

Aus dem Institut für medizinische Psychologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Martha Merrow, PhD

**Vergleichende Untersuchung immunologischer Parameter des  
Menstruationsblutes und des venösen Blutes bei Endometriose.**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Timo Schmitz

aus  
Nördlingen

Jahr  
2022

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Erster Gutachter: Prof. Dr. med. Karin Meißner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Vigo Heissmeyer  
Prof. Dr. Björn Lampe  
Prof. Dr. Christian J. Thaler, M.I.A.C., F.C.R.I

Dekan Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 06.10.2022

## **Zusammenfassung**

**Hintergrund:** Endometriose ist unter Frauen im reproduktiven Alter eine weit verbreitete Erkrankung. Nichtsdestotrotz ist die Diagnostik der Endometriose schwierig und Fehldiagnosen sind häufig. Es existiert bis heute keine kausale Therapie. Einigkeit herrscht darüber, dass immunologische Veränderungen bei der Entstehung und dem Fortschreiten der Erkrankung eine wichtige Rolle spielen. In den vergangenen Jahrzehnten wurde viel zu immunologischen Veränderungen im Zusammenhang mit Endometriose geforscht. Untersucht wurden v.a. venöses Blut, Gewebe aus dem Endometrium oder aus endometriotischen Herden sowie die Peritonealflüssigkeit. Es gibt jedoch kaum Erkenntnisse zu Veränderungen der Immunzellen und des immunologischen Milieus im Menstruationsblut. Das primäre Ziel dieser Studie war es daher, zu untersuchen, ob sich immunologische Unterschiede im Menstruationsblut von Frauen mit Endometriose im Vergleich zu Menstruationsblut von gesunden Frauen finden. Zudem wurden die immunologischen Parameter zwischen venösem Blut und Menstruationsblut verglichen.

**Methoden:** Insgesamt 12 Frauen mit Endometriose und 11 gesunde Frauen als Vergleichsgruppe wurden in diese Studie eingeschlossen. Das zu untersuchende Menstruationsblut wurde mithilfe von Menstruationstassen über einen Zeitraum von 24 Stunden gesammelt. Im Anschluss an die Sammlung erfolgte die Übergabe des Menstruationsblutes und sowie eine venöse Blutentnahme im Institut. Anschließend wurden aus den Proben des gefilterten Menstruationsblutes und des venösen Blutes die mononukleären Zellen (myeloischen Zellen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen) gewonnen und mithilfe der Durchflusszytometrie hinsichtlich der Verteilung von Zellsubpopulationen und der Expression verschiedener Immunmarker untersucht. Zudem wurden Teile der gewonnenen Proben zentrifugiert. Im Überstand der abzentrifugierten Proben wurden mithilfe von ELISAs die Konzentrationen der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sowie der Interleukine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  bestimmt.

**Ergebnisse:** Die Menstruationstasse bewährte sich in dieser Studie als geeignete Möglichkeit zur Gewinnung vitaler Immunzellen des Menstruationsblutes. Der Vergleich von mononukleären Zellen zwischen den beiden Studiengruppen zeigte eine signifikant niedrigere Anzahl an Perforin-positiven Zellen unter den zytotoxischen CD8+T-Zellen bei Frauen mit Endometriose im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Darüber hinaus waren keine signifikanten Unterschiede bei den mononukleären Zellen des Menstruationsblutes oder des venösen Blutes zwischen den beiden Studiengruppen zu sehen. Die venösen Blutplasmaspiegel von ICAM-1 waren in der Gruppe der gesunden Kontrollen signifikant höher als bei den Endometriosepatientinnen, im Menstruationsblut waren hingegen keine

Unterschiede zu beobachten. Ebenfalls unauffällig in dieser Hinsicht waren die Konzentrationen von VCAM-1, IL-6, IL-8 und TNF-  $\alpha$  sowohl im Menstruationsblut als auch im venösen Blut.

Die Immunzellen des Menstruationsblutes unterschieden sich von denen des venösen Blutes hingegen in vielerlei Hinsicht. Im Vergleich zu venösem Blut enthielt das Menstruationsblut signifikant mehr B-Zellen und signifikant weniger T-Zellen. Das CD4/CD8-Verhältnis der T-Zellen war im Menstruationsblut signifikant höher als im venösen Blut, die Anzahl der regulatorischen T-Zellen hingegen war im Menstruationsblut signifikant niedriger. Die T-Zellen und die NK-Zellen des Menstruationsblutes exprimierten jeweils signifikant mehr CD69 als T-Zellen und NK-Zellen im venösen Blut. Anders als die NK-Zellen des peripheren Blutes waren die NK-Zellen des Menstruationsblutes überwiegend CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup>-NK-Zellen und exprimierten signifikant weniger Perforin. Der NK-Rezeptor NKp46 hingegen wurde signifikant stärker von den NK-Zellen des Menstruationsblutes exprimiert.

**Schlussfolgerung:** Mononukleäre Zellen des Menstruationsblutes unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht stark von den mononukleären Zellen des venösen Blutes und ähneln in ihrer Zusammensetzung deutlich den Immunzellen des Endometriums. Die zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen des Menstruationsblutes enthalten signifikant weniger Perforin-Granula bei Frauen mit Endometriose, was auf eine reduzierte Zytotoxizität dieser Zellen schließen lässt.

## **Summary**

**Background:** Endometriosis is a widespread disease in women in the reproductive age, that often reduces the quality of life of those affected by symptoms like dysmenorrhea, dyspareunia or infertility. Diagnosis remains challenging and until now no causal treatment exists. In scientific literature many immunological changes like reduced cytotoxicity of natural killer cells and macrophages or altered concentrations of cytokines and cell adhesion molecules have been reported in women with endometriosis. Research has been concentrated on immunological alterations in peripheral blood, endometrial tissue and peritoneal fluid of women with endometriosis. Yet, knowledge on immunological differences in menstrual effluent is scarce. The aim of this study was to investigate menstrual effluent of women with endometriosis in comparison to healthy controls regarding certain immunological parameters.

**Methods:** 12 women with endometriosis and 11 healthy controls were included in the study. Menstrual effluent (ME) was collected using menstrual cups over a time period of 24 h, and peripheral blood samples (PB) were taken. Mononuclear cells were obtained from ME and PB using density gradient centrifugation and analyzed using flow cytometry. Furthermore, concentrations of cell adhesion molecules (ICAM-I and VCAM-I) and cytokines (IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$ ) were measured in centrifugation supernatant of ME and plasma of PB.

**Results:** The comparison of the mononuclear cells between women with endometriosis and healthy controls revealed a significantly lower expression of perforin in CD8+ T cells from ME. Apart from that, no differences could be detected in mononuclear cells from ME (MMC) or mononuclear cells from PB (PBMC) between the two groups (endometriosis and healthy controls). The endometriosis group had significantly lower plasma ICAM-I concentrations than the control group. There were no significant differences in VCAM-1, IL-6, IL-8 or TNF- $\alpha$  between the two groups.

The comparison of MMC and PBMC revealed some distinct differences. ME contained significantly more B cells and significantly less T cells than peripheral blood. Among the T cells, the CD4/CD8 ratio was significantly higher in the ME, but regulatory T cells (Tregs) were significantly less common in ME. T cells and NK cells expressed significantly more CD69 in ME. In contrast to PB, the NK cells of the ME were predominantly CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup> and the NK cell expressed less perforin. However, NKp46 was significantly more expressed on NK cells derived from ME.

**Conclusion:** MMC are distinctively different from PBMC and seem to be of endometrial origin. The CD8+ T cells derived from ME express significantly less perforin in endometriosis patients than in healthy controls, suggesting a reduced cytotoxic potential.

# Inhalt

1	Einleitung .....	9
1.1	Endometriose als Erkrankung .....	9
1.2	Entstehungstheorien.....	11
1.3	Genetische Faktoren .....	13
1.4	Psychosomatische Aspekte der Endometriose .....	13
2	Theoretischer Hintergrund .....	16
2.1	Überblick über den aktuellen Forschungsstand.....	16
2.2	Hormonelle Veränderungen .....	16
2.3	Immunologische Veränderungen.....	17
2.3.1	Natürliche-Killer-Zellen.....	17
2.3.2	Monozyten und Makrophagen .....	21
2.3.3	T-Zellen und Regulatorische T-Zellen.....	23
2.3.4	B-Zellen und autoimmuner Charakter.....	27
2.4	Zytokine.....	27
2.4.1	Interleukin-6.....	28
2.4.2	Interleukin-8.....	29
2.4.3	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....	30
2.5	Zelladhäsionsmoleküle .....	31
2.5.1	ICAM-1.....	31
2.5.2	VCAM-1 .....	32
2.6	Menstruationsblut .....	34
3	Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	35
4	Material und Methoden .....	36
4.1	Probandinnen .....	36
4.2	Ablauf der Untersuchungen.....	37

4.3	Probengewinnung.....	37
4.4	Durchflusszytometrie .....	39
4.4.1	Die Methode Durchflusszytometrie .....	39
4.4.2	Verwendete Antikörper .....	40
4.4.3	Gating-Strategie.....	41
4.5	ELISA – Beschreibung der Methode .....	43
4.6	Statistische Methoden .....	46
5	Ergebnisse.....	47
5.1	Demographie und klinische Merkmale.....	47
5.2	Menstruationsblut .....	47
5.3	Ergebnisse Durchflusszytometrie .....	49
5.3.1	Vergleich Endometriose und gesunde Kontrollen .....	49
5.3.2	Vergleich Menstruationsblut und venöses Blut .....	63
5.3.3	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie .....	73
5.4	ELISA .....	75
5.4.1	ICAM-1.....	75
5.4.2	VCAM-1 .....	75
5.4.3	Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ .....	76
6	Diskussion.....	78
6.1	Sammlung von Menstruationsblut mithilfe von Menstruationstassen .....	78
6.2	Durchflusszytometrie .....	79
6.2.1	Vergleich der mononukleären Zellen zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.....	79
6.2.2	Vergleich von Menstruationsblut und venösem Blut .....	82
6.3	ELISA – Zelladhäsionsmoleküle und Zytokine .....	84

6.4	Stärken und Schwächen der Studie – Diskussion der Methoden .....	86
7	Schlussfolgerung und Ausblick .....	88
8	Abbildungsverzeichnis .....	90
9	Tabellenverzeichnis .....	92
10	Abkürzungsverzeichnis .....	93
11	Literaturverzeichnis.....	95
	Eidesstattliche Erklärung .....	105
	Danksagung .....	106



# 1 Einleitung

## 1.1 Endometriose als Erkrankung

Unter medizinischen Laien ist die Endometriose eine wenig bekannte Frauenkrankheit. Diese Tatsache ist erstaunlich, bedenkt man, dass in etwa 10% aller Frauen im reproduktionsfähigen Alter darunter leiden [1]. Beschreibungen von Symptomen der Endometriose reichen bis in die Antike zurück [2]. Jedoch dauerte es bis Anfang des 20. Jahrhunderts, bis Thomas Cullen als Erster die Endometriose als Erkrankung beschrieb, bei der sich vitale Gebärmutter-schleimhautzellen außerhalb der Gebärmutter selbst befanden [3]. Laut der S2k-Leitlinie kann die Endometriose als „das Vorkommen endometriumsartiger Zellverbände außerhalb des Cavum uteri“ definiert werden [4]. Am häufigsten betroffen sind das Bauchfell (peritoneale Endometriose), die Eierstöcke, die Eileiter, verschiedene Bandstrukturen des kleinen Beckens (v.a. Ligamentum sacrouterinum) und die Gebärmuttermuskulatur (Adenomyosis uteri); aber auch diverse andere Strukturen des kleinen Beckens, wie Blase und Rektum, können betroffen sein. Auch der Befall von Strukturen außerhalb des kleinen Beckens sind möglich, darunter das Zwerchfell, der Wurmfortsatz und der Bauchnabel [4]. Aufgrund der häufig unspezifischen Symptomatik ist die Latenz zwischen erstmaligem Auftreten von Symptomen bis zur Diagnose mit bis zu 10 Jahren in Deutschland sehr lang; Fehldiagnosen vor der endgültigen Diagnose Endometriose sind häufig [5]. Diagnostisch kommen, je nach Lokalisation, v.a. die transvaginale Sonographie, das MRT sowie die Bauchspiegelung zum Einsatz [4]. Insbesondere bei Verdacht auf Vorliegen der häufigen peritonealen Endometriose ist die Bauchspiegelung zentraler Bestandteil der Diagnostik. So kann die Endometriose klassifiziert und die Diagnose durch Gewebeentnahme mit anschließender histologischer Untersuchung gesichert werden [4].

Leitsymptome der Krankheit sind Unterbauchschmerzen und Menstruationsschmerzen [4]. Diese treten in einer überwiegenden Mehrheit der Fälle auf. Auch die Zyklusblutung ist häufig stark und unregelmäßig (Menometrorrhagie). Weitere häufige Symptome sind Schmerzen beim Geschlechtsverkehr (Dyspareunie), Kopfschmerzen, Schwindel sowie Magen-Darmstörungen [6]. Über 40% der betroffenen Frauen klagen über Kinderlosigkeit, allerdings gilt ein kausaler Zusammenhang als nicht nachgewiesen [4]. Aktuell herrscht keine Einigkeit über die zugrundeliegenden Ursachen der vermehrten Kinderlosigkeit. In Frage kommen unter anderem eine veränderte Beckenanatomie wie beispielsweise ein mechanischer Eileiterverschluss, endokrine und immunologische Ursachen, eine veränderte Zusammensetzung der Peritonealflüssigkeit und ein verändertes Endometriums-gewebe [7]. Eine rein medikamentöse Therapie zeigte in den meisten Studien keine Verbesserung der Fertilität; eine operative Entfernung der Endometrioseherde hingegen scheint eine Erhöhung

der Fertilitätsrate zu bewirken [4].

Es gibt eine Reihe verschiedener Klassifikationssysteme zur Einteilung des Schweregrades. Vorangestellt muss erwähnt werden, dass keines der derzeit existierenden Klassifikationssysteme alle Aspekte der Erkrankung inklusive der subjektiv empfundenen Beeinträchtigungen abbilden kann [8]. Die klinisch relevanteste Einteilung ist aktuell die rASRM-Klassifikation (revised American Society for Reproductive Medicine). Dabei werden makroskopisch Beckenperitoneum, Eierstöcke und Eileiter betrachtet, wobei die Läsionen nach Größe und Tiefe beurteilt und entsprechende Punktwerte vergeben werden. Die Summe aller Punktwerte bildet die Einteilung in die vier Schweregrade: 1 = minimale Endometriose, 2 = milde Endometriose, 3 = moderate Endometriose und 4 = schwere Endometriose [8]. Es handelt sich demnach um ein rein deskriptives Klassifikationssystem. Läsionen außerhalb des kleinen Beckens finden keine Beachtung, ebenso wenig fließt die Morphologie der Herde in die Beurteilung mit ein. Die tief-infiltrierende Endometriose kann mit der rASRM-Klassifikation nicht valide klassifiziert werden. Auch subjektive Krankheitssymptome wie Schmerzen werden nicht erfasst. Um vor allem die tief-infiltrierende Endometriose besser zu erfassen, wurde die ENZIAN-Klassifikation entwickelt. Sie kann als eine Ergänzung zur rASRM-Klassifikation angesehen werden und ähnelt der in der Onkologie gängigen TNM-Klassifikation [8].

Die Ätiologie und Pathophysiologie der Endometriose ist bei weitem noch nicht in allen Details verstanden, dementsprechend gibt es nach wie vor keine kausale Therapie der Erkrankung. Als Goldstandard zur Symptomkontrolle gilt die operative Entfernung der Herde [4]. Eine weitere wichtige Säule der schulmedizinischen Therapie zielt auf die medikamentöse Unterdrückung der Östrogenproduktion ab. Da die Herde in ihrem Wachstum östrogenabhängig sind, kann hierdurch das Voranschreiten der Krankheit eingedämmt und die Symptomatik gelindert werden. Als symptomatische Therapie kommen außerdem verschiedene Analgetika zum Einsatz. Unter den häufigsten sind hier die nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) wie Ibuprofen oder Paracetamol, krampflösende Medikamente wie Butylscopolamin und schwach-wirksame Opioide wie Tramadol zu nennen [6]. Auch physikalische Maßnahmen wie Wärmebehandlungen und pflanzliche Wirkstoffe können helfen [6].

Neben den schulmedizinischen Therapien gibt es auch eine ganze Reihe komplementärmedizinischer Verfahren, die bei den Betroffenen mitunter sehr effektiv sind und subjektiv den Leidensdruck deutlich lindern können. Hier sind vor allem die traditionelle chinesische Medizin (TCM) und die Homöopathie zu nennen, aber auch eine angepasste Diätetik kann zur Symptomlinderung beitragen [6]. Selbsthilfegruppen sind im Umgang mit der Krankheit sehr wertvoll und können vor allem in psychosozialer Hinsicht ein wichtiger Behandlungsbaustein sein [6, 9].

Die unterschiedlichen Heilmethoden und Therapieformen können darüber hinaus auch kombiniert werden und sich so in ihren Wirkungen ergänzen. Hier kann beispielsweise die sogenannte Systemische Autoregulationstherapie (SART) genannt werden, welche Elemente der TCM (insbesondere Akupunktur) und psychotherapeutische Verfahren sehr erfolgreich kombiniert, was bereits durch wissenschaftliche Studien belegt wurde [10, 11]. So ergab eine Studie von Meissner et al., dass eine 3-monatige SART-Therapie eine signifikante Verbesserung der Schmerzsymptomatik und der Lebensqualität in der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkt [10]. Ebenso sank die Verwendung von nichtsteroidalen Antirheumatika als Schmerzmittel signifikant. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass diese signifikanten Verbesserungen ein neurobiologisches Korrelat im Sinne einer veränderten Konnektivität im rechten anterolateralen Hippocampus besitzen [11].

### 1.2 Entstehungstheorien

Zunächst sei gesagt, dass keine der aktuellen Entstehungstheorien zur Endometriose alle Aspekte ausreichend erklären kann und diese daher jeweils nur als Teilerklärungen angesehen werden können. Als Erster beschrieb Sampson in den 1920er Jahren die **Transplantationstheorie** [12]. Ihr zufolge gelangen vitale Schleimhautzellen durch verschiedene Mechanismen an andere Körperstellen, können sich dort anheften und reifen zu größeren Herden heran. Der häufigste Mechanismus ist demzufolge die retrograde Menstruation, wodurch die Schleimhautzellen durch die Eileiter zum Ovar und in die Bauchhöhle gelangen. Vitale Zellen könnten aber auch über Blut, Lymphsystem oder bei Operationen verschleppt werden. Dies stellt sozusagen eine benigne Metastasierung dar [12]. Allerdings bleibt zu bedenken, dass es bei einer Mehrheit der Frauen zu einer retrograden Menstruation kommt; nur ein kleiner Teil von ihnen entwickelt jedoch eine Endometriose [13]. Zur Entstehung von Herden müssen also weitere pathophysiologische Faktoren hinzukommen. Möglicherweise erhöht eine verstärkte retrograde Menstruation die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Herden. Unterstützt wird Sampson's Transplantationstheorie durch Experimente, die im Tierversuch zeigen, dass man durch künstliches Einbringen von Menstruationsblut (MB) in die Bauchhöhle, also der Simulation einer starken retrograden Menstruation, regelmäßig endometriotische Herde hervorrufen kann [14]. Auch obstruktive Faktoren, wie eine Hymenalatresie, erhöhen das Ausmaß retrograder Menstruation und damit das Risiko zu Entstehung einer Endometriose und unterstützen so die Theorie von Sampson [12].

Für eine verstärkte retrograde Menstruation bei Endometriose könnte bei einigen Frauen eine vegetative Dysfunktion verantwortlich sein, welche zu einer verstärkten Kontraktilität der

glatten Uterusmuskulatur führt [15]. Dadurch kommt es womöglich zu einer chronischen Autotraumatisierung des Uterus, weshalb nicht nur, wie gewöhnlich bei der Menses, Zellen der Funktionalis (oberste Schicht der Uterusschleimhaut) abgestoßen werden, sondern zudem auch Zellen aus der Basalschicht. Aus diesen pluripotenten Basalzellen könnte dann, wie im Endometrium selbst, ausdifferenziertes Gebärmutter-schleimhautgewebe entstehen [15]. Tatsächlich konnten Leyendecker et al. bei Frauen mit Endometriose vermehrt Endometriumzellen der Lamina basalis im MB nachweisen [16]. Außerdem zeigten sie, dass die Zellen der endometriotischen Läsionen immunhistochemisch stark denen der Basalzellschicht des Uterus ähneln und sich parallel zu diesem zyklisch verändern [16]. Durch sonographische Videoaufnahmen konnte bei Frauen mit Endometriose eine uterine Hyper- und Dysperistaltik festgestellt werden [17]. Diese veränderte Peristaltik und daraus folgend ein pathologischer Spermientransport und ein zu hoher intrauteriner Druck könnten außerdem eine Erklärung für die mit der Endometriose häufig assoziierte Unfruchtbarkeit sein [15]. Die Ursache der Hyperperistaltik ist bisher ungeklärt, jedoch würde eine Fehlsteuerung des vegetativen Nervensystems nahe liegen [15].

Die Transplantationstheorie kann allerdings nicht erklären, wie es zu einer Entstehung von Herden bei präpubertären Mädchen, Neugeborenen oder Männern kommen kann [13]. Trotz allem ist die Transplantationstheorie heute die verbreitetste und anerkannteste Entstehungstheorie [12].

Die zweite große Theorie zur Entstehung der Endometriose ist die **Metaplasietheorie**. Ihr zufolge stammen die Endometriosezellen nicht von uterinem Endometrium, sondern andere Zellen differenzieren sich zu endometriotischen Zellen. Hier gibt es wiederum verschiedene Theorien, welche Zellen den Ausgangspunkt der Metaplasie darstellen. In Frage kommen hier peritoneale Epithelzellen, undifferenzierte embryonale Stammzellen des pluripotenten Zölomepithels, residuelle embryonale Zellen aus Müller- oder Wolff-Gang (Urnierengang) oder möglicherweise auch Stammzellen aus dem Knochenmark [13, 12]. Trigger für eine Umwandlung könnten hormonelle oder immunologische Ursachen sein. Hier ist vor allem starker Östrogeneinfluss zu nennen, aber auch andere Faktoren wie Umweltgifte könnten an der Pathophysiologie beteiligt sein [12]. Die Metaplasietheorie kann erklären, wie es bei Menschen, die kein vitales Endometriumsgewebe abstoßen können, zum Auftreten endometriotischer Herde kommen kann. Dies ist bei präpubertären Mädchen der Fall; ebenso bei einigen Anlagestörungen mit Uterusaplasie wie dem Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom oder bei Männern, die bei Prostatakarzinom eine starke Östrogen-therapie erhalten [12].

Eine Entstehungstheorie, welche die beiden oben genannten Theorien kombiniert, ist die **Induktionstheorie**. Retrograde Menstruation wirkt ihr zufolge als nötiger Stimulus für die Transformation von Mesothelzellen oder undifferenziertem Mesenchym zu endometrialen Zellen [18]. Bisher unbekannte biologische Substanzen, die von den abgestoßenen Endometriumzellen parakrin sezerniert werden, triggern möglicherweise die Umwandlung von umliegenden Zellen in endometriotisches Gewebe [18].

### 1.3 Genetische Faktoren

Die Endometriose besitzt eine Heritabilität (Vererbbarkeit) von ca. 50%, was einen verhältnismäßig hohen Wert darstellt [19]. Bei fortgeschritteneren Stadien kann eine höhere Vererbbarkeit festgestellt werden als bei leichteren Formen der Erkrankung. Es wird von einem polygenen Vererbungsmodell ausgegangen, d.h. es spielen verschiedene Gene eine Rolle bei der Entstehung der Endometriose [20]. Bei familiärer Häufung der Endometriose tritt diese häufig früher und in schwererer Form auf als ohne familiäre Vorbelastung [20]. Auch dieser Umstand spricht für einen polygenen Erbgang. Aktuell gibt es nur für 8 Gen-Loci robuste Daten, die einen Einfluss der Gene auf die Entstehung einer Endometriose zeigen [19]. Allerdings ist der Einfluss der einzelnen Gene sehr gering. Alle bisher identifizierten Gene können nur einen kleinen Teil der Vererbbarkeit erklären [19]. Es muss berücksichtigt werden, dass zur phänotypischen Ausprägung eines genetischen Merkmals und damit zur tatsächlichen Entstehung der Krankheit auch immer Umweltfaktoren hinzukommen müssen. Ganz besonders gilt dies für Erkrankungen mit polygenetischem Vererbungsmodell wie der Endometriose. Umweltfaktoren entscheiden also maßgeblich mit, ob, wann und in welchem Ausmaß sich eine Endometrioseerkrankung manifestiert.

### 1.4 Psychosomatische Aspekte der Endometriose

Da hinsichtlich der Symptomatik für die meisten Betroffenen die Schmerzen im Vordergrund stehen, kann die Endometriose auch als Schmerzerkrankung angesehen werden. Die verschiedenen Symptome und vor allem die starke Schmerzsymptomatik wirken sich sehr häufig auch auf das alltägliche Leben der Betroffenen aus. Eine Endometrioseerkrankung führt daher oft zu einer teils deutlich verminderten Lebensqualität. Weitere Auswirkungen auf die psychische Gesundheit sind nicht selten. Werden junge Frauen zum ersten Mal mit der Diagnose Endometriose konfrontiert, fällt ihnen der Umgang damit in vielen Fällen schwer. Schlechte Aussichten auf vollständige Heilung, chronische Schmerzen, verminderte Fruchtbarkeit und eine aggressive Therapie bis hin zu Organverlusten drohen. Dies kann mit

schweren psychosozialen Folgen wie Beziehungs- und Sexualprobleme oder Rückzug und Einsamkeit einhergehen [9]. Eine verminderte Fertilität kann Minderwertigkeitsgefühle hervorrufen oder zu einer depressiven Erkrankung führen [21]. Die Ungewissheit einer möglichen Kinderlosigkeit belastet häufig die Partnerschaft oder Ehe schwer und kann sogar zu deren Ende führen [21]. Auch das Arbeitsleben wird durch eine Endometrioseerkrankung mitunter stark beeinflusst. Dies kann in Form von häufigen Krankschreibungen und verminderter Produktivität bis hin zu einer völligen Arbeitsunfähigkeit aufgrund starker Symptomatik geschehen [21]. Die Unfähigkeit normal am Arbeitsleben teilzunehmen kann wiederum selbst psychische Folgen nach sich ziehen.

Interessanterweise korreliert das Stadium (rASRM-Klassifikation) der Endometriose nur sehr gering mit der subjektiven Schmerzsymptomatik und den Auswirkungen auf das alltägliche Leben [22–24]. Eine Reihe von Frauen mit Endometriose ist völlig asymptomatisch, darunter auch Frauen in fortgeschrittenen Stadien [22], während andere Patientinnen mit Stadium-I- oder Stadium-II-Endometriose unter sehr schwerer Schmerzsymptomatik leiden [22].

Wie bereits weiter oben beschrieben, könnte eine Hyperperistaltik des Uterus zu einer vermehrten retrograden Menstruation mit einer höheren Anzahl an Zellen der Basalzellschicht führen und damit einen Teilaspekt der Pathophysiologie darstellen. Aufgrund dieser Überlegungen drängt sich für Lütje und Brandenburg die Frage auf, ob es sich bei der Endometriose nicht doch um eine Stresserkrankung handeln könnte [9]. Als mögliche Ursachen werden unter anderem ungelöste emotionale Konflikte und eine problematische Einstellung zur Menstruation oder Geschlechterrolle diskutiert [9]. In Amerika galt die Endometriose lange Zeit als die Erkrankung der „kinderlosen Karrierefrau“, weshalb Lütje und Brandenburg die Frage aufwerfen, ob die Ablehnung der Mutterrolle zur Endometriose führen könnte [9]. Von dieser Sichtweise ausgehend lässt sich die Frage stellen, ob eine Schwangerschaft deshalb, so wie häufig beobachtet, zu einer Verbesserung oder Inaktivierung der Endometriose führen kann.

Einige Autoren fanden in Metaanalysen und Reviews einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Missbrauchserfahrungen in Kindheit und Jugend und dem Auftreten von chronischen Unterleibsschmerzen (chronic pelvic pain) [25–27]. Auch dieser Zusammenhang deutet darauf hin, dass psychosomatische Aspekte bei der Entstehung und vor allem beim subjektiven Erleben einer Endometrioseerkrankung eine Rolle spielen.

Auf den wichtigen Einfluss psychosomatischer Aspekte auf das Erleben der Erkrankung deuten auch die Ergebnisse einer bereits erwähnten Studie von Beissner et al. hin. Es konnte gezeigt werden, dass die Symptomverbesserungen, herbeigeführt durch die SART-Therapie, ein neurobiologisches Korrelat besitzen. So konnte eine mit den Verbesserungen der

Schmerzsymptomatik einhergehende, veränderten Konnektivität im rechten anterolateralen Hippocampus beobachtet werden [11].

Aus psychosomatischer Sicht ergeben sich so für die Therapie noch einige wichtige Punkte, welche sich in der Praxis als sinnvoll erwiesen haben [28]. Wichtig ist zunächst eine gute Arzt-Patienten-Beziehung auf Augenhöhe. Ziel ist es, die Patientinnen frühzeitig mit allen gewünschten Informationen zu versorgen und diesen so ein Stück weit Kontrolle über die Krankheit zurückzugeben [28]. Hinsichtlich der Ursachen der Erkrankung sollte ein möglichst multifaktorielles Verständnis vermittelt werden. Letzte therapeutische Entscheidungen trifft selbstredend die Patientin. Es ist wichtig, die Betroffenen frühzeitig mit anderen zu vernetzen, beispielsweise im Rahmen einer Selbsthilfegruppe, und ihnen wichtige Skills und Techniken im Umgang mit Stress und Frustration mit an die Hand zu geben [28]. Hilfreich ist es zudem, das engere soziale Umfeld der Patientinnen, vor allem Partner und Familienmitglieder, in diese Prozesse mit einzubeziehen [28].

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Überblick über den aktuellen Forschungsstand

Die genaue Pathophysiologie der Endometriose ist bisher nur in Teilen verstanden und weitere Forschung ist vonnöten, um das Verständnis der Erkrankung zu erweitern und zu vertiefen. Nichtsdestotrotz hat die medizinische Wissenschaft in den letzten Jahrzehnten viele pathophysiologische Aspekte der Erkrankung untersucht und dabei wichtige Fortschritte erzielen können. Die Endometriose kann – je nach Standpunkt – vorrangig als hormonelle, autoimmune oder immunologische Erkrankung betrachtet werden.

### 2.2 Hormonelle Veränderungen

Die Endometriose gilt als östrogenabhängige Krankheit. Östrogen ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für Endometriumgewebe, weshalb hohe Östrogenspiegel als Risikofaktor für die Entstehung einer Endometriose angesehen werden können [29]. Das östrogenabhängige Wachstum spiegelt sich auch darin wider, dass die Endometriose hauptsächlich während der reproduktiven Zeit auftritt, in der die Östrogenspiegel am höchsten sind. Vor der Menarche und nach der Menopause ist die Prävalenz der Erkrankung deutlich geringer.

Das östrogenabhängige Wachstum der Herde wird auch bei der medikamentösen Therapie genutzt. Eine wichtige therapeutische Säule zielt darauf ab, den proliferativen Einfluss von Östrogen zu blockieren [30]. Allerdings können sich die Endometrioseherde in gewisser Weise unabhängig von der externen Hormonzufuhr machen. In den endometriotischen Herden konnten nämlich hohe Aromatase-Konzentrationen gemessen werden [31]. Die Aromatase katalysiert die Umwandlung von Testosteron zu Östrogen. Damit können die Herde selbst für hohe lokale Östrogenkonzentrationen sorgen.

Den hormonellen Gegenspieler zum Östrogen stellt das Progesteron dar. Progesteron dient dem Endometriumgewebe als Signal zur Differenzierung. Hohe Progesteronspiegel, beispielsweise im Rahmen Progesteron-basierter oraler Kontrazeptiva oder während einer Schwangerschaft, können als negativer Risikofaktor für die Entwicklung einer Endometriose gesehen werden [29]. Allerdings weist endometriotisches Gewebe eine gewisse Resistenz gegenüber der Wirkung von Progesteron auf [32]. Dies sorgt unter anderem dafür, dass es lokal zu einer verminderten Inaktivierung der aktiven Form von Östrogen (E2) kommt [32]. Damit kommt es zu einer weiteren Verschärfung des lokalen Östrogen-Progesteron-Ungleichgewichts, was wiederum zu einem Zustand erhöhter lokaler Inflammation und veränderter Immunantwort gegenüber den Endometrioseherden führt [29]. Es wurde beispielsweise ein Zusammenhang zwischen erhöhten Östrogenspiegeln und verminderter Aktivität der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bei Endometriose festgestellt [33].



## 2.3 Immunologische Veränderungen

Die Endometriose geht mit einer Reihe von immunologischen Veränderungen einher. Meist ist jedoch unklar, ob es sich dabei um eine Ursache oder Folge der Erkrankung handelt. Monozyten und Makrophagen als wichtige Phagozyten sind in Zahl und Funktion ebenso verändert wie die zytotoxischen NK-Zellen. Beide Zelltypen sind vermutlich mitverantwortlich für die Eliminierung verschleppter Endometriumzellen. Auch für die zum adaptiven Immunsystem gehörenden T-Zellen und B-Zellen sind Veränderungen beschrieben.

Neben den zellulären immunologischen Veränderungen sind im Endometriumgewebe, im peripheren Blut oder in der Peritonealflüssigkeit auch einige immunologische Botenstoffe in ihren Konzentrationen verändert. Eine pathophysiologische Rolle könnten, neben vielen weiteren, unter anderem die Zytokine Interleukin-6, Interleukin-8 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  sowie die Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) und VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1) spielen. Da diese im Rahmen dieser Studie von Relevanz sind, werden sie im Folgenden genauer dargestellt. Neben den genannten gibt es eine Reihe weiterer in der Literatur beschriebener Veränderungen, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden kann.

### 2.3.1 Natürliche-Killer-Zellen

Die NK-Zellen stellen eine der drei Lymphozytenpopulationen der menschlichen Immunabwehr dar. Entdeckt wurden sie erst vor etwa 40 Jahren [34]. Sie entwickeln sich aus einer mit den B- und T-Lymphozyten gemeinsamen Vorläuferzelle [35]. In etwa 5-10% der peripheren Lymphozyten sind NK-Zellen. Ein erwachsener Mensch beherbergt im gesamten Körper in etwa 2 Milliarden NK-Zellen [36]. Anders als B- und T-Zellen gehören die NK-Zellen jedoch zum angeborenen Teil der Immunabwehr. Es findet also keine somatische Rekombination wie beim T-Zell-Rezeptor oder bei der Antikörperproduktion von B-Zellen statt. Deshalb vermutete man anfangs, die NK-Zellen könnten eine weniger ausgereifte Zwischenstufe in der Evolution des adaptiven Immunsystems sein. Heute geht man davon aus, dass die NK-Zellen, welche einen hochkomplexen Teil des angeborenen Immunsystems darstellen, in ihrer heutigen Form erst ca. 400 Millionen Jahre nach dem adaptiven Immunsystem entstanden sind [37].

Nach der „Missing-Self“-Hypothese ist es Aufgabe der NK-Zellen, Zellen zu erkennen und abzutöten, welche eine veränderte Oberflächenexpression des MHC-I-Komplexes (Major Histocompatibility Complex) aufweisen [38]. Sie erkennen die Zielzellen vornehmlich durch eine zu geringe oder fehlende Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen. Dieser Proteinkomplex wird von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert. Er wird kontinuierlich mit

Peptiden aus Proteasomen des Zellinneren beladen und repräsentiert damit die im Zytoplasma translatierten Proteine [39]. NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen können nun an diese beladenen MHC-I-Moleküle binden und körpereigene von körperfremden Peptiden unterscheiden. Entartete Zellen oder virusinfizierte Zellen exprimieren oftmals keine oder nur sehr wenige MHC-I-Moleküle. Derartige Zellen zu erkennen und abzutöten ist Aufgabe vor allem der NK-Zellen [40].

Mithilfe eines Fc-Rezeptors können NK-Zellen aber auch im Rahmen der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) antikörperbedeckte Zielzellen erkennen, binden und lysieren [41]. Dies geschieht durch die Exozytose der großen zytotoxischen Granula, welche eine Reihe zytotoxischer Moleküle, darunter z.B. Perforin und Granzyme, enthalten [42]. Perforin wird dabei in die Zellmembran der Zielzelle integriert und formiert sich derart, dass eine Art „Pore“ in der Zellmembran entsteht. Durch diese Pore gelangen die Granzyme dann ins Zellinnere der Zielzelle und lösen dort den programmierten Zelltod (Apoptose) aus [43].

NK-Zellen tragen auf ihrer Zelloberfläche diverse Oberflächenantigene. Das CD56-Antigen, auch neurales Zelladhäsionsmolekül 1, ist typisch für NK-Zellen (wenn auch nicht hochspezifisch). Der CD16-Oberflächenmarker ist ein Fc-Rezeptor, womit eine ADCC möglich wird. CD16 stellt in gewisser Hinsicht einen Marker für die Zytotoxizität der NK-Zellen dar [44]. Anhand der unterschiedlichen Oberflächenexpression dieser zwei Moleküle können die NK-Zellen in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: die CD56bright/CD16dim-NK-Zellen und die CD56dim/CD16bright-NK-Zellen [45].

Die CD56bright/CD16dim-NK-Zellen exprimieren viel CD56 und nur wenig CD16. Sie stellen möglicherweise eine Art der unreifen Vorgängerzellen dar und können sich später (nach Aktivierung durch Zytokine) zu CD56dim-NK-Zellen weiter differenzieren [46]. Die CD56bright-NK-Zellen weisen nur eine schwache Zytotoxizität auf und wirken wohl vorrangig immunregulatorisch [45]. Obwohl sie im peripheren Blut gegenüber den CD56dim-NK-Zellen deutlich in der Minderheit sind, stellen sie fast die gesamte Population von NK-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen (Lymphknoten, Tonsillen) dar [45]. CD56bright-NK-Zellen sind in der Lage, nach Aktivierung große Mengen verschiedener Zytokine, allen voran Interferon- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), zu produzieren [42, 47].

