

Aus dem  
Endometriose Forschungszentrum, Klinik für Gynäkologie  
der Charité Universitätsmedizin, Campus Virchow-Klinikum, Berlin  
eingereicht über das  
Institut für Veterinär-Anatomie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Charakterisierung von Immunzellen  
und inflammatorischen Zytokinen in der  
Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Nicolette Halben**  
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 2024  
Journal-Nr.: 4409







Aus dem

**Endometriose Forschungszentrum, Klinik für Gynäkologie**  
der Charité Universitätsmedizin, Campus Virchow-Klinikum, Berlin

eingereicht über das

**Institut für Veterinär-Anatomie**

des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Charakterisierung von Immunzellen  
und inflammatorischen Zytokinen in der  
Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines

**Doktors der Veterinärmedizin**

an der

**Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

**Nicolette Halben**

**Tierärztin**

**aus Hamburg**

**Berlin 2024**

**Journal-Nr.: 4409**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler  
Erster Gutachterin: Frau Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl  
Zweiter Gutachterin: Frau Prof. Dr. Sylvia Mechsner  
Dritter Gutachterin: Frau Univ.-Prof. Dr. Sonja Bröer

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*  
endometriosis, cytokines, inflammation, peritoneum, interleukins

Tag der Promotion: 16.01.2024

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-235-0

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2024**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2024 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin  
[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung und Zielsetzung.....	1
2. Literaturübersicht.....	2
2.1. Endometriose.....	2
2.2. Endometriose bei Tieren und in Tiermodellen.....	3
2.3. Klassifikation der Endometriose.....	5
2.4. Symptome und Diagnose der Endometriose.....	6
2.5. Therapie der Endometriose.....	7
2.6. Ätiologie und Pathogenese der Endometriose.....	8
2.6.1. Implantationstheorie nach Sampson.....	8
2.6.2. Coelom-Metaplasie-Theorie.....	9
2.6.3. Tissue Injury and Repair Concept (TIAR).....	9
2.6.4. Veränderte Immunkomponenten und zellmedierte Immunität der Endometriose.....	10
2.6.4.1. Molekulare Mechanismen.....	10
2.6.4.2. Makrophagen.....	13
2.6.4.3. Dendritische Zellen.....	16
2.6.4.4. T-Zellen.....	17
2.6.4.5. B-Zellen.....	20
2.6.4.6. Natürliche Killerzellen.....	21
2.6.4.7. Veränderungen der Immunzellen: Übersicht.....	23
2.7. Peritonealflüssigkeit.....	27
3. Material und Methoden.....	28
3.1. Materialübersicht.....	28
3.1.1. Auflistung der Geräte.....	28
3.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	29
3.1.3. Reagenzien und Chemikalien.....	30
3.1.4. Ausgewählte CD-Antigene: Zelluläre Expression und Funktion.....	31
3.1.5. Software.....	32
3.2. Auswahl und Charakterisierung des Patientinnenkollektivs.....	33
3.2.1. Endometriose-Patientinnen.....	33

3.2.2. Kontroll-Patientinnen .....	34
3.2.3. Charakterisierung der einzelnen Kohorten.....	36
3.3. Methodik .....	37
3.3.1. Gewinnung und Aufbereitung der Peritonealflüssigkeit.....	37
3.3.2. Durchflusszytometrie .....	37
3.3.2.1. Extrazelluläre FACS-Markierung .....	41
3.3.3. Luminex.....	47
3.3.4. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> -Analyse von Neopterin im Überstand der Peritonealflüssigkeit .....	50
3.4. Statistik .....	51
4. Ergebnisse .....	53
4.1. Charakterisierung von Immunzellen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll Patientinnen .....	53
4.1.1. Monozyten und Makrophagen und deren Subpopulationen.....	53
4.1.2. Dendritische Zellen.....	59
4.1.3. T-Zellen und deren Subpopulationen .....	59
4.1.4. NKT-Zellen .....	60
4.1.5. Mittlere Fluoreszenz Intensität von CD3 auf den T-Zellen und deren Subpopulationen .....	62
4.1.6. B-Zellen.....	65
4.1.7. Natürliche Killerzellen und deren Subpopulationen .....	66
4.1.8. Mittlere Fluoreszenz Intensität von CD56 auf den zytotoxischen NK-Zellen .....	68
4.2. Konzentration von Zytokinen, Interleukinen und Wachstumsfaktoren in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	69
4.2.1. IL-1 $\beta$ .....	69
4.2.2. IL-1Ra .....	71
4.2.3. IL-2.....	72
4.2.4. IL-4.....	73
4.2.5. IL-5.....	73
4.2.6. IL-6.....	74
4.2.7. IL-7.....	74
4.2.8. IL-8.....	75
4.2.9. IL-9.....	75
4.2.10. IL-10.....	76
4.2.11. IL-12 (p70) .....	77
4.2.12. IL-13.....	78
4.2.13. IL-15.....	78
4.2.14. IL-17 $\alpha$ .....	79

