Schoon et al. (1997), Lehmann et al. (2008) und Hoffmann et al. (2009a, 2009b) werden graduell variable aktive, inaktive und gemischte Endometrosen, die mit Destruktionen der involvierten Drüsene epithelien einhergehen können, unterschieden. Der Grad der Endometrose nimmt altersassoziiert zu, es besteht jedoch keine Abhängigkeit von der Anzahl der Abfohlungen (Schoon et al. 1997), jahreszeitlichen und zyklischen endokrinen Veränderungen (Hoffmann 2006). Die Ätiopathogenese der Endometrose ist bislang unbekannt, sie wird als progredient verlaufende, irreversible degenerative Erkrankung (Schoon et al. 1995) angesehen. Einzelne Autoren haben Theorien zur Ätiopathogenese der equinen Endometrose aufgestellt, die einerseits eine primäre stromale Fehldifferenzierung mit konsekutiver epithelialer Schädigung für die Entstehung der periglandulären Fibrose verantwortlich machen (Raila 2000). Andererseits wird eine Alteration der endometrialen Epithelzellen mit partieller Basalmembranschädigung als initiales Ereignis in der Pathogenese der Erkrankung angesehen. Die darauffolgende „überschießende“ Wundheilungsreaktion führt zur Manifestation der Endometrose im Uterus (Hoffmann 2006, Hoffmann et al. 2009b). Denkbar wäre eine Aktivierung der Epithelzellen mit fokaler Überexpression von TGF- β 1, was eine verstärkte Migration und Proliferation der Stromazellen sowie deren Umwandlung zu sekretorisch aktiven Myofibroblasten (Hoffmann 2006, Hoffmann et al. 2009b) anregen würde, die nach Raila (2000) eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten der Endometrose einnehmen. Eine Sekretion von gelatinolytischen Enzymen wie MMP-2 und -9 ist verantwortlich für die fortschreitende Schädigung der Basalmembran bei destruierenden Endometrosen (Hoffmann 2006, Hoffmann et al. 2009b). Die verschiedenen Endometroseformen sind als unterschiedliche, voneinander unabhängig ablaufende fibrotische Prozesse zu werten, die potentiell bis zur vollständigen Destruktion der Uterindrüsen führen (Hoffmann 2006). Eine Schlüsselrolle in der Pathogenese dieser Organfibrosen nehmen die Wachstumsfaktoren der TGF-Familie ein (Zhang et al. 1995, Pardo und Selman 2002, Lewindon et al. 2002). Eine Beteiligung von TGF- α und TGF- β 3 im Rahmen der uterinen Wundheilung beim Pferd konnte bereits belegt werden (Stief 2006). Die Ergebnisse dieser Studie sollen einer Klärung der Frage dienen, ob den Wachstumsfaktoren der TGF-Familie und dem Enzym MMP-2,

als potenzieller einflussnehmender Faktor auf die Extrazellulär-matrix (EZM), in der Pathogenese der equinen Endometrose eine mit anderen Organfibrosen vergleichbare Schlüsselrolle zukommt.

Material und Methoden

Tiere

Es standen Endometriumbioptate von 60 Stuten (im Alter von 3 bis über 20 Jahren) mit Endometrose unterschiedlich in Grad und Erscheinungsform sowie Endometriumbioptate von 22 Stuten (im Alter von 3 bis über 20 Jahren) mit mittelgradiger Endometrose und gleichzeitig vorliegender mittelgradiger eitriger ($n=16$) bzw. nichteitriger ($n=6$) Endometritis aus dem Routineeinsendungsmaterial des Institutes für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig zur Verfügung. Für die Interpretation der immunhistologischen Befunde der Endometrose wurden die unveränderten umgebenden endometrialen Strukturen der jeweils gleichen Stuten als Kontrolle genutzt. Eine zusammenfassende Darstellung des verwendeten Tiergutes und der damit beabsichtigten Untersuchungsziele gibt Tab. 2. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Stute saisonal polyöstrisch ist, wurden nur solche Bioptate mit einer aktiven endometrialen Funktionsmorphologie verwendet, die während der Monate April bis September entnommen wurden.

Histologie

Alle Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme in 4%igem, neutralem, gepuffertem Formalin fixiert, in Paraplast eingebettet, 3-4 μ m dicke Schnitte mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich) angefertigt und anhand von Hämalaun-Eosin-gefärbten Präparaten (Romeis und Böck 1989) lichtmikroskopisch untersucht. Die histopathologische Untersuchung der Bioptate basiert auf den Beschreibungen von Kenney und Doig (1986) und Schoon et al. (1992, 1997). Die Beurteilung von Endometrose, Endometritis und Angiosklerose sowie die morphologischen Kriterien der endometrialen Fehldifferenzierung folgte entsprechend den Angaben von Kenney (1978) sowie Schoon et al. (1992, 1997, 2000) und Hoffmann et al. (2009b).

Immunhistologie

Die immunhistologischen Untersuchungen erfolgten mittels der Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode (PAP), wie von Hoffmann et al. (2009b) beschrieben. Für den Nachweis von MMP-2, TGF- α , TGF- β 1 und TGF- β 3 wurden monoklonale Primärantikörper verwendet. Der Wachstumsfaktor TGF- β 2 wurde mittels eines polyklonalen Primärantikörpers nachgewiesen. Die Verdünnungen, Vorbehandlungen und Bezugs-

Tab. 1 Ermittlung des Endometrosegrades nach Kenney (1978) / Determination of the degree of endometrosis according to Kenney (1978)

Fibrosegrad	Anzahl der Bindegewebsschichten	Anzahl der fibrotischen Herde*
geringgradig	1-3	≤ 2
mittelgradig	4-10	2-4
hochgradig	>10	≥ 4

* = bezogen auf ein lineares Feld von 5,5 mm bei vier untersuchten Gesichtsfeldern

Tab. 2 Übersicht über die in der Studie verwendeten Stuten und die verfolgten Untersuchungsziele
Mares investigated in this study and targets of analysis

Charakterisierung des Untersuchungsmaterials	Untersuchungsziel	Anzahl Stuten	Anzahl Biopate
Routineeinsendung an das Institut für Veterinär-Pathologie • Stuten mit Endometrose • mit Vorbericht • März bis September (1995-2005)	Untersuchung der Expression von TGF- α , TGF- β 1, - β 2, - β 3 und MMP-2 in Abhängigkeit von Endometroseform und -grad	n=60	n=60
Routineeinsendung an das Institut für Veterinär-Pathologie • Stuten mit Endometrose und mit: • mgr. eitriger Endometritis oder • mgr. nichteitriger Endometritis	Untersuchung möglicher Einflüsse der Endometritis auf die Expression von TGF- α , TGF- β 1, - β 2, - β 3 und MMP-2 in Abhängigkeit von Endometroseform und -grad	n=16 n=6	n=16 n=6

mgr. = mittelgradig

Tab. 3 Verwendete Primärantikörper, ihre Bezugsquellen, Vorbehandlungen und Verdünnungen
Primary antibodies used in immunohistochemistry, sources, pretreatments and dilutions