Die CD56dim/CD16bright-NK-Zellen hingegen besitzen eine wesentlich höhere Zytotoxizität [45, 48]. Sie binden etwa zweimal so stark an mögliche Zielzellen und enthalten mehr zytotoxische Enzyme in ihren Granula [42, 45]. Da sie eine hohe Anzahl an CD16-Rezeptoren (Fc-Rezeptor, der gebundene Antikörper erkennt) auf der Zelloberfläche tragen, ist auch die ADCC deutlich höher [45]. Im Allgemeinen scheint also die Zytotoxizität von NK-Zellen negativ mit der Expression von CD56 zu korrelieren. Je mehr CD56 von der Zelle exprimiert wird, desto

geringer ihre zytotoxische Aktivität [48].

Der vollständige Mechanismus, wie die NK-Zellen Zielzellen von gesunden, körpereigenen Zellen unterscheiden, ist noch nicht in allen Details verstanden. Allerdings wurde eine Reihe wichtiger Rezeptoren identifiziert, welche bei diesem Prozess eine bedeutende Rolle spielen. Entscheidend ist dabei immer das Zusammenspiel inhibierender und aktivierender Signale. Je nachdem welche Signale überwiegen, kommt es zur Lyse der Zielzelle oder nicht.

Es sind verschiedene inhibierende Rezeptoren der NK-Zellen bekannt. Allen voran sind hier die KIRs (inhibitory killer immunoglobulin-like receptors) zu nennen. Bindet solch ein Rezeptor ein MHC-I-Molekül einer Zelle, so wird ein inhibierendes Signal ins Zellinnere gesendet. Dieses überwiegt alle aktivierenden Signale in der Zelle und verhindert, dass die gebundene Zelle lysiert wird [37].

Auf der anderen Seite steht den inhibierenden Rezeptoren eine Vielzahl Aktivierender gegenüber. Nach Bryceson et al. kann eine Einteilung u.a. in folgende drei Kategorien geschehen: ITAM, Non-ITAM und Integrin-basierte Rezeptoren [49].

Zu den ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motive) zählt der CD16-Rezeptor. Er bindet an die Gelenkregion von IgG und vermittelt so die ADCC [49]. Eine weitere wichtige Gruppe stellen die NCRs (natural cytotoxicity receptors) dar. Dazu gehört der NKp30-, der NKp44- und der NKp46-Rezeptor [49]. Sie sind von besonderer Bedeutung bei der Abtötung von diversen Tumorzellen [50, 51].

Wichtigster Vertreter der Non-ITAM-Gruppe ist der NKG2D-Rezeptor. Er befindet sich auf allen NK-Zellen und hat mehrere Liganden. Diese Liganden werden auf normalen Gewebezellen nicht exprimiert, sondern werden erst bei erheblichem Zellstress, beispielsweise bei Befall durch einen intrazellulären Erreger oder einer schwerwiegenden genetischen Mutation, gebildet [52].

Die dritte Gruppe aktivierender Rezeptoren sind die Integrin-basierten Rezeptoren. Wichtige Vertreter sind LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) und VLA-4 (very late antigen-4) [49]. LFA-1 bindet das Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 [53]; VLA-4 hat u.a. das Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 als Ligand [54].

### **2.3.1.1 Natürliche Killer-Zellen und Endometriose**

Interessanterweise ist die Anzahl der NK-Zellen im Endometriumgewebe von bis zu 30% aller Lymphozyten höher als im peripheren Blut [55]. Diese NK-Zellen sind zudem deutlich verschieden von den NK-Zellen des peripheren Blutes. Sie besitzen ein spezifisches Rezeptorenrepertoire. Besonders viele endometriale NK-Zellen (eNK) sind NKp46 positiv [51], allerdings exprimieren sie CD16 kaum oder gar nicht [55]. Die eNK sind, verglichen mit

anderen NK-Zellen, inaktiv und werden erst nach Aktivierung durch IL-15 (Interleukin-15) aktiv [55]. Manaster et al. schließen daraus, dass es sich um eine spezielle Form der NK-Zellen handelt, welche die Einnistung einer befruchteten Eizelle erwarten und an der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz gegenüber dem wachsenden Embryo beteiligt sind.

Wenn durch retrograde Menstruation vitale Endometriumzellen über die Eileiter in den Bauchraum gelangen, so ist es Aufgabe des Immunsystems, die falsch lokalisierten Zellen zu erkennen und anschließend zu eliminieren. Retrograde Menstruation ist ein häufig zu beobachtendes Phänomen; in den meisten Fällen kommt es jedoch nicht zur Entwicklung einer Endometriose. Der genaue Mechanismus und das Zusammenspiel der verschiedenen Immunzellen ist hier nicht vollständig verstanden. Essenziell scheinen in diesem Zusammenhang jedenfalls auch die NK-Zellen zu sein [56]. Vermutlich sind sie in der Lage, die ektopischen Endometriumzellen zu erkennen, an sie zu binden und sie schließlich abzutöten. Ist dieser Vorgang gestört, können Endometriumzellen überleben, sich einnisten und später zu großen Herden heranwachsen [56]. Wie weiter oben beschrieben, besitzen v.a. die CD56dim/CD16bright-NK-Zellen starke zytotoxische Aktivität. Vermutlich ist es an dieser Untergruppe der NK-Zellen, dass die Endometriumzellen effektiv lysiert werden. In vielen Studien wurden die Zusammensetzung der beiden NK-Zell-Hauptgruppen und deren zytotoxische Aktivität im Blut und in der Peritonealflüssigkeit bei Endometriosepatientinnen untersucht und mit gesunden Frauen verglichen.

Oosterlynck et al. untersuchten in zwei Studien die zytotoxische Aktivität unter anderem von NK-Zellen aus peripherem Blut und aus der Peritonealflüssigkeit [57, 58]. Als Zielzellen wurden zum einen kultivierte Endometriumzellen, welche durch Biopsie gewonnen wurden, und zum anderen K562-Zellen verwendet. Bei Letzteren handelt es sich um myeloische, leukämische Zellen, die von zytotoxischen NK-Zellen erkannt und lysiert werden. Der 562-Assay stellt ein Standardverfahren zur Messung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen dar. In beiden Fällen werden die Zielzellen mit  $^{51}\text{Cr}$ , ein radioaktives Chrom-Isotop, markiert. Anschließend werden sie mit den NK-Zellen des MB bzw. aus venösem Blut (VB) für einige Stunden inkubiert. Aus dem Überstand wird mithilfe eines Gammazählers die Konzentration des  $^{51}\text{Cr}$  bestimmt. Wird eine mit  $^{51}\text{Cr}$  markierte Zielzelle lysiert, so gelangt das Chrom in Lösung. Die Konzentration korreliert also mit der Anzahl lysierter Zellen und damit der zytotoxischen Aktivität. In beiden Studien konnte bei Endometriosepatientinnen eine gegenüber gesunden Kontrollen signifikant verminderte zytotoxische Aktivität, sowohl gegenüber den K562-Zellen als auch gegenüber den Endometriumzellen, festgestellt werden. Die verminderte Zytotoxizität bei Endometriose war in der Peritonealflüssigkeit weitaus ausgeprägter. Im peripheren Blut korrelierte die verminderte zytotoxische Aktivität allerdings mit dem Stadium der Endometriose.

Eine Reihe weiterer Forscher kommt zu ähnlichen Ergebnissen [59–62]. Petta et al.

untersuchten die Anzahl der endometrialen NK-Zellen bei Frauen mit Endometriose und fanden heraus, dass die Zahl deutlich geringer war als bei gesunden Frauen [63]. Die verminderte zytotoxische Aktivität könnte auch eine Folge einer veränderten Expression von NK-Zell-Rezeptoren sein. Verglichen mit gesunden Frauen sind bei Endometriosepatientinnen inhibierende Rezeptoren (ITIM) deutlich stärker exprimiert als Aktivierende [64–67]. Peritoneale NK-Zellen, die NKp46-positiv sind und damit einen wichtigen aktivierenden Rezeptor exprimieren, sind im Verhältnis zu den NKp46-negativen NK-Zellen bei Endometriose vermindert [67].

Die verminderte zytotoxische Aktivität und die unterschiedlich exprimierten Rezeptoren könnten auch die Folgen einer veränderten Zusammensetzung der NK-Subpopulationen sein. Kikuchi et al. fanden heraus, dass bei Endometriosepatientinnen nach einer Operation die Anzahl der reifen CD16-positiven NK-Zellen anstieg und im Gegenzug die Zahl der unreifen CD16-negativen NK-Zellen sank [68]. Auch Funamizu et al. fanden eine signifikant verminderte Zahl an reifen, stark zytotoxischen CD56dim/NKp46+ NK-Zellen [67].

Insgesamt lässt sich festhalten, dass nach dem aktuellen Forschungsstand eine Beteiligung der NK-Zellen an der Entstehung der Endometriose als sehr wahrscheinlich angesehen werden kann. Entscheidendes Merkmal scheint die verminderte Zytotoxizität der NK-Zellen bei Endometriose zu sein.

### **2.3.2 Monozyten und Makrophagen**

Monozyten und Makrophagen gehören zum angeborenen Teil des Immunsystems. Beide sind wichtige Phagozyten (Fresszellen) und bilden zusammen das mononukleär-phagozytäre System [69]. Sie sind Produzenten einer Reihe von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  oder IL-6 [70]. Die Monozyten sind darüber hinaus in der Lage, Antigene zu präsentieren [71]. Monozyten reifen im Knochenmark aus der myeloischen Stammzellreihe heran und zirkulieren dann für einige Tage im Blut [69]. Anschließend wandern sie in Gewebe ein und werden dort zu Gewebsmakrophagen [69]. Als solche fungieren sie dann für einen Zeitraum von ca. 100 Tagen.

Monozyten gehören, wie die Lymphozyten, zu den mononukleären Zellen; als solche sind sie rundlich und besitzen einen, meist eingekerbten Zellkern. Sie sind mit ca. 20 bis 25  $\mu\text{m}$  etwas größer als die Lymphozyten [72]. Durch den Einfluss von Stress aller Art kann die Anzahl der Monozyten im Blut innerhalb von Minuten stark ansteigen, gefolgt von einem rapiden Abfall zurück auf Ausgangsniveau [71]. Die zusätzlich zirkulierenden Zellen stammen aus einem Pool sonst ruhender Monozyten im Bereich kleiner Venolen und der Milz [71]. Relativ spezifisch für Monozyten und Makrophagen ist der Oberflächenmarker CD14. Hierbei handelt es sich um ein Protein mit Rezeptorfunktion. Im Zusammenspiel mit anderen Peptiden erkennt

es unter anderem bakterielle Lipopolysaccharide [73]. Allerdings ist eine CD14-Expression auch auf dendritischen Zellen und B-Lymphozyten beschrieben [71].

Mithilfe der Durchflusszytometrie können die Blutmonozyten in folgende drei Untergruppen eingeteilt werden: Classical Monozyten (CD14<sup>high</sup>/CD16<sup>low</sup>), Intermediate Monozyten (CD14<sup>high</sup>/CD16<sup>high</sup>) und Non-Classical Monozyten (CD14<sup>low</sup>/CD16<sup>high</sup>). Man geht heute am ehesten davon aus, dass diese drei Monozyten-Subtypen verschiedene Entwicklungsstadien bzw. Lebenszyklen der Monozyten repräsentieren [74]. So treten die im Knochenmark heranreifenden Monozyten als Classical Monozyten in den Blutstrom über und entwickeln sich über mehrere Tage zu Intermediate Monozyten und schließlich zu Non-Classical Monozyten [74].

Die Classical Monozyten produzieren in großen Mengen reaktive Sauerstoffradikale und tragen in großer Zahl den Scavenger-Rezeptor auf ihrer Oberfläche [70]. Sie sind im Vergleich zu den Non-Classic Monozyten sehr aktive Phagozyten und wirken stark zytotoxisch auf Tumorgewebe [70]. Die schwach phagozytisch aktiven Non-Classical Monozyten hingegen exprimieren stärker sowohl den MHC-I-Komplex als auch den MHC-II-Komplex [69, 70]. Sie führen, anders als die Classical Monozyten, nicht zu einer T-Zell-Unterdrückung, sondern induzieren effektiv die TH1-Antwort bei viralen oder bakteriellen Infekten [70].

Nachdem die Monozyten ins Gewebe eingewandert sind, verändert sich ihre Form und die Funktion wird spezifisch an das jeweilige Gewebe angepasst [69]. Die Aufgabe der nun Makrophagen genannten Zellen besteht in der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase [69]. Dabei sind sie für die Beseitigung abgestorbener Zellmaterialien zuständig und an Reparatur und Remodeling von Geweben nach Entzündungsreaktionen beteiligt [69].

### **2.3.2.1 Monozyten und Makrophagen bei Endometriose**

Auch Monozyten und Makrophagen scheinen in ihrer Anzahl und Funktion bei Vorliegen einer Endometriose verändert zu sein. Wie Braun et al. herausfanden, unterdrücken Monozyten von gesunden Spenderinnen in vitro die Proliferation von autologem Endometriumgewebe um etwa 30% [75]. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation von Monozyten mit autologem Endometriumgewebe bei Endometriose, vom Stadium unabhängig, zu einer vermehrten Zellproliferation [75]. Den selben proliferativen Effekt auf endometriales Gewebe scheint zudem auch der Überstand kultivierter Monozyten von Spenderinnen mit Endometriose zu haben [75]. Interessanterweise haben die Monozyten von gesunden Spenderinnen auch einen suppressiven Effekt auf Endometriumzellen von Frauen mit Endometriose [75].

Es ist unklar, welche Botenstoffe und Mediatoren im Detail für diesen proliferativen Effekt verantwortlich sind. In Frage kommen unter anderem die Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ , für die

teilweise eine solche stimulierende Funktion bekannt ist (siehe Kapitel 2.4 Zytokine). Kultivierte Monozyten von Spenderinnen mit Endometriose produzieren signifikant mehr IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  [76]. Ähnliches gilt für kultivierte peritoneale Makrophagen von Frauen mit Endometriose [77].

Bedient et al. zeigten in einer Studie, dass die Monozyten bei Endometriose deutlich stärker auf chemotaktische Signale reagieren als die Monozyten gesunder Frauen. [78]. Sie isolierten dafür Monozyten aus dem peripheren Blut. Diese wurden, getrennt durch eine dünne Schicht basalmembranartiger Matrix, zusammen mit Peritonealflüssigkeit für 48 Stunden isoliert. Monozyten von Endometriosepatientinnen wanderten im Schnitt in über 10-fach größerer Zahl in die Matrix ein. Dazu passend lässt sich in der Peritonealflüssigkeit bei Frauen mit Endometriose eine erhöhte Anzahl an Makrophagen nachweisen [79].

Makrophagen sind zahlenmäßig der in der Peritonealflüssigkeit am häufigsten vertretene Zelltyp [80]. Auch in Endometrioseherden sind sie reichlich vorhanden [81]. Als Phagozyten sind sie möglicherweise, ebenso wie die NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen, mitverantwortlich für die Eliminierung verschleppter, endometrialer Zellen [80]. Trotz einer gesteigerten Anzahl und Aktivität der peritonealen Makrophagen bei Frauen mit Endometriose besitzen diese allerdings eine verminderte phagozytische Aktivität [29]. Durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine tragen die Makrophagen vermutlich zu einem verstärkten Entzündungsgeschehen bei [80]. Da Makrophagen pro-angiogenetische Eigenschaften haben, sind sie womöglich für heranwachsende und größere Herde von besonderer Bedeutung, da diese von einer gesteigerten Neovaskularisation (Gefäßneubildung) abhängig sind [81].

### **2.3.3 T-Zellen und Regulatorische T-Zellen**

Die Entstehung des adaptiven Immunsystems geschah vor etwa 500 Millionen Jahren [82]. Die B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen) bilden die beiden Hauptzellreihen des adaptiven Immunsystems.

Während sich B-Zellen nach Aktivierung zu Plasmazellen entwickeln und massenhaft spezifische Antikörper produzieren, stellen die T-Zellen die zelluläre Komponente des adaptiven Immunsystems dar. Ihre Reifung erfolgt im Thymus. Sie können anhand ihrer Expression von Zelloberflächenmolekülen in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: zytotoxische CD8+T-Zellen und CD4+T-Helferzellen [83]. Ein für T-Zellen hochspezifisches Protein, welches die Zellen auf ihrer Oberfläche exprimieren, ist das CD3. Es kann in Untersuchungen wie der Durchflusszytometrie genutzt werden, um T-Zellen spezifisch zu erkennen und von anderen Lymphozyten zu unterscheiden [84].

Die zytotoxischen CD8<sup>+</sup>T-Zellen exprimieren den CD8-Rezeptor. Dabei handelt es sich um einen Ko-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors (TCR). Der CD8-Ko-Rezeptor bewirkt eine stärkere Bindung der zytotoxischen T-Zelle an den MHC-I-Komplex antigenpräsentierender Körperzellen [85]. Grundsätzlich exprimieren alle kernhaltigen Körperzellen den MHC-I-Komplex und präsentieren den zytotoxischen T-Zellen (wie auch den NK-Zellen) auf diese Weise kontinuierlich Peptide aus dem Zellinneren [39]. Ist eine Zelle entartet oder von einem pathogenen Erreger befallen, so werden in den MHC-I-Komplex nicht-körper eigene Peptide präsentiert [86]. Der T-Zell-Rezeptor kann nun ein für ihn spezifisches körperfremdes Antigen erkennen, das die betroffene Körperzelle über den MHC-I-Komplex präsentiert. Der T-Zellrezeptor bildet zusammen mit dem CD3-Protein den sogenannten TCR/CD3-Komplex [87]. Erkennt der T-Zellrezeptor sein spezifisches, körperfremdes Antigen, so kommt es mithilfe des CD3-Proteins, welches der Signaltransduktion in der Zelle dient, zur Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen [88]. Unter anderem mithilfe von Perforin und Granzymen tötet sie nun die gebundene Zielzelle ab [89]. Wie bei den NK-Zellen wird das Perforin in die Zellmembran der Zielzelle integriert und bildet dort eine Pore, durch welche dann Granzyme ins Zellinnere gelangen und dort einen programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen. Die apoptotische Zelle wird dann rasch von phagozytischen Zellen erkannt und beseitigt [89].

Neben der Induktion der Apoptose in den Zielzellen sezerniert die zytotoxische T-Zelle nach ihrer Aktivierung Botenstoffe wie TNF- $\alpha$  oder Interferon- $\gamma$ . Letzteres beispielsweise inhibiert die virale Replikation in Virus befallenen Zellen und führt zu einer vermehrten Produktion und Expression von MHC-I-Komplexen [89]. Bei ihrer Reifung im Thymus wird sichergestellt, dass zytotoxische T-Zellen nicht körpereigene Antigene erkennen. Dort werden alle Vorläufer-T-Zellen, welche körpereigene Antigene erkennen, ausgesiebt und apoptotisch abgebaut (negative Selektion) [87].

Die zweite große Hauptgruppe der CD3<sup>+</sup>T-Zellen besteht aus den CD4<sup>+</sup>T-Zellen, den sogenannten T-Helferzellen [83]. Das Oberflächenantigen CD4 hat, ähnlich wie CD8 bei den zytotoxischen T-Zellen, eine Rezeptorfunktion. Der CD4-Rezeptor fungiert als Co-Rezeptor für den T-Zell-Rezeptor (TCR) und erkennt zusammen mit diesem den MHC-II-Komplex von spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (antigen presenting cells, APC) [90]. Zu diesen gehören in erster Linie Makrophagen, verschiedene dendritische Zellen in lymphatischen Geweben und B-Zellen [39]. Die Erkennung von spezifischen, körperfremden Antigenen durch den T-Zell-Rezeptor funktioniert nun nach Bindung an den MHC-II-Komplex ähnlich wie bei den zytotoxischen T-Zellen. Die CD4<sup>+</sup>T-Helferzellen setzen sich wiederum aus zwei Hauptzellgruppen zusammen, den Typ1-T-Helferzellen (TH1-Helferzellen) und den Typ2-T-Helferzellen (TH2-Helferzellen) [83]. Während die TH1-Helferzellen vor allem an der zellulären Immunantwort beteiligt sind, sind die TH2-Helferzellen insbesondere in die humorale Immunantwort involviert [83].



Eine weitere, kleinere Untergruppe der CD4+T-Zellen bilden die regulatorischen T-Zellen (Tregs) [83]. Sie können bereits im Thymus zu natürlichen Tregs heranreifen oder aber sich peripher aus naiven CD4+T-Zellen entwickeln (induzierte Tregs) [91]. Die Tregs spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort und bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz [92]. Sie schwächen im Allgemeinen die Immunantwort von zytotoxischen T-Zellen ab. Dabei scheinen sie mehrere Mechanismen zu verwenden, u.a. die Produktion inhibitorischer Zytokine wie IL-10, den Verbrauch aktivierender Zytokine wie IL-2, eine induzierte Lyse von zytotoxischen T-Zellen oder die Unterdrückung der Antigenpräsentation von dendritischen Zellen [92]. Tregs besitzen ein bestimmtes Repertoire an exprimierten Oberflächenproteinen. Sie gehören zur Gruppe der CD4 exprimierenden T-Zellen. Allerdings exprimieren die meisten Tregs, anders als CD4+T-Helferzellen, eine hohe Anzahl an CD25 [93, 94]. Dieses Polypeptid ist Teil des IL-2-Rezeptors und scheint ein typischer, aber nicht hochspezifischer Oberflächenmarker regulatorischer T-Zellen zu sein [95]. CD4+CD25<sup>high</sup> Zellen haben dabei eine besonders starke regulatorische Funktion [96].

Es konnte gezeigt werden, dass eine Funktionseinschränkung oder Verminderung der Anzahl von CD4+CD25<sup>+</sup> Tregs zur Entwicklung von Autoimmunerkrankheiten führt [97, 98]. Hohe Östrogenlevel erhöhen die Anzahl von CD4+CD25<sup>+</sup>Tregs und verstärken deren regulatorische Funktion [99]. Das Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von bestimmten Proteinen stimuliert. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle in Tregs [100]. Das Vorhandensein von FoxP3 ist relativ spezifisch für diese Zellen; insbesondere in Kombination mit anderen Markern lassen sich die Tregs spezifisch mithilfe von FoxP3 erkennen [101]. Die Expression von FoxP3 korreliert stark mit der immunsuppressiven Wirkung von Tregs, auch unabhängig von der CD25-Expression [102]. Die oben beschriebenen Oberflächenmarker CD4, CD25 und FoxP3 werden häufig verwendet, um spezifisch Tregs nachzuweisen, insbesondere mithilfe der Durchflusszytometrie [103, 101].

### **2.3.3.1 Endometriose und T-Zellen**

Das CD4/CD8-Verhältnis beschreibt den Quotienten aus der Anzahl der CD4+T-Zellen dividiert durch die Anzahl der zytotoxischen CD8+T-Zellen. Bei einigen Erkrankungen ist bekannt, dass das CD4/CD8-Verhältnis verringert (z.B. HIV-Infektion, exogene allergische Alveolitis) oder erhöht (z.B. rheumatoide Arthritis, Sarkoidose) sein kann. Einige Studien deuten auch bei der Endometriose auf ein verändertes Verhältnis von CD4-positiven zu CD8-positiven T-Zellen hin. Während das Verhältnis im peripheren Blut erhöht sein könnte [104], wurden in der Peritonealflüssigkeit erniedrigte Werte für das CD4/CD8-Verhältnis und eine erhöhte Anzahl an CD8+T-Zellen bei Frauen mit Endometriose gefunden [105, 106].

Slabe et al. untersuchten die zyklusabhängigen Konzentrationen von zytotoxischen CD8+T-

Zellen im peripheren Blut bei Endometriosepatientinnen und gesunden Frauen. Sie fanden heraus, dass bei gesunden Frauen die Konzentration der zytotoxischen T-Zellen in der lutealen Phase im Vergleich zur folliculären Phase deutlich ansteigt. Bei Frauen mit Endometriose war sogar eine minimale Erniedrigung in der lutealen Phase zu beobachten [107].

Weitere Studien zu zytotoxischen T-Zellen bei Endometriose zeigten eine verminderte Antwort zytotoxischer T-Zellen auf autologe endometriale Zellen, was auf eine reduzierte zytotoxische Aktivität der T-Zellen hindeutet [106]. Konno et al. vermuten, dass der programmierte Zelltod von Endometriumzellen bei der Menstruation durch die zytolytischen Proteine Perforin und Granzym B bewirkt wird. Diese Proteine werden dabei vermutlich von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen ausgeschüttet [108]. Ein ähnlicher Mechanismus könnte dafür verantwortlich sein, dass vitale Endometriumzellen, welche durch retrograde Menstruation in die Bauchhöhle gelangen, beseitigt und dadurch an der Bildung von Endometrioseherden gehindert werden.

Hinsichtlich der Beteiligung der Tregs an der Pathophysiologie der Endometriose ist die Datenlage weniger eindeutig als beispielweise bei den NK-Zellen. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass eine Mehrzahl der Studien zeigte, dass eine erhöhte Anzahl an Tregs in ektopem Endometrium und in der Peritonealflüssigkeit bei Frauen mit Endometriose im Vergleich zu gesunden Kontrollen vorliegt [109, 110]. Deutlich weniger klar ist die Datenlage bezüglich der Tregs im peripheren Blut und in ektopem Endometriumgewebe [109, 110]. Arruvito et al. fanden heraus, dass die Anzahl der FoxP3+T-Zellen im peripheren Blut bei gesunden Frauen zyklusabhängig ist. Zum Ende der folliculären Phase hin erhöht sich deren Anzahl simultan zum ansteigenden Östrogenlevel; in der lutealen Phase sinkt die Anzahl FoxP3-positiver Zellen dann wieder stark ab [111]. Wahrscheinlich bewirkt der Anstieg vor der möglichen Einnistung einer befruchteten Eizelle die nötige Immuntoleranz gegenüber der Eizelle [111, 112]. Dieser starke Anstieg an peripheren FoxP3+T-Zellen vor der Ovulation scheint bei Vorliegen einer Endometriose auszubleiben. Dies könnte auch ein Grund für eine erhöhte Infertilitätsrate sein [111]. Hingegen könnte eine über den ganzen Zyklus gleichbleibende, moderat erhöhte Anzahl an FoxP3+T-Zellen bei Endometriosepatientinnen für eine abgeschwächte Immunantwort gegenüber abgestoßenen, aber vitalen Endometriumzellen sorgen. Die abgestoßenen Zellen können sich dann an anderer Stelle des Körpers festsetzen und zu Herden heranwachsen [112, 113].

Berbic et. al untersuchten die Anzahl an Tregs in eutopischem Endometrium. Sie fanden eine signifikant erhöhte Konzentration in der sekretorischen Phase bei Endometriosepatientinnen. In der Menstruationsphase hingegen war die Anzahl von FoxP3-Zellen bei gesunden Kontrollen höher als bei Frauen mit Endometriose [114]. Zwei weitere Studien legen nahe, dass die Konzentrationen von FoxP3-mRNA bei infertilen Frauen und Frauen mit Endometriose sowohl in eutopischem als auch ektopischem Endometrium im Vergleich zu gesunden Frauen erhöht sind [115, 116].

### **2.3.4 B-Zellen und autoimmuner Charakter**

Den humoralen Teil der erworbenen Immunabwehr bilden die B-Zellen mit der Produktion der verschiedenen Antikörperklassen. Die für die Antikörperproduktion zuständigen B-Zellen reifen im Knochenmark aus einer gemeinsamen Zellreihe mit den T-Zellen und NK-Zellen heran [117]. Sie tragen Antikörperrezeptoren, mit denen sie körperfremde Antigene erkennen können. Die Rezeptoren der B-Zellen weisen aufgrund der somatischen Hypermutation eine beeindruckende Vielfalt auf [118]. Nach Kontakt mit dem entsprechenden Antigen bedürfen sie der Interaktion mit weiteren Immunzellen, beispielsweise der Aktivierung durch T-Helferzellen [119]. Daraufhin können sie sich in Plasmazellen umwandeln und produzieren in großen Mengen spezifische Antikörper [119]. B-Zellen tragen als spezifische Oberflächenmarker die Moleküle CD19 und CD20. Dadurch können sie von anderen mononukleären Zellen zuverlässig unterschieden werden [120].

#### **2.3.4.1 B-Zellen und Endometriose**

In mehreren Studien wurde untersucht, ob die Anzahl und Funktion der B-Zellen bei der Endometriose verändert ist. Während die meisten Studien eine gesteigerte Anzahl und Funktion von B-Zellen bei Endometriose fanden, stellten andere wiederum keine Unterschiede fest oder kamen sogar zu gegenteiligen Ergebnissen [121]. Im Jahr 1980 kam erstmals die Idee auf, bei der Endometriose könnte es sich um eine Erkrankung mit autoimmunem Charakter handeln [106]. Tatsächlich können bei Frauen mit Endometriose vermehrt Antikörper gegen Endometriumsgewebe nachgewiesen werden [106, 121]. Auch Antikörper gegen andere körpereigene Strukturen, die häufig bei Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden wie Anti-DNS-AK oder Anti-Phospholipid-AK, können häufig bei an Endometriose Erkrankten nachgewiesen werden [106]. Ob die vermehrte Bildung oben genannter Antikörper allerdings Ursache oder lediglich Folge der Erkrankung ist, bleibt unklar. Auch deshalb hat sich das Konzept, die Endometriose primär als Autoimmunerkrankung zu betrachten, bisher weitgehend nicht durchgesetzt [106].

## **2.4 Zytokine**

Zytokine sind immunologische Botenstoffe, welche eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Immunantwort und der Kommunikation zwischen den verschiedenen Immunzellen spielen. Chemisch handelt es sich bei den Zytokinen um Peptide. Sie entfalten ihre Wirkung meist auf Zellen in der unmittelbaren Umgebung (parakrin), können aber auch systemisch erhöht sein und so auf den gesamten Organismus wirken [122]. Es gibt sowohl proinflammatorisch wie auch antiinflammatorisch-wirkende Zytokine. Sie werden weiter in verschiedene Untergruppen

unterteilt. Darunter sind unter anderem Interleukine, Interferone und Tumornekrosefaktoren [122]. Einige Zytokine, welche möglicherweise an der Pathophysiologie der Endometriose beteiligt sind, wurden im Rahmen dieser Studie untersucht. Auf ihre mögliche Rolle im Rahmen der Endometrioseerkrankung wird in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen.

### **2.4.1 Interleukin-6**

Interleukin-6 (IL-6) ist ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin und nimmt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Immunantwort ein. Neben den Zellen des Immunsystems können auch mesenchymale, endotheliale und andere Zellen IL-6 produzieren [123]. Es wirkt anti-apoptotisch auf T-Lymphozyten und aktivierend auf B-Lymphozyten, welche von IL-6 zu gesteigerter Antikörperproduktion angeregt werden. Es stimuliert die Angiogenese und hat darüber hinaus diverse Auswirkungen auf verschiedene andere Gewebe [123]. IL-6 ist an der Pathogenese einer Reihe von Krankheiten beteiligt, darunter metabolische und maligne Erkrankungen [124].

Verschiedene Studien legen nahe, dass IL-6 auch an der Entstehung der Endometriose beteiligt ist. So fand man in mehreren Untersuchungen erhöhte Serumlevel des Zytokins bei Vorliegen einer Endometrioseerkrankung im Vergleich zu gesunden Frauen [125–130]. Wie Braun et al. zeigten, könnten die erhöhten Werte von mononukleären Zellen des peripheren Blutes stammen. Diese produzieren bei Endometriose in einer Zellkultur vermehrt IL-6 [131]. Die erhöhten Serum-Level scheinen allerdings nach einer Behandlung zu sinken. Dies gilt sowohl für medikamentöse Intervention mit Danazol oder einem GnRH-Agonisten, als auch für eine chirurgische Intervention [125, 128]. Das Absinken der Werte spiegelt also womöglich einen Therapieerfolg wider.

Die erhöhten systemischen Werte könnten unter anderem vom Endometriumgewebe selbst stammen. Tseng et al. zeigten, dass Endometriumgewebe von Endometriosepatientinnen in vitro deutlich mehr IL-6 produziert als das gesunder Kontrollen. Dabei ist die Produktion in ektopischen endometrialen Läsionen wiederum höher als in eutopischem Endometrium [132]. IL-6-mRNA-Level zeigen sich ebenfalls erhöht in endometriotischem Gewebe [133]. Noble et al. diskutierten einen möglichen Zusammenhang zwischen erhöhten IL-6-Leveln und einer erhöhten Aromatase-Aktivität im Endometrium. So könnte IL-6 einen stimulierenden Effekt auf die lokale Östrogenproduktion haben und auf diese Weise eine Schlüsselrolle beim Zusammenspiel zwischen Immunsystem und endokrinem System einnehmen [31].

Es wird zudem über eine embryotoxische Wirkung von IL-6 diskutiert [134, 135]. In vitro hemmt IL-6 die Entwicklung von befruchteten Eizellen bei Mäusen [136]. Somit könnten erhöhte IL-6-Level für die erhöhte Infertilitätsrate bei Endometriose mitverantwortlich sein.

Auch in der Peritonealflüssigkeit wurden erhöhte Konzentrationen von IL-6 gefunden [137]. Kang et al. zeigten einen hemmenden Effekt von Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen auf die Funktion natürlicher Killerzellen [137]. Die Konzentration von IL-6 korrelierte dabei negativ mit der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen. So stieg u.a. der Anteil von CD56+NK-Zellen, welche als unreife Vorläuferzellen gelten. Die NK-Zellen bildeten weniger zytotoxische Granula wie Granzym B oder Perforin und exprimierten vermehrt inhibitorische Rezeptoren (KIR). Durch die Zugabe von Anti-IL-6-Antikörpern, welche den Einfluss von IL-6 hemmen, konnte die zytotoxische Aktivität wiederhergestellt werden [137].

### 2.4.2 Interleukin-8

Das Zytokin Interleukin-8 (IL-8) ist ein Entzündungsmediator und spielt eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis [138]. Es wirkt vor allem auf neutrophile Granulozyten, die es aktiviert und zum Ort der Entzündung lockt [138]. IL-8 wird unter anderem von Monozyten und Makrophagen produziert [138].

Auch im Endometriumgewebe wird IL-8 produziert [139]. Es induziert dort dosisabhängig eine verstärkte DNA-Synthese und Proliferation und fungiert so möglicherweise als autokriner Wachstumsfaktor [140]. Auch auf Zellen aus endometriotischen Herden wirkt IL-8 wachstumsstimulierend [141]. IL-8 erhöht zudem die Fähigkeit von Endometriumgewebe an Fibronectin zu binden und könnte deshalb das Anheften von verschleppten Zellen ans Peritoneum stimulieren [142]. Diese Auswirkungen auf Endometriumzellen lassen vermuten, dass IL-8 auch am pathophysiologischen Prozess der Endometriose beteiligt sein könnte. Tatsächlich legen eine Reihe von Studienergebnissen diese Hypothese nahe [143].

Beispielsweise zeigten Ulukus et al., dass die IL-8 Konzentrationen in eutopischem Endometrium bei Frauen mit Adenomyosis uteri (einer speziellen Form der Endometriose) höher war als bei gesunden Frauen [144]. Von einigen Autoren wurden auch erhöhte Konzentrationen von IL-8 in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose beschrieben [141, 145, 146]. In einer Untersuchung von Iwabe et al. waren die Konzentrationen von IL-8 bei Vorliegen einer Endometriose nicht nur signifikant erhöht, die IL-8-Konzentrationen korrelierten zudem mit dem Stadium der Endometriose [141].

In einer weiteren Studie wurde beobachtet, dass mononukleäre Zellen des peripheren Blutes von Frauen mit Endometriose signifikant mehr IL-8 produzieren als die gesunder Kontrollen [131]. Eine mögliche Folge könnten die in der Literatur beschriebenen, erhöhten IL-8-Serumkonzentrationen im peripheren Blut von Frauen mit Endometriose sein [147, 146]. In einer weiteren Studie fielen zwei Wochen nach einer laparoskopischen Herdresektion die Plasma-IL-8-Werte signifikant, was auf ein durch die Operation verändertes Entzündungsprofil hindeutet. Allerdings stiegen die Werte drei Monate nach Resektion wieder an und glichen sich

so den Ausgangswerten an [148].

### **2.4.3 Tumornekrosefaktor- $\alpha$**

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gehört ebenfalls zur Gruppe der proinflammatorischen Zytokine. Gebildet wird er hauptsächlich von aktivierten Makrophagen. Seine Funktionen sind vielfältig. Je nach Zielgewebe kann er sowohl zu einer Zellproliferation führen als auch gezielt eine Apoptose einleiten. TNF- $\alpha$  stimuliert die Ausschüttung einer Reihe weiterer Zytokine und fördert die Angiogenese [149]. Entscheidende Bedeutung hat TNF- $\alpha$  bei der Infektionsabwehr und bei der Bekämpfung von Tumorgewebe [150].

Zhang et al. zeigten, dass TNF- $\alpha$  in der Zellkultur zu einem verstärkten Anhaften von Endometriumsgewebe an peritoneales Mesothel führt [151]. Dieses Anhaften ist mutmaßlich ein wichtiger Schritt bei der Entstehung von peritonealen Herden. Weiterhin hat TNF- $\alpha$  einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation von endometriotischem Gewebe. In der Zellkultur zeigt sich bei Zugabe von TNF- $\alpha$  ein signifikant vermehrtes Zellwachstum und eine erhöhte DNA-Synthese [149]. Seine proliferative Wirkung könnte TNF- $\alpha$  unter anderem über Interleukin-8 vermitteln. Endometriotische Zellen produzierten in der Zellkultur dosisabhängig mehr IL-8 nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  [149]. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass die proliferationsfördernden Effekte von TNF- $\alpha$  auf endometriales Gewebe durch die Zugabe von Anti-IL-8-Antikörpern ausbleiben [149]. Neben der IL-8-Produktion stimuliert TNF- $\alpha$  auch die IL-6-Produktion in endometriotischen Zellen [133].

Die Ergebnisse mehrerer Studien legen die Vermutung nahe, dass veränderte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen mit dem Auftreten einer Endometriose assoziiert sind. Richter et al. fanden nicht nur erhöhte Werte für TNF- $\alpha$  in der Peritonealflüssigkeit, sondern stellten zudem eine Korrelation mit dem Krankheitsstadium fest [152]. Auch die Serumlevel von TNF- $\alpha$  waren in einigen Studien bei Frauen mit Endometriose im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht [153–155]. In einer Interventionsstudie von Matalliotakis et al. zeigten sich die zunächst erhöhten Serumlevel nach einer Behandlung mit Danazol rückläufig [154].

