

# On the pathogenesis of endometriosis

## Citation for published version (APA):

van der Linden, P. J. Q. (1995). *On the pathogenesis of endometriosis*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/1995

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

---

## Summary

In the first chapter the literature is reviewed with regard to the pathogenesis of endometriosis. The implantation or transplantation theory, that suggests implantation and subsequent growth of retrogradely shed viable endometrial cells, still remains the most widely accepted theory to explain the pathogenesis of endometriosis. The second part gives an overview of the literature on cell adhesion molecules, in particular cadherins and integrins, the most important cell adhesion molecules involved in cell-cell adhesion and in cell-extracellular matrix interactions respectively. Special interest is given to the possible functional role of these cell adhesion molecules in the human endometrium.

The aim of the thesis is outlined in chapter 2. The first goal was to better characterize retrograde menstruation. The second goal was to assess which sub-classes of cadherins and integrins are expressed in endometrial cells and other cells potentially involved in the pathogenesis of endometriosis. The third goal was to study functional cell adhesion *in vitro*.

In chapter 3 the immunohistochemical properties of epithelial cells in peritoneal fluid were examined and the staining characteristics were compared with cells of endometrium, menstrual effluent, peritoneum, and endometriotic lesions. All but one sample of menstrual effluent and peritoneal fluid cells stained positively with antibodies against vimentin, cytokeratin 18 and 19. The monoclonal antibody BW495/36, that stains endometrial epithelium, but is absent in mesothelium, stained 14 of 16 menstrual effluent samples and 9 of 16 peritoneal fluid cell samples. Endometriotic specimens stained with all markers. No major differences in staining properties were observed in menstrual effluent, endometrium and peritoneal fluid cells between patients with or without endometriosis. These results support the contention of transport of menstrual detritus to the peritoneal cavity in women with patent fallopian tubes.

In chapter 4 the expression of  $\beta 1$  integrins, including  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha 6\beta 1$ , and E-cadherin in cells from peritoneal fluid, endometrium, menstrual effluent, peritoneum and endometriotic lesions during the early follicular phase of the menstrual cycle was studied, using immunohistochemistry. All integrins tested could be detected in the endometrium samples and in endometriotic lesions. From the expression of these cell adhesion molecules, it was concluded that these cell adhesion molecules could be involved in the shedding of endometrial tissue during menstruation and the attachment of endometrial tissue fragments to the peritoneum.

In chapter 5 the expression of P-cadherin in human endometrium and endometriosis was studied and compared with the expression of E-cadherin, using immunohistochemistry. P-cadherin was detected in epithelial cells in all endometrial samples and in all glandular structures of endometriotic lesions. The staining characteristics for P-cadherin and E-cadherin were similar. It was suggested that P-cadherin is functionally involved in the maintenance of the proliferative compartment of endometrium and could have a comparable function in endometriotic lesions.

In chapter 6 cadherin and integrin expression was studied in biopsies of endometrium during well defined phases of the menstrual cycle, using immunohistochemistry in frozen sections. Simultaneously, blood samples were collected for estradiol and progesterone assay. The expression of cell adhesion molecules, including E- and P-cadherin and the integrins  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha 6\beta 1$ , and the expression of estrogen receptor and progesterone receptor was determined. E- and P-cadherin expression was detected in all samples and did not vary throughout the menstrual cycle. If their expression is functionally involved in the cyclic menstrual shedding, the loss of expression is limited to a short period of time. Of the  $\beta 1$  integrins, only  $\alpha 2\beta 1$  expression was modulated during the menstrual cycle and found to be absent in the midluteal phase. No relation was found between the expression of cell adhesion molecules and the expression of estrogen receptor and progesterone receptor. Since the cadherins and  $\beta 1$  integrins could be detected in late luteal phase endometrium it was suggested that these cell adhesion molecules could be involved in the attachment of endometrial fragments to the peritoneal lining as a result of retrograde menstruation.