Antikörper	Anti-körper-Typ	Vorbehandlung	Verdünnung	Bezugsquelle
Maus anti-MMP-2 (Clone A-Gel VC2)	m AK	ohne Vorbehandlung	1 : 400	MS-806-P1 Neomarkers/Lavision Cop., USA
Maus anti-TGF- α (Clone MF9+TG86)	m AK	96°C mit 10 mmol/l Zitratpuffer (pH 6,0) für 30 min	1 : 100	MS-1000-P0 Dianova GmbH Hamburg
Maus anti-TGF- β 1 (Clone TB21)	m AK	96°C mit 10 mmol/l Zitratpuffer (pH 6,0) für 30 min	1 : 1500	DM 1047 Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen
Kaninchen anti-TGF- β 2	p AK	ohne Vorbehandlung	1 : 50	sc-90 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Maus anti-TGF- β 3 (Clone 236-5.2)	m AK	96°C mit 10 mmol/l Zitratpuffer (pH 6,0) für 30 min	1 : 150	GF 16 Calbiochem/Merck Chemicals, Darmstadt

m AK = monoklonaler Antikörper, p AK = polyklonaler Antikörper

Tab.4 Zuordnung von Färbintensität und SI-Wert / *Assignment of staining intensity and SI value*

Laufindex n	Färbereaktion	Wert
1	keine	0
2	angedeutet	0,5
3	schwach	1
4	mäßig	5
5	stark	10

quellen der verwendeten Primärantikörper werden in Tabelle 3 zusammengefasst aufgeführt. Die Primärantikörper wurden in Vorversuchen (Kiesow et al. 2010) am equinen Endometrium getestet und die optimale Verdünnung austitriert (Tab. 3).

Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen

Die Erfassung der Expression von MMP-2, TGF- α , TGF- β 1, - β 2 und - β 3 erfolgte semiquantitativ anhand eines modifizierten „Immunreaktiven Scores“ (IRS) (Özgen et al. 1997, Ellenberger et al. 2008). Es wurde allerdings zusätzlich die Färbintensität „angedeutet“ (Tab. 4) berücksichtigt. Der „Immunreaktive Score“ ergibt sich aus der nachfolgend aufgeführten Formel und kann einen Wert zwischen 0 und 10 einnehmen.

$$IRS = 1/100 \sum_{n=1}^5 (PP_n \times SI_n)$$

n = Laufindex, PP = Prozentsatz der positiven Zellen, SI = Färbintensität

Für die Schätzung des Anteils der, die immunhistologischen Marker exprimierenden Zellen an der Gesamtzellzahl der jeweiligen Gewebsstruktur innerhalb der Endometrose und den Vergleich mit den endometrialen Strukturen außerhalb der Endometroseherde wurde die in Tab. 5 dargestellte graduelle Einteilung verwendet.

Das histologische Bild eines Endometriumbiopatates unterscheidet sich mehr oder weniger, je nach Schnittebene. Die Anzahl der sichtbaren Drüsenanschnitte verändert sich. Eine geringgradige Variabilität bezüglich des Endometrosegrades und der Endometroseform der betroffenen Drüsenanschnitte ist ebenfalls zu beobachten. Daher wurden innerhalb eines jeden Biopatates je Schnitt für die immunhistologische Untersuchung alle sichtbaren Endometrosenester und -einzeldrüsen nach Endometrosegrad und -form erfasst und hinsichtlich der Expression der untersuchten Marker beurteilt.

Tab. 5: Graduelle Einteilung des Anteils immunhistologischer Marker exprimierender Zellen an der Gesamtzellzahl der jeweiligen Gewebestruktur (PP) in und um die Endometrose

Ratio of immunolabelled cells compared to the total number of cells in respective tissue structure (PP) in and around the endometrosis

(+)	vereinzelt positive Zellen, maximal 5-10% der Gesamtzellzahl
+	einzelne positive Zellen, maximal 20% der Gesamtzellzahl
+(+)	mehrere positive Zellen, maximal 40% der Gesamtzellzahl
++	viele positive Zellen, maximal 60% der Gesamtzellzahl
++(+)	sehr viele positive Zellen, maximal 80% der Gesamtzellzahl
+++	(fast) alle Zellen positiv, 80-100% der Gesamtzellzahl

(+) = angedeutet, + = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig, ++(+)= mittel- bis hochgradig, +++ = hochgradig

Statistische Untersuchungen

Die statistische Untersuchung wurde mit dem Statistikprogramm SPSS 14 (SPSS Software-GmbH München) durchgeführt. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Es wurden für die deskriptive Statistik der Medianwert und das 1. sowie 3. Quartil berechnet. Die Signifikanzprüfungen zwischen den Datengruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Statistisch signifikant sind p-Werte $\leq 0,05$.

Ergebnisse

H.-E.-Färbung

Die Endometrose wird histomorphologisch hinsichtlich der Aktivität der involvierten Stromazellen in verschiedene Erscheinungsbilder (aktive, inaktive und gemischte Formen)

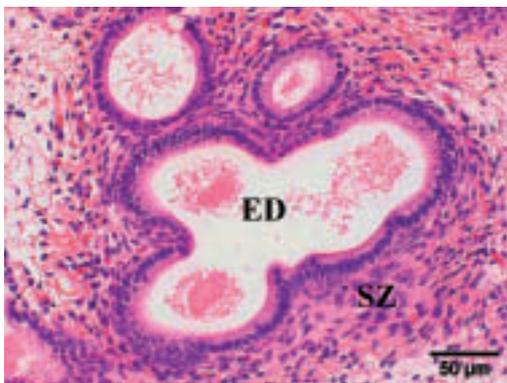


Abb. 1 Aktive nichtdestruierende Endometrose. Einzeldrüse (ED) mit zahlreichen, ungeordnet gelegenen „fibrotischen“ Stromazellen (SZ), diese zeigen eine aktive metabolische Differenzierung mit mittelgroßen bis sehr großen ovalen hypochromatischen Zellkernen und blassem Zytoplasma. (H.-E.-Färbung)

Active nondestructive endometriosis. Single gland (ED) with several disordered fibrotic stroma cells (SZ) showing a metabolically active differentiation with medium to large ovoid hypochromatous nucleus and pale cytoplasm. (H.-E. staining)

eingeteilt. Bei den aktiven Endometrosen weisen die Stromazellen innerhalb der fibrotischen Herde alle bzw. zum überwiegenden Teil ($\geq 75\%$) eine aktive Differenzierung auf und besitzen damit mittelgroße bis sehr große, länglich-ovale bis unregelmäßig rundoval geformte, hypochromatische Zellkerne und ein bauchiges, blasses eosinophiles Zytoplasma (Abb. 1). Innerhalb der inaktiven Endometrose sind alle bzw. der überwiegende Anteil ($\geq 75\%$) der Stromazellen inaktiv diffe-

renziert und besitzen spindelförmige, schmale, hyperchromatische Zellkerne sowie ein langgestrecktes Zytoplasma (Abb. 2), wobei die Achse der Stromazellen parallel zur Achse der benachbarten Drüsenepithelien ausgerichtet ist und so ein „zwiebelschalenartiges“ Erscheinungsbild bedingt.