Wie bereits oben angedeutet, sind möglicherweise die Monozyten des venösen Blutes und die Makrophagen der Bauchhöhle für diese erhöhten Level verantwortlich. Bei Vorliegen einer Endometriose sezernieren beide Zelltypen in der Zellkultur mehr TNF- $\alpha$  als die Zellen gesunder Frauen [77, 131].

## 2.5 Zelladhäsionsmoleküle

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die an der Pathophysiologie beteiligt zu sein scheinen oder bei Endometriose in veränderter Konzentration vorliegen, sind die beiden Zelladhäsionsmoleküle Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und Vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1). Beide gehören der Superfamilie der Immunglobuline an und bilden als Teil des Cluster of 'Differentiation' die Oberflächenantigene CD54 (ICAM-1) und CD106 (VCAM-1).

Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr, beim Entzündungsprozess und auch bei der Entstehung und Metastasierung von Krebszellen [156]. So fanden beispielsweise Jung et al. in Magenkrebsgewebe erhöhte ICAM-1-Werte und diese korrelierten wiederum mit einem aggressiveren Tumortyp, größerer Eindringtiefe des Tumors und einem insgesamt schlechteren Outcome mit verringertem 3-Jahres-Überleben [157].

### 2.5.1 ICAM-1

ICAM-1 vermittelt wichtige Zell-Zell-Kontakte im Bereich des Immunsystems. Es ist unter anderem Teil des LFA1-ICAM-1-Signalwegs. LFA1, auch lymphocyte function-associated antigen, wird von Lymphozyten exprimiert und kann über ICAM-1-vermittelten Zellkontakt an mögliche Zielzellen binden. ICAM-1 fungiert hier also als Ligand für LFA1 [158]. Auf diese Weise können Zellen, welche ICAM-1 auf ihrer Oberfläche exprimieren, als mögliche Zielzellen von B- und T-Zellen oder Natürliche Killer-Zellen erkannt werden.

Lösliches ICAM-1 (sICAM-1) scheint hingegen einen hemmenden Einfluss auf die NK-Zell-Aktivität zu haben. So konnten Fukaya et al. zeigen, dass die Aktivität von kultivierten NK-Zellen durch Zugabe von rekombinantem und peritonealem sICAM-1 deutlich unterdrückt wird [159]. Somigliana et al. zeigten ebenfalls einen hemmenden Einfluss von erhöhten sICAM-1-Werten auf die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität in der Zellkultur [160]. Das lösliche ICAM-1 konkurriert möglicherweise mit den ICAM-1 exprimierenden Zellen als Ligand für das LFA1, sodass diese weniger effektiv als Zielzellen von NK-Zellen erkannt werden können und die Lyse-Rate abnimmt. Auf diese Weise können Zellen durch Ausschüttung von löslichem ICAM-1 die Immunüberwachung teilweise umgehen oder zumindest abschwächen [29].

#### 2.5.1.1 ICAM-1 und Endometriose

Bei Frauen mit Endometriose sind von verschiedenen Autoren veränderte Werte für ICAM-1 gemessen worden. Ein Hauptbildungsort des löslichen ICAM-1 ist endometriales Stromagewebe. Somigliana et al. untersuchten die sICAM-1 Ausschüttung von kultivierten

Endometriumzellen. Die Werte für sICAM-1 im Überstand der Zellkulturen waren für fortgeschrittene Stadien der Endometriose höher als bei Frauen ohne Endometriose [160].

In der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen wurden ebenfalls erhöhte Werte für sICAM-1 gefunden [159]. Endometriumgewebe, welches durch retrograde Menstruation in die Bauchhöhle gelangt, könnte also durch die vermehrte Ausschüttung von löslichem ICAM-1 die Immunüberwachung u.a. durch NK-Zellen umgehen und so das Überleben außerhalb des Uterus ermöglichen [160]. Aber nicht nur in der Peritonealflüssigkeit wurden auffällige ICAM-1-Konzentrationen gefunden. Kuessel et al. fanden erhöhte ICAM-1-mRNA-Levels in ektopen Endometrioseherden verglichen mit eutopischem Endometriumgewebe bei Endometriosepatientinnen. Auch im nicht-endometriotischen Peritoneum fanden sich bei Frauen mit Endometriose erhöhte ICAM-1-mRNA-Werte im Vergleich zu gesunden Kontrollen [161].

Bezüglich der Konzentration von sICAM-1 im peripheren Blut sind in der Literatur allerdings gegenläufige Ergebnisse zu finden. Kuessel et al. fanden im Vergleich zu Patientinnen ohne Endometriose erniedrigte Werte [161]. Barrier et al. fanden ebenfalls erniedrigte Werte für lösliches ICAM-1 im peripheren Blut [162]. Aber auch erhöhte Werte im Vergleich zu Frauen ohne Endometriose wurden von mehreren Autoren beschrieben [163–165].

### **2.5.2 VCAM-1**

Das Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 wird überwiegend auf endothelialen Zellen exprimiert. Das VCAM-1-Protein vermittelt die Adhäsion von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten an das Gefäßendothel und dient im Falle einer Zellbindung der Signaltransduktion in die Zelle [166]. Liganden des VCAM-1 sind verschiedene Integrine wie beispielsweise Integrin  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4), welche vor allem von den genannten Immunzellen exprimiert werden. Bindet nun eine Immunzelle an endotheliales VCAM-1, kommt es in der Endothelzelle zu einem aktivierenden Signal. Auf dieses Signal hin bilden sich in der Umgebung kleine interzelluläre Zwischenräume, die von den Leukozyten als Passagemöglichkeit genutzt werden können, um vom Gefäßsystem ins Gewebe einzuwandern [166]. Dieser Mechanismus ist essentiell bei der Einwanderung von Immunzellen an Orte einer entzündlichen Reaktion, auch Chemotaxis genannt [166]. Die endotheliale Expression von VCAM-1 wird durch verschiedene Faktoren stimuliert, darunter verschiedene Zytokine oder die Aktivierung von endothelialen Toll-Like-Rezeptoren [166].

Durch neuere Studien wird zunehmend auch die Beteiligung von VCAM-1 an der Tumormetastasierung und Tumervaskularisierung deutlich [167]. Beide Mechanismen sind auch bei der Entstehung und dem Wachstum von Endometrioseherden wichtig, weshalb eine pathophysiologische Beteiligung von VCAM-1 bei der Entstehung der Endometriose



angenommen wird.

### **2.5.2.1 VCAM-1 und Endometriose**

Einige Studien untersuchten mögliche Zusammenhänge zwischen VCAM-1 und dem Vorliegen einer Endometriose. Und tatsächlich scheinen bei der Endometriose veränderte Werte für VCAM-1 vorzuliegen. Wie für ICAM-1 zeigten sich auch für VCAM-1 erhöhte mRNA-Level in verschiedenen Geweben bei Frauen mit Endometriose [161]. So sind unter anderem die mRNA-Level in eutopischem Endometriumgewebe bei Frauen mit Endometriose im Vergleich zu Frauen ohne Endometriose erhöht [161]. Anders als bei ICAM-1 fanden bisherige Studien jedoch erhöhte Werte für lösliches VCAM-1 im peripheren Blut von Frauen mit Endometriose [162, 161, 165]. Bei Kuessel et al. korrelierten diese allerdings nicht mit dem Schweregrad der Endometriose [161]. Kuessel et al. diskutierten die VCAM-1/ICAM-1-Ratio als einen möglichen Biomarker für die Endometriose. In ihrer Untersuchung konnte damit eine AUC (Prediction Accuracy) von 0,929 erreicht werden [161].

## 2.6 Menstruationsblut

Eine Forschungsgruppe um RG van der Molen untersuchte in einer Studie die immunologische Zusammensetzung von MB und verglich verschiedene immunologische Parameter des MB mit korrespondierenden Parametern in VB und Endometriumgewebe [168]. Untersucht wurden u.a. die mononukleären Zellen. So fand sich im MB ein höherer Anteil an NK-Zellen und eine erniedrigte Anzahl an T-Zellen als im peripheren Blut. Bei genauerer Analyse der NK-Zellen zeigte sich, dass diese im MB mehrheitlich CD56bright/CD16<sup>-</sup> waren. Diese Zellen gelten als unreife NK-Zellen [45]. Im VB fanden sich hingegen v.a. CD56dim/CD16<sup>+</sup>NK-Zellen. Des Weiteren exprimierten die menstrualen NK-Zellen CD103 und wiesen ein für endometriale Zellen typisches Muster an NK-Zell-Rezeptoren auf. Insgesamt kamen van Molen et al. zu dem Schluss, dass das MB in der Zusammensetzung der mononukleären Zellen dem Endometrium sehr ähnlich und vom peripheren Blut deutlich verschieden ist. Wegen dieser immunologischen Ähnlichkeiten zwischen MB und Endometriumgewebe wurden in der vorliegenden Studie nicht nur Immunparameter des VB, sondern auch des MB untersucht. Auf diese Weise soll eine tiefere und umfassendere Analyse der immunologischen Veränderungen bei Endometriose möglich sein. Dieser Ansatz wurde bei Endometriose bisher nur äußerst selten beschrieben und könnte eine vielversprechende, nicht-invasive Möglichkeit in der Erforschung und Diagnostik der Endometriose darstellen.

### **3 Fragestellung und Ziele der Arbeit**

Ziel dieser Pilotstudie war es, potenzielle immunologische Veränderungen im VB und MB bei an Endometriose erkrankten Frauen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobandinnen zu untersuchen. In der Literatur sind wesentliche Unterschiede vor allem für venöses Blut und die Peritonealflüssigkeit beschrieben. Der aktuelle Forschungsstand zu möglichen immunologischen Veränderungen im MB ist äußerst gering. Da MB in erster Linie endometriale Lymphozytenformen enthält, ergibt sich durch die Sammlung von MB eine nicht-invasive Möglichkeit zur Beurteilung der immunologischen Besonderheiten und Charakteristika im Endometrium. Im Fokus standen dabei vor allem die Verteilung und Subtypisierung der großen mononukleären Zelltypen (Monozyten, B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen) sowie deren phänotypischen Ausprägungen (Expression von Oberflächenmolekülen). Des Weiteren wurden mittels der ELISA-Methode Zytokinkonzentrationen (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) und die Konzentrationen von Zelladhäsionsmolekülen (ICAM-I, VCAM) sowohl im Plasma des VB als auch des MB bestimmt. Als zusätzliche Fragestellung ergab sich die Analyse möglicher Unterschiede zwischen den mononukleären Zellen des VB und denen des MB. Auch hier ist der aktuelle Forschungsstand gering und es bedarf weiterer Studien. Durch diese Studie soll ein Beitrag zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie der Endometriose geleistet werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Probandinnen

Zwischen Januar 2018 und August 2019 wurden in diese monozentrische Studie insgesamt 12 Frauen mit Endometriose sowie 11 gesunde Frauen als Kontrollen eingeschlossen. Die Rekrutierung der Endometrioseprobandinnen erfolgte zum einen direkt über die Praxen der Kooperationspartner der Studie (Dr. med. Annemarie Schweizer-Arau, PD. Dr. med. Roxana Popovici), zum anderen durch Online-Plattformen von Selbsthilfegruppen, den Probandenverteiler der LMU und Aushängen an schwarzen Brettern. Die gesunden Kontrollpersonen wurden mittels Aushängen an schwarzen Brettern und über Online-Plattformen an Hochschulen rekrutiert. Die Teilnahme erfolgte freiwillig nach Kontaktaufnahme der Teilnehmerinnen mit dem Studienteam. Waren die Einschlusskriterien erfüllt und lagen zudem keine Ausschlusskriterien vor, so wurden die Teilnehmerinnen in die Studie eingeschlossen.

Für alle Probandinnen galten folgende Einschlusskriterien:

- Alter: 18 bis 45 Jahre
- Regelmäßiger Zyklus
- Ausreichende Deutschkenntnisse
- Freiwillige Teilnahme nach Aufklärung über Nutzen und Risiko der Untersuchung
- Schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme und Datenerhebung

Zusätzliche Einschlusskriterien für Endometrioseprobandinnen waren:

- Histologisch gesicherte Endometriose
- Schmerzniveau an den Tagen 1-5 der letzten Periode: Dysmenorrhoe  $\geq 5$  auf einer Skala von 0 (gar kein Schmerz) bis 10 (maximal vorstellbarer Schmerz)

Für die Probandinnen beider Gruppen galten folgende Ausschlusskriterien:

- Einnahme von Psychopharmaka bzw. manifeste psychische Erkrankung
- Einnahme von Hormonpräparaten innerhalb der letzten zwei Monate
- Maligne Grunderkrankung
- Schwangerschaft/Stillzeit
- Akut behandlungsbedürftiger Befund bei gynäkologischer Eingangsuntersuchung

Zusätzliches Einschlusskriterium für gesunde Kontrollen:

- Schmerzniveau an den Tagen 1-5 der letzten Periode: Dysmenorrhoe  $\leq 2$  auf einer Skala von 0 (gar kein Schmerz) bis 10 (maximal vorstellbarer Schmerz)

Bei Interesse der Probandinnen wurden in einem ersten Telefonat die oben genannten Kriterien abgefragt. Daraufhin begannen die Probandinnen am ersten Tag der Periode mit dem Ausfüllen des Onlinetagebuches. Es folgte der gynäkologische Untersuchungstermin in der Praxis von PD. Dr. med. Roxana Popovici. Waren alle Einschlusskriterien erfüllt und lagen überdies keine Ausschlusskriterien vor, konnten die Probandinnen in die Studie eingeschlossen werden. Demographische Angaben wurden mithilfe eines Fragebogens am ersten Untersuchungstag erhoben (Alter, Gewicht, Größe, höchster Bildungsabschluss, aktueller Beziehungsstatus).

## 4.2 Ablauf der Untersuchungen

Zu Beginn füllten alle Teilnehmerinnen täglich ein Onlinetagebuch über mindestens einen Menstruationszyklus aus. Dort wurden die tagesaktuelle Schmerzsymptomatik sowie weitere Faktoren zur Lebensqualität abgefragt. Mit Einsetzen der Periodenblutung erfolgte die Probengewinnung des MB mithilfe einer sogenannten Menstruationstasse. Anschließend und noch während der Periode erfolgte dann der Untersuchungstermin am Institut für medizinische Psychologie. Hierbei erfolgte zunächst die Übergabe des gesammelten MB. Danach wurde durch Punktion einer Vene in der Ellenbeuge das VB gewonnen. Es folgte eine EKG-Untersuchung zur Herzfrequenzvarianzanalyse (Ergebnisse nicht dargestellt). Anschließend erfolgte das Ausfüllen der Fragebögen und die Schmerzzeichnung sowie das Interview mit offenen Fragen (Ergebnisse nicht dargestellt).

## 4.3 Probengewinnung

Die Probandinnen sammelten jeweils am ersten Tag ihrer Periode für 2 mal 12 Stunden mithilfe sogenannter Menstruationstassen (auch Mooncups genannt) das MB. Diese sind aus flexiblem Silikon und werden vaginal eingeführt. In einer früheren Studie beschrieben 8 von 9 Probandinnen die Menstruationstassen als akzeptabel [169]. Außerdem zeigte sich, dass das so gesammelte MB vitale Endometriumzellen beinhaltet und diese für in vitro Untersuchungen geeignet waren. Jeweils unmittelbar im Anschluss an das Sammeln des MB, überführten die Patientinnen das Blut aus den Menstruationstassen in einen vorbereiteten Becher, welcher 10ml eines speziellen Mediums enthielt. Zur Vorlage diente hierfür eine Studie von van der

Molen et al., in der MB auf vitale mononukleäre Zellen untersucht wurde. Als Grundlage wurde RPMI-1640-Medium der Firma Life Technologies GmbH aus Darmstadt verwendet, ein Zellkulturmedium v.a. für Leukozyten. Ergänzt wurde das Medium durch folgende Substanzen (ebenfalls von Life Technologies GmbH, die Angaben jeweils in Volumenprozent):

- § 1% Pyruvat (als alternative Energiequelle zur Glucose)
- § 1% GlutaMax (verbesserte Zellviabilität, Elimination von giftigem Ammoniak)
- § 1% Penicillin/Streptomycin (antibiotische Wirkung)
- § 0,5% Na-Citrat 60% (Säurepufferung)

Nach Zusammenführung mit dem oben beschriebenen Medium wurde das MB bei Raumtemperatur gelagert. Am 2.-4. Tag der Periode kamen die Probandinnen dann zum Untersuchungstermin an das Institut. Hier erfolgte die Übergabe des MB an das Studienteam, sowie die venöse Blutabnahme aus einer Vene in der Armbeuge. Es wurden pro Studienteilnehmerin ca. 25 ml Blut in EDTA-Röhrchen abgenommen. Am selben Tag erfolgte die Weiterverarbeitung des Blutes. Das MB wurde quantifiziert und optisch hinsichtlich der folgenden Kriterien beurteilt: Viskosität (Zähflüssigkeit), Koagulation (Blutgerinnung), Gewebepartikel und Zellyse. Letzteres wurde anhand der Farbe (weniger rötlich, stärker rötlich) des Zellüberstandes nach Zentrifugation beurteilt. Insgesamt erfolgte die Beurteilung mithilfe einer ordinalen Skala durch die Vergabe einer Zahl zwischen 0 (trifft gar nicht zu) und 3 (trifft sehr stark zu). Im Anschluss wurde das MB zuerst durch 70µm feine Zellsiebe und anschließend durch 40µm Zellsiebe gefiltert (Firma: OMNILAB-LABORZENTRUM GmbH & Co.Kg). Dadurch wurden Mukosagewebe und größere Zellklumpen herausgesiebt.

Am Helmholtz-Zentrum München („Immunoanalytics-Core Facility“) wurden dann aus dem gefilterten MB und dem VB die zu untersuchenden mononukleären Zellen gewonnen. Die mononukleären Zellen sind rundliche Blutzellen mit einem rundlichen Zellkern. Sie setzen sich aus myeloischen Zellen (v.a. Monozyten), T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen zusammen. Die Isolation dieser Zellen erfolgt mithilfe einer Dichtegradientenzentrifugation. Dabei wird das Blut zusammen mit Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (Handelsname Ficoll-Plaque) in einem konischen Zentrifugenröhrchen („Falcon Tube“) zentrifugiert. Die Zentrifugation bewirkt die Bildung verschiedener Schichten („Layer“). Die mononukleären Zellen sammeln sich dabei in einem eigenen Layer und werden so von den Erythrozyten und Granulozyten separiert. Nach der Isolierung der mononukleären Zellen wurde die Anzahl der isolierten, vitalen Zellen mithilfe von Trypanblau bestimmt. Diese Substanz wird von toten Zellen aufgenommen und diese färben sich daraufhin blau. Vitale Zellen hingegen nehmen kein Trypanblau auf und können so von den toten Zellen unterschieden werden [170]

Nach der Isolation der vitalen mononukleären Zellen mithilfe der Dichtegradienten-

zentrifugation wurden diese anschließend mit dem Cell-Freezing-Medium DMSO (Dimethylsulfoxid) bis zur Untersuchung mittels Durchflusszytometrie weggefroren.

Kleinere Teile des MB und des VB wurden zudem 15 min bei 4° Celsius und 1.000 bzw. 3.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand des Zentrifugats abpipettiert und aliquotiert. Die Aliquots wurden unmittelbar im Anschluss bei -20° bzw. -80° Celsius weggefroren. Aus diesen Proben wurden nach Abschluss der Probengewinnung die Konzentrationen der Zelladhäsionsmoleküle und Zytokine mittels ELISA („Enzyme-linked-immunosorbent-Assay“) bestimmt.

## **4.4 Durchflusszytometrie**

### **4.4.1 Die Methode Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist eine effektive Analyseverfahren zur Quantifizierung verschiedener Zelltypen und deren Untersuchung auf bestimmte Zelleigenschaften wie der Expression verschiedener Oberflächenantigene. Die technische Durchführung der Untersuchungen wurde am Helmholtz-Zentrum München, Immunoanalytics-Core Facility, unter der Leitung von Prof. Dr. Elfriede Nößner umgesetzt. Der grundsätzliche Ablauf der Untersuchung soll im Folgenden kurz skizziert werden.

Die vitalen mononukleären Zellen werden zuerst mit speziellen Antikörpern inkubiert, welche gegen bestimmte Oberflächenantigene oder auch Strukturen im Zellinneren gerichtet sind. Trägt eine Zelle ein spezifisches Antigen, so bindet der entsprechende Antikörper. Je stärker das Antigen von der Zelle exprimiert wird, desto mehr entsprechende Antikörper binden an eine einzelne Zelle. Diese Antikörper wiederum sind mit speziellen Fluoreszenzmolekülen markiert. Trifft weißes Licht auf diese Moleküle, absorbieren diese das Licht teilweise und speichern für sehr kurze Zeit die Energie durch elektronische Übergänge. Das Molekül befindet sich nun in einem angeregten Zustand. Durch Aussendung von Licht mit einer spezifischen Wellenlänge kehrt das Molekül anschließend wieder in seinen energetisch ursprünglichen Zustand zurück.

Bei der Durchflusszytometrie macht man sich dieses Prinzip (Aussendung von Licht mit einer spezifischen Wellenlänge) zu Nutze. Die in Flüssigkeit suspendierten und mit Antikörpern markierten Zellen werden in einer Art Zelltrichter vereinzelt und fließen dann einzeln am Messpunkt vorbei [171]. Nun wird die Zelle kurz mit weißem Licht angestrahlt. Es können jetzt die beiden Streuungen, Vorwärtsstreuung (FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC), gemessen werden. Die Vorwärtsstreuung gibt vornehmlich Auskunft über die Zellgröße, die Seitwärtsstreuung hingegen nimmt mit der strukturellen Komplexität des Zellinneren zu [171]. Zudem sendet die Zelle je nach Antikörperbeladung über den oben beschriebenen

Fluoreszenzmechanismus Licht in spezifischen Wellenlängen aus. Dieses Licht wird nun über Spiegel und Filter zu dem für die jeweilige Wellenlänge spezifischen Detektor geleitet und von diesem registriert [171]. Die auf die jeweiligen Detektoren treffenden Photonen werden dort in elektrische Signale umgewandelt und mithilfe einer speziellen Software ausgewertet [171]. Die Aussendung des Fluoreszenzlichts hat zwar ihr Maximum bei einer spezifischen Wellenlänge, allerdings werden auch kleine Mengen Licht im Umgebungsbereich dieser spezifischen Wellenlänge ausgesendet. So kann es hinsichtlich der Wellenlängen zu kleinen Überschneidungen mit anderen Fluoreszenzmarkern kommen. Deshalb müssen zusätzliche Messungen mit Standardfärbungen durchgeführt werden. Diese Standards sind meist mit nur einem Antikörper markiert. Auf diese Weise können mögliche Überschneidungen der verschiedenen Fluoreszenzmarker bestimmt werden und anschließend kompensatorisch aus Messungen herausgerechnet werden [171]. Auf die oben beschriebene Weise kann für jede Zelle die Beladung mit verschiedenen Antikörpern in nur einem Messdurchgang ermittelt werden. Je mehr eines bestimmten Antigens die Zelle auf ihrer Oberfläche trägt, desto mehr Antikörper binden an die Zelloberfläche. Je mehr Antikörper wiederum an die Zelle gebunden sind, desto mehr Fluoreszenzlicht in einer spezifischen Wellenlänge sendet die Zelle beim Messvorgang aus. Neue Geräte können die Zellen auf eine Vielzahl verschiedener Antigene simultan testen. Ein Messdurchgang wird Panel genannt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt anschließend vor allem durch sogenannte Dotplots. Diese erlauben zusätzlich eine übersichtliche graphische Darstellung der Ergebnisse.

#### 4.4.2 Verwendete Antikörper

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 13 verschiedene Antikörper verwendet. Die Messung war aufgeteilt in zwei verschiedene Messdurchgänge mit 7 (Panel 1, siehe Tabelle 1) bzw. 8 Antikörpern (Panel 2, siehe Tabelle 2). In Panel 1 lag der Fokus in erster Linie auf den NK-Zellen und den myeloischen Zellen/Monozyten. In Panel 2 wurden insbesondere die T-Zellen genauer untersucht. Die beiden nachfolgenden Tabellen (Tabelle 1 und 2) geben jeweils einen Überblick über die spezifische Funktion der eingesetzten Antikörper.

*Tabelle 1: Antikörper des Panel 1: Funktion bzw. Aussagekraft*

<b>Antikörper</b>	<b>Funktion / Aussagekraft</b>
<i>CD14</i>	v.a. ein Marker für Monozyten
<i>CD3</i>	ein T-Zell-spezifisches Oberflächenantigen



<i>CD56</i>	ein Zelladhäsionsmolekül; wird unter den mononukleären Zellen in erster Linie von den NK-Zellen exprimiert
<i>CD16</i>	ein Fc-Rezeptor; Marker u.a. für zytotoxische Aktivität
<i>NKp46</i>	ein Oberflächenrezeptor der NK-Zellen
<i>CD69</i>	ein Oberflächenmarker, der u.a. nach Aktivierung exprimiert wird
<i>CD19/20</i>	ein spezifischer Marker für B-Lymphozyten

*Tabelle 2: Antikörper des Panel 2: Funktion bzw. Aussagekraft*

<b>Antikörper</b>	<b>Funktion / Aussagekraft</b>
<i>CD14</i>	v.a. ein Marker für Monozyten
<i>CD56</i>	ein Zelladhäsionsmolekül; wird unter den mononukleären Zellen in erster Linie von den NK-Zellen exprimiert
<i>CD3</i>	ein T-Zell-spezifisches Oberflächenantigen
<i>CD8</i>	ein Co-Rezeptor des T-Zellrezeptors, exprimiert von zytotoxischen T-Zellen
<i>CD4</i>	ein Co-Rezeptor des T-Zellrezeptors, exprimiert von T-Helferzellen
<i>CD25</i>	ein Zytokinrezeptor, wird u.a. von Tregs exprimiert
<i>FoxP3</i>	ein Transkriptionsfaktor im Zellinneren; ein spezifischer Marker für Tregs
<i>Perforin</i>	ein zytolytisches Protein in intrazellulären Granula; Maß für die Zytotoxizität von T-Zellen und NK-Zellen

#### **4.4.3 Gating-Strategie**

Neben den spezifischen Antikörpern wurden unspezifisch-bindende Antikörper als sogenannte Isotyp-Kontrollen verwendet. Dabei handelt es sich um Antikörper, von welchen angenommen wird, dass sie keines der auf den Zellen vorkommenden Antigene spezifisch binden. Sie besitzen dieselben Fluoreszenzeigenschaften wie die spezifischen Antikörper. Mit ihrer Hilfe kann das Ausmaß einer unspezifischen Bindung von Antikörpern an die Zellen bestimmt

werden. Sie stellen also eine Art Negativkontrolle dar. Die Isotyp-Kontrollen wurden vor allem beim Gating verwendet, um die Grenze zwischen Antigen-positiven und Antigen-negativen Zellen zu bestimmen. Die Analyse der Durchflusszytometrie-Daten (das Gating) erfolgte mit dem Programm FlowJo Version 10.6.2.

In einem ersten Gating-Schritt wurden Zelltrümmer und -fragmente (sogenannte Debris) unter Verwendung von FSC und SSC aus der weiteren Auswertung entfernt. Debris weist niedrige Werte beim FSC auf und befindet sich demnach in den klassischen Dotplots am linken Rand, siehe Abbildung 1. Anschließend wurden tote Zellen unter Zuhilfenahme der Live-Dead-Blue-Färbung ebenso ausgeschlossen wie nicht-vereinzelte Zellen. In den nächsten Schritten wurden die großen Zellgruppen (B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen und myeloische Zellen) unterschieden. Der CD19/CD20-Antikörper differenziert zwischen B-Zellen und anderen mononukleären Zellen. Die Nicht-B-Zellen wurden dann mithilfe des CD3-Antikörpers in CD3+T-Zellen und CD3-negative Zellen unterteilt (CD14-CD3-Dotplot). Mithilfe der CD4- und CD8-Antikörper wurden die CD3+T-Zellen in die beiden großen Untergruppen, die zytotoxischen CD8+T-Zellen und die CD4+T-Helferzellen, eingeteilt. Die Nicht-T-Zellen wurden weiter in NK-Zellen (CD56+) und myeloische Zellen (CD14+) aufgeteilt. Diese vier großen Hauptzellgruppen wurden anschließend hinsichtlich Subpopulationen, Zelloberflächenmarkern und intrazellulären Proteinen analysiert.

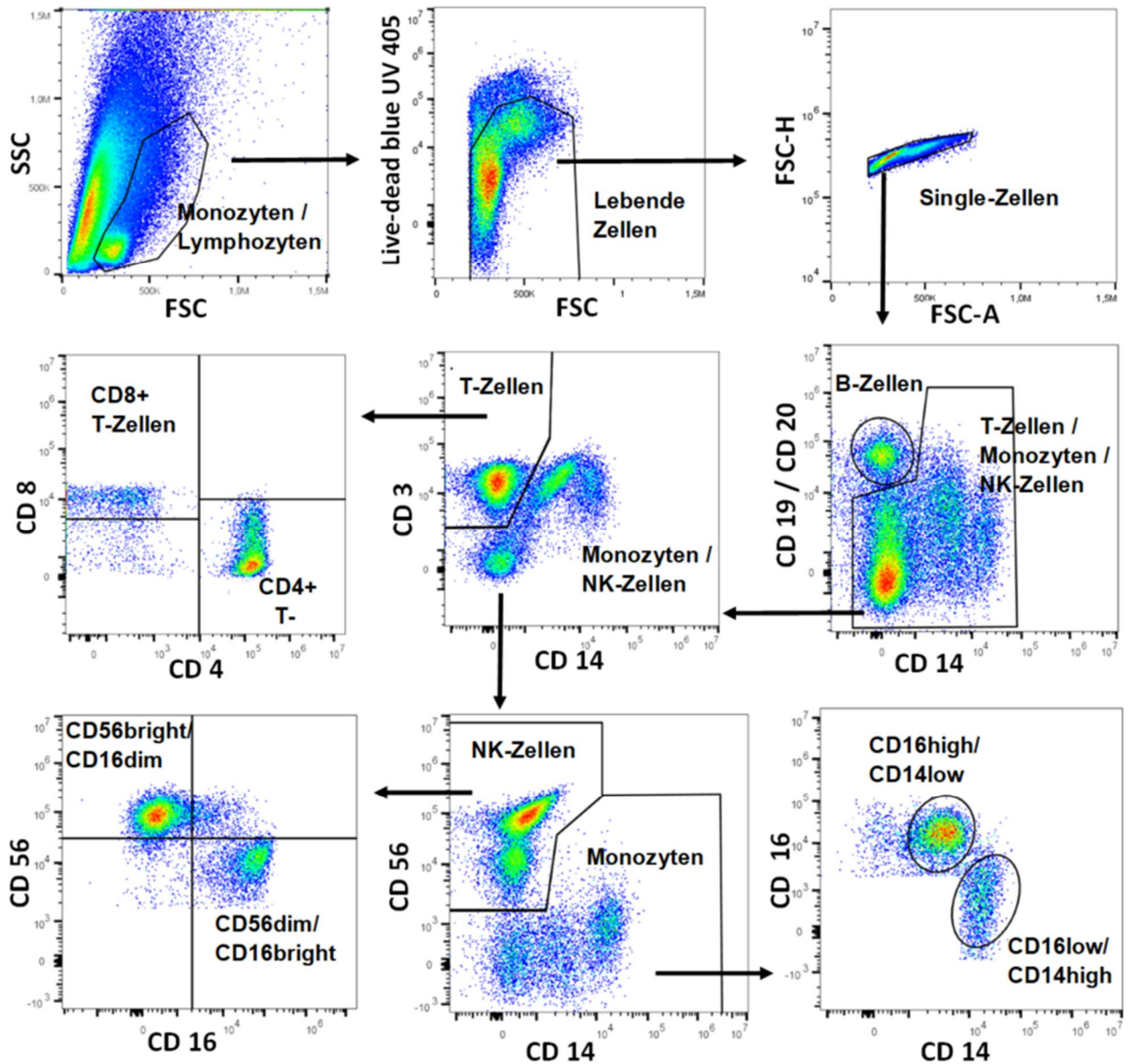


Abbildung 1: Auswertungsstrategie (Gating) der Durchflusszytometrie.

Die Abbildung zeigt exemplarisch die einzelnen Schritte der Durchflusszytometrieauswertung unter Verwendung des Auswertungsprogrammes FlowJo. Im ersten Schritt wurden die mononukleären Zellen selektiert und in den anschließenden Schritten tote Zellen sowie nicht vereinzelt Zellen aussortiert. Die so ausgewählten Zellen wurden anhand der Zelloberflächenmarker CD19/20 (B-Zellen), CD3 (T-zellen), CD56 (NK-Zellen) und CD14 (myeloische Zellen) in die vier großen Hauptgruppen unterteilt, die in nachfolgenden Gating-Schritten dann eingehender analysiert wurden.

#### 4.5 ELISA – Beschreibung der Methode

Die Konzentrationen der löslichen Proteine VCAM-I, ICAM-I, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  im Plasma des venösen Vollbluts sowie im abzentrifugierten Überstand des MB wurden mithilfe von

Enzyme-linked Immunosorbent Assays, kurz ELISAs, bestimmt. Das Prinzip dieser Quantifizierungsmethode ist für die verschiedenen ELISA-Typen (direkter ELISA, indirekter ELISA, Sandwich-ELISA, kompetitiver ELISA) ähnlich. Sie unterscheiden sich jedoch in der Verwendung der Antikörper und in einigen Zwischenschritten [172]. In dieser Studie wurden ELISA-Kits verwendet, die auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA basieren. Im Folgenden wird das allgemeine Prinzip dieser ELISA-Methode und die Durchführung genauer erläutert.

Verwendet wird eine Mikrotiterplatte mit insgesamt 96 Vertiefungen, auch Wells genannt, in welchen die Proben mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und später die Absorption in einem Photometer gemessen wird. Die Mikrotiterplatten werden mit einer konzentrierten Lösung mit dem entsprechenden Antikörper über Nacht inkubiert [172]. So adsorbieren die Antikörper auf der Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatten.

Im nächsten Schritt werden die Mikrotiterplatten mehrfach mit einem speziellen ‚Washbuffer‘ gewaschen, um nicht gebundene Flüssigkeit komplett aus den Wells zu entfernen [172]. Nun kann in jede Vertiefung eine bestimmte Menge der aufgetauten (und verdünnten) Proben (Plasma des VB bzw. Zentrifugationsüberstand des MB) hinein pipettiert werden [172]. Je höher die Konzentration des zu quantifizierenden Proteins in der Probe, desto mehr Antikörper in den Wells binden ein solches Protein. Nach einer Inkubationsphase wird das überschüssige Probenmaterial mit dem ‚Washbuffer‘ ausgewaschen; lediglich die gebundenen Proteine verbleiben in den Wells.

Anschließend wird eine Lösung mit einem zweiten Antikörper hinzugefügt [172]. An diesen Antikörper ist kovalent das Vitamin Biotin gebunden. Der zweite Antikörper bindet nun ebenfalls an das durch den ersten Antikörper gebundene Protein (an einer anderen Stelle / an einem anderen Epitop des Antigens). Je mehr Protein durch den ersten Antikörper gebunden wurde und sich daher noch in den Wells der Mikrotiterplatte befindet, desto mehr zweite Antikörper haften an diese Proteine. Nach einer Inkubationszeit werden die nicht gebundenen Antikörper ausgewaschen [172].

In einem weiteren Schritt wird zu den Wells Avidin-HRP hinzugegeben. Dies ist eine Verbindung aus Avidin und der Meerrettichperoxidase (HRP). Das Avidin bindet mit starker Affinität an das an den zweiten Antikörper gebundene Biotin [172]. Nach erneutem Waschen verbleiben nur diejenigen Avidin-HRP-Moleküle in den Wells, die an Biotin binden konnten. Das Enzym HRP liegt also nun in einer Konzentration vor, die abhängig ist von der ursprünglichen Konzentration des gesuchten Proteins. Je höher die Proteinkonzentration, desto mehr HRP verbleibt nach dem Waschen in den Wells und desto höher ist dort seine enzymatische Aktivität.

Als nächstes wird eine Substratlösung hinzugegeben, welche das Molekül Tetramethylbenzidin (TMB) enthält [173]. Dieses vorher farblose Molekül wird nach einer

Umwandlung – katalysiert von HRP – blau und absorbiert einfallendes Licht. Nach etwa 15 min wird eine Stoplösung hinzutitriert, um die chemische Reaktion zu beenden [173]. Je größer die Aktivität der HRP ist, desto mehr Substrat kann in derselben Zeit umgewandelt werden und desto stärker fällt die Verfärbung aus. Die Stoplösung sorgt zudem für einen sichtbaren Farbumschlag von blau zu gelb.

Abschließend wird in einem Photometer für jedes Well die optische Dichte (O.D.) bei 450 nm Wellenlänge gemessen [173]. Zur Korrektur wird davon der Wert der optischen Dichte bei 570 nm Wellenlänge abgezogen. Je höher die ursprüngliche Konzentration des jeweiligen Proteins in der Probe, desto mehr einfallendes Licht wird absorbiert, die optische Dichte steigt [173].

Neben den zu untersuchenden Proben wird außerdem die optische Dichte von mehreren Standardlösungen mit bekannter Konzentration des gesuchten Proteins bestimmt. Eine zusätzliche Probe, welche das gesuchte Protein nicht enthält, wird im Sinne einer Negativkontrolle gemessen und als Blindwert bezeichnet.

Jede Probe sowie die Standards und der Blindwert werden jeweils zwei Mal gemessen und anschließend wird aus den beiden Messwerten der Mittelwert errechnet. Mithilfe der Standardlösungen wird eine Standardkurve erstellt, wobei auf der Ordinatenachse (Y-Achse) logarithmisch die optische Dichte und auf die Abszissenachse (X-Achse) die bekannte Konzentration der jeweiligen Standards aufgetragen wird [173]. Anschließend wird mithilfe einer Regressionsrechnung (in diesem Fall eine 4-Parameter Logistik) eine Standardkurve erstellt. Nun kann für alle Proben anhand des gemessenen Wertes der optischen Dichte eine Konzentration bestimmt werden.

Für die vorliegende Studie wurden die folgenden ELISA-Kits der Firma Thermo-Fischer verwendet:

- Invitrogen ICAM-1 (Soluble) Human ELISA Kit (Katalog-Nr. BMS201)
- Invitrogen VCAM-1 Human ELISA Kit (Katalog-Nr. KHT0601)
- Invitrogen IL-6 Human Uncoated ELISA Kit with Plates (Katalog-Nr. 88-7066-22)
- Invitrogen IL-8 Human Uncoated ELISA Kit with Plates (Katalog-Nr. 88-8086-22)
- Invitrogen TNF- $\alpha$  Human Uncoated ELISA Kit with Plates (Katalog-Nr. 88-7346-22)

Die Durchführung der Messungen erfolgte entsprechend der beiliegenden Protokolle.