In chapter 7 an *in vitro* model was developed to study the interaction between endometrial cells and extracellular matrix (ECM) and the expression of cell adhesion molecules in endometrial cells and tissue fragments under *in vitro* conditions was evaluated. Endometrial biopsies were collected and were either digested using collagenase type I, or dissected mechanically. Adhesion of isolated cells and tissue fragments to stripped amniotic membranes and to coverslips coated with ECM components was studied. Also the steroid responsive endometrial carcinoma cell lines RL95-2 and AN3CA were used. The expression of  $\beta 1$  integrins and cadherins was assessed using immunohistochemistry. Collagenase digestion of endometrial biopsies yielded viable single cells. These cells did not adhere to either side of stripped amniotic membranes, and did not show expression of the cell adhesion molecules. In contrast, mechanically fragmented endometrium samples adhered to both sides of stripped amniotic membranes and showed immunohistochemical expression of E- and P-cadherin and integrins  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha 6\beta 1$ . The carcinoma cell lines RL95-2 and AN3CA adhered rapidly to amniotic mem-

branes and to coverslips coated with ECM components. It was concluded that amniotic membranes, after stripping of epithelial lining, are suitable to study interactions between endometrial tissue and extracellular matrix in functional and structural studies. Endometrial cells after collagenase type I digestion are less suitable to study initial phases of adhesion due to loss of functional cell adhesion molecules. Carcinoma cell lines can serve as an *in vitro* model for the study of adhesion behavior.

In chapter 8 adhesion between endometrial tissue and peritoneum using intact amniotic membranes as an *in vitro* model was studied. Mechanically dissected tissue fragments from endometrial biopsies were cultured on either side of intact amniotic membranes. Also the carcinoma cell lines RL95-2 and AN3CA were used. Peritoneum and amniotic membrane were similar with respect to expression of cytokeratins in epithelial lining and of extracellular matrix (ECM) components. The endometrial fragments did not adhere to the intact epithelial side of the amniotic membrane. In contrast, adhesion did occur to the non-epithelial side of the amnion. The carcinoma cell lines RL95-2 and AN3CA adhered to either side of intact amniotic membranes. It was concluded that an intact epithelial lining prevents adhesion of endometrial fragments to the ECM of amniotic membranes *in vitro*. An intact epithelium could be an important defense mechanism in preventing initial adhesion of retrogradely shed endometrium fragments to peritoneum.

In chapter 9 an attempt is made to integrate the previous chapters with the existing literature and to outline some future perspectives. Future research should be focussed on interfering with the adhesion process, i.e. by specific inhibition of function of cell adhesion molecules at the protein level using antibodies. Further research should be directed towards the role of an intact epithelium in preventing adhesion of endometrial fragments to the mesothelium.



---

# Samenvatting

Endometriose is het voorkomen van functioneel endometriumachtig weefsel op andere plaatsen dan de baarmoederholte.

In het eerste hoofdstuk van dit proefschrift wordt een literatuuroverzicht gegeven van de pathogenese van endometriose. De implantatie of transplantatietheorie blijft de meest geaccepteerde theorie om de pathogenese van endometriose te verklaren. De implantatietheorie behelst implantatie en vervolgens groei van vitale endometrium cellen, die door retrograde menstruatie in de buikholte terecht komen. Het tweede deel geeft een overzicht van de literatuur over celadhesiemoleculen, in het bijzonder de cadherines en de integrines. Deze celadhesiemoleculen zijn betrokken bij respectievelijk cel-celadhesie en bij cel-extracellulaire matrix-interacties. Er wordt speciale aandacht geschonken aan de mogelijke functionele rol van deze celadhesiemoleculen in het humane endometrium.