4.2.15.	Eotaxin .....	80
4.2.16.	FGFb.....	81
4.2.17.	PDGF-BB.....	82
4.2.18.	G-CSF.....	83
4.2.19.	GM-CSF.....	83
4.2.20.	IFN- $\gamma$ .....	83
4.2.21.	IP-10.....	84
4.2.22.	MCP-1.....	85
4.2.23.	Mip-1 $\alpha$ .....	86
4.2.24.	MIP-1 $\beta$ .....	87
4.2.25.	RANTES.....	88
4.2.26.	TNF- $\alpha$ .....	89
4.2.27.	VEGF.....	89
4.3.	Expression von Neopterin in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen.....	91
5.	Diskussion.....	92
5.1.	Immunreaktion: Monozyten/Makrophagen allgemein.....	92
5.2.	Pro-inflammatorische Aspekte: Monozyten/Makrophagen und ihre Botenstoffe.....	93
5.3.	Anti-inflammatorische Aspekte: Monozyten/Makrophagen und ihre Botenstoffe.....	99
5.4.	Immunreaktion der Dendritischen Zellen.....	101
5.5.	Immunreaktion der T-Zellen.....	102
5.6.	Immunreaktion der B-Zellen.....	106
5.7.	Immunreaktion der Natürlichen Killerzellen.....	107
5.8.	Fazit und Ausblick.....	109
6.	Zusammenfassung.....	112
7.	Summary.....	113
8.	Literaturverzeichnis.....	114
	Eigene Publikationen.....	135
	Danksagung.....	136
	Finanzierungsquellen.....	138
	Interessenskonflikte.....	138
	Selbstständigkeitserklärung (eidesstattliche Erklärung).....	138

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Veränderungen einzelner Immunzellpopulationen in der Peritonealflüssigkeit (PF), peripherem Blut (PB), ektopen Endometrioseläsionen (EL) und eutopem endometrialen Gewebe (EU) von Endometriose-Patientinnen .....	23
Fortsetzung von <b>Tabelle 1:</b> .....	24
<b>Tabelle 2:</b> Quellen zu Tabelle 1 .....	25
<b>Tabelle 3:</b> Geräte .....	28
<b>Tabelle 4:</b> Verbrauchsmaterialien .....	29
<b>Tabelle 5:</b> Reagenzien, Chemikalien und Assays .....	30
<b>Tabelle 6:</b> Antigene und deren zelluläre Expression sowie Funktion .....	31
<b>Tabelle 7:</b> Software .....	32
<b>Tabelle 8:</b> Symptome der Endometriose-Patientinnen .....	34
<b>Tabelle 9:</b> Charakterisierung der Patientinnenkollektive .....	36
<b>Tabelle 10:</b> Verwendete monoklonale anti-humane Antikörper .....	38
<b>Tabelle 11:</b> Verwendete Fluorochrome, Anregungswellenlängen und Filter .....	40
<b>Tabelle 12:</b> Namen, Abkürzungen und Stoffklassen der untersuchten Botenstoffe .....	48
<b>Tabelle 13:</b> Konzentrationen der Analyten in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen (Luminex) .....	90