## 4.6 Statistische Methoden

Aufgrund der relativ kleinen Stichprobengröße im Rahmen dieser Pilotstudie wurden zur Darstellung der Ergebnisse nicht-parametrische statistische Methoden verwendet. Für die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und der ELISAs wurde als Maß der zentralen Tendenz der Median gewählt, da dieser keine bestimmte Verteilung der Daten voraussetzt und robuster gegenüber größeren Ausreißern ist. Abweichend hiervon wurden die demographischen Daten (Alter etc.) und die Ergebnisse der Beurteilung des MB als Durchschnittswerte dargestellt. Grund für letzteres ist eine schlechte Differenzierung bei der Darstellung als Median durch die Beurteilung mithilfe der ordinalen Skala. Zur Beurteilung der statistischen Signifikanz von möglichen Mittelwertsunterschieden zwischen den zu untersuchenden Gruppen (MB und VB bzw. Endometriose und gesunde Kontrollen) wurden ebenfalls nicht-parametrische Tests verwendet. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für verbundene Stichproben wurde für den Vergleich zwischen MB und VB verwendet; der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben wurde beim Vergleich zwischen den Studiengruppen (Endometriose und gesunde Kontrollen) angewandt. Bei einem p-Wert kleiner 0,05 wurden die Unterschiede als statistisch signifikant bewertet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Demographie und klinische Merkmale

Insgesamt wurden in diese Studie 23 Teilnehmerinnen eingeschlossen, davon 12 Probandinnen in die Endometriosegruppe und 11 in die Gruppe der gesunden Kontrollen. Alle Studienteilnehmerinnen waren aus dem deutschsprachigen Raum. Die 12 Endometriosepatientinnen waren im Schnitt 33,7 (Standardabweichung (SD): 6,3) Jahre alt; die jüngste Probandin der Endometriosegruppe war 25 Jahre alt und die älteste Probandin 45 Jahre. Die gesunden Kontrollteilnehmerinnen waren durchschnittlich 32,5 (SD: 7,2) Jahre alt, wobei die jüngste 22 Jahre alt und die älteste Probandin der Kontrollgruppe 42 Jahre alt war.

Bei allen Probandinnen der Endometriosegruppe lag eine operativ bestätigte Endometrioseerkrankung vor. Im Schnitt lag die erste Operation im Rahmen der Endometriose vor der Teilnahme an der Studie 19,5 Monate (Minimum: 2 Monate, Maximum: 58 Monate) zurück. Nach der rASRM-Klassifikation hatten 4 Frauen eine Endometriose Grad I, 2 Frauen eine Endometriose Grad II, 3 Frauen eine Endometriose Grad III und weitere 3 Frauen eine Endometriose Grad IV.

Die Frauen mit Endometriose hatten während der letzten Menstruation signifikant stärkere Dysmenorrhoe (maximale Unterbauchschmerzen) als die Frauen der Kontrollgruppe. Auf einer Bewertungsskala von 0 = kein Schmerz bis 100 = maximaler Schmerz gaben Frauen mit Endometriose einen Median von 78 (Spannweite: 65 bis 100) an, verglichen mit einem Median von 22 (Spannweite: 0 bis 68) bei den gesunden Kontrollen (p-Wert: <0,0001).

Alle Teilnehmerinnen nahmen im Rahmen der Studie an einer gynäkologischen Untersuchung, durchgeführt von einer gynäkologischen Fachärztin, teil. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde der Befund der Endometriose sonographisch bestätigt; bei den gesunden Kontrollprobandinnen wurde eine Endometrioseerkrankung oder eine andere schwere gynäkologische Erkrankung ausgeschlossen. Allen Teilnehmerinnen wurde zudem die medizinische Tauglichkeit zur Teilnahme an der Studie bestätigt.

### 5.2 Menstruationsblut

Die Sammlung des MB mithilfe von Menstruationstassen wurde von allen Teilnehmerinnen als praktikabel beschrieben. Über einen Zeitraum von zweimal 12 Stunden sammelten die Probandinnen im Schnitt 26 ml MB (Spannweite: 10 ml bis 95 ml). Auffallend war hierbei, dass die Menge des gesammelten MB bei den Teilnehmerinnen mit Endometriose höher war als bei den gesunden Vergleichsteilnehmerinnen (durchschnittliches Volumen Endometriose: 30,4 ml, Spannweite: 10 ml bis 95 ml; durchschnittliches Volumen gesunde Kontrollen: 21,4

ml, Spannweite:10ml bis 60ml); siehe Tabelle 3.

Neben dem Volumen des MB wurde dieses vor Verarbeitung optisch hinsichtlich folgender Kriterien beurteilt: Gewebepartikel, Viskosität (Zähflüssigkeit), Zellyse und Koagulation (Blutgerinnung); siehe Tabelle 3. Die Beurteilung des MB erfolgte bei allen genannten Kriterien anhand einer ordinalen Skala, wobei 0 = `gar nicht zutreffend` und 3 = `voll zutreffend` bedeuteten.

Die Menge der im MB enthaltenen Gewebepartikel war bei den Frauen mit Endometriose höher als bei den Teilnehmerinnen ohne Endometriose. Das Blut der Frauen mit Endometriose wies hinsichtlich der Gewebepartikel im Schnitt einen Wert von 1,4 (Spannweite: 0 bis 3) auf, wohingegen das MB der Frauen ohne Endometriose nur einen durchschnittlichen Wert von 1,1 (Spannweite: 0 bis 3) aufwies. Das MB der Endometriosepatientinnen war zudem visköser (Mittelwert: 1,3; Spannweite 0 bis 2,5) als das der Vergleichsgruppe (Mittelwert: 1,0; Spannweite: 0 bis 3).

Darüber hinaus zeigte sich bei den Endometriosepatientinnen eine höhere Koagulation (Mittelwert: 1.1, Spannweite: 0 bis 2) des MB als bei den gesunden Kontrollen (Mittelwert: 0.8, Spannweite: 0 bis 2). Die Zellyse war bei den Proben aus der Endometriosegruppe deutlich niedriger (Mittelwert: 1.3, Spannweite: 0,5 bis 2,5) als bei den gesunden Kontrollen (Mittelwert: 2.0, Spannweite: 0,5 bis 2,5).

*Tabelle 3: Volumen und optische Beurteilung des Menstruationsblutes im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.*

	<b>Endometriose (n = 12)</b>			<b>Gesunde Kontrollen (n=11)</b>			<b>P-Wert*</b>
	<b>Mittelwert</b>	<b>Median</b>	<b>Range</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Median</b>	<b>Range</b>	
<b>Volumen (ml/24h)</b>	30,4	20	10 - 95	21,4	20	10 - 60	0,1917
<b>Gewebepartikel</b>	1,4	1,5	0 - 3	1,1	1,0	0 - 3	0,4523
<b>Viskosität</b>	1,3	1,5	0 – 2,5	1,0	0,5	0 - 3	0,5517
<b>Koagulation</b>	1,1	1,5	0 - 2	0,8	0,5	0 - 2	0,3919
<b>Zellyse</b>	1,3	1,0	0,5 –2,5	2,0	2,0	0,5 - 2,5	0,0422

\* Mann-Whitney-U-Test



Mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation (‘Ficoll-Plaque’) konnten im Median 1,7 Millionen vitale, mononukleäre Zellen aus dem gesammelten MB isoliert werden. Diese Anzahl ist ausreichend, um eine valide Analyse mittels Durchflusszytometrie durchzuführen. Die Anzahl der mononukleären Zellen des VB war jedoch mit durchschnittlich 3,0 Millionen isolierten Zellen deutlich höher.

### **5.3 Ergebnisse Durchflusszytometrie**

#### **5.3.1 Vergleich Endometriose und gesunde Kontrollen**

##### **5.3.1.1 Große Zellgruppen**

Das Hauptinteresse dieser Studie galt den mononukleären Zellen des MB und dem Vergleich dieser Zellen zwischen Frauen mit Endometriose und gesunden Kontrollen. Im MB zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede bei der Anzahl der T-Zellen (Endometriose Median (IQR): 44,2% (26,2%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 39,6% (26,2%), p-Wert: 0,4965) und der Zahl der myeloischen Zellen (Endometriose Median (IQR): 14,9% (24,5%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 14,9% (17,4%), p-Wert: 0,8718); siehe Abbildung 2. Die Anzahl der NK-Zellen und der B-Zellen war jeweils nicht-signifikant etwas niedriger bei den Patientinnen mit Endometriose im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobandinnen (NK-Zellen: Endometriose Median (IQR): 10,0% (6,0%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 15,2% (21,6%), p-Wert: 0,2276; B-Zellen: Endometriose Median (IQR): 5,6% (7,1%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 7,2% (7,8%), p-Wert: 0,7223); siehe Abbildung 2.

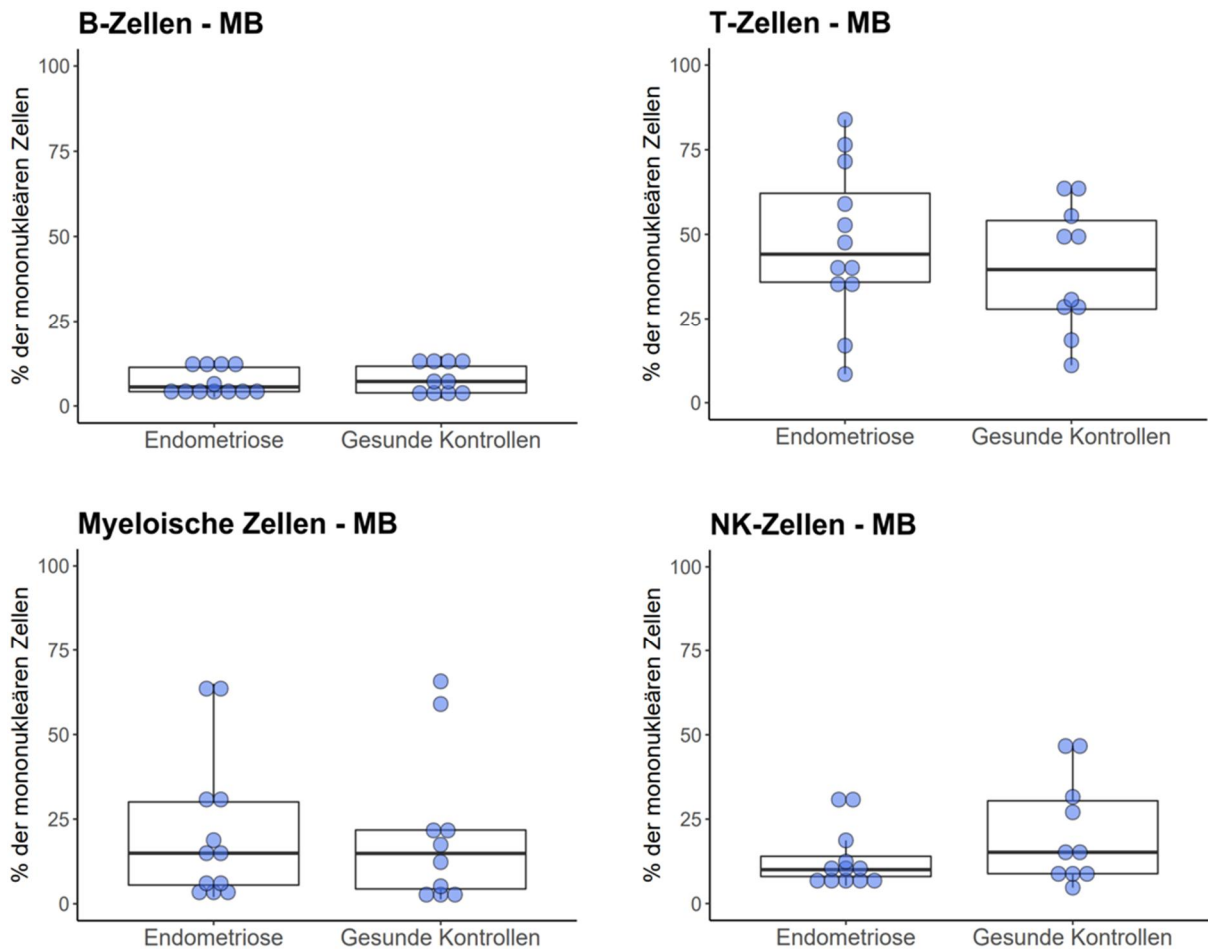


Abbildung 2: Vergleich der großen Zellgruppen zwischen Frauen mit Endometriose und gesunden Kontrollen im Menstruationsblut.

In den Abbildungen dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellgruppe an der Gesamtheit der isolierten, mononukleären Zellen des MB. Die T-Zellen stellten die größte Zellpopulation dar; die B-Zellpopulation war anteilmäßig am kleinsten. Es zeigten sich allerdings keine Unterschiede zwischen der Endometriose-Gruppe und der Gruppe der gesunden Kontrollen.

Auch im VB zeigten sich bei der Verteilung der großen Zellgruppen keine signifikanten Unterschiede; siehe Abbildung 3. Die Anzahl der B-Zellen (Endometriose Median (IQR): 4,7% (1,5%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 4,7% (1,9%), p-Wert: 0,9742) und Monozyten (Endometriose Median (IQR): 12,8% (6,5%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 13,4% (5,4%), p-Wert: 0,8718) war in beiden Gruppen in etwa gleich. In der Gruppe der Endometriosepatientinnen war der Anteil der T-Zellen nicht-signifikant etwas höher (Endometriose Median (IQR): 68,2% (8,9%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 64,6% (12,3%), p-Wert: 0,8212) und der Anteil der NK-Zellen nicht-signifikant etwas niedriger (Endometriose Median (IQR): 11,0% (3,2%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 13,4% (5,4%), p-Wert: 0,8212); siehe Abbildung 3.

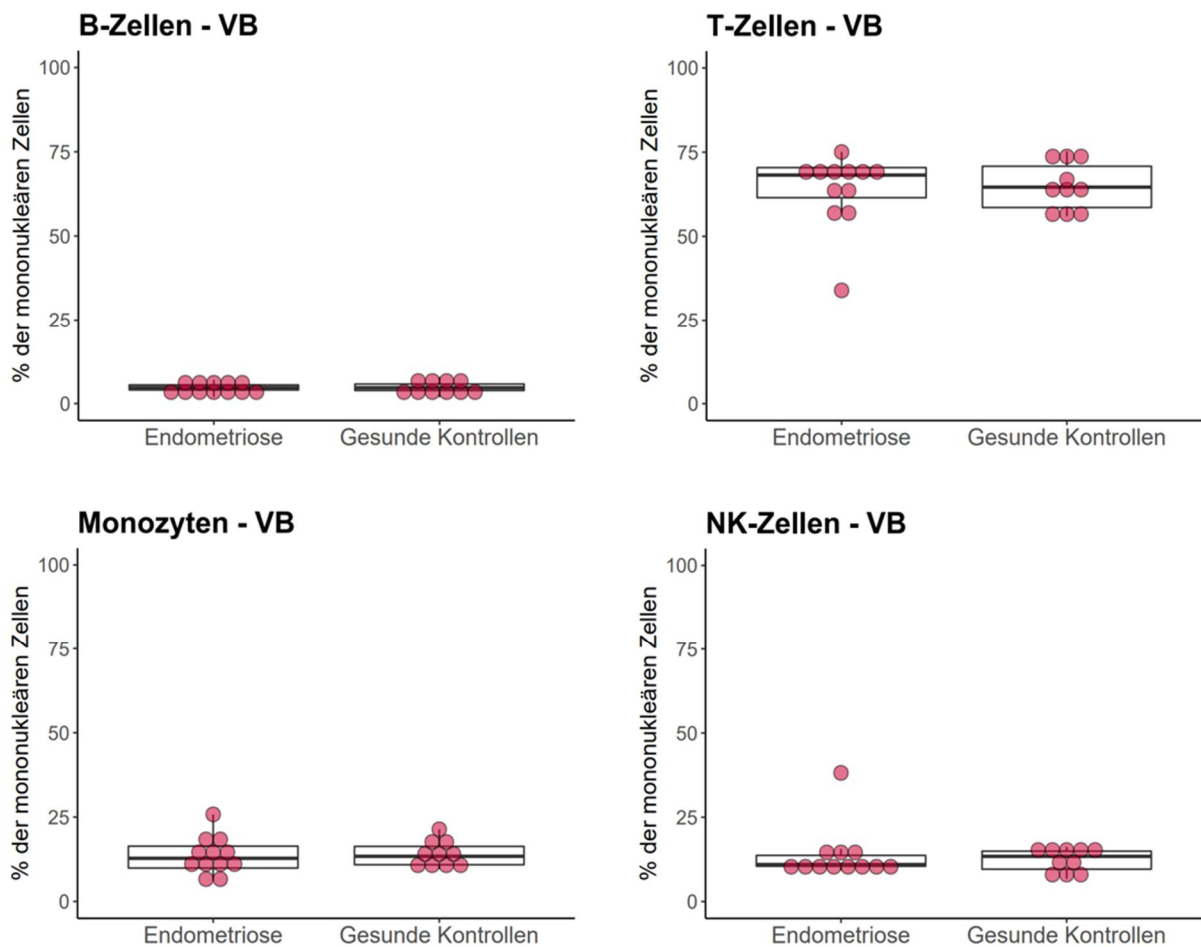


Abbildung 3: Vergleich der großen Zellgruppen zwischen Frauen mit Endometriose und gesunden Kontrollen im venösen Blut.

Die Abbildungen zeigen die Verteilung der großen Zellgruppen im VB. In den Plots dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil der verschiedenen Zellgruppen an der Gesamtheit der isolierten, mononukleären Zellen. Wie im MB war auch im VB die T-Zellpopulation zahlenmäßig die Größte, während die B-Zellen am seltensten vorkamen. Auch im VB waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen zu finden.

Abbildung 4 veranschaulicht die Aufteilung der großen Zellgruppen in Form von Säulendiagrammen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der entsprechenden Zellpopulationen. Getrennt nach MB und VB wurden sowohl für die Gruppe der Endometrioseprobandinnen als auch für die Gruppe der gesunden Kontrollen entsprechende Diagramme erstellt.

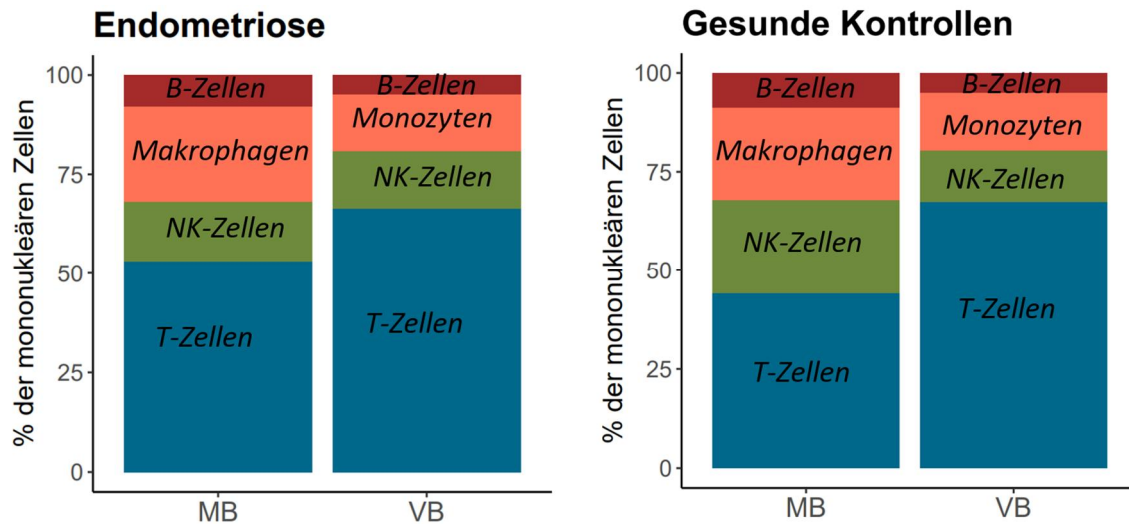


Abbildung 4: Säulendiagramme zur Verteilung der großen Zellgruppen.

Zusammenfassende Darstellung der Verteilung der großen Zellgruppen im MB und VB stratifiziert nach Endometriose und gesunden Kontrollen. Die Höhe der Balken repräsentiert den mittleren Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der Gesamtheit der isolierten mononukleären Zellen.

### 5.3.1.2 T-Zellen

In einem nächsten Schritt erfolgte eine genauere Analyse der T-Zellen hinsichtlich möglicher Unterschiede zwischen Endometriosepatientinnen und gesunden Frauen. Es konnten sowohl im MB als auch im VB keine signifikanten Unterschiede für das CD4/CD8-Verhältnis und für den Anteil der zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen an den CD3<sup>+</sup>-T-Zellen beobachtet werden.

Während das CD4/CD8-Verhältnis im VB bei Endometriose nicht-signifikant höher war als bei gesunden Kontrollen (Endometriose Median (IQR): 2,4 (0,5), gesunde Kontrollen Median (IQR): 2,0 (0,5), p-Wert: 0,08452), zeigte sich im MB ein umgekehrter Trend und ein etwas niedrigeres CD4/CD8-Verhältnis bei Endometriose (Endometriose Median (IQR): 2,5 (0,9), gesunde Kontrollen Median (IQR): 3,4 (6,5), p-Wert: 0,3144); siehe Abbildung 5.

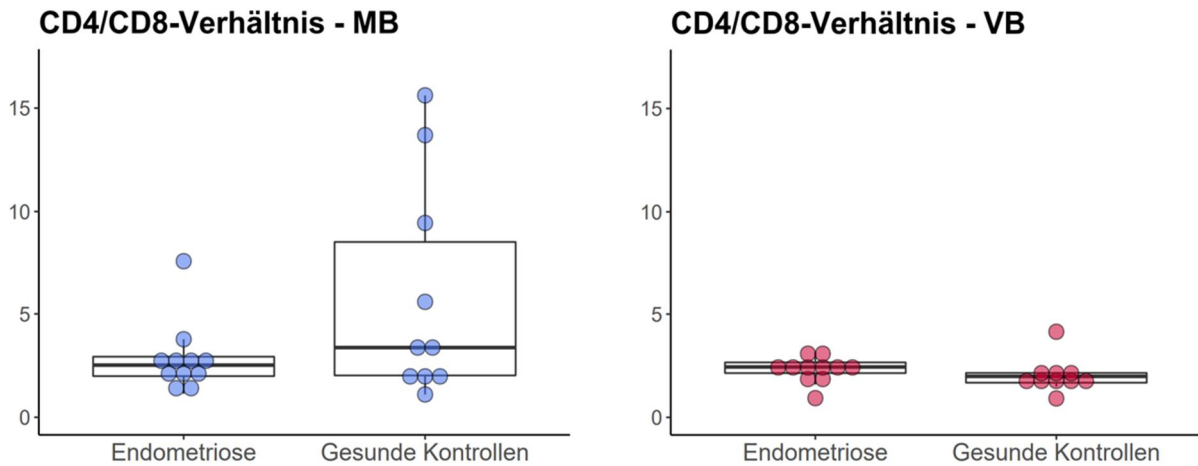


Abbildung 5: CD4/CD8-Verhältnis im MB und VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.

Mithilfe des T-Zellmarkers CD3 wurden zunächst die T-Zellen selektiert und anschließend anhand der für T-Zellen wichtigen Oberflächenmarker CD4 und CD8 in die beiden Hauptsubtypen CD4+T-Zellen und CD8+T-Zellen unterteilt. Die Diagramme zeigen jeweils das zahlenmäßige Verhältnis dieser beiden Subtypen. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen festzustellen.

Entsprechend dem CD4/CD8-Verhältnis war der Anteil der CD8+T-Zellen an allen T-Zellen bei den Endometriosepatientinnen im MB nicht-signifikant höher (Endometriose Median (IQR): 26,7%, (7,4%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 18,9% (20,0%), p-Wert: 0,1971) und im VB nicht-signifikant niedriger (Endometriose Median (IQR): 27,5% (3,9%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 31,5% (2,8%), p-Wert: 0,08408); siehe Abbildung 6.

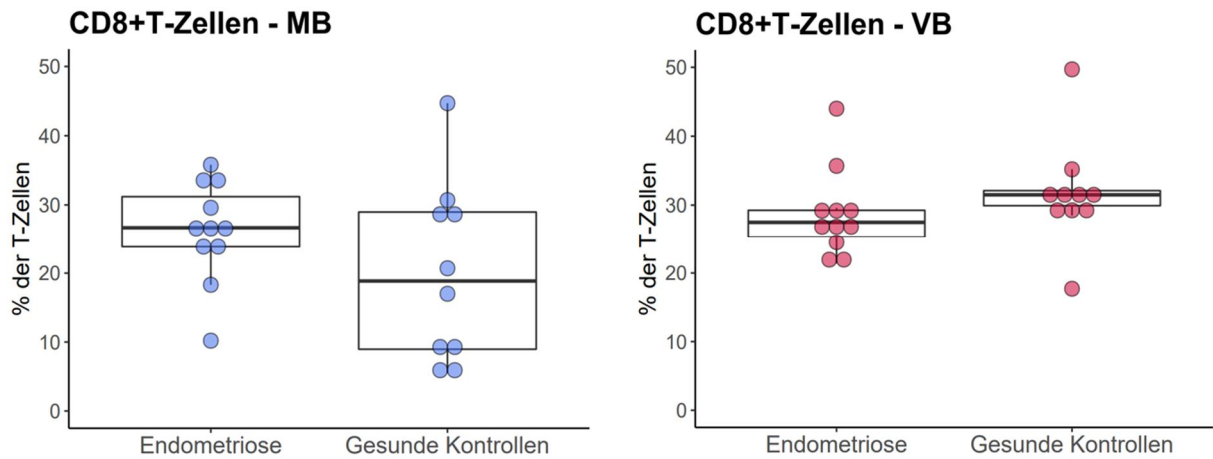


Abbildung 6: Anteile der CD8+T-Zellen an allen T-Zellen im MB und VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.

In den Plots dargestellt ist jeweils die prozentuale Häufigkeit der CD8+ T-Zellen unter allen CD3+T-Zellen. Die CD8+T-Zellen werden aufgrund ihrer Funktionalität auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen der Endometriose-Gruppe und der Gruppe der gesunden Kontrollen.

In einem nächsten Schritt wurden die CD8+T-Zellen genauer analysiert. Bei Frauen mit Endometriose enthielten diese zytotoxischen T-Zellen des MB signifikant weniger Perforin-Granula als die entsprechende Zellgruppe bei den gesunden Kontrollen (Endometriose Median (IQR): 4,0% (4,8%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 11,2% (10,4%), p-Wert: 0,0295). Der gleiche Trend konnte für das VB beobachtet werden, die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant (Endometriose Median (IQR): 9,0% (6,6%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 12,9% (17,3%), p-Wert: 0,7512); siehe Abbildung 7. Abbildung 8 zeigt exemplarisch einige repräsentative Dotplots der zytotoxischen T-Zellen hinsichtlich ihrer Perforin-Expression. Die Zellen rechts der Trennlinie enthielten viele Perforin-Granula in ihrem Zytosol und wurden folglich als Perforin-positive Zellen klassifiziert. Die Zellen links der Trennlinie stellen die Perforin-negativen Zellen dar.

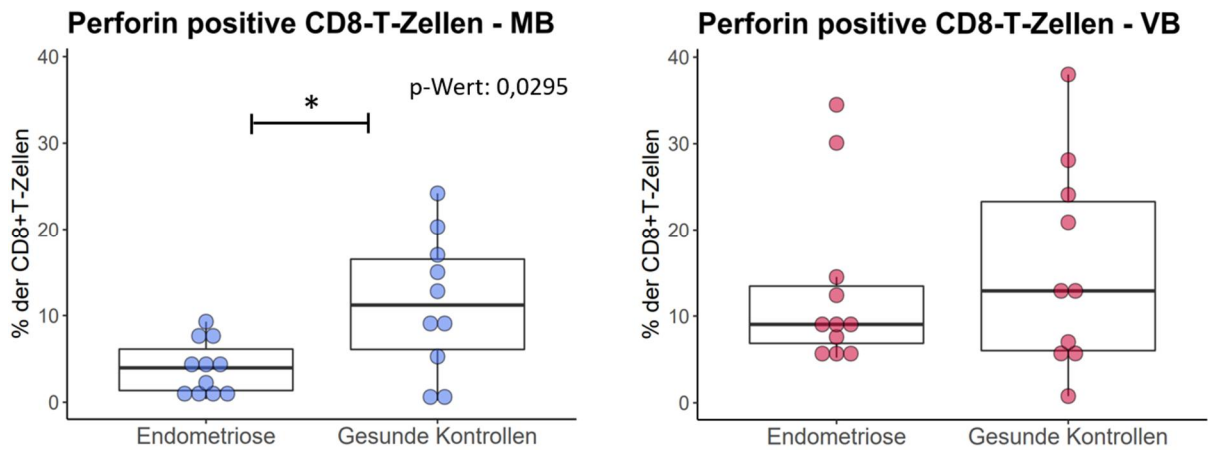


Abbildung 7: Häufigkeit von Perforin-positiven CD8+T-Zellen im MB und VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.

Die zytotoxischen CD8+T-Zellen verfügen über eine Vielzahl an Möglichkeiten, virusbefallene oder entartete Zellen zu eliminieren. Ein wichtiger Mechanismus nutzt die Freisetzung von intrazellulären Perforin-Granula, um die Zielzelle abzutöten. In den Diagrammen dargestellt ist der Anteil derjenigen zytotoxischen T-Zellen, die über eine größere Menge intrazellulärer Perforin-Granula verfügen und damit einhergehend ein starkes zytotoxisches Potential besitzen. Im MB enthielten die zytotoxischen T-Zellen von gesunden Kontrollen signifikant häufiger Perforin-Granula als die entsprechenden Zellen bei Frauen mit Endometriose.

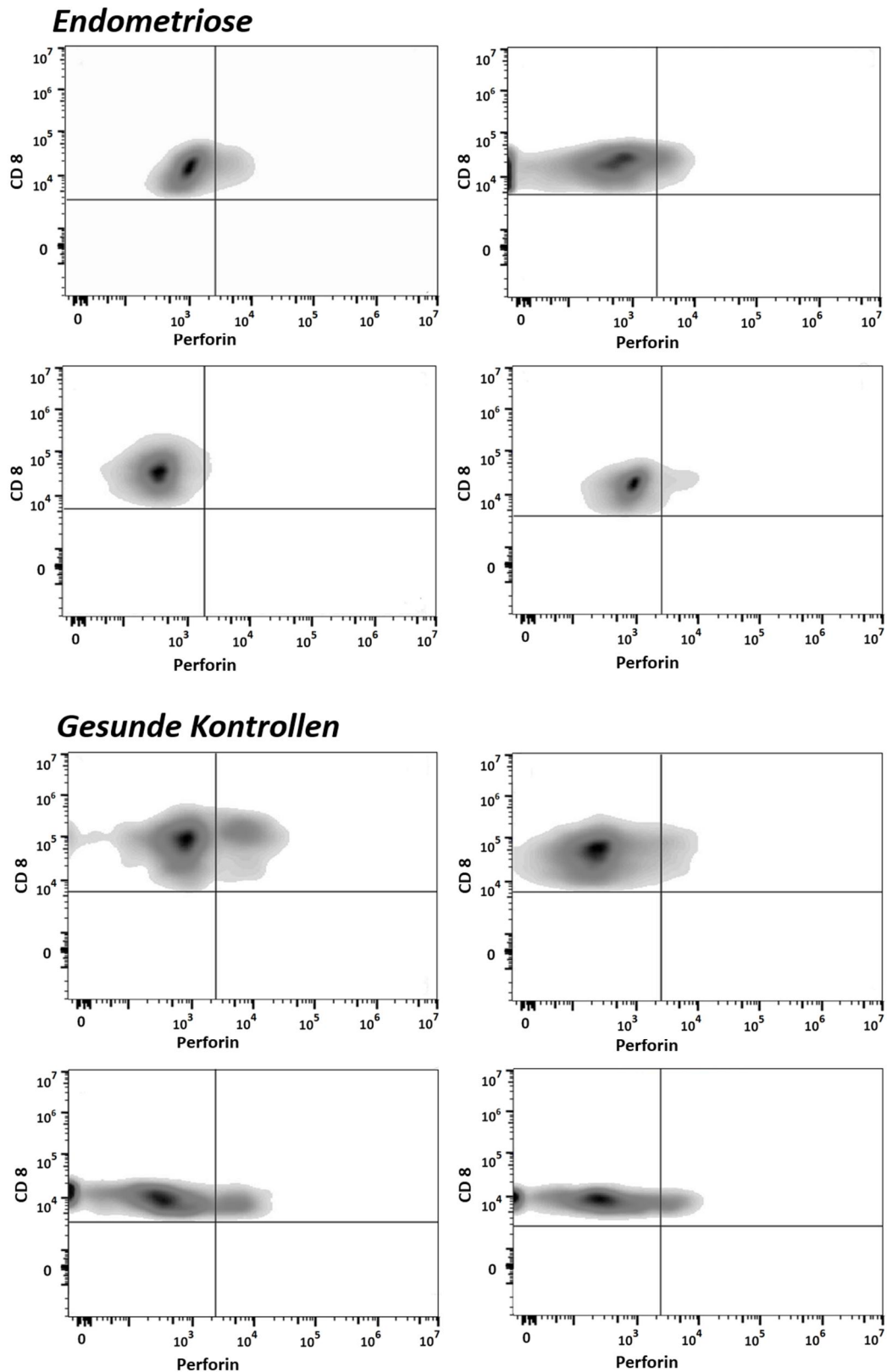


Abbildung 8: DichtepLOTS zur Perforin-Expression von zytotoxischen T-Zellen im MB.

Repräsentative DichtepLOTS verdeutlichen den Unterschied in der Perforin-Ausstattung der zytotoxischen T-Zellen zwischen Endometriose (die oberen vier PLOTS) und gesunden Kontrollen (die unteren vier PLOTS). Die Zellen links der senkrechten Trennlinie wurden als Perforin-negativ klassifiziert; alle Zellen rechts dieser Linie hingegen als Perforin-positiv zytotoxische T-Zellen.



Die regulatorischen T-Zellen waren sowohl im VB als auch im MB bei Frauen mit Endometriose häufiger als bei gesunden Kontrollen; siehe Abbildung 9. Die Darstellung erfolgte jeweils als Anteil der Tregs (FoxP3+CD25+) an den CD4+T-Zellen. Die Unterschiede waren allerdings jeweils nicht signifikant (MB: Endometriose Median (IQR): 0,86% (1,3%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 0,30% (0,4%), p-Wert: 0,3415; VB: Endometriose Median (IQR): 5,4% (1,1%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 4,5% (1,3%), p-Wert: 0,1971).

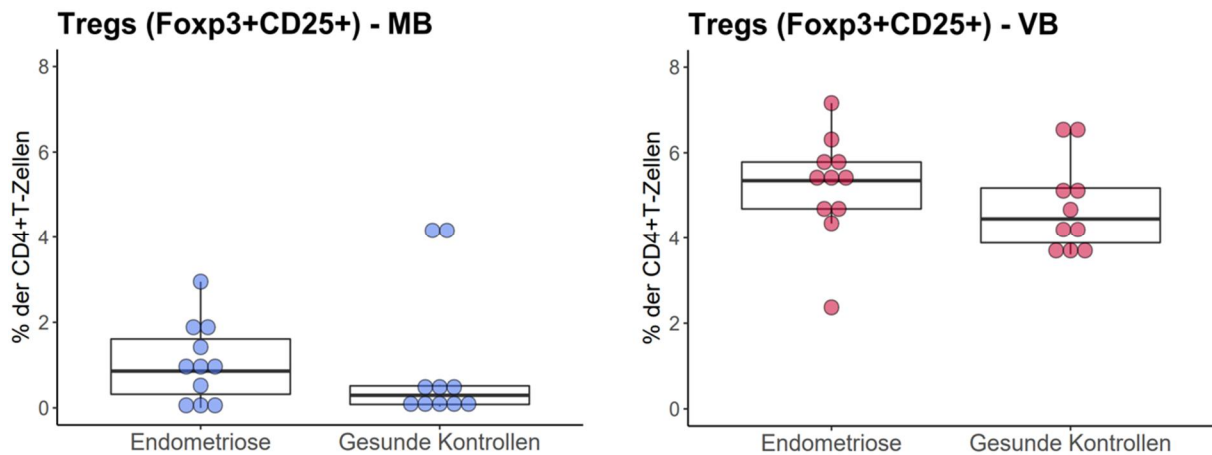


Abbildung 9: Anteile der Tregs (FoxP3+CD25+) an den CD4+T-Zellen im MB und VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.

Regulatorische T-Zellen bilden eine zahlenmäßig kleine, aber wichtige Untergruppe der CD4-positiven T-Helferzellen. Sie regulieren unter anderem die Immunantwort. Sie zeichnen sich durch das Vorhandensein der Zellmarker FoxP3 und CD25 aus. In den Plots dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil dieser Zellen an allen CD4-positiven T-Helferzellen.

### 5.3.1.3 NK-Zellen

Bei den NK-Zellen waren keine auffälligen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, Endometriose und gesunde Kontrollen, zu beobachten. Die beiden großen NK-Zell-Untergruppen, CD56bright/CD16dim-NK-Zellen und CD56dim/CD16bright-NK-Zellen, waren sowohl im MB als auch im VB in beiden Gruppen ähnlich verteilt (MB CD56bright/CD16dim: Endometriose Median (IQR): 68,0% (46,1%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 65,7% (50,5%), p-Wert: 0,9742; MB CD56dim/CD16bright: Endometriose Median (IQR): 15,3% (39,2%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 13,8% (46,4%), p-Wert: 0,8212; VB CD56bright/CD16dim: Endometriose Median (IQR): 3,9% (1,7%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 3,9% (2,9%), p-Wert: 1; VB CD56dim/CD16bright: Endometriose Median (IQR): 87,9% (5,6%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 87,9% (6,1%), p-Wert: 1); siehe Abbildung 10.