Die Stromazellen innerhalb der gemischten Endometrose zeigen zu gleichen Teilen 50% eine aktive und 50% eine inaktive Differenzierung (Abb. 3). Es können Einzeldrüsen (Abb. 1 und 2) von der periglandulären Fibrose betroffen sein oder es werden Drüsenester gebildet (Abb. 3).

Neben der Unterscheidung der Stromalen Differenzierung werden auch Alterationen der involvierten Drüsenzellen berücksichtigt. So werden nichtdestruierende (Abb. 1) und destruiende (Abb. 2) Endometrosen unterschieden. Die glandulären Alterationen der betroffenen Drüsenepithelien reichen von einer vakuolären Degeneration bis hin zur vollständigen Destruktion der epithelialen Anteile.

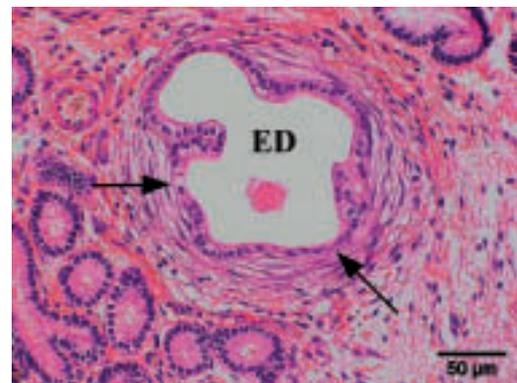


Abb. 2 Inaktive destruiende Endometrose. Einzeldrüse (ED) mit metabolisch inaktiv differenzierten, parallel zur Achse der Drüsenepithelien hin ausgerichteten „fibrotischen“ Stromazellen (SZ) und multifokalen Destruktionserscheinungen einzelner Epithelien (Pfeile). Die inaktiv differenzierten Stromazellen sind charakterisiert durch spindelförmige, hyperchromatische Zellkerne und ein verlängertes Zytoplasma. (H.-E.-Färbung)

Inactive destructive endometriosis. Single gland (ED) with metabolically inactive fibrotic stroma cells (SZ) which lie parallelly arranged to the axis of the adjacent gland and multifocal destruction of single epithelial cells (arrows). The inactive differentiated stroma cells are characterised by spindle shaped, hyperchromatous nuclei and an elongated cytoplasm. (H.-E. staining)

Immunhistologie

Einzeldrüsen und Drüsenester weisen ein weitgehend übereinstimmendes immunhistologisches Reaktionsmuster auf,

Tab. 6 Immunhistologische Befunde innerhalb der verschiedenen Endometroseherde im Vergleich zum unveränderten umgebenden endometrialen Gewebe
Immunohistochemical findings within variable endometrotic foci in comparison to unaltered surrounding endometrial tissue

		Vergleich mit unverändertem, umgebendem Endometrium					
		Nichtdestruierende Endometrose			Destruierende Endometrose		
Endometriale Strukturen	Parameter	aktive	inaktive	gemischte	aktive	inaktive	gemischte
Stromazellen der Fibrose	TGF- α	▼▼▼	▼▼▼*	▼*	▼▼▼*	▼▼▼*	▼▼*
	TGF- β 1	∅	▼▼▼*	∅	∅	▼▼▼*	∅
	TGF- β 2	▼*	▼▼*	▼*	▼*	▼▼*	▼*
	TGF- β 3	∅	▼▼▼*	▼*	▼*	▼▼▼*	▼*
	MMP-2	▲▲▲*	▲▲*	▲▲*	▲▲*	▲▲▲*	▲▲*
Drüsenzellen der Fibrose	TGF- α	∅	∅	∅	▲*	▲*	▲*
	TGF- β 1	∅	∅	∅	∅	▼*	▼*
	TGF- β 2	∅	∅	∅	▲*	▲*	▲*
	TGF- β 3	∅	∅	∅	∅	∅	∅
	MMP-2	∅	∅	∅	▲*	▲*	▲*

∅ = keine Expressionsunterschiede, ▼ = geringgradig vermindert, ▼▼ = mittelgradig vermindert, ▼▼▼ = hochgradig vermindert, ▲ = geringgradig erhöht, ▲▲ = mittelgradig erhöht, ▲▲▲ = hochgradig erhöht, * = statistisch signifikant ($p < 0,05$)

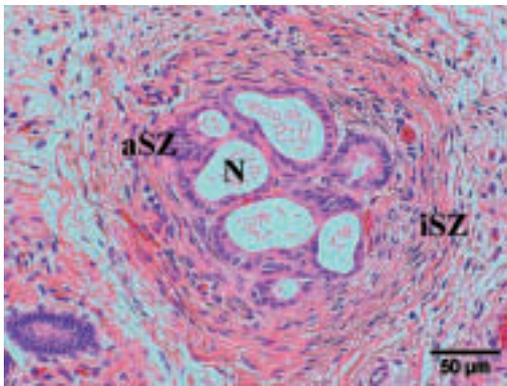


Abb. 3 Gemischte nichtdestruierende Endometrose. Drüsenest mit periglandulären, aktiv (aSZ) und inaktiv (iSZ) differenzierten „fibrotischen“ Stromazellen im Verhältnis 50:50. (H.-E.-Färbung)
Mixed nondestructive endometrosis. Glandular nest (N) with periglandular fibrotic stroma cells showing a metabolically active (aSZ) and inactive (iSZ) differentiation in proportion 50:50. (H.-E. staining)



Abb. 5 Expression von TGF- β 2 innerhalb der Endometrose. Drüsenest (N) mit einer gemischten nichtdestruierenden Endometrose, auffällig die im Vergleich zu den umliegenden unveränderten Stromazellen (uSZ) verminderte Expression von TGF- β 2 in den fibrotischen Stromazellen (SZ). (Immunhistologie, Normarski-Interferenzkontrast)
Expression of TGF- β 2 within the endometrosis. Glandular nest (N) with mixed nondestructive endometrosis, compared to the surrounding non affected stroma cells (uSZ) the fibrotic stroma cells (SZ) show a clearly decreased expression of TGF- β 2. (Immunohistochemistry, Nomarski-interference-contrast)