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Endometriose-assoziierte Immunzellinfiltrate (EMaZI) in Läsionen verschiedener Endometriose-Typen (Immunhistochemie, IHC) .....	26
<b>Abbildung 2:</b> Gating Strategie Panel 1 .....	45
<b>Abbildung 3:</b> Gating Strategie Panel 2 .....	46
<b>Abbildung 4:</b> Vergleich der Frequenz und Expression ko-stimulatorischer Moleküle auf Monozyten/Makrophagen [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	56
<b>Abbildung 5:</b> Vergleich der Frequenz und Expression ko-stimulatorischer Moleküle auf Monozyten/Makrophagen [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	57
<b>Abbildung 6:</b> Vergleich der Mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) von HLA-DR auf Monozyten/Makrophagen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	57
<b>Abbildung 7:</b> Vergleich der Größe [Forward scatter (FSC-A)] von Monozyten/Makrophagen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	58
<b>Abbildung 8:</b> Vergleich der Frequenz von DC [%] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	59
<b>Abbildung 9:</b> Vergleich der Frequenz von T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen [%] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	61
<b>Abbildung 10:</b> Vergleich der Mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) von CD3 auf T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	64
<b>Abbildung 11:</b> Vergleich der Frequenz von B-Zellen [%] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	65
<b>Abbildung 12:</b> Vergleich der Frequenz [%] der NK-Zellen und NK-Zell-Subpopulationen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	67
<b>Abbildung 13:</b> Vergleich der Mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) von CD56 auf zytotoxischen NK-Zellen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	68
<b>Abbildung 14:</b> Vergleich der Konzentration von IL-1 $\beta$ [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	70
<b>Abbildung 15:</b> Vergleich der Konzentration von IL-1Ra [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen.....	71

<b>Abbildung 16:</b> Vergleich der Konzentration von IL-2 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	72
<b>Abbildung 17:</b> Vergleich der Konzentration von IL-4 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	73
<b>Abbildung 18:</b> Vergleich der Konzentration von IL-7 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	74
<b>Abbildung 19:</b> Vergleich der Konzentration von IL-8 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	75
<b>Abbildung 20:</b> Vergleich der Konzentration von IL-10 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	76
<b>Abbildung 21:</b> Vergleich der Konzentration von IL-12 (p70) [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	77
<b>Abbildung 22:</b> Vergleich der Konzentration von IL-13 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	78
<b>Abbildung 23:</b> Vergleich der Konzentration von IL-17 $\alpha$ [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen.....	79
<b>Abbildung 24:</b> Vergleich der Konzentration von Eotaxin [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen.....	80
<b>Abbildung 25:</b> Vergleich der Konzentration von FGFb [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	81
<b>Abbildung 26:</b> Vergleich der Konzentration von PDGF-BB [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen.....	82
<b>Abbildung 27:</b> Vergleich der Konzentration von G-CSF [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen.....	83
<b>Abbildung 28:</b> Vergleich der Konzentration von IP-10 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	84
<b>Abbildung 29:</b> Vergleich der Konzentration von MCP-1 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen.....	85
<b>Abbildung 30:</b> Vergleich der Konzentration von MIP-1 $\alpha$ [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen.....	86
<b>Abbildung 31:</b> Vergleich der Konzentration von MIP-1 $\beta$ [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen.....	87
<b>Abbildung 32:</b> Vergleich der Konzentration von RANTES [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen.....	88
<b>Abbildung 33:</b> Vergleich der Konzentration von TNF- $\alpha$ [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen.....	89
<b>Abbildung 34:</b> Vergleich der Konzentration von Neopterin [nmol/L] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen .....	91

## Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AM	Adenomyosis uteri
ANA	Antinukleäre Antikörper
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>Cluster of differentiation</i> , Differenzierungsmarker
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DC	Dendritische Zellen
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EFI	<i>Endometriosis Fertility Index</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Endometriose
EMaIZI	Endometriose assoziierte Immunzellinfiltrate
FGFb	<i>Basic Fibroblast growth factor</i>
FSC-A	<i>Forward scatter</i> -Fläche
FSC-H	<i>Forward scatter</i> -Höhe
g	Gramm
g*	Erdschwerebeschleunigung
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen-DR isotype</i>
HMM	<i>Human Mature Macrophages</i>
IHC	Immunhistochemie
l	Liter
IFN	Interferon