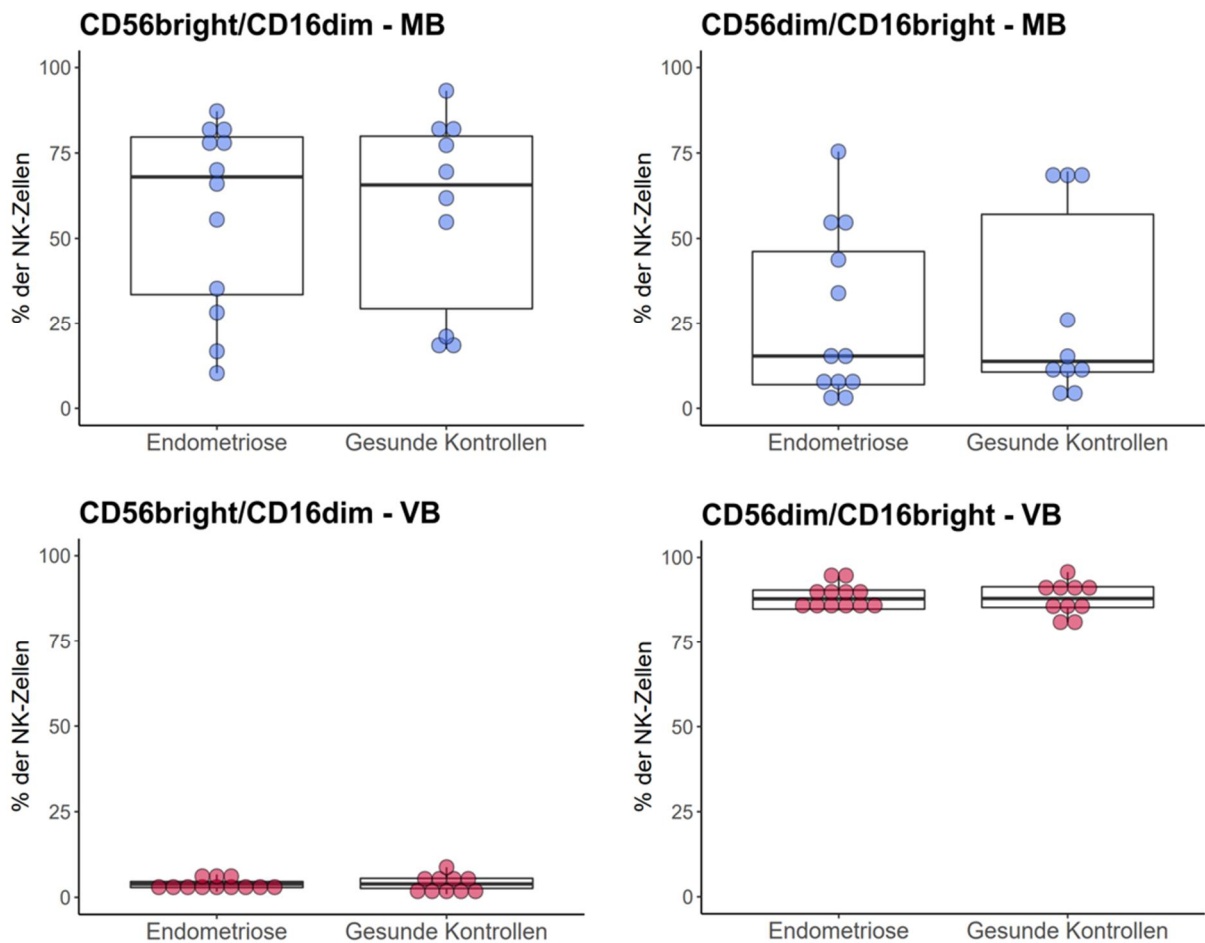


Abbildung 10: Verteilung der NK-Zell-Subpopulationen im MB und VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.

Die NK-Zellen werden üblicherweise anhand der wichtigen Oberflächenmarker CD56 und CD16 in zwei Hauptuntergruppen unterteilt: Die schwach zytotoxischen CD56bright/CD16dim-NK-Zellen und die stark zytotoxischen CD56dim/CD16bright-NK-Zellen. Der jeweilige prozentuale Anteil dieser Subgruppen an der Gesamtheit aller CD56-positiven NK-Zellen ist in den vier Plots dargestellt. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen feststellen.

Auch in Bezug auf Perforin-Beladung der NK-Zellen (Anzahl der Perforin-high NK-Zellen) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Endometriose-Gruppe und der Gruppe der gesunden Kontrollen (MB: Endometriose Median (IQR): 52,7% (49,8%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 36,2% (58,2%), p-Wert: 1; VB: Endometriose Median (IQR): 92,2% (4,1%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 94,9% (3,2%), p-Wert: 0,2512); siehe Abbildung 11. Für eine genaue Beschreibung der Gating-Strategie bezüglich der Perforin-Expression der NK-Zellen siehe Kapitel 5.3.2.3.

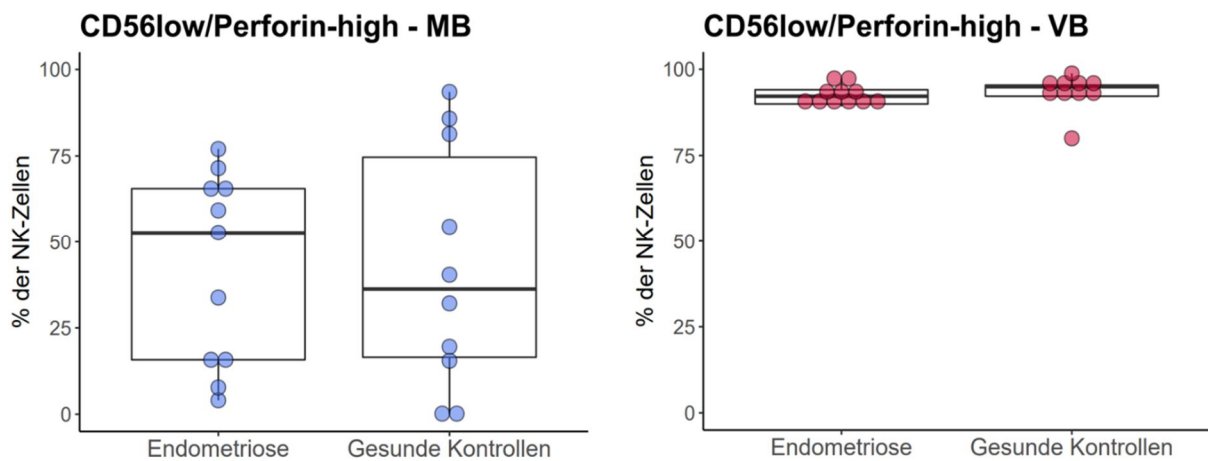


Abbildung 11: Häufigkeit von CD56low/Perforin-high-NK-Zellen im MB und VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.

Wie die zytotoxischen T-Zellen enthielten auch viele NK-Zellen Perforin-Granula. Letztere waren allerdings fast ausschließlich in den CD56low-NK-Zellen in relevanten Mengen zu finden. Diese NK-Zell-Subgruppe besitzt mutmaßlich ein hohes zytotoxisches Potential. Der prozentuale Anteil dieser Zellen an der Gesamtheit der CD56+NK-Zellen ist in den beiden Plots dargestellt. Es zeigten sich keine auffälligen Unterschiede zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.

Hinsichtlich der Expression des NK-Zell-Rezeptors NKp46 (CD335) waren bei den NK-Zellen weder im MB (Endometriose Median (IQR): 61,1% (19,9%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 53,2% (20,6%), p-Wert: 0,3463) noch im VB (Endometriose Median (IQR): 91,8% (7,0%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 85,1% (16,6%), p-Wert: 0,4176) signifikante Unterschiede zu beobachten; siehe Abbildung 12.

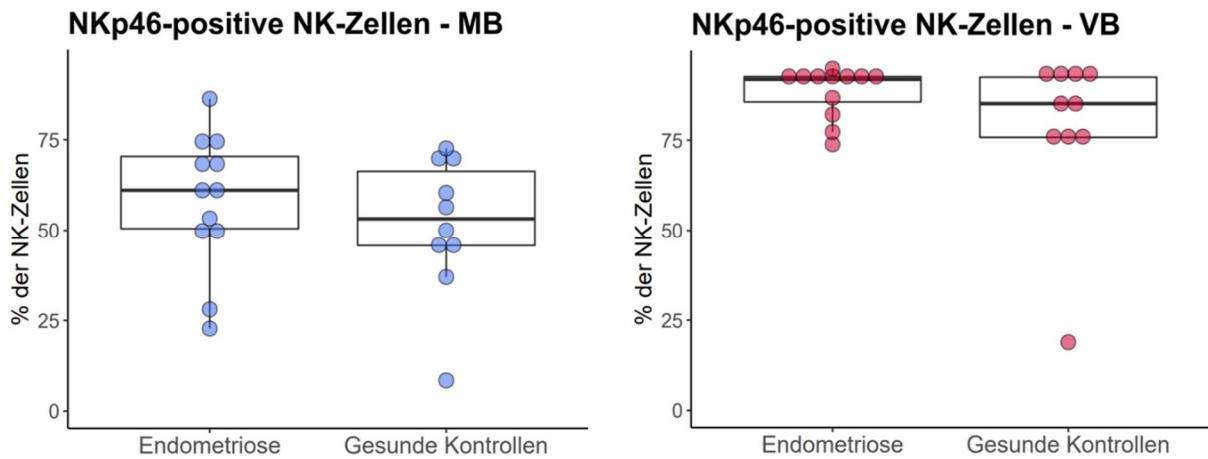


Abbildung 12: Anteile der NKp46-positiven NK-Zellen an allen NK-Zellen im MB und VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.

NKp46 ist ein Rezeptorprotein in der Zellmembran von NK-Zellen und spielt eine wichtige Rolle für die spezifische NK-Zellfunktionalität. Die Plots zeigen den prozentualen Anteil derjenigen NK-Zellen, die das NKp46-Protein in großer Zahl auf ihrer Oberfläche exprimieren. Es zeigten sich vergleichbare Häufigkeiten für Endometriose und gesunde Kontrollen.

#### 5.3.1.4 Monozyten und Makrophagen

Bei den Subpopulationen der myeloischen Zellen (Monozyten bzw. Makrophagen) zeigten sich im MB keine Unterschiede zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen. Die beiden großen myeloischen Zellgruppen (CD16low/CD14high und CD16high/CD14low) hatten vergleichbare Anteile in der Endometriose-Gruppe und in der Gruppe der gesunden Kontrollen (Anteil der CD16low/CD14high Zellen: Endometriose Median (IQR): 63,3% (57,5%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 46,0 % (37,6%), p-Wert: 0,4176; Anteil der CD16high/CD14low Zellen: Endometriose Median (IQR): 26,6% (45,0%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 38,7% (26,1%), p-Wert: 0,5387); siehe Abbildung 13. Für eine genaue Beschreibung der Gating-Strategie bei den myeloischen Zellen im MB siehe Kapitel 5.3.2.4.

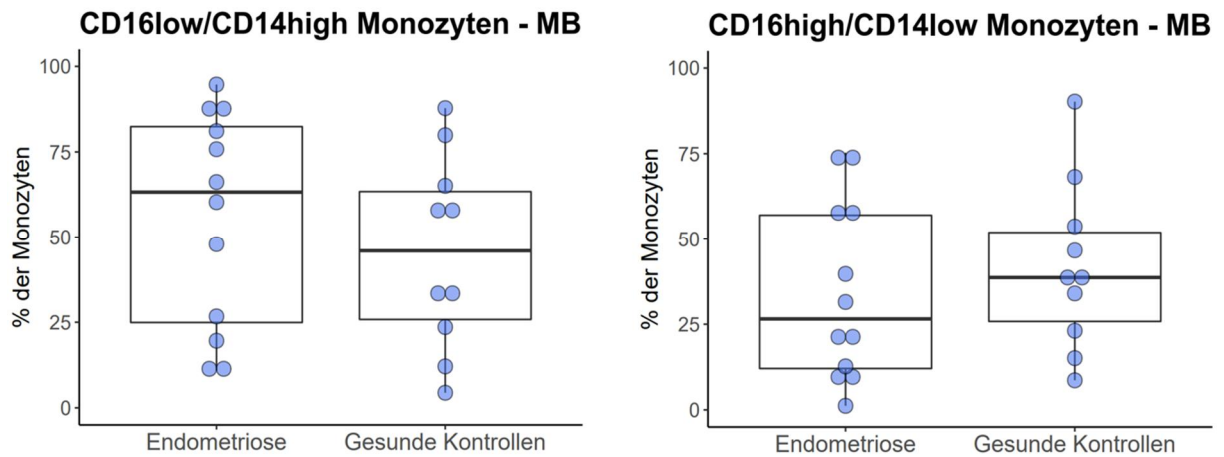


Abbildung 13: Verteilung der Makrophagen-Subpopulationen ( $CD16^{low}/CD14^{high}$  und  $CD16^{high}/CD14^{low}$ ) als Anteil an allen Makrophagen im MB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.

Die myeloischen Zellen des MB ließen sich anhand der Oberflächenmarker  $CD16$  und  $CD14$  in zwei Hauptgruppen unterteilen, wobei jede Untergruppe jeweils nur einen der beiden Marker stark auf der Zelloberfläche exprimierte. Diese Einteilung folgt nicht der aus dem VB bekannten Unterteilung der Monozyten. Die prozentuale Verteilung der beiden Subgruppen im MB war bei Endometriose und gesunden Kontrollen sehr ähnlich.

Auch im VB waren keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich der Monozyten-Subpopulationen zwischen den beiden Studiengruppen zu sehen (Classical Monozyten: Endometriose Median (IQR): 79,9% (11,5%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 82,4% (7,1%), p-Wert: 0,3721; Intermediate Monozyten: Endometriose Median (IQR): 4,2% (2,9%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 4,4% (1,2%), p-Wert: 1; Non-Classical Monozyten: Endometriose Median (IQR): 14,7% (8,4%), gesunde Kontrollen Median (IQR): 11,9% (6,0%), p-Wert: 0,2678); siehe Abbildung 14.

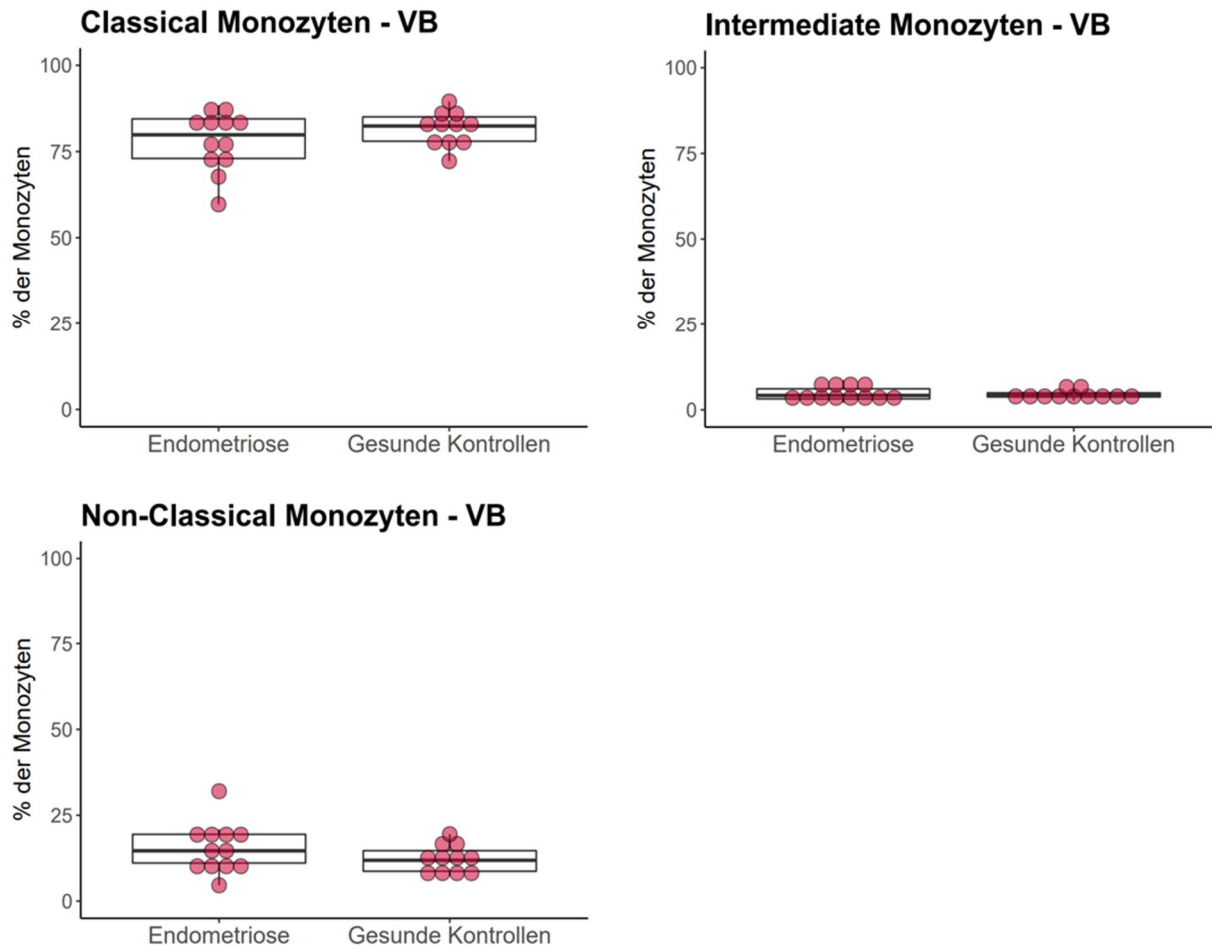


Abbildung 14: Verteilung der Monozyten-Subpopulationen im VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.

Die klassische Einteilung der myeloischen Zellen des VB in Classical Monozyten, Intermediate Monozyten und Non-Classical Monozyten erfolgt anhand der Oberflächenmarker CD16 und CD14. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Anteile der verschiedenen Monozyten-Subtypen an der Gesamtheit aller Monozyten. Es zeigten sich keine besonderen Unterschiede zwischen den Monozyten bei Endometriose und bei gesunden Kontrollen.

### **5.3.2 Vergleich Menstruationsblut und venöses Blut**

Nach dem Vergleich der mononukleären Zellen des MB und des VB zwischen der Endometriosegruppe und der Gruppe der gesunden Kontrollen folgte in einem zweiten Schritt der Vergleich der Immunzellen zwischen dem MB und dem VB. Die Unterschiede zwischen den mononukleären Zellen der Endometriosegruppe und der Kontrollgruppe waren mit wenigen Ausnahmen eher moderat. Für die im Folgenden dargestellten Ergebnisse beim Vergleich der Immunzellen des MB mit denen des VB wurden die beiden Studiengruppen deshalb zu einer gemeinsamen Gruppe zusammengefasst ( $n = 23$ ). Darüber hinaus wurden auch für beide Gruppen jeweils getrennt statistische Tests durchgeführt. Diese Ergebnisse können aus Tabelle 4 entnommen werden.

#### **5.3.2.1 Große Zellgruppen**

Hinsichtlich der Verteilung der großen Zellgruppen (siehe Abbildung 15) waren für die CD56+NK-Zellen (MB Median (IQR): 11,5% (16,7%), VB Median (IQR): 11,3% (4,3%), p-Wert: 0,8917) und die CD14-positiven myeloischen Zellen (MB Median (IQR): 14,9% (22,6%), VB Median (IQR): 13,0% (6,4%), p-Wert: 0,3377) keine signifikanten Unterschiede zwischen MB und VB zu beobachten, wobei der Anteil der myeloischen Zellen im MB nicht-signifikant etwas höher war. Die CD19/CD20+B-Zellen waren im MB signifikant häufiger als im VB (MB Median (IQR): 5,9% (7,9%), VB Median (IQR): 4,7% (1,9%), p-Wert: 0,0319). Der größte Unterschied war bei der Anzahl der CD3+T-Zellen zu beobachten: das MB enthielt signifikant weniger T-Zellen als VB (MB Median (IQR): 44,1% (28,1%), VB Median (IQR): 66,0% (12,0%), p-Wert: 0,00137).

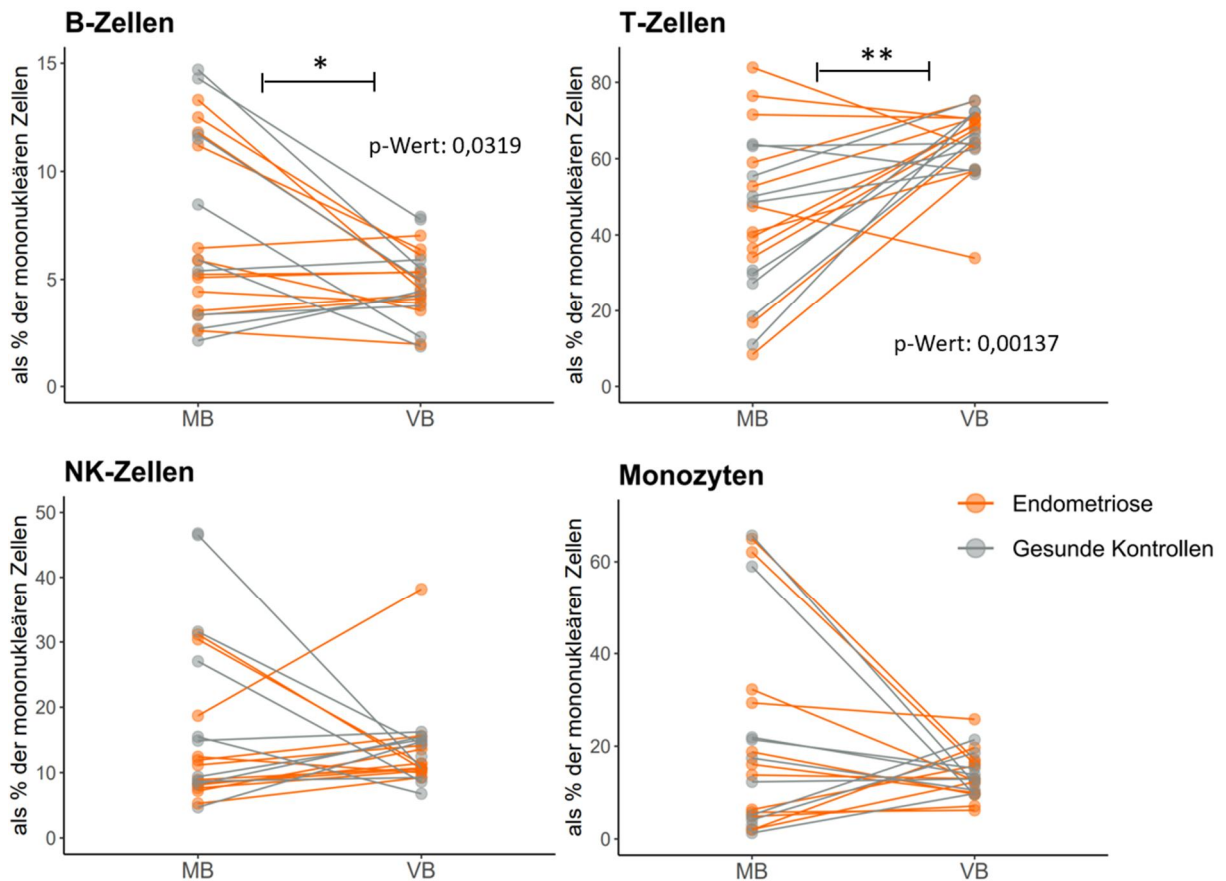


Abbildung 15: Verteilung der großen Zellgruppen als Anteile an den mononukleären Zellen im Vergleich zwischen MB und VB.

In den Plots sind jeweils die prozentualen Anteile der großen Hauptzellgruppen an der Gesamtheit der isolierten mononukleären Zellen dargestellt. Der Anteil der zahlenmäßig größten Zellgruppe, den CD3+T-Zellen, war im MB signifikant geringer als im VB, wohingegen im MB unter den mononukleären Zellen signifikant mehr CD19/CD20+B-Zellen zu finden waren. Die Anteile der CD56+NK-Zellen und der CD14-positiven myeloischen Zellen unterschieden sich nicht signifikant zwischen MB und VB.

### 5.3.2.2 T-Zellen

Innerhalb der CD3+T-Zellpopulation waren nun weitere Unterschiede zwischen MB und VB festzustellen. Das CD4/CD8-Verhältnis der CD3+T-Zellen war im MB signifikant höher (MB Median (IQR): 2,6 (1,8), VB Median (IQR): 2,2 (0,8), p-Wert: 0,0399); siehe Abbildung 16. Damit zusammenhängend war auch die Zahl der CD8+T-Zellen als Anteil an allen T-Zellen im MB signifikant niedriger als im VB (MB Median (IQR): 26,0% (12,6%), VB Median (IQR): 29,6% (5,5%), p-Wert: 0,0239); siehe Abbildung 16. Darüber hinaus war die Anzahl der Perforin-positiven Zellen unter den CD8+T-Zellen im MB signifikant niedriger als im VB (MB Median (IQR): 5,3% (8,0%), VB Median (IQR): 9,0% (14,8%), p-Wert: 0,02356).



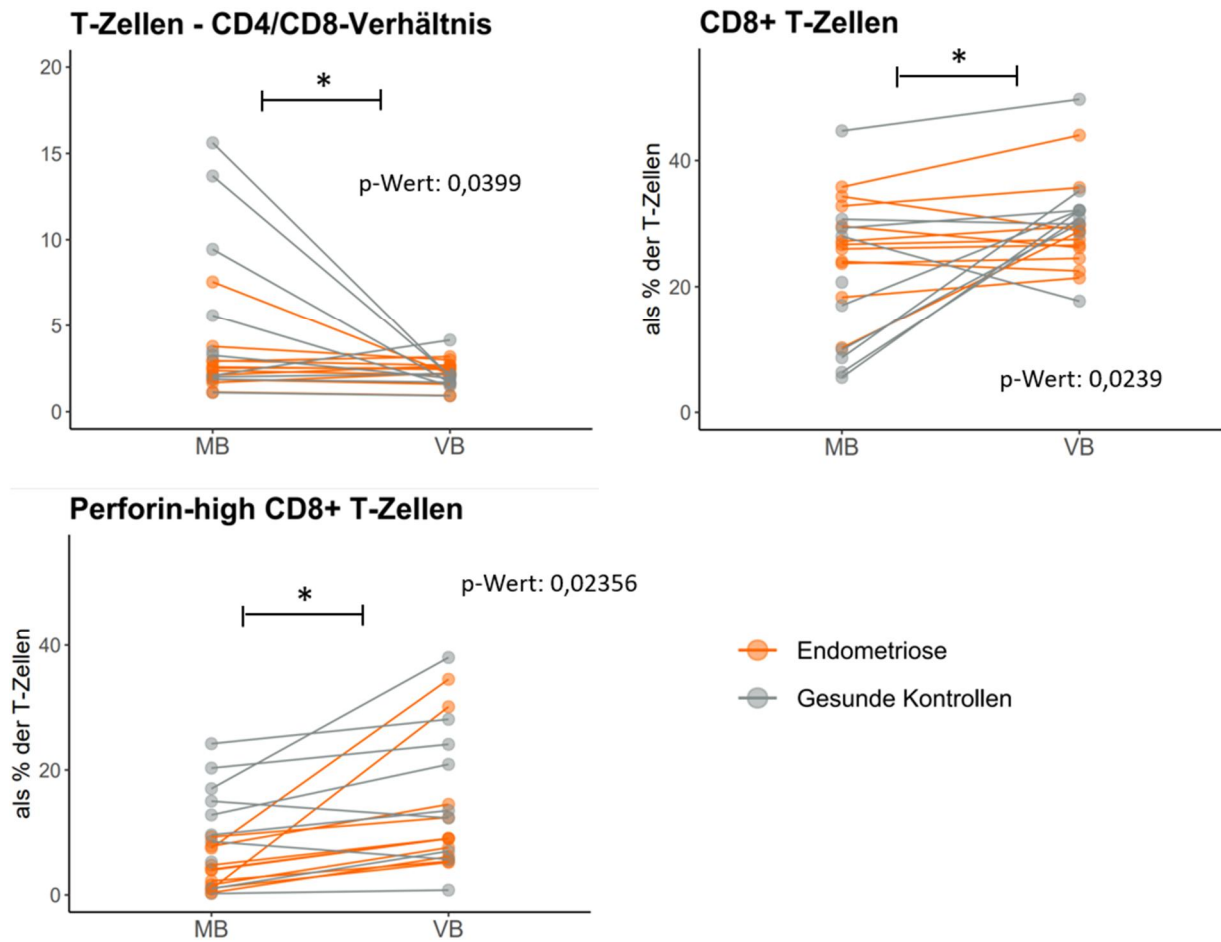


Abbildung 16: CD4/C8-Verhältnis der T-Zellen, Anteil der zytotoxischen CD8+T-Zellen an allen CD3+T-Zellen und Anteil der Perforin-positiven CD8+T-Zellen an allen CD8+T-Zellen; jeweils im Vergleich zwischen MB und VB.

Die CD3+T-Zellen werden anhand der beiden Oberflächenmarker CD4 und CD8 in die beiden Hauptsubgruppen CD4+T-Helferzellen und zytotoxische CD8+T-Zellen unterteilt. Das prozentuale Verhältnis dieser beiden Subtypen war im MB signifikant höher als im VB und damit einhergehend auch der Anteil der zytotoxischen CD8+T-Zellen an der Gesamtheit der T-Zellen im MB signifikant niedriger. Zudem waren die CD8+T-Zellen im MB signifikant seltener Perforin positiv.

Die T-Zellen des MB exprimierten den Zelloberflächenmarker CD96 wesentlich stärker als die Zellen des VB, dementsprechend war der Anteil der CD69 positiven T-Zellen im MB deutlich höher (MB Median (IQR): 48,2% (26,4%), VB Median (IQR): 11,1% (8,9%), p-Wert <0,0001), siehe Abbildung 17.

Der Anteil der Tregs (FoxP3+CD25+) an den CD3+T-Zellen war im MB hingegen signifikant niedriger als im VB (MB Median (IQR): 0,5% (1,3%), VB Median (IQR): 5,0% (1,5%), p-Wert: < 0,0001); siehe Abbildung 17. Abbildung 18 zeigt repräsentative Dotplots der Tregs für das MB und das VB.

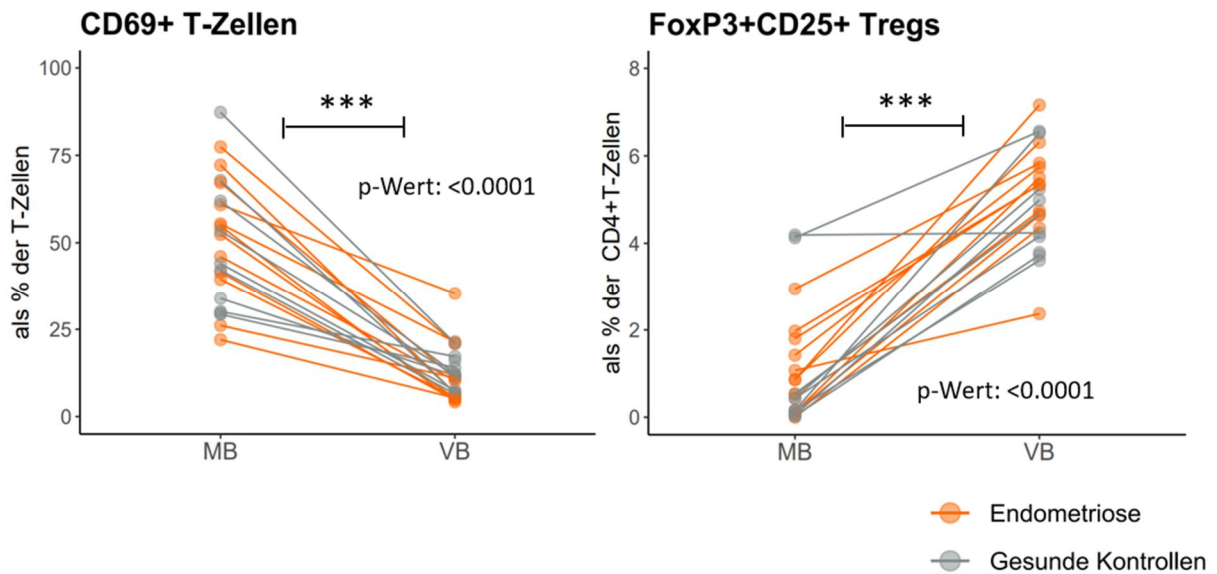


Abbildung 17: Anteile der CD69-positiven T-Zellen an allen T-Zellen und Anteile der FoxP3+CD25+Tregs an den CD4+T-Zellen, jeweils im Vergleich zwischen MB und VB.

Die CD3+T-Zellen des MB trugen signifikant häufiger den frühen Aktivierungsmarker CD69, der hier möglicherweise als Gewebemarker betrachtet werden sollte.

Der Anteil der FoxP3+CD25+Tregs an der Gesamtheit der CD4-positiven T-Helferzellen war im MB auffallend niedriger als im VB. Die Tregs gelten als spezialisierte, immunregulatorische T-Zellen, die unter anderem die Selbsttoleranz des Immunsystems regulieren.

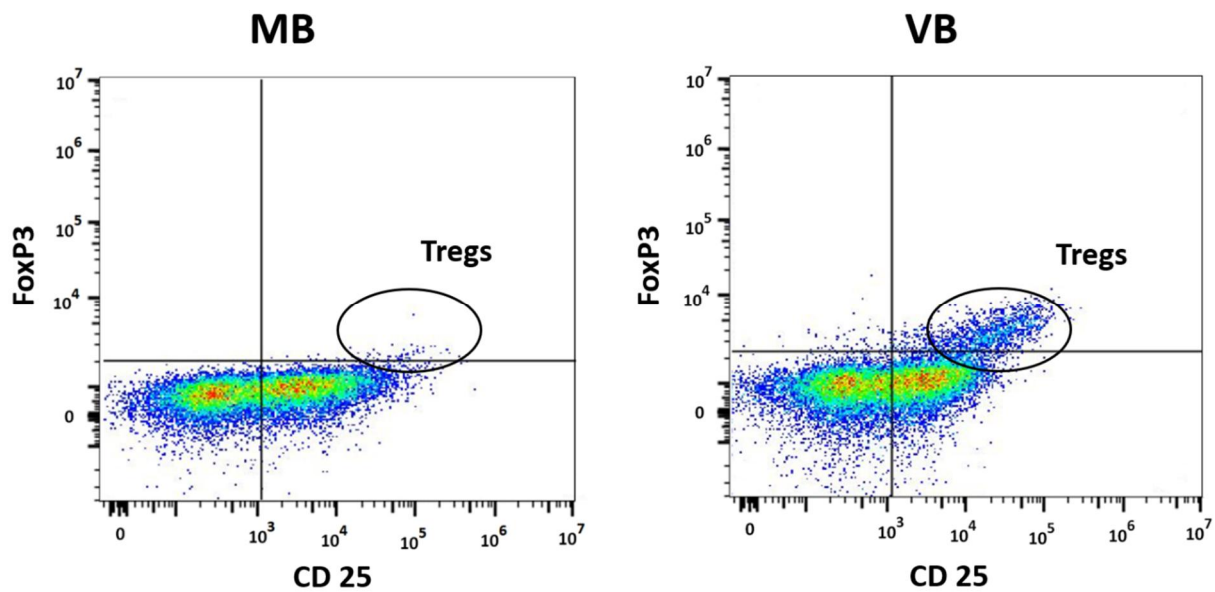


Abbildung 18: Repräsentative Dotplots der Tregs (FoxP3+CD25+).

Die Plots zeigen beispielhaft die Expression von CD25 (x-Achse) und FoxP3 (y-Achse) der CD4+T-Helferzellen. Die FoxP3+CD25+Tregs sind innerhalb des Markierungskreises im rechten oberen Quadranten zu finden. Der linke Plot zeigt ein Beispiel des MB: es sind nur sehr wenige Treg-Zellen zu erkennen. Im VB hingegen (rechter Plot) zeigt sich innerhalb der Kreismarkierung eine ausgeprägte Treg-Population.

### 5.3.2.3 NK-Zellen

Bei genauerer Analyse der CD56+ NK-Zellen waren weitere Unterschiede zwischen MB und VB zu erkennen. Die NK-Zellen wurden zunächst in die beiden großen Subgruppen, CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup>-NK-Zellen und CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>bright</sup>-NK-Zellen, unterteilt. Das MB enthielt dabei signifikant mehr CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>dim</sup>-NK-Zellen (MB Median (IQR): 67,8% (50,3%), VB Median (IQR): 3,9% (2,9%), p-Wert: < 0,0001), siehe Abbildung 19. Repräsentative Dotplots dieser beiden NK-Zell-Subtypen zeigt Abbildung 20. Des Weiteren wurde die Perforin-Expression der NK-Zellen untersucht. Stellt man die NK-Zellen in einem Dotplot (X-Achse: Perforin, Y-Achse: CD56) dar, so können zwei Hauptzellgruppen unterschieden werden: Perforin-high/CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen und Perforin-low/CD56<sup>high</sup>-NK-Zellen (für repräsentative Dotplots siehe Abbildung 21). Die Perforin-Expression ist demnach fast ausschließlich in den CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen zu finden, während die CD56<sup>bright</sup>-NK-Zellen keine oder fast keine Perforin-Granula besitzen. Das MB enthielt nun signifikant weniger Perforin-high/CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen als das VB (MB Median (IQR): 40,4% (51,2%), VB Median (IQR): 92,6% (4,9%), p-Wert: < 0,0001), siehe Abbildung 19.

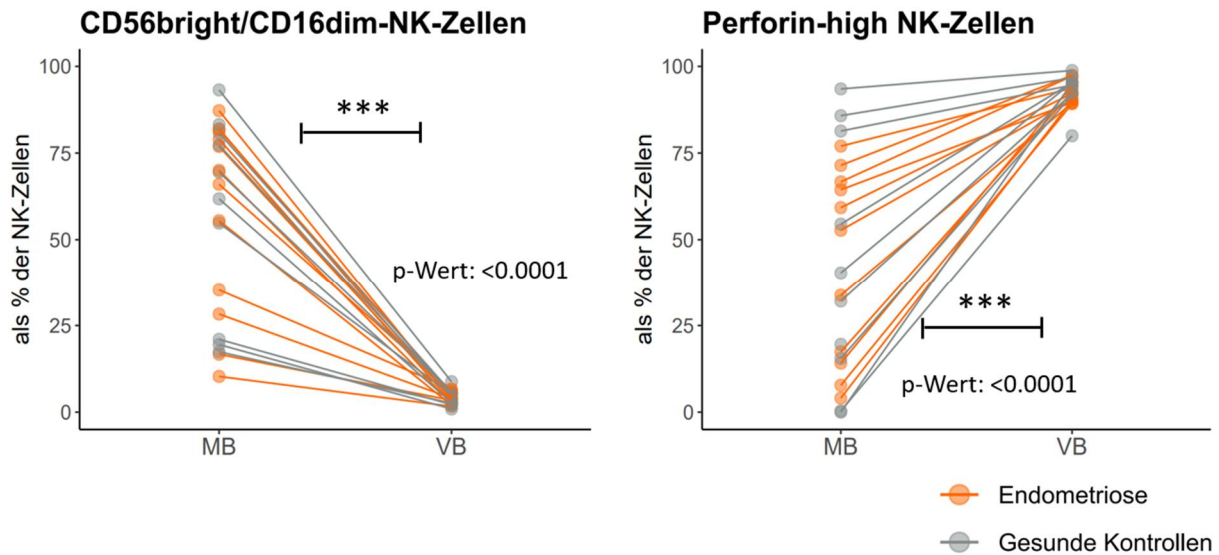


Abbildung 19: Anteile der CD56bright/CD16dim-NK-Zellen an den CD56+NK-Zellen (links) und Anteile der Perforin-high-NK-Zellen an den CD56+NK-Zellen (rechts), jeweils im Vergleich zwischen MB und VB.