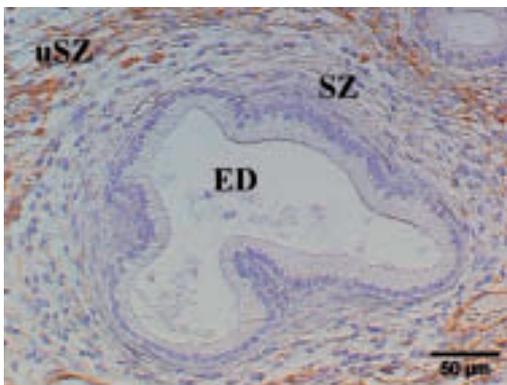


Abb. 4 Expression von TGF- α innerhalb der Endometrose. Einzeldrüse (ED) mit einer gemischten nichtdestruierenden Endometrose. Auffällig ist die im Vergleich zu den umliegenden unveränderten Stromazellen (uSZ) verminderte Expression von TGF- α in den fibrotischen Stromazellen (SZ). (Immunhistologie, Nomarski-Interferenzkontrast)
Expression of TGF- α within the endometrosis. Single gland (ED) with mixed nondestructive endometrosis. Notable is the reduced expression of TGF- α in fibrotic stroma cells (SZ) in compared to the surrounding non affected stroma cells (uSZ). (Immunohistochemistry, Nomarski-interference-contrast)

Expressionsunterschiede bezüglich des Grades ergaben sich nicht. Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen werden in Tabelle 6 zusammenfassend dargestellt.

Stromazellen in der Endometrose

In allen Endometroseherden wird in den fibrotischen Stromazellen, unabhängig von ihrer Differenzierung (aktiv, inaktiv, gemischt) und dem Vorkommen glandulärer Destruktionerscheinungen, im Vergleich zum unveränderten Stroma eine statistisch signifikant ($p < 0,05$) verminderte Expression von TGF- α (Abb. 4) und TGF- β 2 (Abb. 5) beobachtet. MMP-2 (Abb. 6) ist dagegen in den fibrotischen Stromazellen aller Endometroseformen statistisch signifikant ($p < 0,05$) vermehrt nachweisbar. Im Vergleich zum umliegenden

unveränderten Stroma wird nur in den inaktiven destruierenden und nichtdestruierenden Fibroseherden eine statistisch signifikant ($p < 0,05$) verminderte stromale Expression von TGF- β 1 (Abb. 7) beobachtet. Die Stromazellen innerhalb aktiver destruierender, inaktiver (destruierender und nichtdestruierender) und gemischter (destruierender und nichtdestruierender) Endometroseherde weisen eine statistisch signifikant ($p < 0,05$) verminderte Expression von TGF- β 3 (Abb. 8) auf.

Drüsenepithelien in der Endometrose

Die glandulären Epithelien innerhalb der nichtdestruierenden Endometroseformen (aktive, inaktive und gemischte) zei-



Abb. 6 Expression von MMP-2 innerhalb der Endometrose. Drüsennest (N) mit einer inaktiven nichtdestruierenden Endometrose, im Vergleich zu den umliegenden unveränderten Stromazellen (uSZ) zeigen die „fibrotischen“ Stromazellen (SZ) eine deutlich stärkere Expression von MMP-2. (Immunhistologie, Normarski-Interferenzkontrast)

Expression of MMP-2 within the endometrosis. Glandular nest (N) with inactive nondestructive endometrosis, compared to the surrounding non affected stroma cells (uSZ) the fibrotic stroma cells (SZ) show a clearly increased expression of MMP-2. (Immunohistochemistry, Nomarski-interference-contrast)

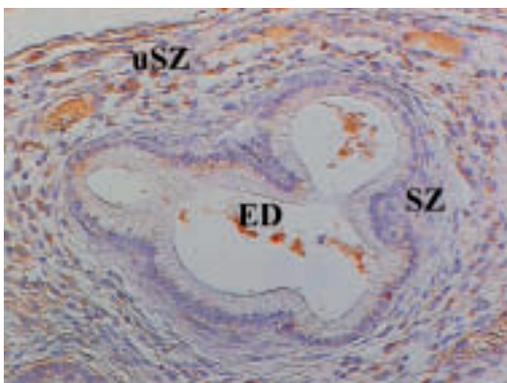


Abb. 7 Expression von TGF- β 1 innerhalb der Endometrose. Einzeldrüse (ED) mit einer inaktiven nichtdestruierenden Endometrose, die fibrotischen Stromazellen (SZ) zeigen eine verminderte Expression von TGF- β 1 im Gegensatz zu den umliegenden unveränderten Stromazellen (uSZ). (Immunhistologie, Normarski-Interferenzkontrast)

Expression of TGF- β 1 within the endometrosis. Single gland (ED) with inactive nondestructive endometrosis, the fibrotic stroma cells (SZ) show a reduced expression of TGF- β 1 in contrast to the the surrounding non affected stroma cells. (Immunohistochemistry, Nomarski-interference-contrast)

gen eine den unveränderten Drüsenzellen entsprechende Expression von TGF- β 1, - β 2 und - β 3. Die involvierten Uterindrüsen in den destruierenden Endometroseformen (aktive, inaktive und gemischte) sind durch eine statistisch signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Expression von TGF- β 2 (Abb. 9) gekennzeichnet. Sie exprimieren TGF- α und MMP-2 (Abb. 10), was sonst lediglich im angrenzenden unveränderten Endometrium seitens der Stromazellen erfolgt. Ein statistisch signifikant verminderter ($p < 0,05$) immunhistologischer Nachweis von TGF- β 1 in den glandulären Epithelien ist nur in den inaktiven destruierenden und gemischten destruierenden Fibroseherden nachzuweisen. Die Uterindrüsen in allen destruierenden Endometroseformen sind durch eine, den unveränderten Drüsenzellen entsprechende, Expression von TGF- β 3 charakterisiert.

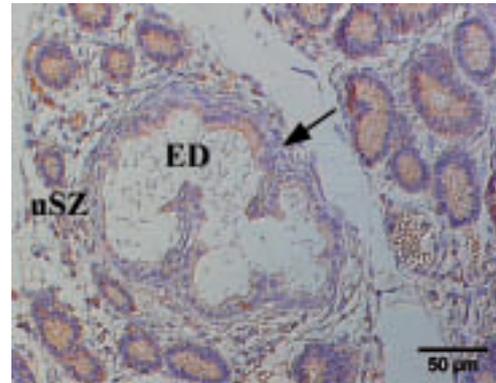


Abb. 8 Expression von TGF- β 3 innerhalb der Endometrose. Einzeldrüse (ED) mit inaktiver destruierender Endometrose. Die „fibrotischen“ Stromazellen (Pfeil) zeigen eine verminderte intrazytoplasmatische Expression von TGF- β 3 im Gegensatz zu den umliegenden unveränderten Stromazellen (uSZ). (Immunhistologie, Normarski-Interferenzkontrast)