IL	Interleukin
IP10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
K	Kontroll-Gruppe
LPS	Lipopolysaccharide
M1	M1-polarisierte pro-inflammatorische Makrophagen
M2	M2-polarisierte anti-inflammatorische Makrophagen
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIP-(1 $\alpha$ ; 1 $\beta$ ; 3 $\beta$ )	<i>Macrophage Inflammatory Protein-(1-alpha; 1-beta; 3-beta)</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol/L	Millimol pro Liter
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzellen
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
°C	Grad Celsius
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PBSbsa	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> ) plus bovines Serumalbumin
PDGF-BB	<i>Platelet-derived growth factor beta polypeptide</i>
PF	Peritonealflüssigkeit
pg/mL	Picogramm pro Milliliter
POP	<i>Progesterone Only Pills</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted</i>
rASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine Revised Classification of Endometriosis</i>

rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
SSC	<i>Sideward scatter</i>
Std	Stunde
SYTOX	SYTOX <i>Green</i>
T <sub>C</sub>	Zytotoxische T-Zellen
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
TIAR	<i>Tissue Injury and Repair Concept</i>
T <sub>Reg</sub>	Regulatorische T-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor



# 1. Einleitung und Zielsetzung

Die Endometriose ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen von Frauen im reproduktiven Alter und gehört zu den chronisch-inflammatorischen Krankheiten. Viele Theorien werden der Pathogenese dieser Erkrankung zugrunde gelegt, jedoch bleiben ursächliche Mechanismen bis heute ungeklärt. Es ist bekannt, dass verschiedene Komponenten des Immunsystems Einfluss auf die Entstehung der Endometriose nehmen.

Demnach sind fundierte Daten über die zellulären und inflammatorischen Komponenten im Rahmen der Endometriose elementar, da ein möglicher therapeutischer Schlüssel in der Hemmung der Aktivitäten einzelner Immunkomponenten liegen könnte. So könnten fehlgeleitete oder gestörte inflammatorische Reaktionen im Rahmen der Immunantwort kontrolliert werden, um adhäsive, angiogene und proliferative Prozesse zu unterbinden und damit die Etablierung ektoper Herde zu verhindern.

Diese experimentelle Arbeit prüft, welche Rolle im Speziellen die Immunzellen und deren inflammatorischen Zytokine im Rahmen der Endometriose spielen. Zudem wird der pro-inflammatorische Botenstoff Neopterin als potentieller Biomarker genauer untersucht, da er für viele andere chronische Erkrankungen als diagnostischer Marker genutzt wird. Die Peritonealflüssigkeit bildet für die Untersuchungen ein geeignetes Kompartiment, da es die peritonealen Läsionen umspült und lokale Immunprozesse widerspiegeln kann.

Zunächst werden die Endometriose-assoziierten Immunzellen der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen isoliert. Anschließend erfolgt die Charakterisierung von T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, Natürlichen Killerzellen und Dendritischen Zellen sowie deren Subpopulationen. Hierzu wird das Verfahren der Durchflusszytometrie angewendet, da es über Multi-Markierungen der isolierten Zellen mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern eine genaue Differenzierung einzelner Immunzellpopulationen ermöglicht. Darüber hinaus erfolgt die Analyse von 27 pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren sowie des pro-inflammatorischen Neopterin, ebenfalls in der Peritonealflüssigkeit der Patientinnen. Die Luminex Technologie (LUMINEX) und *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Analysen bilden hierzu die geeigneten Methoden, da sie über die Detektion der Konzentrationen einzelner Analyten den Vergleich von gesunden und erkrankten Patientinnen ermöglichen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die immunologischen Prozesse der Endometriose besser zu verstehen, um Rückschlüsse auf die Pathogenesemechanismen dieser Erkrankung zu ziehen, sodass auf dieser Basis neue, gezielte kausal-therapeutische Ansätze etabliert werden können.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Endometriose

Bei der Endometriose handelt es sich um eine chronisch inflammatorische östrogen-abhängige Erkrankung, welche circa 6 – 10 % aller Frauen im reproduktiven Alter betrifft (Eskenzi und Warner 1997; Noble et al. 1997; Bulun 2009; Fuldeore und Soliman 2017). Asymptomatische Verläufe und eine aufwändige, häufig sehr späte Diagnosestellung erschweren die Erhebung der genauen Prävalenz und somit kann von einer weitaus höheren Anzahl an erkrankten Frauen ausgegangen werden (Nnoaham et al. 2011).