Die als weniger zytotoxisch geltende NK-Zell-Subgruppe der CD56bright/CD16dim-NK-Zellen stellte im MB meist die zahlenmäßig größte Untergruppe der NK-Zellen dar, während diese Gruppe im VB stets eine kleine Minderheit ausmachte. Auch der Anteil der Perforin-positiven NK-Zellen war im MB deutlich niedriger als im VB, wo eine überwiegende Mehrheit der NK-Zellen Perforin-Granula enthielt. Beide Beobachtungen weisen auf ein vermindertes zytotoxisches Potential der NK-Zellen im MB hin.

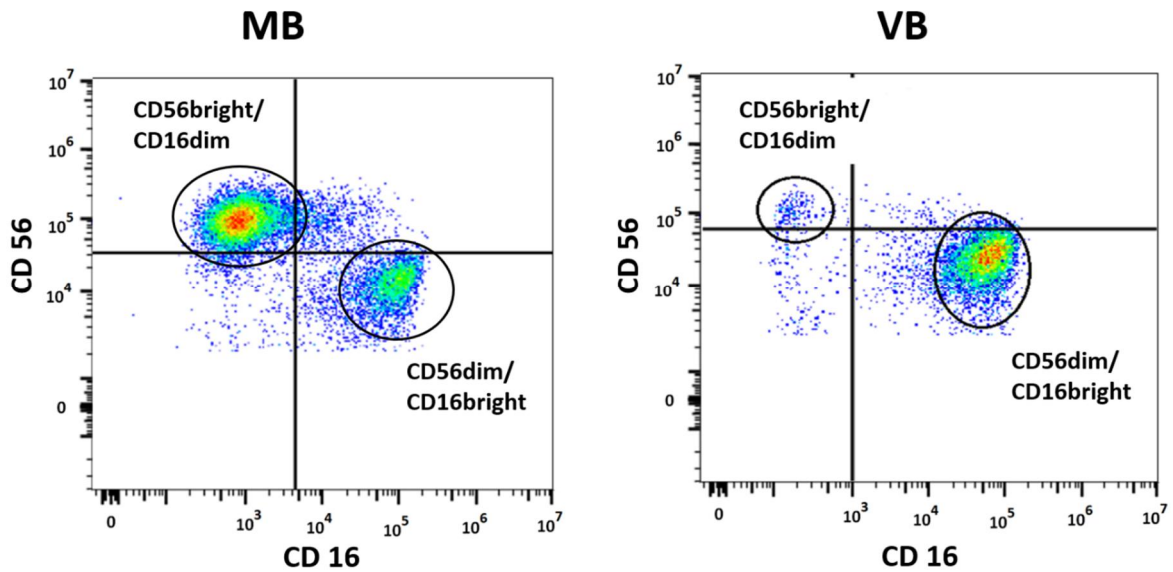


Abbildung 20: Beispielhafte Dotplots der NK-Zellen und deren Expression von CD56 und CD16 im MB und VB.

Die NK-Zellen werden klassischerweise in zwei Hauptgruppen unterteilt: die stark zytotoxischen CD56dim/CD56bright-NK-Zellen (jeweils im rechten unteren Quadranten) und die als weniger zytotoxisch geltenden CD56bright/CD56dim-NK-Zellen (jeweils im linken oberen Quadranten). Im VB (rechter Plot) zeigten sich erwartungsgemäß überwiegend CD56dim/CD56bright-NK-Zellen und nur sehr wenige CD56bright/CD56dim-NK-Zellen. Im MB hingegen lag überwiegend ein invertiertes Verhältnis dieser beiden Subgruppen vor; hier waren die CD56bright/CD56dim-NK-Zellen oft in der Mehrheit.

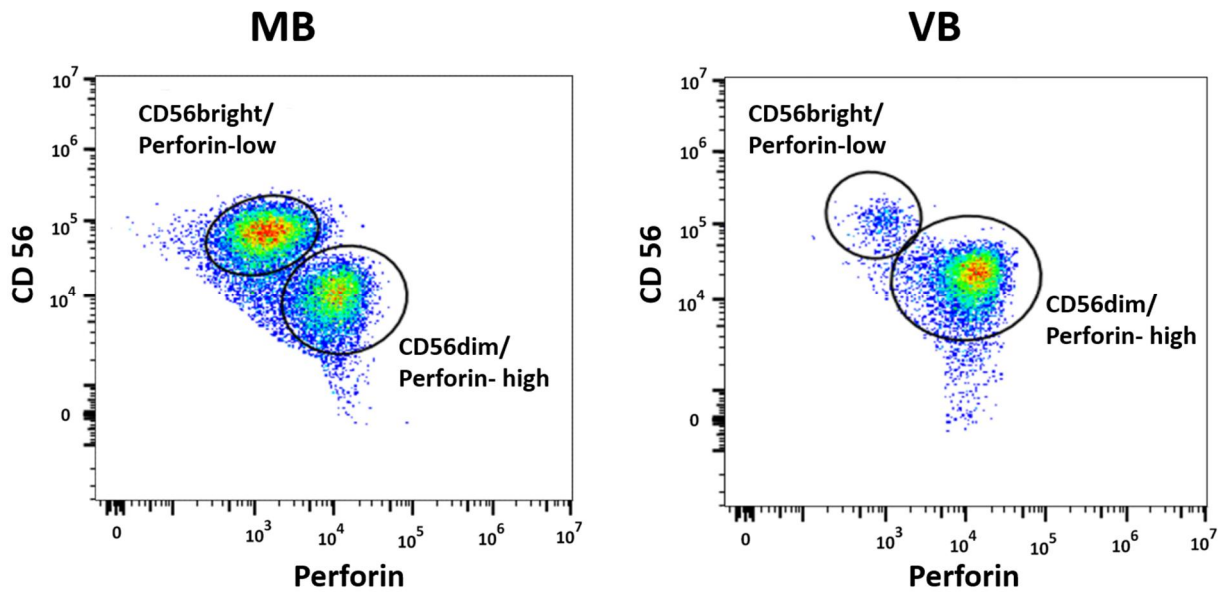


Abbildung 21: Perforin-Expression der NK-Zellen im MB und VB.

Die beiden Dotplots zeigen die Perforin-Ausstattung der NK-Zellen. Es lassen sich zwei Hauptgruppen unterscheiden: die CD56bright/Perforin-low-NK-Zellen (jeweils links oben) und die CD56dim/Perforin-high NK-Zellen (rechts unten). Auffallend ist, dass im MB beide Subgruppen in großer Zahl vorhanden waren, während hingegen im VB die überwiegende Mehrzahl der NK-Zellen eine starke Perforin-Expression aufwies (CD56dim/Perforin-high).

Wie auch schon bei den T-Zellen wurde der Zelloberflächenmarker CD69 auf den NK-Zellen des MB stärker exprimiert als auf den NK-Zellen des VB und folglich war der Anteil der CD69+NK-Zellen im MB signifikant höher als im VB (MB Median (IQR): 81,0% (16,3%), VB Median (IQR): 15,4% (15,3%), p-Wert: < 0,0001), siehe Abbildung 22. Der NK-Zellrezeptor NKp46 hingegen wurde auf den NK-Zellen des VB signifikant stärker exprimiert, entsprechend war der Anteil der NKp46+NK-Zellen im VB signifikant höher als im MB (MB Median (IQR): 58,4% (22,5%), VB Median (IQR): 91,5% (13,9%), p-Wert: < 0,0001), siehe Abbildung 22.

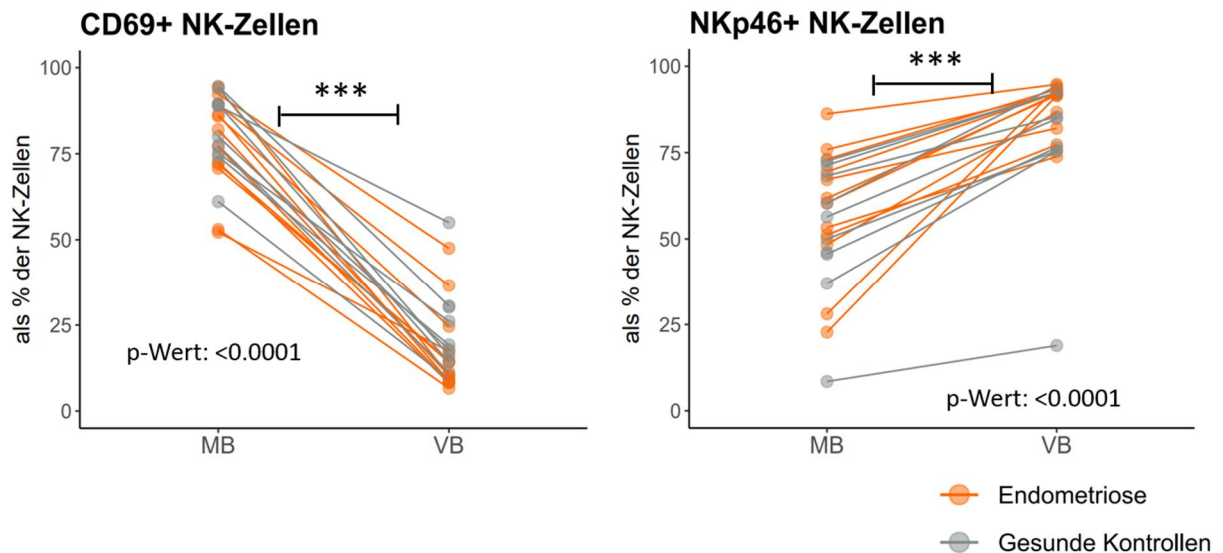


Abbildung 22: Anteile der CD69+NK-Zellen an allen CD56+NK-Zellen (links) und Anteile der NKp46+NK-Zellen an allen CD56+NK-Zellen (rechts), jeweils im Vergleich zwischen MB und VB.

Genau wie die T-Zellen exprimierten die NK-Zellen des MB den Oberflächenmarker CD69 signifikant häufiger als die entsprechenden Zellen im VB. Das Rezeptorprotein NKp46 hingegen wurde von den NK-Zellen des MB signifikant seltener exprimiert als im VB.

### 5.3.2.4 Monozyten und Makrophagen

Die Monozyten des peripheren Blutes wurden entsprechend der gängigen Einteilung anhand der Oberflächenmarker CD14 und CD16 in drei Subgruppen unterteilt: Classical Monozyten (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>), Intermediate Monozyten (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) und Non-Classical Monozyten (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>). Bei den myeloischen Zellen des MB (die am ehesten wohl als Makrophagen bezeichnet werden können) schien diese Einteilung allerdings nicht zu den entsprechenden Dotplots zu passen. Im Wesentlichen waren zwei große Subgruppen zu identifizieren: CD14<sup>high</sup>/CD16<sup>low</sup>-Zellen und CD14<sup>low</sup>/CD16<sup>high</sup>-Zellen. Erstere entsprechen hinsichtlich ihrer Expression von CD14 und CD16 eher den Classical Monozyten des peripheren Blutes, wohingegen die zweite Gruppe eher die Intermediate und Non-Classical Monozyten repräsentiert. Durch die unterschiedliche Einteilung in MB und VB ist kein zahlenmäßiger Vergleich in puncto myeloischen Zellen möglich (MB: CD14<sup>high</sup>/CD16<sup>low</sup>-Zellen Median (IQR): 57,9% (54,5%), CD14<sup>low</sup>/CD16<sup>high</sup>-Zellen Median (IQR): 36,2% (39,1%); VB: Classical Monozyten Median (IQR): 82,0% (8,1%), Intermediate Monozyten Median (IQR): 4,3% (2,1%), Non-Classical Monozyten Median (IQR): 13,4% (8,2%)), siehe Abbildung 23.

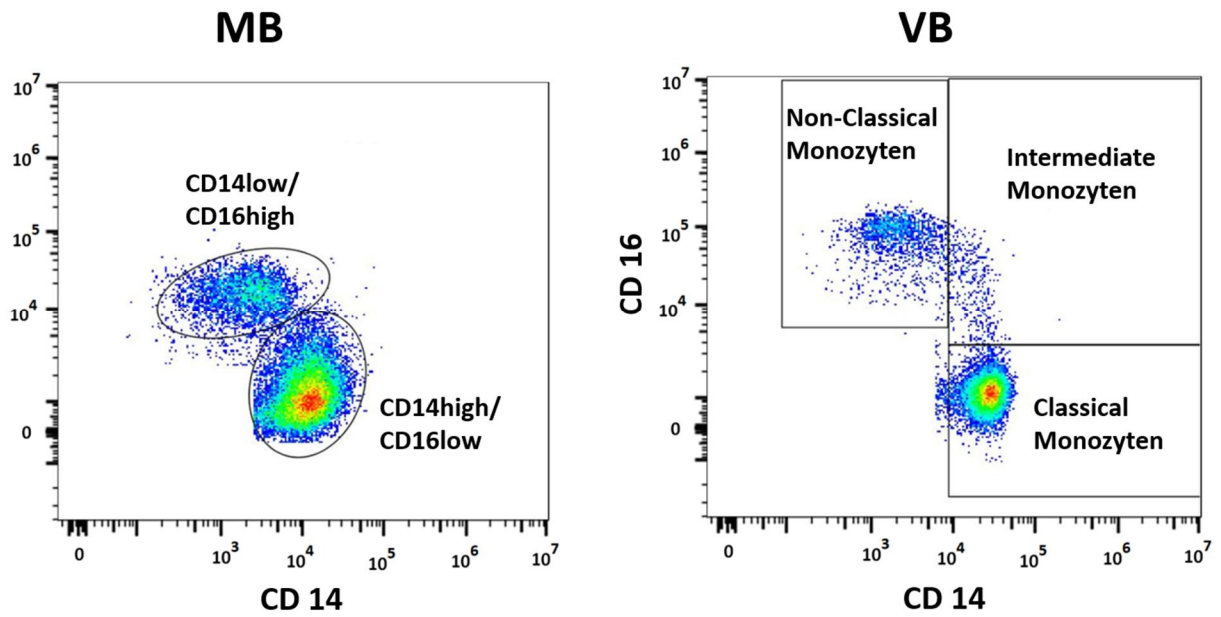


Abbildung 23: Beispielhafte Plots der Subpopulationen der myeloischen Zellen.

Links: Makrophagen des MB. Es sind zwei Hauptzellgruppen auszumachen: die CD14low/CD16high Zellen und die CD14high/CD16low Zellen. Die Subgruppeneinteilung weicht damit von der klassischen Unterteilung der myeloischen Zellen des VB ab. Im linken Dotplot ist ein repräsentativer Plot der myeloischen Zellen des VB dargestellt. Die Aufteilung der Zellgruppen folgt der gängigen Klassifikation für Monozyten-Subgruppen des VB (Classical, Intermediate und Non-Classical Monozyten).



### 5.3.3 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Die im Vorangegangenen dargestellten Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Untersuchungen sind im Folgenden zusammenfassend nochmals in Tabellenform dargestellt (siehe Tabelle 4).

*Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie.*

	<b>Endometriose</b>		<b>Gesunde Kontrollen</b>		<b>p-Wert</b> (Endom. vs. Kontrollen) *	<b>Gesamte Stichprobe</b>	
	Median % (IQR)	<b>p-Wert</b> (MB vs. VB) **	Median % (IQR)	<b>p-Wert</b> (MB vs. VB) **		Median % (IQR)	<b>p-value</b> (MB vs. VB) **
<b>Hauptzellgruppen</b> (als % der mononukleären Zellen)							
B-Zellen MB	5,6 (7,1)	0,1514	7,2 (7,8)	0,1641	0,7223	5,9 (7,9)	0,0319
B-Zellen VB	4,7 (1,5)		4,7 (1,9)		0,9742	4,7 (1,9)	
T-Zellen MB	44,2 (26,2)	0,0425	39,6 (26,2)	0,0117	0,4965	44,1 (28,1)	0,00137
T-Zellen VB	68,2 (8,9)		64,6 (12,3)		0,8212	66,0 (12,0)	
NK-Zellen MB	10,0 (6,0)	0,3013	15,2 (21,6)	0,4961	0,2276	11,5 (16,7)	0,8917
NK-Zellen VB	11,0 (3,2)		13,4 (5,4)		0,8212	11,3 (4,3)	
Myeloische Zellen MB	14,9 (24,5)	0,4238	14,9 (17,4)	0,7344	0,8718	14,9 (22,6)	0,3377
Myeloische Zellen VB	12,8 (6,5)		13,4 (5,4)		0,8718	13,0 (6,4)	
<b>T-Zellen</b>							
CD4/CD8-Ratio MB	2,5 (0,9)	0,2661	3,4 (6,5)	0,0742	0,3144	2,6 (1,8)	0,0399
CD4/CD8-Ratio VB	2,4 (0,5)		2,0 (0,5)		0,0845	2,2 (0,8)	
CD8+T Zellen (% aller T-Zellen) MB	26,7 (7,4)	0,1696	18,9 (20,0)	0,0391	0,1971	26,0 (12,6)	0,0239
CD8+T-Zellen (% aller T-Zellen) VB	27,5 (3,9)		31,5 (2,8)		0,0841	29,6 (5,5)	
CD69+T-Zellen MB	53,6 (21,5)	0,0005	43,0 (28,7)	0,0040	0,6744	48,2 (26,4)	< 0,0001
CD69+T-Zellen VB	8,5 (8,2)		12,1 (7,0)		0,1802	11,1 (8,9)	
Perforin-high (% der CD8+T-Zellen) MB	4,0 (4,8)	0,0005	11,2 (10,4)	0,0391	0,02948	5,3 (8,0)	0,02356
Perforin-high (% der CD8+T-Zellen) VB	9,0 (6,6)		12,9 (17,3)		0,7512	9,0 (14,8)	

Ergebnisse

Tregs (% der CD4+T-Zellen) MB	0,9 (1,3)	0,0342	0,3 (0,4)	0,0040	0,3415	0,5 (1,3)	< 0,0001
Tregs (% of CD4+T-Zellen) VB	5,4 (1,1)		4,5 (1,3)		0,1971	5,0 (1,5)	
<b>NK-Zellen</b>							
CD56bright/ CD16dim-NK-Zellen MB	68,0 (46,1)	0,0005	65,7 (50,5)	0,0040	0,9742	67,8 (50,3)	< 0,0001
CD56bright/ CD16dim-NK-Zellen VB	3,9 (1,7)		3,9 (2,9)		1	3,9 (2,9)	
CD56low/Perforin-high-NK-Zellen MB	52,7 (49,8)	0,0005	36,2 (58,2)	0,0040	1	40,4 (51,2)	< 0,0001
CD56low/Perforin-high-NK-Zellen VB	92,2 (4,1)		94,9 (3,2)		0,2512	92,6 (4,9)	
NKp46+NK-Zellen MB	61,1 (19,9)	0,0005	53,2 (20,6)	0,0040	0,3463	58,4 (22,5)	< 0,0001
NKp46+NK-Zellen VB	91,8 (7,0)		85,1 (16,6)		0,4176	91,5 (13,9)	
CD69+ NK-Zellen MB	79,5 (15,4)	0,0005	84,5 (13,7)	0,0040	0,3136	81,0 (16,3)	< 0,0001
CD69+NK-Zellen VB	12,3 (10,6)		18,5 (14,5)		0,1072	15,4 (15,3)	
<b>Myeloische Zellen</b> (kein statistischer Vergleich zwischen MB und VB möglich)							
CD16low/CD14high Zellen MB	63,3 (57,5)		46,0 (37,6)		0,4176	57,9 (54,5)	
CD16high/CD14low Zellen MB	26,6 (45,0)		38,7 (26,1)		0,5387	36,2 (39,1)	
Classical Monozyten VB	79,9 (11,5)		82,4 (7,1)		0,3721	82,0 (8,1)	
Intermediate Monozyten VB	4,2 (2,9)		4,4 (1,2)		1	4,3 (2,1)	
Non-Classical Monozyten VB	14,7 (8,4)		11,9 (6,0)		0,2678	13,4 (8,2)	

\* Mann-Whitney-U-Test, \*\* Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test

## 5.4 ELISA

### 5.4.1 ICAM-1

Die ICAM-1-Konzentrationen im VB waren bei den Frauen mit Endometriose signifikant niedriger als bei gesunden Kontrollen (Endometriose Median (IQR): 355,2 (201,3) ng/ml, gesunde Kontrollen Median (IQR): 459,2 (114,3) ng/ml, p-Wert: 0,0268); siehe Abbildung 24. Im MB waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der ICAM-1-Konzentrationen zu beobachten (Endometriose Median (IQR): 601,9 (449,8) ng/ml, gesunde Kontrollen Median (IQR): 673,4 (165,8) ng/ml, p-Wert: 0,9229). Insgesamt waren die ICAM-1-Konzentrationen im MB etwas höher als im VB; siehe Abbildung 24.

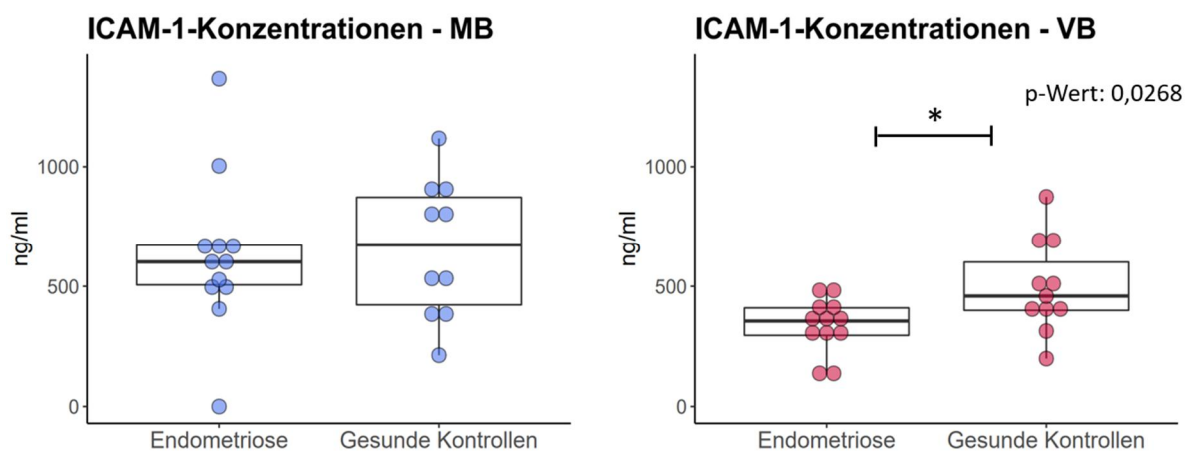


Abbildung 24: ICAM-1-Konzentrationen im MB (links) und VB (rechts), jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.

Die Konzentrationen des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 wurden mithilfe der ELISA-Methode bestimmt. Es zeigte sich eine gegenüber dem Plasma des VB erhöhte Konzentration im abzentrifugierten MB. Während sich im MB keine Unterschiede zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen zeigten, waren die Konzentrationen von ICAM-1 im VB-Plasma bei Endometriose signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.

### 5.4.2 VCAM-1

Sowohl die VCAM-1-Plasma-Konzentrationen des VB (Endometriose Median (IQR): 1089,0 (1354,4) ng/ml; gesunde Kontrollen Median (IQR): 853,0 (1076,3) ng/ml, p-Wert: 1) als auch die Konzentrationen im MB (Endometriose Median (IQR): 551,8 (362,7) ng/ml; gesunde Kontrollen Median (IQR): 543,0 (359,1) ng/ml, p-Wert: 0,7713) waren zwischen den beiden Studiengruppen (Endometriose und gesunde Kontrollen) vergleichbar. Auffällig war, dass die VCAM-1-Konzentrationen, anders als die ICAM-1-Konzentrationen, im MB niedriger waren als im VB; siehe Abbildung 25.

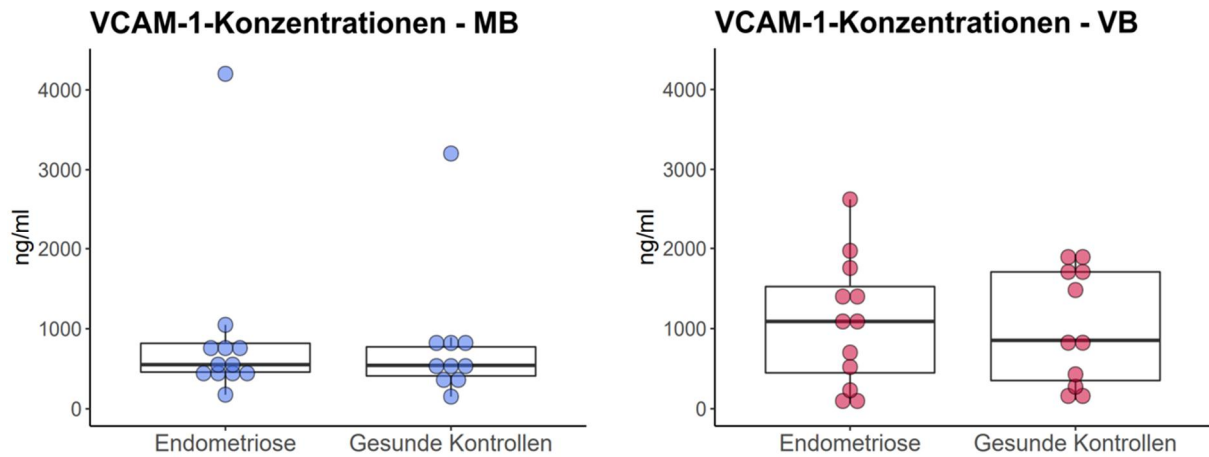


Abbildung 25: VCAM-1-Konzentrationen im MB (links) und VB (rechts), jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.

Die Konzentrationen des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 wurden ebenfalls mithilfe der ELISA-Methode bestimmt. Im MB zeigte sich eine gegenüber dem Plasma des VB verminderte Konzentration von VCAM-1. Allerdings gab es weder im MB noch in VB Unterschiede zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.

#### 5.4.3 Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$

Die Konzentrationen der Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  waren im MB sehr hoch. Um die Konzentrationen valide quantitativ bestimmen zu können, ist es notwendig, dass sich die Konzentrationen der Zytokine in den Proben in einem bestimmten Bereich befinden. Um jenes zu erreichen waren sehr hohe Verdünnungen der ursprünglichen Proben erforderlich (Verdünnungen: IL-6: 1:120, IL-8: 1:400, TNF- $\alpha$ : 1:40). Die Konzentrationen der Zytokine im MB unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Studiengruppen: IL-6: Endometriose Median (IQR): 7,7 (8,8) ng/ml, gesunde Kontrollen Median (IQR): 8,5 (12,8) ng/ml, p-Wert: 0,6744; IL-8: Endometriose Median (IQR): 57,0 (19,9) ng/ml, gesunde Kontrollen Median (IQR): 71,8 (42,3) ng/ml, p-Wert: 0,1593; TNF- $\alpha$ : Endometriose Median (IQR): 7,9 (6,8) ng/ml, gesunde Kontrollen Median: 10,0 (7,1) ng/ml, p-Wert: 0,6277; siehe Abbildung 26.

Die Konzentrationen im VB hingegen waren sehr niedrig und mit den verwendeten ELISA-Kits überwiegend unterhalb der Detektionsgrenze. Eine zahlenmäßige Auswertung ist somit nicht sinnvoll.

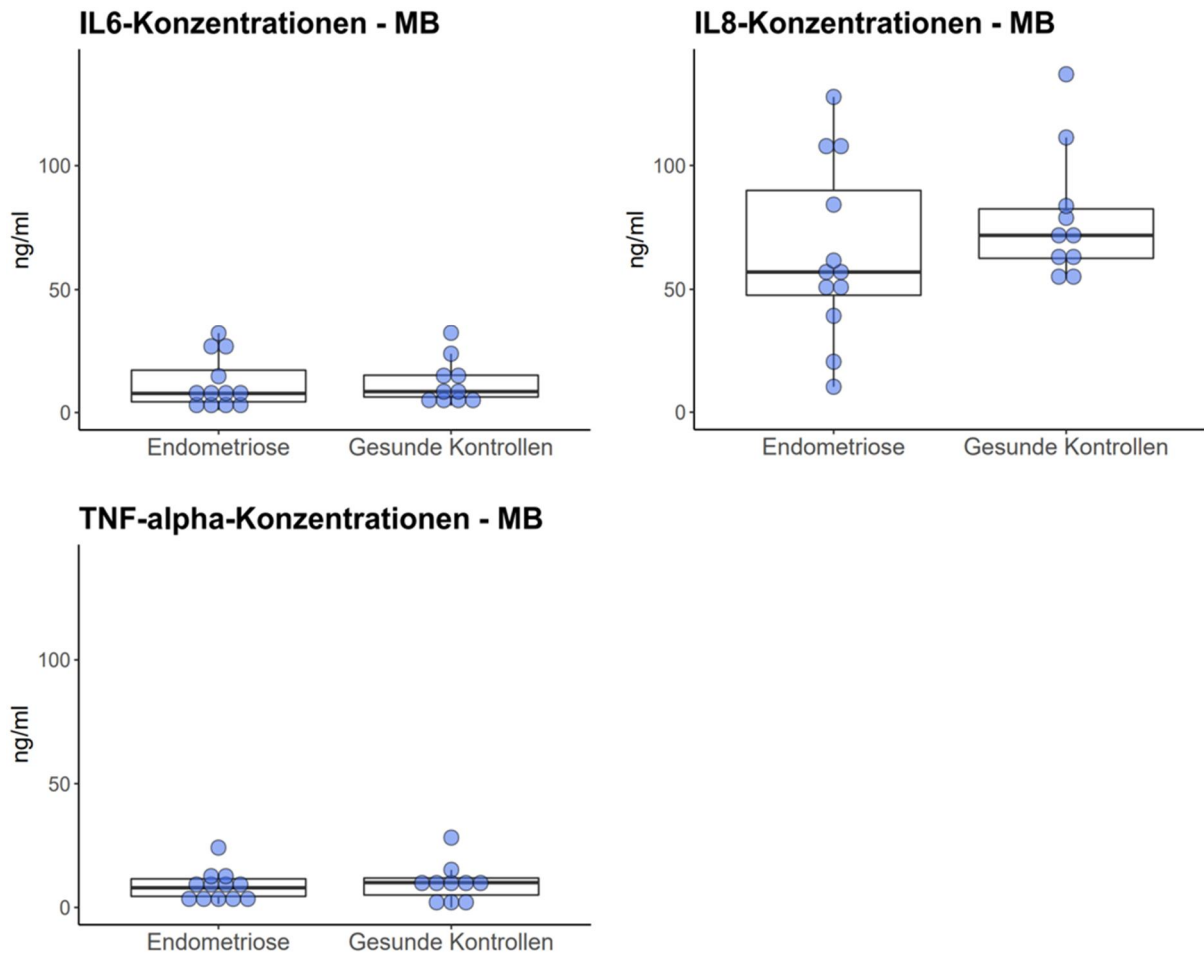


Abbildung 26: Konzentrationen von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  im MB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.

Die Konzentrationen der Zytokine IL-6, IL-8 sowie TNF- $\alpha$  im abzentrifugierten Plasma des MB wurden mithilfe der ELISA-Methode gemessen. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen. Die Konzentrationen dieser Zytokine im VB waren Großteiles unterhalb der Detektionsgrenze der verwendeten ELISA-Kits, sodass keine Werte dargestellt werden können.

## 6 Diskussion

Das Hauptinteresse der vorliegenden Studie galt dem Vergleich von mononukleären Zellen des MB zwischen Frauen mit Endometriose und gesunden Kontrollen sowie der Analyse immunologischer Parameter des MB im Vergleich zu den korrespondierenden Parametern des VB. Die mononukleären Zellen des MB wurden mithilfe von Menstruationstassen gesammelt und anschließend mithilfe der Durchflusszytometrie genauer untersucht. Die Zellen, welche aus dem MB isoliert wurden, unterschieden sich in vielerlei Hinsicht deutlich von den mononukleären Zellen des VB. Auffallende Unterschiede waren sowohl bei den T-Zellen und den NK-Zellen wie auch bei den myeloischen Zellen (Monozyten/Makrophagen) zu beobachten. Unterschiede zwischen den Endometriosepatientinnen und den gesunden Kontrollprobandinnen waren im MB bei den T-Zellen zu beobachten: die zytotoxischen, CD8-positiven T-Zellen des MB waren bei den Proben der Endometriosepatientinnen signifikant seltener Perforin-positiv als bei den Proben der gesunden Kontrollgruppe. Des Weiteren wurden im venösen Plasma in der Endometriosegruppe signifikant erniedrigte ICAM-1-Konzentrationen gemessen. Im Folgenden werden die Methoden und Ergebnisse dieser Studie genauer diskutiert.

### 6.1 Sammlung von Menstruationsblut mithilfe von Menstruationstassen

Insgesamt war das Volumen des gesammelten MB bei den Frauen mit Endometriose innerhalb von 24 Stunden mit 30,4 ml höher als bei den gesunden Kontrollpatientinnen (21,4 ml). Dieses Ergebnis deckt sich mit der bei Endometriose bekannten Menorrhagie [6]. Auch die Menge an Gewebepartikeln, die Viskosität und die Koagulation des MB waren bei den Endometriosepatientinnen höher als bei der Vergleichsgruppe. Das gesammelte MB der gesunden Kontrollen hingegen wies eine im Vergleich höhere Zelllyse auf.

Die erhöhte Anzahl an endometrialen Gewebsanteilen im MB der Endometriosepatientinnen könnte unter anderem durch eine vermehrte Peristaltik des Uterus bei der Menstruation bedingt sein [15]. Dadurch gelangen möglicherweise auch mehr vitale Endometriumzellen durch retrograde Menstruation in die Bauchhöhle und begünstigen so die Entstehung weiterer Endometrioseherde.

Im Anschluss an die makroskopische Beurteilung des MB wurde dieses weiter aufbereitet. Nach dem Filtern des Blutes mithilfe der Zellsiebe wurden am Helmholtz-Zentrum München die vitalen mononukleären Zellen isoliert und mithilfe von DMSO eingefroren. Insgesamt konnten so im Durchschnitt 1,7 Millionen vitale Zellen isoliert werden. Damit war die Zahl der vitalen Zellen, die aus dem MB isoliert werden konnten, zwar geringer als die Anzahl der vitalen Zellen, welche aus dem VB isoliert werden konnten. Dennoch bestätigte sich, wie bereits

frühere Studien zeigten, die Sammlung von MB mithilfe der Menstruationstassen als geeignete Methode zur Gewinnung vitaler Immunzellen [168, 174]. Die Menstruationstassen wurden von allen Patientinnen als praktikabel empfunden.

## **6.2 Durchflusszytometrie**

### **6.2.1 Vergleich der mononukleären Zellen zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen**

Sowohl im MB als auch im VB waren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der großen mononukleären Zellgruppen (myeloische Zellen, T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen) zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen zu beobachten. Das MB von Frauen mit Endometriose enthielt jedoch nicht signifikant weniger NK-Zellen als die Kontrollgruppe. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Warren et al. [174].

Es wird vermutet, dass NK-Zellen und eine von ihnen ausgehende, verringerte Zytotoxizität an der Pathogenese der Endometriose beteiligt sind [48, 56]. Folglich waren mögliche Unterschiede innerhalb der NK-Zellpopulation und insbesondere in der Anzahl der CD56bright/CD16dim-NK-Zellen zu erwarten. Die CD56bright/CD16dim-NK-Zellen produzieren zwar reichlich Zytokine, enthalten jedoch geringere Mengen an Perforin, Granzymen und anderen zytolytischen Granula, was auf ihre verringerte Zytotoxizität hinweist [45]. Einige frühere Studien deuteten auf einen erhöhten Prozentsatz unreifer CD56bright-NK-Zellen im Endometriumgewebe und im peripheren Blut bei Frauen mit Endometriose und Unfruchtbarkeit hin [175, 68, 56]. Allerdings konnten in der vorliegenden Studie weder für NK-Zellen des MB noch für NK-Zellen des VB signifikante Unterschiede festgestellt werden. Gründe für die abweichenden Ergebnisse könnten zum einen eine zu geringe Stichprobengröße sein, zum anderen kommen verschiedene methodische Unterschiede in Betracht: die Art und Weise sowie der Zeitpunkt der Probengewinnung, Unterschiede in der Probenverarbeitung (beispielsweise das Einfrieren von mononukleären Zellen), unterschiedliche Antikörper oder abweichende Gating-Strategien.

Auch hinsichtlich der Expression der untersuchten Oberflächen- und Immunmarker zeigten sich keine auffälligen Unterschiede bei den NK-Zellen zwischen der Endometriosegruppe und der Gruppe der gesunden Kontrollen. So war die Expression von Perforin, NKp46 und CD69 in den NK-Zellen für beide Gruppen sowohl im MB als auch im VB ähnlich. Bezüglich der NK-Zellen ließen sich also zwischen den beiden Gruppen keine auffälligen Abweichungen feststellen, welche auf eine veränderte Aktivierung oder Zytotoxizität der NK-Zellen bei Frauen mit Endometriose hinweisen würden.