Expression of TGF- β 3 within the endometrosis. Single gland (ED) with inactive destructive endometrosis, notable is the reduced expression of TGF- β 3 in fibrotic stroma cells (arrow) compared to the surrounding non affected stroma cells (uSZ). (Immunohistochemistry, Nomarski-interference-contrast)

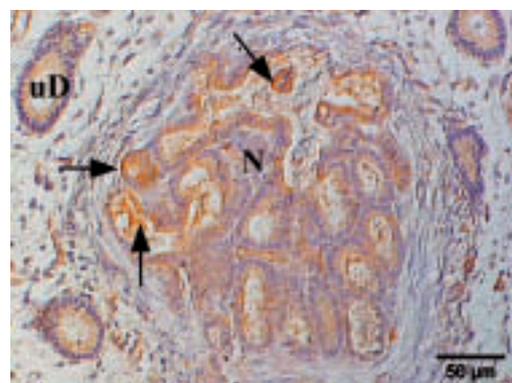


Abb. 9 Glanduläre Expression von TGF- β 2 innerhalb der destruierenden Endometrose. Drüsennest (N) mit gemischter destruierender Endometrose, die destruierten Drüsenepithelzellen zeigen im Vergleich zu unveränderten Drüsenzellen (uD) eine deutlich stärkere Expression von TGF- β 2 (Pfeile). (Immunhistologie, Normarski-Interferenzkontrast)

Glandular expression of TGF- β 2 within the destructive endometrosis. Glandular nest (N) with mixed destructive endometrosis, compared to the unaltered glandular cells (uD) the destroyed glandular epithelial cells show a clearly increased expression of TGF- β 2 (arrows). (Immunohistochemistry, Nomarski-interference-contrast)

Tab. 7 Expression von TGF-β2 und -β3 innerhalb der Stromazellen der Endometroseherde mit Endometritis (eitrig und nichteitrig) im Vergleich zum unveränderten, umgebenden endometrialen Gewebe
Expression of TGF-β2 and -β3 of stroma cells within endometrotic foci in endometria with endometritis (suppurative and nonsuppurative) in comparison to unaltered surrounding endometrial tissue

Endometrose		TGF-β2		Endometritis		TGF-β3	
		nichteitrige	eitrige	nichteitrige	eitrige		
nichtdestruierende	aktive	∅	∅	∅	∅		
	inaktive	∅	▼*	▼▼▼*	▼▼▼*		
	gemischte	∅	∅	▼▼*	∅		
Destruierende	aktive	∅	∅	∅	∅		
	inaktive	∅	▼*	▼▼▼*	▼▼▼*		
	gemischte	∅	▼*	▼▼*	∅		

∅ = keine Expressionsunterschiede, ▼ = geringgradig vermindert, ▼▼ = mittelgradig vermindert, ▼▼▼ = hochgradig vermindert, * = statistisch signifikant (p<0,05)

Stromazellen in der Endometrose bei gleichzeitigem Vorliegen einer Endometritis

Das gleichzeitige Auftreten einer Endometritis (nichteitrige bzw. eitrig) beeinflusst das Expressionsverhalten der fibrotischen Stromazellen, hinsichtlich der Expression von TGF-α, TGF-β1 und MMP-2, nicht. Einzelne Endometroseformen zeigen bei gleichzeitigem Auftreten einer Endometritis (nichteitrige bzw. eitrig) ein abweichendes stromales Expressionsmuster von TGF-β2 und TGF-β3, welches in Tabelle 7 zusammenfassend dargestellt wird.

Drüsenepithelien in der Endometrose bei gleichzeitigem Vorliegen einer Endometritis

Das glanduläre Expressionsmuster des Wachstumsfaktors TGF-β3 innerhalb der verschiedenen Endometroseherde wird durch das gleichzeitige Auftreten entzündlicher Alterationen nicht beeinflusst. Die Drüsenzellen innerhalb destrukturierender Endometroseherde in Endometrien mit eitrig oder nichteitrig Endometritis zeigen eine dem unveränderten, umgebenden Endometrium gleichende Expression von TGF-β1 und -β2.

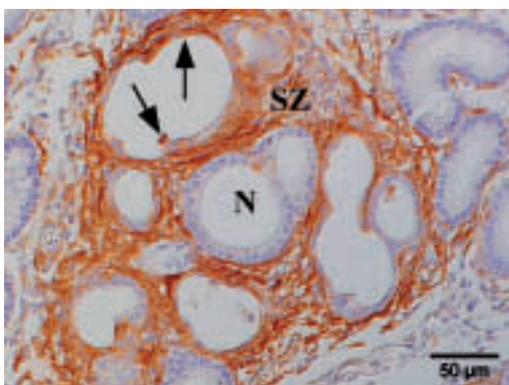


Abb. 10 Glanduläre Expression von MMP-2 innerhalb der destrukturierenden Endometrose. Drüsenest (N) mit gemischter destrukturierender Endometrose und multifokaler kräftiger basaler Expression von MMP-2 in den geschädigten Drüsenepithelzellen (Pfeile) und den fibrotischen Stromazellen (SZ). (Immunhistologie, Normarski-Interferenzkontrast)
Glandular expression of MMP-2 within the destructive endometrosis. Glandular nest (N) with mixed destructive endometrosis and multifocal strong basal located expression of MMP-2 in the destroyed glandular epithelial cells (arrows) and the fibrotic stroma cells (SZ). (Immunohistochemistry, Nomarski-interference-contrast)

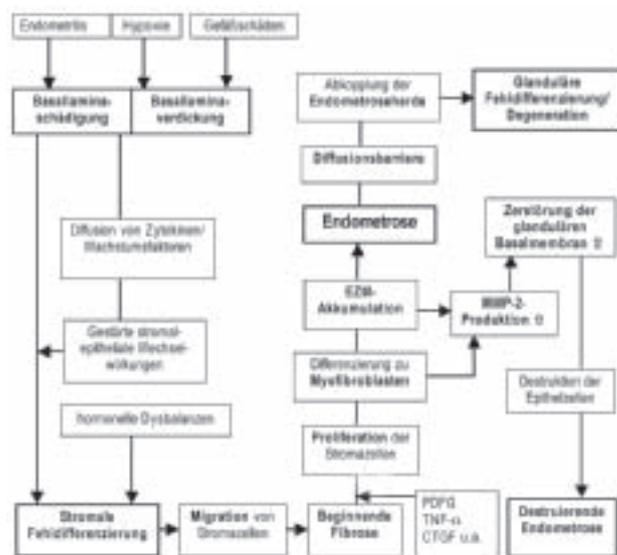


Abb. 11 Schematische Darstellung der möglichen Pathogenese der equinen Endometrose
Schematic display of the possible pathogenesis of equine endometrosis