Das Vorkommen von Gebärmutter-schleimhaut-ähnlichen Geweben außerhalb der Uterushöhle charakterisiert die Endometriose, welche in der Regel mit erheblichen Schmerzen und/oder Unfruchtbarkeit assoziiert ist und so leiden rund 50 % aller Frauen mit Schmerzen wie Dysmenorrhoe und Dyspareunie, Infertilität oder kombinierten Symptomen an dieser histopathologisch benignen Erkrankung (Meuleman et al. 2009; Johnson et al. 2017). Sie manifestiert sich vorwiegend herdförmig auf den Oberflächen des kleinen Beckens, des Peritoneums und in seltenen Fällen auch des Diaphragmas, wobei die Größe der Läsionen im Durchmesser von 1 mm großen, oberflächlichen peritonealen Herden bis hin zu über 10 cm großen Ovarialzysten (Endometriomen) variiert (ASRM 1997; Redwine 2002; Kennedy et al. 2005; Horton et al. 2008). Das über 5 mm tiefe Infiltrieren in angrenzende Organe wie den Darm, die Blase, die Ureteren oder das Gewebe der Vagina bildet eine Sonderform (*Deep Infiltrating Endometriosis*, DIE), wobei die Tiefe der Läsionen mit dem Grad sowie der Art der Symptome korreliert (Cornillie et al. 1990; Koninckx et al. 1991; Johnson et al. 2017). Darüber hinaus kann sich das ektope Gewebe in der muskulären Schicht, dem sogenannten Myometrium, der Gebärmutter manifestieren (Renner et al. 2006). Wandern endometriale Zellen in das Myometrium ein, spricht man von einer Adenomyose.

Mikroskopisch sind die ektopen Läsionen aus endometrialem Drüsenepithel, Stromazellen und glatter Muskulatur geformt (Anaf et al. 2000; Barcena de Arellano et al. 2011). Durch ein gesteigertes adhäsives und proliferatives Potential der Zellen, kann es über die Bildung von fibrotischem Gewebe in Bereichen der Endometriose-assoziierten Inflammation zu Adhäsionen kommen (Kennedy et al. 2005). Folglich können anatomische Veränderungen über die Störung der Ovulation Leitsymptome wie Infertilität bedingen (Schenken et al. 1984; Klemmt et al. 2007).

Viele Patientinnen erfahren durch anhaltende, teils höchstgradig ausgeprägte Symptome eine extreme physische Belastung, welche nicht selten zu immensen psychischen Problemen und somit einer deutlichen Minderung der Lebensqualität führt (Rush und Misajon 2018). Besonders die daraus resultierende reduzierte Leistungsfähigkeit gemeinsam mit den notwendigen Behandlungskosten hat außerordentliche ökonomische Auswirkungen, welche mit denen anderer chronischer Erkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus vergleichbar sind (Simoens et al. 2012).