Die T-Zellen können anhand der Expression der Oberflächenmarker CD4 und CD8 in ihre zwei

Hauptuntergruppen eingeteilt werden: die zytotoxischen, CD8-positiven T-Zellen und die CD4-positiven T-Helferzellen. Da bekanntermaßen bei einigen Erkrankungen das Verhältnis dieser beiden Subpopulationen verändert sein kann, berechnet man üblicherweise das CD4/CD8-Verhältnis, auch CD4/CD8-Ratio genannt. Sowohl im MB als auch im VB gab es bezüglich des CD4/CD8-Verhältnisses keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Damit einhergehend waren auch bei der Anzahl der CD8+T-Zellen (jeweils als Anteil an allen CD3+T-Zellen) keine signifikanten Unterschiede bei den Endometrioseprobandinnen zu erkennen. Zwar erreichten die Ergebnisse dieser Studie keine statistische Signifikanz, jedoch war im VB der Endometriosegruppe eine Tendenz hin zu einem höheren CD4/CD8-Verhältnis bei den T-Zellen zu sehen. Im MB hingegen war das CD4/CD8-Verhältnis eher niedriger als in der Kontrollgruppe.

Frühere Studien deuteten auf ein verändertes CD4/CD8-Verhältnis bei Vorliegen einer Endometriose hin. Während in einer Studie aus dem Jahr 2003 die CD4/CD8-Ratio der T-Zellen des peripheren Blutes bei Frauen mit Endometriose erhöht war [104], zeigte sich in der Peritonealflüssigkeit das CD4+/CD8+-Verhältnis verringert und die Anzahl der CD8+-T-Zellen erhöht [105, 106]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie passen demnach gut zu den in der Literatur publizierten Ergebnissen. Die fehlende Signifikanz könnte hier in erster Linie in einem zu kleinen Stichprobenumfang begründet sein.

Die Tregs werden meist als die FoxP3-positiven und CD25-positiven Zellen innerhalb der CD4-positiven T-Zellen definiert. Allerdings gibt es hier keine einheitlich verwendete Definition, sodass andere Autoren bisweilen andere Definitionen und Einteilungen zugrunde legen. Bei den Tregs zeigte sich in dieser Studie die Zahl der FoxP3+CD25+Treg-Zellen als Anteil an den CD4+T-Zellen bei Endometriose sowohl im MB als auch im VB als nicht-signifikant höher im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Während die meisten Studien einen erhöhten Prozentsatz an Tregs in endometriotischen Läsionen und der Peritonealflüssigkeit fanden, ist die Datenlage bezüglich veränderten Treg-Konzentrationen im eutopischen Endometrium und im peripheren Blut weniger eindeutig [109, 110]. Als immunmodulatorische Zellen können die Tregs die zytotoxische Aktivität von CD8+T-Zellen und NK-Zellen verringern [176, 177]. Es wird vermutet, dass eine erhöhte Anzahl von Tregs oder eine gesteigerte Aktivität von Tregs zu einer verminderten Zytotoxizität führen könnte, welche den Endometriumzellen erlaubt, außerhalb des Endometriums zu überleben und schließlich zu Herden heranzuwachsen [110]. Während die Anzahl der Tregs in der Endometriosegruppe nicht signifikant erhöht war, so lassen sich jedoch über deren Funktionalität im Rahmen dieser Studie keine weitergehenden Aussagen machen.

Die zweite große Untergruppe der T-Zellen, die zytotoxischen, CD8-positiven T-Zellen des MB unterschieden sich in ihrer Perforin-Expression signifikant im Vergleich zwischen den Studiengruppen (Endometriose und gesunde Kontrollen). So waren diese Zellen bei Frauen



mit Endometriose signifikant seltener Perforin-positiv als in der Kontrollgruppe. Dieser Umstand weist auf ein vermindertes zytotoxisches Potenzial dieser Zellgruppe bei Frauen mit Endometriose hin. Die verringerte Menge an Perforin-Granula der CD8+T-Zellen könnte einerseits durch veränderte Milieubedingungen und daraus resultierender, veränderter oder unterdrückter Stimulation der zytotoxischen T-Zellen durch Zytokine und andere Botenstoffe verursacht sein. Hier kommen unter anderem IL-10, VEGF oder TGF- $\beta$  in Betracht [178–180]. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die verminderte Anzahl an Perforin-Granula wäre eine erst kürzlich erfolgte, starke zytotoxische Aktivität der CD8+T-Zellen und folglich eine Degranulation und Depletion der Granula [181]. Da keine weiterführenden Messdaten zu verschiedenen Messzeitpunkten oder umfangreiche Informationen zu speziellen Botenstoffen vorliegen, ist es im Rahmen dieser Studie nicht möglich, zwischen diesen beiden Erklärungsansätzen zu differenzieren.

Auch frühere Studien weisen auf eine Beteiligung zytotoxischer T-Zellen an der Pathogenese der Krankheit hin. Beispielsweise wurde über eine fehlerhafte T-Zell-Reaktion auf autologe Endometriumzellen bei Endometriose berichtet, was auch auf eine verringerte Zytotoxizität dieser Zellen hinweist [106]. Konno et al. vermuten, dass beim Menschen die Menstruation dadurch induziert wird, dass in den abzustoßenden Endometriumzellen durch Perforin und Granzym B aus zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen eine Apoptose eingeleitet wird [108]. Ein analoger Mechanismus könnte für die Beseitigung ektopischer Endometriumzellen verantwortlich sein, um so das Einnisten von vitalen Endometriumzellen bzw. die Entstehung von endometriotischen Läsionen zu verhindern. In der onkologischen Forschung vermutet man, dass Perforin-Pathologien auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung einiger Malignome spielen könnten [182–185]. Zytotoxische Lymphozyten sollen transformierte und dislozierte Zellen detektieren und unter anderem mithilfe von Perforin und Granzymen abtöten [43]. Da die pathophysiologischen Mechanismen bei der Entstehung von bösartigen Malignomen und gutartigen Tumoren, wie bei der Endometriose vorliegend, einige Ähnlichkeiten aufweisen, kann man vermuten, dass die Perforin-vermittelte Zytotoxizität auch am Prozess der Beseitigung ektopischer Endometriumzellen beteiligt sein könnte.

Die CD14-positiven myeloischen Zellen (Monozyten bzw. Makrophagen) können anhand ihrer Oberflächenexpression von CD14 und CD16 in verschiedene Subtypen eingeteilt werden. Hier waren sowohl im MB als auch im VB keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen der Endometriosegruppe und den Zellen der gesunden Kontrollen zu sehen. In der Literatur sind bislang keine signifikanten Auffälligkeiten hinsichtlich der Verteilung von Monozyten-Subpopulationen im VB bei Endometriose beschrieben, was sich mit den Ergebnissen dieser Studie deckt. Ergebnisse früherer Studien zu CD14+Zellen des MB im Zusammenhang mit Endometriose liegen nicht vor.

### 6.2.2 Vergleich von Menstruationsblut und venösem Blut

Nachdem die Unterschiede hinsichtlich der mononukleären Zellen zwischen der Endometriosegruppe und der Kontrollgruppe sowohl im MB als auch im VB im Allgemeinen relativ gering waren, wurden für die statistischen Vergleiche von MB und VB beide Gruppen (Endometriose und gesunde Kontrollen) zusammengefasst. Zunächst erfolgte ein Vergleich bezüglich der Aufteilung der großen Zellgruppen (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und myeloische Zellen), jeweils als Anteil an allen mononukleären Zellen. Hier waren bei den CD14+Zellen (myeloische Zellen) und CD56+NK Zellen keine Unterschiede zwischen MB und VB zu erkennen. Bei den myeloischen Zellen zeigte sich jedoch eine nicht-signifikante Tendenz hin zu einem vermehrten Auftreten im MB. Im Endometriumgewebe selbst sind laut Literatur bis zu 30% aller Lymphozyten NK-Zellen [55]. Dementsprechend wurden in zwei früheren Studien (Stichprobenumfang: n=17 and n=12) tatsächlich höherer Anteile an NK-Zellen im MB im Vergleich zu peripherem Blut gefunden [186, 187], weshalb auch bei der vorliegenden Studie höhere Anteile an NK-Zellen im MB im Vergleich zum VB erwartet werden konnten. Es zeigten sich in dieser Hinsicht allerdings keine signifikanten Auffälligkeiten. Dies könnte einerseits einem zu geringen Stichprobenumfang geschuldet sein, andererseits aber auch durch methodische Unterschiede (Art und Weise der Probengewinnung und Zeitpunkt der Sammlung innerhalb des Menstruationszyklus, dem Einfrieren der Proben, den verwendeten Antikörpern etc.) erklärt werden.

Der Anteil der CD19/CD20+B-Zellen an den mononukleären Zellen war im MB signifikant höher als im peripheren Blut. Die bisher in der wissenschaftlichen Literatur publizierten Ergebnisse sind hier nicht eindeutig. Während in einer Studie die B-Zellen erniedrigt waren (n = 5, jeweils an mehreren aufeinanderfolgenden Menstruationszyklen) [168], fand eine weitere Studie keine Unterschiede bezüglich der Anzahl B-Zellen zwischen MB und VB (n=17) [186]. In einer dritten Studie wiederum waren die B-Zellen im MB in größerer Anzahl vertreten als im VB (n=12) [187], was mit den Ergebnissen dieser Studie übereinstimmt. Die widersprüchlichen Ergebnisse in der aktuellen Literatur sind auch hier vermutlich auf relativ kleine Stichprobenanzahlen und methodische Unterschiede (in einer Studie beispielsweise das Sammeln des MB direkt vor einer nachfolgenden Schwangerschaft) in den jeweiligen Studien zurückzuführen.

Die Gruppe der T-Zellen (CD3 positive Zellen) stellten sowohl im MB als auch in VB die größte Gruppe unter den mononukleären Zellen dar. Allerdings waren die T-Zellen im MB signifikant seltener als im VB, was sich mit früheren Ergebnissen anderer Studien deckt [168, 186].

In einem nächsten Schritt wurden die mononukleären Zellen des MB und des VB weiter in Subtypen der großen Zellgruppen eingeteilt und hinsichtlich ihrer Expression verschiedener Oberflächenmarker und intrazellulärer Zellmarker verglichen. Das Verhältnis der beiden

großen T-Zell-Subpopulationen, das CD4/CD8-Verhältnis, war im MB signifikant höher als im VB; entsprechend war auch der Anteil der CD8+T-Zellen an allen CD3+T-Zellen im MB signifikant niedriger. In einer Studie aus dem Jahr 2014 von van der Molen et al. (n = 5, jeweils an mehreren aufeinanderfolgenden Menstruationszyklen) hingegen war der Anteil der CD8+T-Zellen an allen T-Zellen im MB höher als im VB [168]. Auch hier muss in erster Linie die recht geringe Stichprobenanzahl bei der Bewertung der Unterschiede bedacht werden. Die Anzahl der Tregs (FoxP3+CD24+CD4+) als Anteil an den CD4+T-Zellen war im MB signifikant niedriger als im VB. Van der Molen et al. berichten hier ähnliche Prozentsätze an Tregs für das MB wie für das periphere Blut [168]. Der Zelloberflächenmarker CD69 war auf den T-Zellen des MB bei Weitem stärker exprimiert als auf den T-Zellen des VB. Zu diesem Ergebnis kamen auch van der Molen et al. in der bereits genannten Studie [168]. Die stark vermehrte Expression von CD69 kann einerseits auf einen unterschiedlichen Aktivierungsstatus hindeuten (CD69 gilt als früher Aktivierungsmarker) [188], zum anderen aber auch als Gewebemarker interpretiert werden [189].

Die NK-Zellen des MB unterschieden sich am deutlichsten von denen des VB. Die Einteilung der CD56-positiven NK-Zellen erfolgt anhand der Expression der Oberflächenmarker CD56 und CD16 in zwei Hauptpopulationen: CD56bright/CD16dim und CD56dim/CD16bright-NK-Zellen. Die NK-Zellen des MB waren mehrheitlich CD56bright/CD16dim-NK-Zellen, während jene des VB ganz überwiegend CD56dim/CD16bright-NK-Zellen waren. Die CD56bright/CD16dim-NK-Zellen stellen eine Untergruppe mit geringerer Zytotoxizität dar und sind als starke Zytokin-Produzenten bekannt [45]. Somit konnten die Ergebnisse von van der Molen et al. reproduziert werden, welche ebenfalls signifikant mehr CD56bright/CD16dim-NK-Zellen im MB fanden [168]. Diese Zusammensetzung der NK-Zellen ist vergleichbar mit der von endometrialen NK-Zellen, bei denen es sich ebenfalls überwiegend um CD56bright-NK-Zellen handelt [190]. Darüber hinaus war im MB der Anteil der NK-Zellen, der Perforin positiv war, geringer als im VB. Zudem war die Perforin-Expression beinahe ausschließlich in CD56dim NK-Zellen zu finden. Dieser Umstand deutet in der Tat auf eine verminderte zytotoxische Kapazität der endometrialen NK-Zellen im Vergleich zu den NK-Zellen des VB hin.

Genau wie die T-Zellen des MB exprimierten auch die NK-Zellen des MB signifikant mehr CD69 auf ihrer Zelloberfläche als die entsprechenden Zellen des VB. Auch hier kann dies einerseits auf eine veränderte Zellaktivierung hindeuten oder die vermehrte Expression von CD69 im Sinne eines Gewebemarkers interpretiert werden. Des Weiteren unterschieden sich die NK-Zellen des MB auch in einer signifikant verminderten Expression des NK-Zellrezeptors NKp46 (CD335) im Vergleich zu den entsprechenden Zellen des VB. Ähnlich wie die unterschiedliche Zusammensetzung der NK-Subtypen und die verminderte Perforin-Expression der MB-NK-Zellen, deutet die verminderte Expression des NKp46-Rezeptors auf

eine verminderte Zytotoxizität der NK-Zellen des MB hin.

Monozyten und Makrophagen gehören zu den myeloischen Zellen und bilden das Monozyten-Makrophagen-System. Die Monozyten zirkulieren zunächst im Blut und wandern schließlich ins Gewebe aus, wo sie dann Makrophagen genannt werden. Die Monozyten des peripheren Blutes werden klassischerweise entsprechend ihrer Expression von CD16 und CD14 in drei Gruppen eingeteilt: Classical Monozyten (CD14<sup>high</sup>/CD16<sup>low</sup>), Intermediate Monozyten (CD14<sup>high</sup>/CD16<sup>high</sup>) und Non-Classical Monozyten (CD14<sup>low</sup>/CD16<sup>high</sup>) [71, 191, 192]. Diese Einteilung wurde zur Klassifizierung der Monozyten des VB zugrunde gelegt. Allerdings erschien diese Art der Klassifikation für die myeloischen des MB als nicht adäquat. Im MB ließen sich zwei Hauptgruppen von myeloischen unterscheiden: CD16<sup>low</sup>/CD14<sup>high</sup>-Zellen und CD16<sup>high</sup>/CD14<sup>low</sup> Zellen. Ob und inwieweit die beiden Zellgruppen funktional den Classical Monozyten bzw. Intermediate und Non-Classical Monozyten des venösen Blutes entsprechen, kann im Rahmen dieser Studie nicht beantwortet werden. Eine alternative Erklärung könnte es sein, dass diese Zellen vielmehr (teil-) differenzierten Gewebsmakrophagen entsprechen und somit naturgemäß eine andere Differenzierung und Oberflächenexpression aufweisen als Monozyten des peripheren Blutes. Es muss weiterhin erwähnt werden, dass diese Art der Einteilung nicht für jede einzelne MB-Probe dieser Studie als rundum geeignet erschien. Bei insgesamt 3 Proben passte die oben beschriebene, dichotome Einteilung in den CD14/CD16-Dotplots nur unzureichend. Da bis zum aktuellen Zeitpunkt noch keine publizierten Studienergebnisse zu den myeloischen Zellen des MB vorhanden sind, besteht keine Möglichkeit die Resultate dieser Studie hinsichtlich der myeloischen Zellen des MB mit den Ergebnissen anderer Studien zu vergleichen. Weitere Forschung ist notwendig, um diese Klassifizierung zu validieren bzw. eine geeignetere Einteilung für die myeloischen Subtypen des MB zu finden und die exakte Herkunft dieser Zellen genauer zu bestimmen.

Die oben beschriebenen Unterschiede in der Verteilung der großen Zellgruppen und noch mehr die Unterschiede in den Subtypen sowie die veränderte Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern lassen stark vermuten, dass die mithilfe der Menstruationstassen gesammelten mononukleären Zellen mukosalen bzw. endometrialen Ursprungs sind und bestätigen ferner die Annahme, dass die aus dem MB stammenden Immunzellen in vielerlei Hinsicht das immunologische Milieu des Endometriums repräsentieren [168].

### **6.3 ELISA – Zelladhäsionsmoleküle und Zytokine**

Veränderungen bei immunologischen Botenstoffen wie Zytokinen oder Zelladhäsionsmolekülen könnten eine mögliche Erklärung für die bei der Endometriose beschriebenen Veränderungen der Immunzellen darstellen. Diese Botenstoffe haben

vielfältige Auswirkungen auf die verschiedenen Immunzellen und können die Funktionalität von Zellen unter anderem der zytotoxischen CD8+T-Zellen verändern [193]. Eine Reihe früherer Studien fand Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen einer Endometrioseerkrankung und Konzentrationen von Zytokinen oder Zelladhäsionsmolekülen in peripherem Blut oder in der Peritonealflüssigkeit [162, 194–196]. Nach aktuellem Kenntnisstand gibt es bislang jedoch noch keine Studien zu möglichen Unterschieden in den Konzentrationen von Zytokinen und Zelladhäsionsmolekülen im MB. Deshalb wurden im Rahmen dieser Studie die Konzentrationen der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 und der Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  sowohl im abzentrifugierten Überstand des MB sowie im Plasma des VB gemessen. Es wird vermutet, dass die genannten Zelladhäsionsmoleküle und Zytokine an der Pathophysiologie der Endometriose beteiligt sein könnten.

In der Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle zeigten sich im VB signifikant niedrigere Konzentrationen für lösliches ICAM-1 bei den Frauen mit Endometriose. Von einigen Autoren wurde die Hypothese aufgestellt, dass hohe Konzentrationen an löslichem ICAM-1 die Immunüberwachung von ektopischen Endometriumzellen durch die Leukozyten, insbesondere den NK-Zellen, beeinflussen könnte [160, 159]. Pathophysiologischer Hintergrund ist, dass zellgebundenes ICAM-1 auf Endometriumzellen die Zell-Zell-Interaktionen zwischen Endometriumzelle und Immunzelle initiiert und daher mutmaßlich eine wichtige Rolle bei der Immunüberwachung spielt [158]. Darüber hinaus ist ICAM-1 auch an der Leukodiapedese, dem Auswandern von Immunzellen aus dem Gefäßsystem, beteiligt, indem es die Zellkontakte zwischen Leukozyten und Endothelzellen vermittelt [197].

Die erniedrigten ICAM-1-Konzentrationen im VB bestätigen die Ergebnisse früherer Studien [161, 162], allerdings wurden in anderen Studien auch ähnliche oder sogar höhere Konzentrationen von ICAM-1 im peripheren Blut bei Frauen mit Endometriose gefunden [163, 164]. Kuessel et al. beispielsweise berichteten signifikant niedrigere ICAM-1-Serumspiegel bei Frauen mit Endometriose im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Die Serumspiegel stiegen allerdings nach Laparoskopie stark an und waren 6-10 Wochen nach Laparoskopie signifikant höher als in der Kontrollgruppe [161]. In einer Studie von Placido et al. hingegen wurden bei Frauen mit Endometriose im Stadium I-II signifikant niedrigere sICAM-1-Spiegel gemessen als bei Endometriosepatientinnen im Stadium III-IV [198]. Die Ergebnisse dieser beiden Studien deuten einen wichtigen Einfluss des Krankheitsstadiums auf die sICAM-1-Spiegel im VB an. Darüber hinaus könnten die sICAM-1-Spiegel durch den Menstruationszyklus beeinflusst werden und so der Blutentnahmezeitpunkt eine wichtige Rolle spielen. Dies wäre eine weitere Erklärung für die sich widersprechenden Ergebnisse in der wissenschaftlichen Literatur.

Im Gegensatz zu den Messergebnissen im VB zeigten sich im MB keine Unterschiede in den Konzentrationen von ICAM-1 zwischen der Endometriosegruppe und den gesunden

Kontrollen. Auch die Konzentrationen des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-1 im MB und VB unterschieden sich nicht wesentlich zwischen den Probandinnen mit Endometriose und den gesunden Kontrollprobandinnen. Im VB waren die Plasmaspiegel von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  mit den in dieser Studie verwendeten ELISA-Kits größtenteils unterhalb des nachweisbaren Bereichs. Hier müssten ggf. high-sensitiv ELISA-Tests angewendet werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Die Konzentrationen in MB waren dagegen sehr hoch, was eine hohe Verdünnung erforderlich machte. Es bleibt an dieser Stelle jedoch ungewiss, ob diese hohen Zytokinkonzentrationen tatsächlich sehr große Mengen an extrazellulären Zytokinen im MB repräsentieren oder ob diese vielmehr das Resultat eines Lagerungs- und Verarbeitungsartefaktes sein könnten. Die zelluläre Produktion von Zytokinen durch Immunzellen und die Zellyse von Leukozyten, aber auch von roten Blutkörperchen, kann zu artifiziell hohen Mengen an Zytokinen im Zentrifugationsüberstand des MB führen [199, 200]. Als mögliche Ursachen kommen eine unsachgemäße Lagerung der gesammelten Proben durch manche Studienteilnehmerinnen infrage. So könnte es während der Lagerungszeit zu einer durch Zellstress ausgelösten, starken Produktion von Zytokinen durch die Leukozyten gekommen sein. Zudem gab es eine Verzögerung von bis zu 4 Tagen zwischen Sammlung des MB und der Übergabe ans Studienteam. Folglich muss eine relevante Zellyse in Betracht gezogen werden. Beide Möglichkeiten könnten die sehr hohen Werte zumindest in Teilen erklären.

In einer Studie aus 2018 kultivierten Luckow Invitti et al. durch Biopsie gewonnene Endometriumzellen von Frauen mit Endometriose und gesunden Kontrollen [201]. Die von Frauen mit Endometriose gewonnenen Endometriumzellen produzierten im Laufe der Zeit (gemessen an Tag 7 und 10) signifikant mehr IL-6 und IL-8 als Endometriumzellen von gesunden Frauen. Messungen in den ersten Tagen der Zellkultur (gemessen an Tag 1 und 3) allerdings ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Zellen des MB in dieser Studie wurden nicht kultiviert und die gesammelten Proben innerhalb von 4 Tagen verarbeitet. Somit sind die Ergebnisse (keine Unterschiede zwischen Frauen mit Endometriose und gesunden Kontrollen) in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Luckow Invitti et al.

### **6.4 Stärken und Schwächen der Studie – Diskussion der Methoden**

Die Studie zeichnet sich durch mehrere Stärken, aber auch einige Schwächen aus. Eine Analyse von Immunzellen des MB wurde bisher nur in sehr wenigen Studien durchgeführt. Untersuchungen von mononukleären Zellen des MB bei Frauen mit Endometriose sind äußerst selten und entsprechend begrenzt ist das aktuelle medizinische Wissen in dieser Hinsicht. Ähnliches gilt für die Bestimmung von Botenstoffen wie Zelladhäsionsmoleküle oder

Interleukine im MB; auch hier ist das medizinische Wissen äußerst gering.

Die Sammlung von MB mithilfe von Menstruationstassen zu Studienzwecken wurde bisher eher selten praktiziert, durch diese Studie konnte die Praktikabilität dieser Methode bestätigt werden. Eine in diesem Zusammenhang zu erwähnende Limitation bei der Sammlung von MB ist die eingeschränkte Möglichkeit, den Sammlungs- und Aufbewahrungsprozess zu standardisieren. Anders als bei der venösen Blutentnahme schwankt bei der Sammlung von MB stets die Menge und Beschaffenheit der Probe. Darüber hinaus muss das gesammelte MB für eine gewisse Zeit bis zur Übergabe an das Studienpersonal von den Probandinnen selbst gelagert werden und ist damit unterschiedlichen Einflüssen (Temperatur, Dauer bis zur Verarbeitung, Transport etc.) ausgesetzt. Diese methodisch-bedingten Schwankungen bei der Probengewinnung und -lagerung des MB durch die Studienteilnehmerinnen gibt es bei der Untersuchung von venösem Vollblut nicht oder nur in deutlich geringerem Ausmaß. Um die Unterschiede zwischen den Teilnehmerinnen möglichst zu minimieren, erhielten diese eine genaue und detaillierte Anleitung zur Sammlung und Aufbewahrung des MB. Inwieweit diese methodisch-bedingten Schwankungen die Resultate der Messungen beeinflusst haben, kann an dieser Stelle nicht mit Sicherheit beurteilt werden.

Die Immunzellen des gesammelten MB und VB wurden mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht, welche ein etabliertes, aber aufwändiges Standardverfahren zur Analyse von Zellen ist. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Studie von einem erfahrenen und spezialisierten Team des Helmholtz-Zentrum Münchens durchgeführt, sodass von validen Messergebnissen auszugehen ist. Nach Gewinnung und Isolation der mononukleären Zellen mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation wurden diese zunächst mithilfe von DMSO eingefroren (Kryokonservierung). Es bleibt zu bedenken, dass die Kryokonservierung unter Umständen die Viabilität der Zellen beeinflusst oder die Expression von bestimmten Oberflächenmarkern induziert haben könnte. Dies würde insbesondere die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Studien erschweren. Allerdings haben frühere Studien gezeigt, dass die Kryokonservierung eine adäquate Methode nicht nur zur Analyse von mononukleären Zellen des VB, sondern auch zur Untersuchung mukosaler Leukozyten darstellt [202, 203].

Die unterschiedlichen Schritte der Probenverarbeitung- und Messung (Isolierung der mononukleären Zellen, Einfrieren der Proben, Durchführung der Durchflusszytometrie) wurden jeweils von derselben Person durchgeführt, um eine größtmögliche Einheitlichkeit im methodischen Prozess zu gewährleisten und die Interassay-Variabilität zu minimieren. Die beiden Proben (MB und VB) derselben Probandin wurden jeweils gemeinsam verarbeitet und gemessen. In jedem Messdurchgang der Durchflusszytometrie wurden sowohl Proben von Endometriosepatientinnen als auch von gesunden Kontrollprobandinnen verwendet, sodass auch hier eine bestmögliche Vergleichbarkeit gewährleistet ist.

Insgesamt wurden 12 Frauen mit operativ-gesicherter Endometriose und 11 gesunde Kontrollen in diese Studie eingeschlossen. Alle Teilnehmerinnen waren vor Teilnahme an der Studie zur gynäkologischen Untersuchung bei einer erfahrenen Fachärztin für Gynäkologie, wo die Endometriose per Sonographie nochmals bestätigt bzw. im Falle der gesunden Kontrollen ausgeschlossen wurde. Die Ergebnisse dieser Pilotstudie mit einer Stichprobenanzahl von 23 sind statistisch auswertbar und besitzen bereits eine vernünftige Aussagekraft. Zudem ist diese Studie die bislang umfangreichste, welche mononukleäre Zellen des MB von Frauen mit Endometriose untersuchte. Nichtsdestotrotz haben statistische Zufallsschwankungen in den Messwerten bei einem Stichprobenumfang von 23 noch einen wichtigen Einfluss. Es bedarf daher zur Verifizierung der gefunden Ergebnisse weiterer Forschung mit umfangreicheren Stichproben. Darüber hinaus ist die Trennschärfe (Test-Power) der statistischen Tests bei einem Stichprobenumfang von 23 im Allgemeinen zu gering, um sehr geringe Unterschiede zwischen den Studiengruppen zuverlässig zu detektieren.

## 7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die nicht-invasive Sammlung von MB mithilfe sogenannter Menstruationstassen bewies sich in dieser Studie als praktikable und wertvolle Möglichkeit zur immunologischen Untersuchung des MB. Der Einsatz ist auch für umfangreichere Studien möglich und könnte so zukünftig ein wichtiges Instrument in der gynäkologischen Forschung sein. Die mononukleären Zellen des gesammelten MB sind von den Zellen des VB in vielerlei Hinsicht verschieden. Unterschiede sind unter anderem bei den NK-Zellen, T-Zellen und den myeloischen Zellen zu beobachten. Die mononukleären Zellen des MB ähneln in wesentlichen Punkten denen des Endometriums und repräsentieren so in gewisser Weise das immunologische Milieu der Uterusschleimhaut.

Die zytotoxischen CD8+T-Zellen des MB enthielten bei Frauen mit Endometriose signifikant weniger Perforin-Granula im Vergleich zu den zytotoxischen T-Zellen gesunder Kontrollen. Dieser Umstand weist auf ein vermindertes zytotoxisches Potential dieser Zellen hin. Zur Eliminierung von vitalen Endometriumzellen, die durch retrograde Menstruation u.a. in die Bauchhöhle gelangen, bedarf es einer ausreichenden Zytotoxizität verschiedener Immunzellen. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass die eingeschränkte Zytotoxizität der CD8+T-Zellen an der Pathophysiologie der Endometriose-Erkrankung beteiligt sein könnte. Des Weiteren waren die ICAM-1-Konzentrationen im VB bei Frauen mit Endometriose signifikant niedriger.

Auf welche kausalen Ursachen die gefundenen immunologischen Unterschiede zurückzuführen sind, muss an dieser Stelle offenbleiben. Infrage kommen neben genetischen Ursachen [19] und Umwelteinflüssen [204] auch psychoneuroimmunologische Aspekte. Ein Review kam zu dem Ergebnis, dass Stress und Depressionen mit einer verringerten T-Zell-



und NK-Zell-Zytotoxizität assoziiert sind und auf diese Weise die Beseitigung von Tumorzellen durch das Immunsystem beeinträchtigt sein kann [205]. Da die Endometriose – wie bereits beschrieben – viele pathophysiologische Gemeinsamkeiten mit malignen Tumorerkrankungen aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass auch für die Endometriose psychoneuroimmunologische Ursachen in Frage kommen. Dieser Umstand kann jedoch insbesondere auch als Chance für die Behandlungsmöglichkeiten der Endometriose betrachtet werden. In weiteren Übersichtsarbeiten wurde festgestellt, dass sich beispielsweise psychotherapeutische Interventionen oder Achtsamkeitsmeditation auf diverse Immunparameter – wie Zytokinkonzentrationen oder Anzahl und Funktionalität von Immunzellen – auswirken können [206]. Es kann vermutet werden, dass auch bei der Endometriose solche neuroimmunologischen Effekte bei den verschiedenen psychotherapeutischen und anderen nicht-medikamentösen Therapieformen, wie zum Beispiel der SART-Therapie [10], maßgeblich am Therapieerfolg beteiligt sein könnten.

Die Ergebnisse dieser Studie werfen weiterhin die Frage auf, ob die Sammlung von MB mithilfe von Menstruationstassen zukünftig für die nicht-invasive Diagnostik der Endometriose genutzt werden könnte. Die aktuell zur Verfügung stehenden diagnostischen Möglichkeiten wie venöse Blutentnahme oder Sonographie reichen in vielen Fällen nicht aus, um das Vorhandensein einer Endometriose-Erkrankung mit ausreichender Sicherheit festzustellen. Möglicherweise bietet sich mit der Analyse des MB eine weitere, nicht-invasive diagnostische Möglichkeit, die das bestehende Spektrum ergänzen könnte und so zu einer zuverlässigeren und schnelleren Diagnose beitragen kann. Besonders erfreulich wäre es, wenn hierdurch eine diagnostische Bauchspiegelung und die damit einhergehenden medizinischen Risiken wie Blutung, Infektion oder Verletzung von umliegenden Organen, in einigen Fällen vermieden werden könnte.

Nach wie vor gibt es zur Behandlung der Endometriose keine Kausaltherapie und in nicht wenigen Fällen kann mit den aktuell zur Verfügung stehenden therapeutischen Möglichkeiten keine ausreichende Symptomkontrolle erreicht werden. Entstehungs- bzw. Manifestationsort der Endometriose sind das Endometrium bzw. die Organe des kleinen Beckens. Da das Menstruationsblut direkt vom Ort des Krankheitsgeschehens ausgeht, ist es im Vergleich zu VB mutmaßlich aussagekräftiger in Hinblick auf die Erforschung pathophysiologischer Zusammenhänge. Das pathophysiologische Verständnis der Endometriose-Erkrankung könnte durch die weitere Erforschung des MB erweitert und vertieft werden. Es besteht somit die Hoffnung, dass sich hieraus mittelfristig Ansätze für neue Behandlungsmöglichkeiten ergeben. Ziel ist es, dem teils immensen Leidensdruck vieler an Endometriose erkrankter Frauen medizinisch besser gerecht werden zu können.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Auswertungsstrategie (Gating) der Durchflusszytometrie.....	43
Abbildung 2: Vergleich der großen Zellgruppen zwischen Frauen mit Endometriose und gesunden Kontrollen im Menstruationsblut. ....	50
Abbildung 3: Vergleich der großen Zellgruppen zwischen Frauen mit Endometriose und gesunden Kontrollen im venösen Blut. ....	51
Abbildung 4: Säulendiagramme zur Verteilung der großen Zellgruppen. ....	52
Abbildung 5: CD4/CD8-Verhältnis im MB und VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen. ....	53
Abbildung 6: Anteile der CD8+T-Zellen an allen T-Zellen im MB und VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen. ....	54
Abbildung 7: Häufigkeit von Perforin-positiven CD8+T-Zellen im MB und VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen. ....	55
Abbildung 8: Dichteplots zur Perforin-Expression von zytotoxischen T-Zellen im MB. ....	56
Abbildung 9: Anteile der Tregs (FoxP3+CD25+) an den CD4+T-Zellen im MB und VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen. ....	57
Abbildung 10: Verteilung der NK-Zell-Subpopulationen im MB und VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen. ....	58
Abbildung 11: Häufigkeit von CD56low/Perforin-high-NK-Zellen im MB und VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen. ....	59
Abbildung 12: Anteile der NKp46-positiven NK-Zellen an allen NK-Zellen im MB und VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen. ....	60
Abbildung 13: Verteilung der Makrophagen-Subpopulationen (CD16low/CD14high und CD16high/CD14low) als Anteil an allen Makrophagen im MB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen. ....	61
Abbildung 14: Verteilung der Monozyten-Subpopulationen im VB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen. ....	62
Abbildung 15: Verteilung der großen Zellgruppen als Anteile an den mononukleären Zellen im Vergleich zwischen MB und VB. ....	64
Abbildung 16: CD4/C8-Verhältnis der T-Zellen, Anteil der zytotoxischen CD8+T-Zellen an allen CD3+T-Zellen und Anteil der Perforin-positiven CD8+T-Zellen an allen CD8+T-Zellen; jeweils im Vergleich zwischen MB und VB. ....	65
Abbildung 17: Anteile der CD69-positiven T-Zellen an allen T-Zellen und Anteile der FoxP3+CD25+Tregs an den CD4+T-Zellen, jeweils im Vergleich zwischen MB und VB. ....	66
Abbildung 18: Repräsentative Dotplots der Tregs (FoxP3+CD25+). ....	67
Abbildung 19: Anteile der CD56bright/CD16dim-NK-Zellen an den CD56+NK-Zellen (links) und Anteile der Perforin-high-NK-Zellen an den CD56+NK-Zellen (rechts), jeweils im	

## Abbildungsverzeichnis

Vergleich zwischen MB und VB.....	68
Abbildung 20: Beispielhafte Dotplots der NK-Zellen und deren Expression von CD56 und CD16 im MB und VB. ....	69
Abbildung 21: Perforin-Expression der NK-Zellen im MB und VB. ....	70
Abbildung 22: Anteile der CD69+NK-Zellen an allen CD56+NK-Zellen (links) und Anteile der NKp46+NK-Zellen an allen CD56+NK-Zellen (rechts), jeweils im Vergleich zwischen MB und VB. ....	71
Abbildung 23: Beispielhafte Plots der Subpopulationen der myeloischen Zellen.....	72
Abbildung 24: ICAM-1-Konzentrationen im MB (links) und VB (rechts), jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen. ....	75
Abbildung 25: VCAM-1-Konzentrationen im MB (links) und VB (rechts), jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen. ....	76
Abbildung 26: Konzentrationen von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ im MB, jeweils im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen. ....	77

## 9 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Antikörper des Panel 1: Funktion bzw. Aussagekraft .....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 2: Antikörper des Panel 2: Funktion bzw. Aussagekraft .....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 3: Volumen und optische Beurteilung des Menstruationsblutes im Vergleich zwischen Endometriose und gesunden Kontrollen.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie.....</i>	<i>73</i>

## 10 Abkürzungsverzeichnis

<i>APC</i>	<i>antigen presenting cells (antigenpräsentierende Zellen)</i>
<i>ADCC</i>	<i>antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimethylsulfoxid</i>
<i>eNK</i>	<i>endometriale NK-Zellen</i>
<i>FoxP3</i>	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
<i>FSC</i>	<i>Forward Scatter (Vorwärtsstreuung)</i>
<i>HRP</i>	<i>Meerrettichperoxidase</i>
<i>IL</i>	<i>Interleukin</i>
<i>IQR</i>	<i>Interquartile range / Interquartilsabstand</i>
<i>ITAM</i>	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation Motive</i>
<i>KIRs</i>	<i>inhibitory killer immunoglobulin-like receptors</i>
<i>LFA-1</i>	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
<i>MB</i>	<i>Menstruationsblut</i>
<i>MHC-I-Komplex</i>	<i>Major Histocompatibility Complex-1</i>
<i>MHC-II-Komplex</i>	<i>Major Histocompatibility Complex-2</i>
<i>NCRs</i>	<i>natural cytotoxicity receptors</i>
<i>NK-Zellen</i>	<i>Natürliche Killerzellen</i>
<i>rASRM-Klassifikation</i>	<i>Revised Classification der American Society for Reproductive Medicine</i>
<i>SD</i>	<i>Standardabweichung</i>
<i>SSC</i>	<i>Side Scatter (Seitwärtsstreuung)</i>
<i>TCR</i>	<i>T-Zell-Rezeptor</i>
<i>TH1-Helferzellen</i>	<i>Typ1-T-Helferzellen</i>
<i>TH2-Helferzellen</i>	<i>Typ2-T-Helferzellen</i>
<i>TMB</i>	<i>Tetramethylbenzidin</i>
<i>TNF- <math>\alpha</math></i>	<i>Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math></i>
<i>Tregs</i>	<i>regulatorische T-Zellen</i>