Diskussion

Die equine Endometrose stellt eine der Hauptursachen equiner Fertilitätsstörungen dar (Kenney und Doig 1986). Nach Schoon et al. (1997), Lehmann et al. (2008) und Hoffmann et al. (2009a, 2009b) werden graduell variable aktive, inaktive und gemischte Endometrosen, die mit Destruktionen der involvierten Drüsenepithelien einhergehen können, unterschieden. Der Grad der Endometrose nimmt altersassoziiert zu, es besteht jedoch keine Abhängigkeit von der Anzahl der Abfohlungen (Schoon et al. 1997), jahreszeitlichen und zyklischen endokrinen Veränderungen (Hoffmann 2006). Die Endometrose gilt als progredient verlaufende, irreversible degenerative Erkrankung (Schoon et al. 1995), hochgradige sowie mittelgradige destrukturierende Endometroseformen sind mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert (Lehmann et al. 2008). Die Ätiopathogenese der Endometrose ist bislang unbekannt. Da im Rahmen der Pathogeneseforschungen anderer Organfibrosen, z.B. Leber- und Lungenfibrose, v.a. den profibrotischen Wachstumsfaktoren der TGF-Familie (Zhang et al. 1995, Pardo und Selman 2002, Lewindon et al. 2002) und dem Enzym MMP-2 (Zhanh et al. 1995, Pardo und Selman 2002, Lewindon et al. 2002) eine Schlüsselrolle zugesprochen wird, sollte die vorlie-

gende Studie die Frage klären, ob und inwieweit den TGFs und dem Enzym MMP-2 in der Ätiopathogenese der equinen Endometrose eine ähnliche Bedeutung zukommt.

Das Vorkommen der Wachstumsfaktoren TGF- α , - β 1, - β 2 und - β 3 sowie des Enzyms MMP-2 im zyklischen equinen unveränderten Endometrium wurde bereits von *Kiesow et al.* (2010) beschrieben, detaillierte Untersuchungen zur immunhistologischen Expression der TGF-Wachstumsfaktoren im Rahmen der equinen Endometrose existierten bislang jedoch nicht.

Die Stromazellen innerhalb der verschiedenen Endometroseherde zeigen im Vergleich zum unveränderten Endometrium eine zum Teil deutlich verminderte Expression von TGF- α , TGF- β 2, TGF- β 3 (exkl. der aktiven nichtdestruierenden Endometrosen) und TGF- β 1 (nur inaktiven Endometrosen). Dies ist möglicherweise auf eine gestörte/verminderte hormonelle Stimulation der Stromazellen durch eine veränderte Hormonrezeptorexpression zurückzuführen, wie sie von *Hoffmann* (2006) nachgewiesen wurde. Die Abkopplung der endometriotischen Herde von den peripher zirkulierenden Steroidhormonen könnte somit die Expression der TGF- β -Isoformen direkt oder indirekt beeinflussen. Insbesondere die inaktiv differenzierten Stromazellen zeichnen sich durch eine stark verminderte TGF- β -Expression aus. Ursächlich ist möglicherweise eine geringere metabolische Aktivität der inaktiven Stromazellen vom Typ II (*Raila* 2000) und Myofibroblasten (*Hoffmann* 2006) innerhalb der inaktiven Fibrosenester zu diskutieren. Untersuchungen belegen, dass die Stromazellen innerhalb inaktiver Endometroseherde eine, im Vergleich zum unveränderten Gewebe, geringere Proliferationsaktivität aufweisen (*Hoffmann* 2006). Neben der verminderten Proliferation wäre auch eine Einschränkung der stromalen Syntheseleistung in Folge veränderter epithelial/stromaler Wechselwirkungen vorstellbar. Das Enzym MMP-2 wird dagegen in den Stromazellen aller Endometroseherde, unabhängig von deren Differenzierung und dem Auftreten glandulärer Alterationen, deutlich vermehrt nachgewiesen, dies ist sehr wahrscheinlich Folge der EZM-Akkumulation innerhalb der Endometroseherde (*Walter et al.* 2005) und für die fortschreitende Zerstörung der glandulären Basallamina verantwortlich. Eine direkte Anregung der MMP-2-Produktion durch die Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie (*Overall et al.* 1989) ist in den endometrialen Stromazellen anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht wahrscheinlich. Allein eine erhöhte MMP-2-Expression kann jedoch nicht für die zunehmende Destruktion der Drüsenzellen innerhalb der Endometroseherde verantwortlich gemacht werden, da stromale Expressionsunterschiede zwischen destruierenden und nichtdestruierenden Endometroseherden, sowie gradabhängige Unterschiede nicht feststellbar sind. Aktivitätsunterschiede des Enzyms in den unterschiedlich differenzierten Endometroseherden sind wahrscheinlich. Eine Unterscheidung zwischen der aktiven und inaktiven Form des Enzyms mittels des verwendeten Antikörpers ist jedoch nicht möglich, weitere Untersuchungen sind diesbezüglich notwendig. Von *Walter et al.* (2005) wurde mittels Gelatin-Zymographie in Endometrien mit Endometrose eine erhöhte Aktivität von MMP-2 festgestellt.

Die glanduläre Expression der Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie innerhalb der Endometroseherde gleicht weitgehend der der unveränderten umgebenden Drüsenzellen. Lediglich in destruierenden Endometrosen werden TGF- β 2 und sogar die, im unveränderten Endometrium nur von den Stromazellen

exprimierten, Marker TGF- α und MMP-2 in den involvierten Drüsenzellen vermehrt nachgewiesen. Mögliche Ursachen wären eine Diffusion durch die geschädigte glanduläre Basallamina bzw. eine Anregung der Synthese im Rahmen der epithelialen Wundheilung (*Stief* 2006). Die verminderte glanduläre Expression von TGF- β 1 in inaktiven und gemischten destruierenden Endometroseherden ist möglicherweise auf Synthesestörungen durch veränderte epithelial/stromale Wechselwirkungen in Folge von Destruktionsvorgängen im Bereich der glandulären Basallamina zurückzuführen. Eine intakte Basallamina, die als Mediator der vom Stroma ausgehenden Signale fungiert, ist Grundvoraussetzung für eine intakte parakrine Beziehung zwischen Stroma und Epithel (*Lin und Bissell* 1993, *Arnold et al.* 2001). Die geschädigte glanduläre Basallamina innerhalb der Endometroseherde ist wahrscheinlich nicht mehr in der Lage, die komplexen parakrinen Beziehungen zwischen Drüsen- und Stromazellen zu steuern (*Hoffmann* 2006). Zudem werden stromal/epitheliale Kontakte (*Raila* 2000) sowie direkte Kontakte der Epithelzellen mit der veränderten Extrazellulärmatrix ermöglicht und somit die glanduläre Fehldifferenzierung gefördert (*Hoffmann* 2006).