### 2.2. Endometriose bei Tieren und in Tiermodellen

Das spontane Auftreten einer Endometriose ist bisher neben dem Menschen nur in nicht-humanen Primaten beobachtet worden (Fanton und Hubbard 1983; Zondervan et al. 2004). Im Besonderen sind Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) und Steppenpaviane (*Papio cynocephalus*) betroffen, wobei auch bei weiteren Affenarten wie dem Javaneraffen (*Macaca fascicularis*) eine spontane Endometriose diagnostiziert wurde (Fanton und Hubbard 1983; Fanton et al. 1986; Dick et al. 2003). Die Symptome sind vielfältig und überschneiden sich mit denen der humanen Endometriose-Patientinnen. Inaktivität und Anorexie ermöglichen die Schlussfolgerung, dass die Affen initial an klinischen Symptomen wie Zyklus-assoziierten Schmerzen oder Hypermenorrhoe leiden (Mattison et al. 2007). Ebenfalls ist bekannt, dass es bei Pavianen mit steigendem Schweregrad der Erkrankung zu einer korrelierenden Beeinträchtigung der Fertilität kommt (D'Hooghe et al. 1996). Die Diagnosestellung erfolgt, ähnlich wie bei den humanen Patientinnen, häufig sehr spät, wodurch die Endometriose selten in frühen Stadien erkannt wird (Mattison et al. 2007). Bleibt die Erkrankung unbehandelt, so können die teilweise tief-infiltrierenden Endometrioseherde zu großen Massen heranwachsen, die Organe funktionell blockieren und somit das Leben der Affen bedrohen (Mattison et al. 2007). Eine Therapie erfolgt mit dem Ziel, die Affen von den Endometriose-induzierten Schmerzen zu befreien und das Ausbreiten der Herde und weiterhin die Bildung von Adhäsionen zu vermeiden. Hierzu werden, wie in der Humanmedizin, Hormonpräparate eingesetzt und auch chirurgische Maßnahmen durchgeführt. Die Letztgenannten können das Entfernen von ektopen Läsionen oder Endometriomen beinhalten, um die Progression der Erkrankung einzudämmen sowie die Entfernung der Ovarien, um die Steroidbildung durch das Endometrium zu reduzieren und so der zyklischen Proliferation der extrauterinen Herde entgegenzuwirken (Mattison et al. 2007). Die Adenomyose hingegen wurde sowohl bei verschiedenen nicht-humanen Primaten wie Orang-Utans (*Pongo abelii/pygmaeus*) und Schimpansen (*Pan troglodytes*), als auch bei

## Literatur

verschiedenen anderen Säugetieren wie Katzen, (Wild-) Hunden sowie Mäusen beschrieben, wobei diese Beobachtungen Einzelfälle darstellen (Tamada et al. 2005; Greaves und White 2006; Barrier et al. 2007; Bulman-Fleming 2008; Graham et al. 2009; Newell-Fugate und Lane 2009; Malik 2017). Rinder wiederum sind häufiger betroffen und so ergaben Untersuchungen einer Hereford und Nelore Fleisch-Rasse (Kreuzzucht), dass über 50 % von 130 untersuchten Kühen und Färsen mit Fertilitätsproblemen an einer Adenomyose erkrankt waren und somit endometriale Zellen das Myometrium dieser Tiere besiedelt hatten (Ferreira et al. 2008).

Tierische Modelle verhelfen im Rahmen der Endometrioseforschung dazu, das Verständnis über die pathophysiologischen Vorgänge der Erkrankung zu erweitern, um bessere diagnostische und therapeutische Maßnahmen zu etablieren. Affenarten wie Rhesusmakaken gelten als ein besonders geeignetes Modell, da das Auftreten einer spontanen Endometriose und die Morphologie und Lokalisation der Läsionen dem klinischen Bild der humanen Patientinnen weitestgehend entsprechen (MacKenzie und Casey 1975; Fanton et al. 1986). Da die spontane Endometriose bei Affen jedoch kein häufiges Phänomen darstellt, wurden alternative Methoden entwickelt, um diese gynäkologische Erkrankung in dieser Tierart zu induzieren. Hierzu existieren mehrere Techniken. Basierend auf der Theorie nach Sampson wurden (chirurgische) Techniken entwickelt, um durch den Verschluss des Gebärmutterhalses eine gesteigerte retrograde Menstruation zu bewirken (Sampson 1927; D'Hooghe et al. 1994). Eine weitere Möglichkeit, Endometriose zu induzieren, liegt in der Transplantation von homologem endometrialem Gewebe in die Peritonealhöhle der Affen (Fazleabas et al. 2002). Die Modelle der nicht-humanen Primaten haben sich sehr bewährt, um Erkenntnisse über pathophysiologische Vorgänge im Rahmen der Endometriose zu gewinnen. So konnte beispielsweise bei Pavianen gezeigt werden, dass Immunsuppressiva die Endometrioseläsionen vergrößern und deren Anzahl erhöhen (D'Hooghe et al. 1995). Außerdem zeigte sich, dass die intrapelvine Injektion von Endometriumzellen in Pavianen die Frequenz an Leukozyten und inflammatorischen Zytokinen in der Peritonealflüssigkeit steigert und mit einer lokalen Inflammation vergesellschaftet ist (D'Hooghe et al. 2001). Zudem korrelierten erhöhte Estradiolwerte und eine genetische Prädisposition bei Rhesusaffen mit der Entwicklung einer Endometriose (Hadfield et al. 1997; Zondervan et al. 2004).