## Abkürzungsverzeichnis

<i>VB</i>	<i>venöses Blut</i>
<i>VLA-4</i>	<i>very late antigen-4</i>

## 11 Literaturverzeichnis

1. Giudice LC, Kao LC (2004) Endometriosis. *The Lancet* 364(9447):1789–1799. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17403-5
2. Nezhat C, Nezhat F, Nezhat C (2012) Endometriosis: ancient disease, ancient treatments. *Fertil Steril* 98(6 Suppl):S1-62. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.001
3. Brosens I, Benagiano G (2011) Endometriosis, a modern syndrome. *Indian J Med Res* 133(6):581–593
4. Ulrich U (2013) Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Endometriose. Zuckschwerdt, München
5. Hudelist G, Fritzer N, Thomas A et al. (2012) Diagnostic delay for endometriosis in Austria and Germany. Causes and possible consequences. *Hum Reprod* 27(12):3412–3416. doi: 10.1093/humrep/des316
6. Keckstein J (ed) (2009) Endometriose. Die verkannte Frauenkrankheit ; Diagnostik und Therapie aus ganzheitsmedizinischer Sicht, 5., vollst. überarb. Neuaufl. Genderforschung, Frauenforschung, Frauengesundheit. Diametric-Verl., Würzburg
7. Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S et al. (2010) Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet* 27(8):441–447. doi: 10.1007/s10815-010-9436-1
8. Engel J, Berkes E, Tinneberg HR (2015) Klassifikation der Endometriose. *Gynkologe* 48(3):200–208. doi: 10.1007/s00129-014-3423-z
9. Lütje W, Brandenburg U (2003) Psychosomatische Aspekte der Endometriose (Psychosomatic aspects of endometriosis). *Zentralbl Gynakol* 125(7-8):281–285. doi: 10.1055/s-2003-42283
10. Meissner K, Schweizer-Arau A, Limmer A et al. (2016) Psychotherapy With Somatosensory Stimulation for Endometriosis-Associated Pain: A Randomized Controlled Trial. *Obstet Gynecol* 128(5):1134–1142. doi: 10.1097/AOG.0000000000001691
11. Beissner F, Preibisch C, Schweizer-Arau A et al. (2018) Psychotherapy With Somatosensory Stimulation for Endometriosis-Associated Pain: The Role of the Anterior Hippocampus. *Biol Psychiatry* 84(10):734–742. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.01.006
12. Burney RO, Giudice LC (2012) Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 98(3):511–519. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.029
13. Sourial S, Tempest N, Hapangama DK (2014) Theories on the pathogenesis of endometriosis. *Int J Reprod Med* 2014:179515. doi: 10.1155/2014/179515
14. Harirchian P, Gashaw I, Lipskind ST et al. (2012) Lesion kinetics in a non-human primate model of endometriosis. *Hum Reprod* 27(8):2341–2351. doi: 10.1093/humrep/des196
15. Weinschenk S (2004) Endometriose, Dysmenorrhö, Sterilität und vegetatives Nervensystem. *Erfahrungsheilkunde* 53(09):523–532. doi: 10.1055/s-2004-828286
16. Leyendecker G (2002) Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium. *Human Reproduction* 17(10):2725–2736. doi: 10.1093/humrep/17.10.2725
17. Leyendecker G, Kunz G, Wildt L et al. (1996) Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility. *Hum Reprod* 11(7):1542–1551
18. Bontis JN, Vavilis DT (1997) Etiopathology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 816:305–309
19. Rahmioglu N, Montgomery GW, Zondervan KT (2015) Genetics of endometriosis. *Womens Health (Lond)* 11(5):577–586. doi: 10.2217/whe.15.41
20. Wieser F, Wenzl R, Taylor RN et al. (2004) Genetik der Endometriose. *Gynkologe* 37(8). doi: 10.1007/s00129-004-1558-z
21. Ferreira ALL, Bessa MMM, Drezett J et al. (2016) Quality of life of the woman carrier of endometriosis. Systematized review. *Reprodução & Climatério* 31(1):48–54. doi: 10.1016/j.recli.2015.12.002
22. Fedele L, Parazzini F, Bianchi S et al. (1990) Stage and localization of pelvic endometriosis and pain. *Fertil Steril* 53(1):155–158

23. Vercellini P, Trespidi L, Giorgi O de et al. (1996) Endometriosis and pelvic pain. Relation to disease stage and localization. *Fertil Steril* 65(2):299–304
24. (2001) Relationship between stage, site and morphological characteristics of pelvic endometriosis and pain. *Hum Reprod* 16(12):2668–2671
25. Walling MK, Reiter RC, O'Hara MW et al. (1994) Abuse history and chronic pain in women. I. Prevalences of sexual abuse and physical abuse. *Obstet Gynecol* 84(2):193–199
26. Rapkin AJ, Kames LD, Darke LL et al. (1990) History of physical and sexual abuse in women with chronic pelvic pain. *Obstet Gynecol* 76(1):92–96
27. Latthe P, Mignini L, Gray R et al. (2006) Factors predisposing women to chronic pelvic pain. Systematic review. *BMJ* 332(7544):749–755. doi: 10.1136/bmj.38748.697465.55
28. Johannes Blitzer (2011) Psychosomatic Aspects of Endometriosis. *Journal of Endometriosis*(3):166–170. doi: 10.5301/JE.2011.8906
29. Herington JL, Bruner-Tran KL, Lucas JA et al. (2011) Immune interactions in endometriosis. *Expert Rev Clin Immunol* 7(5):611–626. doi: 10.1586/eci.11.53
30. Parente Barbosa C, Bentes De Souza AM, Bianco B et al. (2011) The effect of hormones on endometriosis development. *Minerva Ginecol* 63(4):375–386
31. Noble LS, Simpson ER, Johns A et al. (1996) Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81(1):174–179. doi: 10.1210/jcem.81.1.8550748
32. Bulun SE, Cheng Y-H, Yin P et al. (2006) Progesterone resistance in endometriosis. Link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol* 248(1-2):94–103. doi: 10.1016/j.mce.2005.11.041
33. Provinciali M, Di Stefano G, Muzzioli M et al. (1995) Relationship between 17-beta-estradiol and prolactin in the regulation of natural killer cell activity during progression of endometriosis. *J Endocrinol Invest* 18(8):645–652
34. Holder KA, Comeau EM, Grant MD (2018) Origins of natural killer cell memory. Special creation or adaptive evolution. *Immunology* 154(1):38–49. doi: 10.1111/imm.12898
35. Abel AM, Yang C, Thakar MS et al. (2018) Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* 9:1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869
36. Blum KS, Pabst R (2007) Lymphocyte numbers and subsets in the human blood. Do they mirror the situation in all organs? *Immunol Lett* 108(1):45–51. doi: 10.1016/j.imlet.2006.10.009
37. Caligiuri MA (2008) Human natural killer cells. *Blood* 112(3):461–469. doi: 10.1182/blood-2007-09-077438
38. Ljunggren H-G, Kärre K (1990) In search of the 'missing self'. MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today* 11:237–244. doi: 10.1016/0167-5699(90)90097-S
39. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J et al. (2017) Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front. Immunol.* 8:292. doi: 10.3389/fimmu.2017.00292
40. Welsch, Deller T (2010) *Lehrbuch histologie*, 3. Auflage. Urban & Fischer, Munich [Germany]
41. Rassow J (2012) *Biochemie*. Mit 67 Tabellen ; [mit Stoffwechselweg-Animationen], 3., vollst. überarb. u. erw. Aufl. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart
42. Jacobs R, Hintzen G, Kemper A et al. (2001) CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur. J. Immunol.* 31(10):3121–3126. doi: 10.1002/1521-4141(2001010)31:10<3121::AID-IMMU3121>3.0.CO;2-4
43. Osińska I, Popko K, Demkow U (2014) Perforin. An important player in immune response. *ceji* 1:109–115. doi: 10.5114/ceji.2014.42135
44. Mandelboim O, Malik P, Davis DM et al. (1999) Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10):5640–5644. doi: 10.1073/pnas.96.10.5640
45. Poli A, Michel T, Thérésine M et al. (2009) CD56bright natural killer (NK) cells. An important NK cell subset. *Immunology* 126(4):458–465. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x
46. Chan A, Hong D-L, Atzberger A et al. (2007) CD56bright Human NK Cells Differentiate



- into CD56dim Cells. Role of Contact with Peripheral Fibroblasts. *The Journal of Immunology* 179(1):89–94. doi: 10.4049/jimmunol.179.1.89
47. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* 22(11):633–640. doi: 10.1016/S1471-4906(01)02060-9
  48. Jeung I, Cheon K, Kim M-R (2016) Decreased Cytotoxicity of Peripheral and Peritoneal Natural Killer Cell in Endometriosis. *Biomed Res Int* 2016:2916070. doi: 10.1155/2016/2916070
  49. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G et al. (2006) Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 214:73–91. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x
  50. Moretta A, Bottino C, Vitale M et al. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19:197–223. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.197
  51. Fukui A, Kamoi M, Funamizu A et al. (2015) NK cell abnormality and its treatment in women with reproductive failures such as recurrent pregnancy loss, implantation failures, preeclampsia, and pelvic endometriosis. *Reprod Med Biol* 14(4):151–157. doi: 10.1007/s12522-015-0207-7
  52. González S, Groh V, Spies T (2006) Immunobiology of Human NKG2D and Its Ligands. In: Compans RW, Colonna M, Cooper MD et al. (eds) *Immunobiology of Natural Killer Cell Receptors*, vol 298. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 121–138
  53. Long EO (2011) ICAM-1: getting a grip on leukocyte adhesion. *J Immunol* 186(9):5021–5023. doi: 10.4049/jimmunol.1100646
  54. Chakraborty S, Hu S-Y, Wu S-H et al. (2015) The interaction affinity between vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and very late antigen-4 (VLA-4) analyzed by quantitative FRET. *PLoS ONE* 10(3):e0121399. doi: 10.1371/journal.pone.0121399
  55. Manaster I, Mizrahi S, Goldman-Wohl D et al. (2008) Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *J Immunol* 181(3):1869–1876
  56. Thiruchelvam U, Wingfield M, O'Farrelly C (2015) Natural Killer Cells. *Key Players in Endometriosis*. *American Journal of Reproductive Immunology* 74(4):291–301. doi: 10.1111/aji.12408
  57. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M et al. (1991) Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 56(1):45–51
  58. Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M et al. (1992) The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril* 58(2):290–295
  59. Garzetti GG, Ciavattini A, Provinciali M et al. (1993) Natural killer cell activity in endometriosis. Correlation between serum estradiol levels and cytotoxicity. *Obstet Gynecol* 81(5 (Pt 1)):665–668
  60. Jeung I-C, Chung Y-J, Chae B et al. (2015) Effect of helixor A on natural killer cell activity in endometriosis. *Int J Med Sci* 12(1):42–47. doi: 10.7150/ijms.10076
  61. Tanaka E, Sendo F, Kawagoe S et al. (1992) Decreased natural killer cell activity in women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 34(1):27–30. doi: 10.1159/000292720
  62. Wilson TJ, Hertzog PJ, Angus D et al. (1994) Decreased natural killer cell activity in endometriosis patients. Relationship to disease pathogenesis\*\*Supported by Monash IVF, Richmond, Victoria, Australia. *Fertil Steril* 62(5):1086–1088. doi: 10.1016/S0015-0282(16)57082-4
  63. Petta CA, Pelliggia A, Salamonsen L et al. (2010) Natural Killer Cells and Telomerase in the Endometrium of Patients with Endometriosis. *Journal of Endometriosis* 2(4):182–188. doi: 10.1177/228402651000200402
  64. Maeda N, Izumiya C, Yamamoto Y et al. (2002) Increased killer inhibitory receptor KIR2DL1 expression among natural killer cells in women with pelvic endometriosis. *Fertil Steril* 77(2):297–302
  65. Matsuoka S, Maeda N, Izumiya C et al. (2005) Expression of inhibitory-motif killer immunoglobulin-like receptor, KIR2DL1, is increased in natural killer cells from women

- with pelvic endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 53(5):249–254. doi: 10.1111/j.1600-0897.2005.00271.x
66. Wu MY, Yang JH, Chao KH et al. (2000) Increase in the expression of killer cell inhibitory receptors on peritoneal natural killer cells in women with endometriosis. *Fertil Steril* 74(6):1187–1191
  67. Funamizu A, Fukui A, Kamoi M et al. (2014) Expression of natural cytotoxicity receptors on peritoneal fluid natural killer cell and cytokine production by peritoneal fluid natural killer cell in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 71(4):359–367. doi: 10.1111/aji.12206
  68. Kikuchi Y, Ishikawa N, Hirata J et al. (1993) Changes of peripheral blood lymphocyte subsets before and after operation of patients with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 72(3):157–161
  69. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5(12):953–964. doi: 10.1038/nri1733
  70. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M (2001) Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* 69(1):11–20
  71. Ziegler-Heitbrock L (2015) Blood Monocytes and Their Subsets. Established Features and Open Questions. *Front. Immunol.* 6:415. doi: 10.3389/fimmu.2015.00423
  72. Goasguen JE, Bennett JM, Bain BJ et al. (2009) Morphological evaluation of monocytes and their precursors. *Haematologica* 94(7):994–997. doi: 10.3324/haematol.2008.005421
  73. Tapping RI, Tobias PS (2000) Soluble CD14-mediated cellular responses to lipopolysaccharide. *Chem Immunol* 74:108–121. doi: 10.1159/000058751
  74. Coillard A, Segura E (2019) In vivo Differentiation of Human Monocytes. *Front. Immunol.* 10:1907. doi: 10.3389/fimmu.2019.01907
  75. Braun DP, Muriana A, Gebel H et al. (1994) Monocyte-mediated enhancement of endometrial cell proliferation in women with endometriosis\*†. *Fertil Steril* 61(1):78–84. doi: 10.1016/S0015-0282(16)56456-5
  76. Braun DP, Gebel H, House R et al. (1996) Spontaneous and induced synthesis of cytokines by peripheral blood monocytes in patients with endometriosis\*\*Supported in part by Public Health Service Grants CA 58922, Bethesda, Maryland and a grant from Sterling International, New York, New York.††Presented at the 50th Annual Meeting of The American Fertility Society, San Antonio, Texas, November 5 to 10, 1994. *Fertil Steril* 65(6):1125–1129. doi: 10.1016/S0015-0282(16)58325-3
  77. Rana N, Braun DP, House R et al. (1996) Basal and stimulated secretion of cytokines by peritoneal macrophages in women with endometriosis\*\*Supported in part by Public Health Service Grant CA 58922, Bethesda, Maryland, and a grant from Sterling International, New York, New York††Presented at the 51st Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, Seattle, Washington, October 7 to 12, 1995. *Fertil Steril* 65(5):925–930. doi: 10.1016/S0015-0282(16)58262-4
  78. Bedient CE, Rodriguez DC, Roberts C et al. (2014) The role of monocytes in endometriosis. *Fertil Steril* 102(3):e6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.026
  79. Oral E, Olive DL, Arici A (1996) The peritoneal environment in endometriosis. *Human reproduction update* 2(5):385–398. doi: 10.1093/humupd/2.5.385
  80. Gazvani R, Templeton A (2002) Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 123(2):217–226
  81. Capobianco A, Rovere-Querini P (2013) Endometriosis, a disease of the macrophage. *Front. Immunol.* 4:9. doi: 10.3389/fimmu.2013.00009
  82. Pancer Z, Cooper MD (2006) The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 24:497–518. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090542
  83. Golubovskaya V, Wu L (2016) Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 8(3). doi: 10.3390/cancers8030036
  84. Chetty R, Gatter K (1994) CD3: structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. *J Pathol* 173(4):303–307. doi: 10.1002/path.1711730404
  85. Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P et al. (2006) Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 126(1):32–41. doi: 10.1038/sj.jid.5700001

86. Rock KL, Reits E, Neefjes J (2016) Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends in Immunology* 37(11):724–737. doi: 10.1016/j.it.2016.08.010
87. Hwang J-R, Byeon Y, Kim D et al. (2020) Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp Mol Med* 52(5):750–761. doi: 10.1038/s12276-020-0435-8
88. Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC (2006) Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 24(2):133–139. doi: 10.1016/j.immuni.2006.01.006
89. Janeway C (2001) *Immunobiology. The immune system in health and disease - Chapter: T cell-mediated cytotoxicity*, 5. ed. Garland Publ, New York, NY
90. Ravichandran KS, Collins TL, Burakoff SJ (1996) CD4 and signal transduction. *Curr Top Microbiol Immunol* 205:47–62
91. Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW et al. (2009) The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci* 66(16):2603–2622. doi: 10.1007/s00018-009-0026-2
92. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ (2008) How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8(7):523–532. doi: 10.1038/nri2343
93. Shevach EM (2001) Certified Professionals. *J Exp Med* 193(11):F41–F46. doi: 10.1084/jem.193.11.F41
94. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J et al. (2001) Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells. Their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182:18–32
95. Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E (2006) FOXP3+ regulatory T cells. Current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol* 36(11):2832–2836. doi: 10.1002/eji.200636459
96. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ et al. (2001) CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *The Journal of Immunology* 167(3):1245–1253. doi: 10.4049/jimmunol.167.3.1245
97. Sakaguchi S (2004) Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531–562. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122
98. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M et al. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology* 155(3):1151–1164
99. Prieto GA, Rosenstein Y (2006) Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology* 118(1):58–65. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02339.x
100. Kim CH (2009) FOXP3 and its role in the immune system. *Adv Exp Med Biol* 665:17–29
101. Sayed D, El-Badawy OHB, Eldin EN et al. (2014) Is Foxp3 a good marker for regulatory T cells? *Egypt J Immunol* 21(2):1–8
102. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM et al. (2005) Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22(3):329–341. doi: 10.1016/j.immuni.2005.01.016
103. Buckner JH (2010) Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 10(12):849–859. doi: 10.1038/nri2889
104. Szylo K, Tchorzewski H, Banasik M et al. (2003) The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators Inflamm* 12(3):131–138. doi: 10.1080/0962935031000134842
105. Izumi G, Koga K, Takamura M et al. (2018) Involvement of immune cells in the pathogenesis of endometriosis. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 44(2):191–198. doi: 10.1111/jog.13559
106. Osuga Y, Koga K, Hirota Y et al. (2011) Lymphocytes in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 65(1):1–10. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00887.x
107. Slabe N, Meden-Vrtovec H, Verdenik I et al. (2013) Cytotoxic T-Cells in Peripheral Blood in Women with Endometriosis. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 73(10):1042–1048. doi:

- 10.1055/s-0033-1350702
108. Konno R, Igarashi T, Okamoto S et al. (1999) Apoptosis of Human Endometrium Mediated by Perforin and Granzyme B of NK Cells and Cytotoxic T Lymphocytes. *Tohoku J. Exp. Med.* 187(2):149–155. doi: 10.1620/tjem.187.149
  109. Barros IBL de, Malvezzi H, Gueuvoghlian-Silva BY et al. (2017) “What do we know about regulatory T cells and endometriosis? A systematic review”. *Journal of Reproductive Immunology* 120:48–55. doi: 10.1016/j.jri.2017.04.003
  110. Hou X-X, Wang X-Q, Li D-J (2019) Roles of regulatory T Cells in pathogenesis of endometriosis. *Reprod Dev Med* 3(2):117. doi: 10.4103/2096-2924.262392
  111. Arruvito L, Sanz M, Banham AH et al. (2007) Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ Regulatory T Cells during the Follicular Phase of the Menstrual Cycle. Implications for Human Reproduction. *The Journal of Immunology* 178(4):2572–2578. doi: 10.4049/jimmunol.178.4.2572
  112. Fazleabas AT, Braundmeier A, Parkin K (2015) Endometriosis-induced changes in regulatory T cells - insights towards developing permanent contraception. *Contraception* 92(2):116–119. doi: 10.1016/j.contraception.2015.06.006
  113. Berbic M, Fraser IS (2011) Regulatory T cells and other leukocytes in the pathogenesis of endometriosis. *Journal of Reproductive Immunology* 88(2):149–155. doi: 10.1016/j.jri.2010.11.004
  114. Berbic M, Hey-Cunningham AJ, Ng C et al. (2010) The role of Foxp3+ regulatory T-cells in endometriosis. A potential controlling mechanism for a complex, chronic immunological condition. *Hum Reprod* 25(4):900–907. doi: 10.1093/humrep/deq020
  115. Barbosa CP, Mafra FA, Cordts EB et al. (2012) Aberrant FOXP3 gene expression in eutopic and ectopic endometrium of infertile women with endometriosis. *Fertil Steril* 98(3):S219. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.07.793
  116. Chen S, Zhang J, Huang C et al. (2012) Expression of the T regulatory cell transcription factor FoxP3 in peri-implantation phase endometrium in infertile women with endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 10:34. doi: 10.1186/1477-7827-10-34
  117. Laurenti E, Göttgens B (2018) From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* 553(7689):418–426. doi: 10.1038/nature25022
  118. Ollila J, Vihinen M (2005) B cells. *Int J Biochem Cell Biol* 37(3):518–523. doi: 10.1016/j.biocel.2004.09.007
  119. Cyster JG, Allen CDC (2019) B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* 177(3):524–540. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.016
  120. Sanz I, Wei C, Jenks SA et al. (2019) Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Front. Immunol.* 10:2458. doi: 10.3389/fimmu.2019.02458
  121. Riccio LGC, Baracat EC, Chapron C et al. (2017) The role of the B lymphocytes in endometriosis: A systematic review. *Journal of Reproductive Immunology* 123:29–34. doi: 10.1016/j.jri.2017.09.001
  122. Dinarello CA (2007) Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1:S34-45. doi: 10.1002/eji.200737772
  123. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2014) IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(10):a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295
  124. Mauer J, Denson JL, Brüning JC (2015) Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends in Immunology* 36(2):92–101. doi: 10.1016/j.it.2014.12.008
  125. Koumantakis E, Matalliotakis I, Neonaki M et al. (1994) Soluble serum interleukin-2 receptor, interleukin-6 and interleukin-1a in patients with endometriosis and in controls. *Arch Gynecol Obstet* 255(3):107–112
  126. Othman EE-DR, Hornung D, Salem HT et al. (2008) Serum cytokines as biomarkers for nonsurgical prediction of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 137(2):240–246. doi: 10.1016/j.ejogrb.2007.05.001
  127. Pellicer A, Albert C, Mercader A et al. (1998) The follicular and endocrine environment in women with endometriosis. Local and systemic cytokine production. *Fertil Steril* 70(3):425–431
  128. Iwabe T, Harada T, Sakamoto Y et al. (2003) Gonadotropin-releasing hormone agonist

- treatment reduced serum interleukin-6 concentrations in patients with ovarian endometriomas. *Fertil Steril* 80(2):300–304
129. Bedaiwy MA, Falcone T, Sharma RK et al. (2002) Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers. A prospective controlled trial. *Hum Reprod* 17(2):426–431
  130. Kashanian M, Sariri E, Vahdat M et al. (2015) A comparison between serum levels of interleukin-6 and CA125 in patients with endometriosis and normal women. *Med J Islam Repub Iran* 29:280
  131. Braun DP, Gebel H, House R et al. (1996) Spontaneous and induced synthesis of cytokines by peripheral blood monocytes in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 65(6):1125–1129
  132. Tseng JF, Ryan IP, Milam TD et al. (1996) Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81(3):1118–1122. doi: 10.1210/jcem.81.3.8772585
  133. Tsudo T, Harada T, Iwabe T et al. (2000) Altered gene expression and secretion of interleukin-6 in stromal cells derived from endometriotic tissues. *Fertil Steril* 73(2):205–211
  134. Gómez-Torres M-J, Acién P, Campos A et al. (2002) Embryotoxicity of peritoneal fluid in women with endometriosis. Its relation with cytokines and lymphocyte populations. *Hum Reprod* 17(3):777–781
  135. Harada T, Yoshioka H, Yoshida S et al. (1997) Increased interleukin-6 levels in peritoneal fluid of infertile patients with active endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 176(3):593–597
  136. Iwabe T, Harada T, Terakawa N (2002) Role of cytokines in endometriosis-associated infertility. *Gynecol Obstet Invest* 53 Suppl 1:19–25. doi: 10.1159/000049420
  137. Kang Y-J, Jeung IC, Park A et al. (2014) An increased level of IL-6 suppresses NK cell activity in peritoneal fluid of patients with endometriosis via regulation of SHP-2 expression. *Hum Reprod* 29(10):2176–2189. doi: 10.1093/humrep/deu172
  138. Bickel M (1993) The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol* 64(5 Suppl):456–460
  139. Arici A, Seli E, Senturk LM et al. (1998) Interleukin-8 in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 83(5):1783–1787. doi: 10.1210/jcem.83.5.4754
  140. Arici A, Seli E, Zeyneloglu HB et al. (1998) Interleukin-8 induces proliferation of endometrial stromal cells. A potential autocrine growth factor. *J Clin Endocrinol Metab* 83(4):1201–1205. doi: 10.1210/jcem.83.4.4743
  141. Iwabe T, Harada T, Tsudo T et al. (1998) Pathogenetic significance of increased levels of interleukin-8 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil Steril* 69(5):924–930
  142. Garcia-Velasco JA, Arici A (1999) Interleukin-8 stimulates the adhesion of endometrial stromal cells to fibronectin. *Fertil Steril* 72(2):336–340
  143. Sikora J, Smycz-Kubańska M, Mielczarek-Palacz A et al. (2017) Abnormal peritoneal regulation of chemokine activation-The role of IL-8 in pathogenesis of endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 77(4). doi: 10.1111/aji.12622
  144. Ulukus EC, Ulukus M, Seval Y et al. (2005) Expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in adenomyosis. *Hum Reprod* 20(10):2958–2963. doi: 10.1093/humrep/dei154
  145. Gazvani MR, Christmas S, Quenby S et al. (1998) Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in women with endometriosis. Relationship to stage of disease. *Hum Reprod* 13(7):1957–1961
  146. Pizzo A, Salmeri FM, Ardita FV et al. (2002) Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 54(2):82–87. doi: 10.1159/000067717
  147. Măluțan AM, Drugan T, Ciorțea R et al. (2017) Endometriosis-associated changes in serum levels of interferons and chemokines. *Turk J Med Sci* 47(1):115–122. doi: 10.3906/sag-1507-185
  148. Monsanto SP, Edwards AK, Zhou J et al. (2016) Surgical removal of endometriotic

- lesions alters local and systemic proinflammatory cytokines in endometriosis patients. *Fertil Steril* 105(4):968-977.e5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.11.047
149. Iwabe T, Harada T, Tsudo T et al. (2000) Tumor necrosis factor-alpha promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab* 85(2):824–829. doi: 10.1210/jcem.85.2.6335
150. Idriss HT, Naismith JH (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.* 50(3):184–195. doi: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184:AID-JEMT2>3.0.CO;2-H
151. Zhang RJ, Wild RA, Ojago JM (1993) Effect of tumor necrosis factor-alpha on adhesion of human endometrial stromal cells to peritoneal mesothelial cells. An in vitro system. *Fertil Steril* 59(6):1196–1201
152. Richter ON, Dorn C, Rösing B et al. (2005) Tumor necrosis factor alpha secretion by peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 271(2):143–147. doi: 10.1007/s00404-003-0591-9
153. Cho SH, Oh YJ, Nam A et al. (2007) Evaluation of serum and urinary angiogenic factors in patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 58(6):497–504. doi: 10.1111/j.1600-0897.2007.00535.x
154. Matalliotakis I, Neonaki M, Zolindaki A et al. (1997) Changes in immunologic variables (TNF-a, sCD8 and sCD4) during danazol treatment in patients with endometriosis. *Int J Fertil Womens Med* 42(3):211–214
155. Galo S, Zúbor P, Szunyogh N et al. (2005) TNF-alpha serum levels in women with endometriosis: prospective clinical study (TNF-alpha serum levels in women with endometriosis: prospective clinical study). *Ceska Gynekol* 70(4):286–290
156. Ohene-Abuakwa Y, Pignatelli M (2000) Adhesion Molecules as Diagnostic Tools in Tumor Pathology. *Int J Surg Pathol* 8(3):191–200. doi: 10.1177/106689690000800306
157. Jung W-C, Jang Y-J, Kim J-H et al. (2012) Expression of intercellular adhesion molecule-1 and e-selectin in gastric cancer and their clinical significance. *J Gastric Cancer* 12(3):140–148. doi: 10.5230/jgc.2012.12.3.140
158. Barber DF, Long EO (2003) Coexpression of CD58 or CD48 with Intercellular Adhesion Molecule 1 on Target Cells Enhances Adhesion of Resting NK Cells. *The Journal of Immunology* 170(1):294–299. doi: 10.4049/jimmunol.170.1.294
159. Fukaya T, Sugawara J, Yoshida H et al. (1999) Intercellular adhesion molecule-1 and hepatocyte growth factor in human endometriosis. Original investigation and a review of literature. *Gynecol Obstet Invest* 47 Suppl 1:11-6; discussion 16-7. doi: 10.1159/000052854
160. Somigliana E, Viganò P, Gaffuri B et al. (1996) Human endometrial stromal cells as a source of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 molecules. *Hum Reprod* 11(6):1190–1194
161. Kuessel L, Wenzl R, Proestling K et al. (2017) Soluble VCAM-1/soluble ICAM-1 ratio is a promising biomarker for diagnosing endometriosis. *Hum Reprod* 32(4):770–779. doi: 10.1093/humrep/dex028
162. Barrier BF, Sharpe-Timms KL (2002) Expression of soluble adhesion molecules in sera of women with stage III and IV endometriosis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 9(2):98–101
163. Wu MH, Yang BC, Hsu CC et al. (1998) The expression of soluble intercellular adhesion molecule-1 in endometriosis. *Fertil Steril* 70(6):1139–1142
164. Matalliotakis IM, Vassiliadis S, Goumenou AG et al. (2001) Soluble ICAM-1 levels in the serum of endometriotic patients appear to be independent of medical treatment. *Journal of Reproductive Immunology* 51(1):9–19
165. Daniel Y, Geva E, Amit A et al. (2000) Do soluble cell adhesion molecules play a role in endometriosis? *American Journal of Reproductive Immunology* 43(3):160–166. doi: 10.1111/j.8755-8920.2000.430305.x
166. Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H (2011) Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal* 15(6):1607–1638. doi: 10.1089/ars.2010.3522

167. Kong D-H, Kim YK, Kim MR et al. (2018) Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci* 19(4). doi: 10.3390/ijms19041057
168. van der Molen RG, Schutten JHF, van Cranenbroek B et al. (2014) Menstrual blood closely resembles the uterine immune micro-environment and is clearly distinct from peripheral blood. *Hum Reprod* 29(2):303–314. doi: 10.1093/humrep/det398
169. Koks CA, Dunselman GA, Goeij AF de et al. (1997) Evaluation of a menstrual cup to collect shed endometrium for in vitro studies. *Fertil Steril* 68(3):560–564
170. Strober W (2001) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology Appendix 3:Appendix 3B*. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21
171. Picot J, Guerin CL, van Kim C et al. (2012) Flow cytometry. Retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* 64(2):109–130. doi: 10.1007/s10616-011-9415-0
172. Alhadj M, Farhana A (2020) StatPearls. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Treasure Island (FL)
173. Cox KL, Devanarayan V, Kriauciunas A et al. (2004) Assay Guidance Manual. *Immunoassay Methods*, Bethesda (MD)
174. Warren LA, Shih A, Renteira SM et al. (2018) Analysis of menstrual effluent: diagnostic potential for endometriosis. *Mol Med* 24(1):1. doi: 10.1186/s10020-018-0009-6
175. Lynch L, Golden-Mason L, Eogan M et al. (2007) Cells with haematopoietic stem cell phenotype in adult human endometrium. Relevance to infertility? *Human Reproduction* 22(4):919–926. doi: 10.1093/humrep/del456
176. Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD et al. (2003) CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 198(6):889–901. doi: 10.1084/jem.20030171
177. Pedroza-Pacheco I, Madrigal A, Saudemont A (2013) Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 10(3):222–229. doi: 10.1038/cmi.2013.2
178. Chen WF, Zlotnik A (1991) IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol* 147(2):528–534
179. Ziogas AC, Gavalas NG, Tsiatas M et al. (2012) VEGF directly suppresses activation of T cells from ovarian cancer patients and healthy individuals via VEGF receptor Type 2. *Int J Cancer* 130(4):857–864. doi: 10.1002/ijc.26094
180. Thomas DA, Massagué J (2005) TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer cell* 8(5):369–380. doi: 10.1016/j.ccr.2005.10.012
181. Isaaz S, Baetz K, Olsen K et al. (1995) Serial killing by cytotoxic T lymphocytes: T cell receptor triggers degranulation, re-filling of the lytic granules and secretion of lytic proteins via a non-granule pathway. *Eur. J. Immunol.* 25(4):1071–1079. doi: 10.1002/eji.1830250432
182. Brennan AJ, Chia J, Trapani JA et al. (2010) Perforin deficiency and susceptibility to cancer. *Cell Death Differ* 17(4):607–615. doi: 10.1038/cdd.2009.212
183. Trapani JA, Thia KYT, Andrews M et al. (2013) Human perforin mutations and susceptibility to multiple primary cancers. *Oncoimmunology* 2(4):e24185. doi: 10.4161/onci.24185
184. Kontani K, Sawai S, Hanaoka J et al. (2001) Involvement of granzyme B and perforin in suppressing nodal metastasis of cancer cells in breast and lung cancers. *Eur J Surg Oncol* 27(2):180–186. doi: 10.1053/ejso.2000.1060
185. Cullen SP, Brunet M, Martin SJ (2010) Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ* 17(4):616–623. doi: 10.1038/cdd.2009.206
186. Feyaerts D, Benner M, van Cranenbroek B et al. (2017) Human uterine lymphocytes acquire a more experienced and tolerogenic phenotype during pregnancy. *Sci Rep* 7(1):584. doi: 10.1038/s41598-017-03191-0
187. Sabbaj S, Hel Z, Richter HE et al. (2011) Menstrual blood as a potential source of endometrial derived CD3+ T cells. *PLoS ONE* 6(12):e28894. doi: 10.1371/journal.pone.0028894

188. González-Amaro R, Cortés JR, Sánchez-Madrid F et al. (2013) Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol Med* 19(10):625–632. doi: 10.1016/j.molmed.2013.07.006
189. Cibrián D, Sánchez-Madrid F (2017) CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol* 47(6):946–953. doi: 10.1002/eji.201646837
190. Lukassen HGM, Joosten I, van Cranenbroek B et al. (2004) Hormonal stimulation for IVF treatment positively affects the CD56bright/CD56dim NK cell ratio of the endometrium during the window of implantation. *Molecular Human Reproduction* 10(7):513–520. doi: 10.1093/molehr/gah067
191. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW (1989) Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74(7):2527–2534
192. Marimuthu R, Francis H, Dervish S et al. (2018) Characterization of Human Monocyte Subsets by Whole Blood Flow Cytometry Analysis. *J Vis Exp*(140). doi: 10.3791/57941
193. Condotta SA, Richer MJ (2017) The immune battlefield: The impact of inflammatory cytokines on CD8+ T-cell immunity. *PLOS Pathogens* 13(10):e1006618. doi: 10.1371/journal.ppat.1006618
194. Wu M-Y, Ho H-N (2003) The Role of Cytokines in Endometriosis\*. *American Journal of Reproductive Immunology* 49(5):285–296. doi: 10.1034/j.1600-0897.2003.01207.x
195. Králíčková M, Vetvicka V (2015) Immunological aspects of endometriosis. A review. *Ann Transl Med* 3(11):153. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.06.08
196. Witz CA (2003) Cell Adhesion Molecules and Endometriosis. *Semin Reprod Med* 21(2):173–182. doi: 10.1055/s-2003-41324
197. Yang L, Froio RM, Sciuto TE et al. (2005) ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood* 106(2):584–592. doi: 10.1182/blood-2004-12-4942
198. Placido G de, Alviggi C, Di Palma G et al. (1998) Serum concentrations of soluble human leukocyte class I antigens and of the soluble intercellular adhesion molecule-1 in endometriosis: relationship with stage and non-pigmented peritoneal lesions. *Human Reproduction* 13(11):3206–3210. doi: 10.1093/humrep/13.11.3206
199. Zhou X, Fragala MS, McElhaney JE et al. (2010) Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13(5):541–547. doi: 10.1097/MCO.0b013e32833cf3bc
200. Karsten E, Breen E, Herbert BR (2018) Red blood cells are dynamic reservoirs of cytokines. *Sci Rep* 8(1):3101. doi: 10.1038/s41598-018-21387-w
201. Luckow Invitti A, Schor E, Martins Parreira R et al. (2018) Inflammatory cytokine profile of co-cultivated primary cells from the endometrium of women with and without endometriosis. *Mol Med Rep* 18(2):1287–1296. doi: 10.3892/mmr.2018.9137
202. Weinberg A (2016) Cryopreservation of Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Detrick B, Schmitz JL, Hamilton RG (eds) *Manual of molecular and clinical laboratory immunology*, 8th ed. ASM Press, Washington, District of Columbia, pp 263–268
203. Hughes SM, Shu Z, Levy CN et al. (2016) Cryopreservation of Human Mucosal Leukocytes. *PLoS ONE* 11(5):e0156293. doi: 10.1371/journal.pone.0156293
204. Bellelis P, Podgaec S, Abrão MS (2011) Environmental factors and endometriosis. *Rev Assoc Med Bras* (1992) 57(4):448–452. doi: 10.1590/s0104-42302011000400022
205. Reiche EMV, Nunes SOV, Morimoto HK (2004) Stress, depression, the immune system, and cancer. *The Lancet Oncology* 5(10):617–625. doi: 10.1016/S1470-2045(04)01597-9
206. Shields GS, Spahr CM, Slavich GM (2020) Psychosocial Interventions and Immune System Function: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *JAMA Psychiatry* 77(10):1031–1043. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2020.0431



## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Timo Schmitz, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### ***Vergleichende Untersuchung immunologischer Parameter des Menstruationsblutes und des venösen Blutes bei Endometriose***

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiterer Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Altenmünster, 10.10.2022

***Timo Schmitz***

## **Danksagung**

Allen voran danke ich Frau Prof. Dr. Karin Meißner für die Möglichkeit, diese Dissertation zu erstellen und für das entgegengebrachte Vertrauen. Ich fühlte mich von ihr zu jeder Zeit hervorragend betreut.

Mein weiterer Dank gilt dem ganzen Team des Instituts für medizinische Psychologie, welches an dieser Studie mitgewirkt hat: Verena, Elisabeth, Anne-Marie und Alina.

Des Weiteren danke ich herzlich Frau Prof. Dr. Elfriede Nößner vom Helmholtz-Zentrum München für die Kooperation und die großartige Unterstützung. Mein besonderer Dank für die hervorragende Zusammenarbeit gilt Babs und Thomas.

Darüber hinaus möchte ich allen weiteren an der Studie beteiligten Personen danken, insbesondere den Probandinnen, die sich für diese Studie zur Verfügung gestellt haben.

Zuletzt danke ich Lara und meiner Familie für die fortwährende Unterstützung.