In Endometrien mit entzündlichen Alterationen weist lediglich das stromale und glanduläre Expressionsmuster von TGF- β 2 und - β 3 innerhalb einzelner Endometroseformen Expressionsunterschiede im Vergleich zu Endometrien ohne Endometritis auf, die jedoch keine eindeutige Interpretation zulassen. Eine deutliche Anregung der glandulären und stromalen Expression der TGF-Wachstumsfaktoren und des Enzyms MMP-2 im Rahmen der Endometrose durch die Anwesenheit von Entzündungszellen ist nicht zu belegen. In Übereinstimmung mit *Hoffmann* (2006) müssen am fortschreitenden Prozess der Endometrose daher weitere, bisher unbekannte, entzündungsunabhängige Faktoren beteiligt sein.

Die Pathogenese der Endometrose kann nicht mit der anderer Organfibrosen gleichgesetzt werden. Das überwiegend verminderte stromale Expressionsmuster der Wachstumsfaktoren stützt dagegen die Theorie einer primären stromalen Fehldifferenzierung (*Raila* 2000) als Ausgangspunkt der Endometrose. Aus den in dieser Studie dargestellten Ergebnissen können hinsichtlich der Pathogenese der Endometrose die nachfolgenden Hypothesen abgeleitet werden, die in Abb. 11 schematisch dargestellt sind.

Denkbar wäre, dass eine Schädigung der Basallamina, die möglicherweise mit einer partiellen Verdickung einhergeht, das initiale Ereignis in der Entstehung eines fibrotischen Herdes im Rahmen der Endometrose darstellt. So vermuten bereits *Penney und Rosenkrans* (1984), dass eine geschädigte Basallamina reparative Prozesse stimuliert, die zunächst in einer nur elektronenmikroskopisch erkennbaren Verdickung resultieren. Auch *Raila* (2000) beobachtet in frühen Endometrostadien eine partielle Basallaminaverdickung.

Faktoren, die eine solche Alteration begünstigen könnten, sind vielfältig. So wären eine periglandulär lokalisierte Endometritis oder eine Perivaskulitis/Vaskulitis mit ausgeprägtem Endothelzellschaden ebenso denkbar wie beispielsweise fokale Hypoxien durch mittel- bis hochgradige Angiosklerosen. Durch die geschädigten Basalmembranstrukturen ist eine Diffusion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren möglich. Zudem kann es zu direkten Kontakten zwischen Epithel- und Stromazellen

kommen, die gestörte epithelial-stromale Wechselwirkungen zur Folge haben. Diese Interaktionen und auftretende hormonelle Dysbalancen können eine stromalen Fehldifferenzierung fördern. Diese Mechanismen resultieren dann in der „beginnenden Fibrose“, die neben einer dezenten Basallaminaalteration durch die fokale periglanduläre Akkumulation von Stromazellen (durch die Migration zum Ort der Schädigung) und deren Kollagensynthese charakterisiert ist (Raila 2000). Stromal synthetisierte profibrotische Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie beispielsweise PDGF, TNF- α , CTGF u.a., die bei verschiedenen Gewebsfibrosen nachgewiesen wurden (Antonias et al. 1990, Kapanci et al. 1995, Leask et al. 2002, Novosyadlyy et al. 2006), können zusammen die Stromazellproliferation, deren Umdifferenzierung zu Myofibroblasten sowie eine gesteigerte EZM-Synthese induzieren. Ein solches Milieu teils synergistisch wirkender Wachstumsfaktoren und Zytokine führt möglicherweise zu der Entstehung der für die Endometrose typischen fibrotischen Herde.

Durch die periglanduläre Zubildung von Bindegewebe entsteht eine Diffusionsbarriere mit Abkopplung der Drüsenzellen innerhalb der Endometroseherde von den peripher zirkulierenden Hormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Folge ist eine glanduläre Fehldifferenzierung bzw. Degeneration der Drüsenzellen durch eine hypoxische Schädigung und zellulären Minderernährung (Raila 2000). Die Fähigkeit der Myofibroblasten zur Freisetzung der die Basallamina degradierenden MMP-2 (Selman et al. 2000, Ramos et al. 2001) und die vermehrte EZM-Akkumulation innerhalb der Endometroseherde führt wahrscheinlich zu der in dieser Arbeit beobachteten vermehrten MMP-2-Expression. Die gelatinolytische Wirkung dieses Enzyms ist für die fortschreitende Zerstörung der glandulären Basallamina und durch die Destruktion der Drüsenzellen für die Manifestation der destruierenden Endometrose verantwortlich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine mit der Leber- und Lungenfibrose vergleichbare Schlüsselrolle der TGF-Wachstumsfaktoren in der Pathogenese der equinen Endometrose anhand der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit nicht eindeutig belegt werden kann. Eine generell erhöhte epitheliale und/oder stromale TGF-Wachstumsfaktor-Expression im Sinne einer „überschießenden“ Wundheilungsreaktion wurde in der equinen Endometrose nicht nachgewiesen. Lediglich TGF- α und TGF- β 2 waren in den involvierten Drüsenzellen destruierender Endometrosen vermehrt nachweisbar. Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich mehr um eine Anregung der epithelialen Expression als reaktiven Prozess im Rahmen der epithelialen Reparatur und weniger um eine primäre Aufregulierung der Synthese dieser Faktoren. Inwieweit anderen profibrotischen Wachstumsfaktoren, wie z. B. PDGF (Pinzani et al. 1996, Hoyle et al. 1999), EGF (Kömüves et al. 2000), CTGF (Pan et al. 2001, Leask et al. 2002), β FGF (Thornton et al. 1992, Fibbi et al. 1999) und IGF-1 (Saile et al. 2004, Novosyadlyy et al. 2006), die in anderen Organfibrosen nachgewiesen wurden, in der Pathogenese der equinen Endometrose eine möglicherweise größere Bedeutung zukommt, muss in nachfolgenden Studien geklärt werden.

Danksagungen

Vielen Dank an Frau Herzog, Frau Schleinitz und Frau Pleitz für die Anfertigung sehr guter histologischer Schnitte sowie Frau

Wipplinger für die sorgfältige Arbeit bei der Durchführung der Immunhistologie. Besonderer Dank gilt Herrn Richter (Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik der Universität Leipzig) für die Durchführung der statistischen Analysen.