Darüber hinaus werden homologe oder heterologe Mausmodelle häufig in der Forschung verwendet, wobei diese Tierart weder menstruiert noch eine spontane Endometriose entwickelt und somit die Vergleichbarkeit mit dem humanen Krankheitsbild limitiert ist (Tirado-Gonzalez et al. 2010). In homologen Modellen, welche sowohl für Mäuse, Hasen, Ratten als auch Hamster etabliert sind, wird die Endometriose chirurgisch durch die

Implantation von autologem uterinem Gewebe in die Peritonealhöhle des jeweiligen Nagers induziert (Schenken und Asch 1980; Steinleitner et al. 1991; do Amaral et al. 2009; Pelch et al. 2012). Im Gegensatz dazu werden im heterologen Tiermodell Fragmente von humanem Endometriumsgewebe oder Endometrioseläsionen intraperitoneal oder subkutan transplantiert, woraufhin die immunsuprimierten Nager eine Endometriose entwickeln (Zamah et al. 1984; Nisolle et al. 2000).

Die v.a. bei Pferden auftretende Endometrose darf nicht mit der Endometriose verwechselt werden (Buczowska et al. 2014). Bei der Endometrose handelt es sich um eine chronisch-degenerative, irreversible Veränderung der Gebärmutter Schleimhaut auf histologischer Ebene (Aurich 2005).

### 2.3. Klassifikation der Endometriose

Abhängig von der Lokalisation der Läsionen wird die Endometriose in drei unterschiedliche Formen eingeteilt.

1. Die *Endometriosis genitalis externa* schließt die peritonealen Läsionen ein, welche sich außerhalb des Uterus, beispielsweise im Bereich des kleinen Beckens, der Ovarien, der *Ligamenta sacrouterina* oder im Douglasraum befinden. Auch ovarielle Endometriosezysten (Endometriome) gehören zu dieser Variante (Renner et al. 2006).

Die *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM; früher *Revised American Fertility Society*, rAFS) hat für diese Endometrioseform ein *Scoring*-System entwickelt, welches weltweit Anwendung findet (ASRM 1997). Demnach erfolgt die Klassifizierung der *Endometriosis genitalis externa* laparoskopisch gestützt in vier Schweregrade: I – minimal, II – mild, III – moderat und IV – schwer. Hierbei werden unterschiedliche Aspekte, wie z. B. der Ausdehnungsgrad (Größe und Tiefe) der Läsionen und Adhäsionen in Abhängigkeit von deren Lokalisation berücksichtigt, wobei zwischen Eileitern, Ovarien und dem Beckenperitoneum unterschieden wird. Darüber hinaus wird ein partieller oder kompletter Tubenverschluss ebenfalls berücksichtigt. Die Zuordnung erfolgt anhand eines Punktesystems, das durch ein grafisches Schema gestützt wird (ASRM 1997).

2. Das Vorkommen von Epithel- und Stromazellen in der muskulären Schicht des Uterus (*Adenomyosis uteri*) zählt zu der *Endometriosis genitalis interna*.

3. Zur *Endometriosis extragenitalis* lassen sich Läsionen zuordnen, welche sich außerhalb des kleinen Beckens in den angrenzenden Organen, wie beispielsweise Blase, Darm, Vagina und seltener in Leber, Pankreas, Zwerchfell oder zentralem Nervensystem ansiedeln (Renner et al. 2006).

Ergänzend zur *ASRM* entwickelten Tuttlies et al. den *ENZIAN-Score* (Tuttlies et al. 2005). Dieser berücksichtigt insbesondere tief-infiltrierende Formen, wie die rektovaginale Endometriose, welche eine besondere Variante dieser Erkrankung darstellt. Die Zuordnung erfolgt in diesem System in drei unterschiedliche retroperitoneale Kompartimente (A: *Spatium rectovaginale* (in longitudinaler Richtung) vom Douglasraum bis zur Vagina; B: Sacrouterinbänder, seitliche Beckenwand, Ureter(en), *Nervi splanchnici* und C: Rektum und Sigmoid. Das F („far“) bezeichnet entfernte Manifestation jenseits der drei genannten (*posterioeren, pelvinen*) Kompartimente, z. B. Blase (FB), Adenomyose (FA), distante Darminfiltration (FI)). Unter Berücksichtigung der Tiefe der Infiltration werden den einzelnen Kompartimenten noch jeweils *Scores* zugeteilt (Grad I: Invasion < 1 cm, Grad II: Invasion 1 bis 3 cm, Grad III: Invasion > 3 cm) (Tuttlies et al. 2005; Haas et al. 2013).