De doelstellingen van het beschreven onderzoek waren driedelig. Het eerste doel was het beter karakteriseren van retrograde menstruatie. Het tweede doel was het bepalen van de sub-klassen van cadherines en integrines die tot expressie komen in endometriumcellen en andere cellen die mogelijk betrokken zijn bij de pathogenese van endometriose. Het derde doel was het bestuderen van functionele celadhesie *in vitro*.

De immunohistochemische eigenschappen van epitheliale cellen in peritoneumvloeistof worden onderzocht en vergeleken met die van cellen van het endometrium, van het menstruum, van het peritoneum en van endometrioselesies. Alle celmonsters van het menstruum en van de peritoneumvloeistof kleurden positief met antilichamen tegen vimentine en cytokeratine 18 en 19, op één na. Het monoclonale antilichaam BW495/36, dat endometriumepitheel wel kleurt, maar cellen van het peritoneum niet, kleurde 14 van de 16 celmonsters van het menstruum en 9 van de 16 celmonsters van de peritoneumvloeistof. Cellen in endometrioselesies kleurden met alle merkstoffen. Er werden geen grote verschillen waargenomen in de kleuringen van de cellen van het menstruum, van het endometrium en van de cellen in de peritoneumvloeistof van patiënten met en zonder endometriose. Deze bevindingen maken aannemelijk dat transport van cellen uit het menstruum naar de peritoneale holte optreedt bij vrouwen met open tubae.

Met behulp van immunohistochemie wordt vervolgens de expressie van  $\beta 1$ -integrines, waaronder  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  en  $\alpha 6\beta 1$ , en E-cadherine onderzocht in cellen van peritoneumvloeistof, endometrium, menstruum, peri-

toneum en endometrioselaesies gedurende de vroeg-folliculaire fase van de menstruele cyclus. Alle integrines, die werden bestudeerd, werden aangetoond in de celmonsters van het endometrium en de endometrioselaesies. Op basis van de expressie van deze celadhesiemoleculen wordt geconcludeerd dat deze celadhesiemoleculen betrokken kunnen zijn bij het loslaten van endometriumweefsel tijdens de menstruatie en de aanhechting van endometriumfragmenten aan het peritoneum.

De expressie van P-cadherine wordt onderzocht in humaan endometrium en in endometrioselaesies en deze wordt vergeleken met de expressie van E-cadherine. P-cadherine werd aangetroffen in de epitheelcellen van alle endometriummonsters en in alle glandulaire structuren van endometrioselaesies. De kleuringskarakteristieken van P-cadherine en E-cadherine waren vergelijkbaar. Het is aannemelijk dat P-cadherine functioneel betrokken is bij de handhaving van het proliferatieve deel van het endometrium en dat het een vergelijkbare rol heeft in endometriosehaarden.

Voorts wordt de immunohistochemische expressie van cadherines en integrines bestudeerd in endometriumbiopsies, die afgenomen zijn op goed gedefinieerde momenten van de menstruele cyclus. Tegelijkertijd werden bloedmonsters verzameld voor de bepaling van oestradiol en progesteron. De expressie van celadhesiemoleculen, waaronder E- en P-cadherine en de integrines  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  en  $\alpha 6\beta 1$ , en de expressie van oestrogen- en progesteronreceptor werd bepaald. E- en P-cadherine werden gedetecteerd in alle monsters en varieerde niet tijdens de cyclus. Wanneer de expressie ervan functioneel betrokken zou zijn bij het cyclische afstoten van het endometrium, dan is het verlies van expressie beperkt tot een heel korte periode. Van de  $\beta 1$ -integrines was slechts het  $\alpha 2\beta 1$  wisselend aanwezig gedurende de menstruele cyclus. Dit werd niet gevonden in de mid-luteale fase. Er werd geen relatie gevonden tussen de expressie van celadhesiemoleculen en de expressie van oestrogenreceptor en progesteronreceptor. Omdat de cadherines en de  $\beta 1$ -integrines konden worden aangetoond in endometrium uit de laat-luteale fase, is het aannemelijk dat deze celadhesiemoleculen betrokken kunnen zijn bij de aanhechting aan het peritoneum van endometriumfragmenten, die als gevolg van retrograde menstruatie in de buikholte aanwezig zijn.