Literatur

- Antoniades H. N., Bravo M. A., Avila R. E., Galanopoulos T., Neville-Golden J., Maxwell M. und Selman M. (1990) Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 86, 1055-1064
- Arnold J. T., Kaufman D. G., Seppala M. und Lessey B. A. (2001) Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum. Reprod.* 16, 836-845
- Ellenberger C., Wilsher S., Allen W. R., Hoffmann C., Kolling M., Bazer F. W., Klug J., Schoon D. und Schoon H. A. (2008) Immunolocalisation of the uterine secretory proteins uterocalin, uteroferrin and uteroglobin in the mare's uterus and placenta throughout pregnancy. *Theriogenology* 70, 746-757
- Fibbi G., Pucci M., Grappone C., Pellegrini G., Salzano R., Casini A., Milani S. und Del Rosso M. (1999) Functions of the fibrinolytic system in human Ito cells and its control by basic fibroblast and platelet-derived growth factor. *Hepatology* 29, 868-878
- Hoffmann C. (2006) Morphologisch-funktionelle Untersuchungen zur Pathogenese der equinen Endometrose unter besonderer Berücksichtigung endometrialer Proteine und Kohlenhydrate. Dissertation med. vet. Leipzig
- Hoffmann C., Bazer F. W., Klug J., Aupperle H., Ellenberger C. und Schoon H. A. (2009a) Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium Expression patterns for mares suffering from endometrosis. *Theriogenology* 71, 264-274
- Hoffmann C., Ellenberger C., Mattos R. C., Aupperle H., Rhein S., Stief B. und Schoon H. A. (2009b) The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Anim. Reprod. Sci.* 111, 261-278
- Hoyle G. W., Li J., Finkelstein J. B., Eisenberg T., Liu J. Y., Lasky J. A., Athas G., Morris G. F. und Brody A. R. (1999) Emphysematous lesions, inflammation, and fibrosis in the lungs of transgenic mice overexpressing platelet-derived growth factor. *Am. J. Pathol.* 154, 1763-1775
- Kapanci Y., Desmouliere A., Pache J. C., Redard M. und Gabbiani G. (1995) Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis. Possible role of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152, 2163-2169
- Kenney R. M. (1978) Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal Of The American Veterinary Medical Association* 172, 241-262
- Kenney R. M. und Doig P. A. (1986) Equine Endometrial Biopsy. 2nd, 723-729
- Kiesow C., Ellenberger C., Sieme H. und Schoon H. A. (2010) Immunhistologische Untersuchungen zur Expression der Wachstumsfaktoren Transforming growth factor- α , - β 1, - β 2 und - β 3 sowie der Matrixmetalloproteinase-2 im zyklischen Endometrium des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 26, 130-140
- Kömüves L. G., Feren A., Jones A. L. und Fodor E. (2000) Expression of epidermal growth factor and its receptor in cirrhotic liver disease. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 821-830
- Leask A., Holmes A. und Abraham D. J. (2002) Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 4, 136-142
- Lehmann J., Ellenberger C., Hoffmann C., Bazer F. W., Klug J., Allen W. R., Sieme H. und Schoon H. A. (2008) The equine endometrosis - new approaches for a more precise fertility prognosis? *Pferdeheilkunde* 24, 115-116
- Lewindon P. J., Pereira T. N., Hoskins A. C., Bridle K. R., Williamson R. M., Shepherd R. W. und Ramm G. A. (2002) The role of hepatic stellate cells and transforming growth factor- β (1) in cystic fibrosis liver disease. *Am. J. Pathol.* 160, 1705-1715
- Lin C. Q. und Bissell M. J. (1993) Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* 7, 737-743
- Novosyadlyy R., Dudas J., Pannem R., Ramadori G. und Scharf J. G. (2006) Crosstalk between PDGF and IGF-I receptors in rat liver myofibroblasts: implication for liver fibrogenesis. *Lab Invest.* 86, 710-723
- Overall C. M., Wrana J. L. und Sodek J. (1989) Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 264, 1860-1869
- Özgen S., Rasch K., Kropp G., Schoon H. A., Aupperle H. und Sieme H. (1997) Aetiopathogenesis and therapy of equine hydrometra: preliminary data. *Pferdeheilkunde* 13, 533-534
- Pan L. H., Yamauchi K., Uzuki M., Nakanishi T., Takigawa M., Inoue H. und Sawai T. (2001) Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *Eur. Respir. J.* 17, 1220-1227
- Pardo A. und Selman M. (2002) Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1534-1538
- Penney D. P. und Rosenkrans W. A. Jr. (1984) Cell-cell matrix interactions in induced lung injury. I. The effects of X-irradiation on basal laminar proteoglycans. *Radiat. Res.* 99, 410-419
- Pinzani M., Milani S., Herbst H., DeFranco R., Grappone C., Gentilini A., Caligiuri A., Pellegrini G., Ngo D. V., Romanelli R. G. und Gentilini P. (1996) Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* 148, 785-800
- Raila G. (2000) Zur Pathogenese der Endometrose der Stute - Morphologisch-funktionelle Untersuchungen. Diss. Med. Vet. Leipzig
- Ramos C., Montano M., Garcia-Alvarez J., Ruiz V., Uhal B. D., Selman M. und Pardo A. (2001) Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24, 591-598
- Romeis B. und Böck P. (1989) Mikroskopische Technik. Urban und Schwarzenberg Verlag, München 17th.
- Saile B., DiRocco P., Dudas J., El-Armaouche H., Sebb H., Eisenbach C., Neubauer K. und Ramadori G. (2004) IGF-I induces DNA synthesis and apoptosis in rat liver hepatic stellate cells (HSC) but DNA synthesis and proliferation in rat liver myofibroblasts (rMF). *Lab Invest.* 84, 1037-1049
- Schoon H. A., Schoon D. und Klug E. (1992) Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. *Pferdeheilkunde* 8, 355-362
- Schoon H. A., Schoon D. und Klug E. (1997) Die Endometriumbiopsie bei der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. *Pferdeheilkunde* 13, 453-464
- Schoon H. A., Schoon D., Kötter B., Runge A. und Klug E. (1995) Zu Pathogenese und Prognose der Endometrose der Stute. In: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft. Bericht des 21. Kongress der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V., Bad Nauheim, 273-282
- Schoon H. A., Wiegandt I., Schoon D., Aupperle H. und Bartmann C. P. (2000) Functional disturbances in the endometrium of barren mares; a histological and immunohistological study. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 56, 381-391
- Selman M., Ruiz V., Cabrera S., Segura L., Ramirez R., Barrios R. und Pardo A. (2000) TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279, L562-L574
- Stief B. (2006) Heilungsvorgänge am Uterus der Stute nach minimalinvasiven chirurgischen Eingriffen. Diss. Med. Vet. Leipzig
- Thornton S. C., Robbins J. M., Penny R. und Breit S. N. (1992) Fibroblast growth factors in connective tissue disease associated interstitial lung disease. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 447-452
- Walter I., Handler J., Miller I. und Aurich C. (2005) Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue transglutaminase (TG 2) are expressed in periglandular fibrosis in horse mares with endometrosis. *Histol. Histopathol.* 20, 1105-1113
- Zhang K., Flanders K. C. und Phan S. H. (1995) Cellular localization of transforming growth factor- β expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 147, 352-361

Dr. Claudia Kiesow
Landesamt für Verbraucherschutz
Haferbreiter Weg 132-135, 39576 Stendal
claudia.kiesow@lav.ms.sachsen-anhalt.de