Verder wordt de ontwikkeling beschreven van een *in vitro* model om de interactie te bestuderen tussen endometriumcellen en extracellulaire matrix (ECM). Tevens wordt de expressie van celadhesiemoleculen in endometriumcellen en weefselfragmenten onder *in vitro* omstandigheden bestudeerd. Endometriumbiopsies werden verzameld en werden ofwel gedigesteerd met collagenase type I, ofwel mechanisch gefragmenteerd door middel van dissectie. Amnionvlies werden ontdaan van hun epitheellaag (gestript). Adhesie van losse cellen en van weefselfragmenten aan deze gestripte amnionvlies en aan

objectglasjes gecoat met ECM componenten werd bestudeerd. Ook werden de steroidgevoelige carcinoomcellijnen RL95-2 en AN3CA gebruikt. De expressie van  $\beta 1$ -integrines en cadherines werd beoordeeld met immunohistochemie. Collagenasedigestie van endometriumweefsel leverde vitale losse cellen op. Deze cellen vertoonden geen adhesie aan een van beide kanten van gestripte amnionvliezen en vertoonden geen expressie van celadhesiemoleculen. Mechanisch gefragmenteerde endometriummonsters vertoonden daarentegen adhesie aan beide kanten van gestripte amnionvliezen en immunohistochemische expressie van E- en P-cadherine en van de integrines  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  en  $\alpha 6\beta 1$ . De carcinoomcellijnen RL95-2 en AN3CA vertoonden snel adhesie aan amnionvliezen en aan objectglasjes met coating van ECM componenten. Er wordt geconcludeerd dat amnionvliezen na verwijdering van hun epitheellaag bruikbaar zijn om de interactie van endometriumweefsel en extracellulaire matrix zowel functioneel als structureel te bestuderen. Endometriumcellen zijn na collagenase type I digestie minder geschikt om de initiële fase van adhesie te bestuderen ten gevolge van verlies van functionele celadhesiemoleculen. Carcinoomcellijnen kunnen dienen als een *in vitro* model om celadhesiegedrag te onderzoeken.

Tenslotte wordt adhesie van endometriumweefsel aan peritoneum bestudeerd, gebruikmakend van intacte amnionvliezen als een *in vitro* model. Mechanisch gedissecteerde weefsselfragmenten van endometriumbiopten zijn gekweekt op beide kanten van intacte amnionvliezen. Ook de carcinoomcellijnen RL95-2 en AN3CA zijn gebruikt. Peritoneum en amnion waren vergelijkbaar wat betreft de expressie van cytokeratines in de epitheelbekleding en de extracellulaire matrixcomponenten. De endometriumfragmenten vertoonden geen adhesie aan de intacte epitheliale kant van het amnionvlies, terwijl adhesie wel optrad aan de niet-epitheliale kant. De carcinoomcellijnen RL95-2 en AN3CA vertoonden adhesie aan beide kanten van het amnionvlies. Er wordt geconcludeerd dat een intacte epitheellaag adhesie voorkomt van endometriumfragmenten aan de extracellulaire matrix van amnionvliezen *in vitro*. Een intacte epitheellaag kan een belangrijk afweermechanisme zijn in de preventie van adhesie van retrograad gemenstrueerde endometriumfragmenten aan het peritoneum.

Toekomstig onderzoek zou zich dienen te richten op het beïnvloeden van het adhesieproces, bijvoorbeeld door specifieke remming van de functie van celadhesiemoleculen op eiwitniveau, gebruikmakend van antilichamen. Verder dient het gericht te worden op de rol van intact epitheel in het voorkomen van adhesie van endometriumfragmenten aan het peritoneum.