Um Aussagen über die zu erwartende symptomatische Verbesserung, v.a. der Fertilität und Schwangerschaftschancen nach Behandlung treffen zu können, haben Adamson und Pasta den *Endometriosis Fertility Index* (EFI) eingeführt. In diesem System fließen neben speziellen anamnestischen Faktoren wie Alter der Patientinnen sowie Dauer der Unfruchtbarkeit und Paritätshistorie (Anzahl von Geburten), auch der (postoperative) Zustand und die Funktionalität der Adnexe, Fimbrien und Ovarien sowie Schweregrad der Erkrankung (*ASRM-Score*) in die Kalkulation mit ein (Adamson und Pasta 2010; Garavaglia et al. 2015).

## 2.4. Symptome und Diagnose der Endometriose

Die Anzeichen und Symptome treten entweder allein oder kombiniert auf, können je nach Lokalisation und Schweregrad der Endometriose variieren und sich unter Progression der Erkrankung verändern (Koninckx et al. 1991; Kennedy et al. 2005). So verläuft sie zu rund 4 % asymptomatisch und kann im Rahmen von laparoskopisch gestützten Sterilisationen oder Ähnlichem einen Zufallsbefund darstellen (Cramer und Missmer 2002). In der Regel jedoch geht Endometriose mit erheblichen chronischen zyklisch oder azyklisch auftretenden Schmerzen einher und ist in über 50 % der Fälle mit Dysmenorrhoe oder Dyspareunie assoziiert (Kennedy et al. 2005; Meuleman et al. 2009). Sind Organe wie die Blase oder der Darm betroffen, können die Läsionen zu Dysurie oder Dyschezie führen und zudem leiden viele Frauen unter starken Blutungsstörungen (Hypermenorrhoe/Menorrhagie) (Kennedy et al. 2005). Ein weiteres Hauptsymptom stellt die primäre oder sekundäre Infertilität dar, von welcher circa jede zweite Patientin betroffen ist (Aliani et al. 2018; Paramonova et al. 2018). Die Schweregrade der Erkrankung (Lokalisation und Klassifizierung) und der Symptome wie

Schmerzen, scheinen nur bei der tief infiltrierenden Endometriose zu korrelieren (Koninckx et al. 1991; Chapron et al. 2003; Vercellini et al. 2007; Aliani et al. 2018). Der unerfüllte Kinderwunsch sowie die anderen gravierenden, das Leben, den Alltag und auch mögliche Partnerschaften beeinträchtigende Symptome stellen eine immense psychische Belastung für die Patientinnen dar und wirken sich erheblich auf deren Lebensqualität aus (Marki et al. 2017). Somit ist es nicht verwunderlich, dass die Endometriose in 60 % der Fälle mit depressiven Verstimmungen oder sogar mit klinisch relevanten Depressionen sowie Angststörungen einhergeht (Halis et al. 2010).

Es ist schwierig, die Diagnose ausschließlich auf Grundlage der Symptome zu stellen, da sich diese zum einen sehr variabel zeigen und zum anderen eine große Ähnlichkeit zu anderen Erkrankungen aufweisen. Das Reizdarmsyndrom, entzündliche Beckenerkrankungen sowie das prämenstruelle Syndrom, Blasen-, Ureteren-Probleme u. v. m., sind differential-diagnostisch in Betracht zu ziehen (Kennedy et al. 2005; Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine 2008). Daher wird die ausführliche Anamnese in der Regel durch eine (rekto-)vaginale Ultraschalluntersuchung gestützt und in selteneren Fällen durch eine Magnetresonanztomografie ergänzt. Mit diesen nicht-invasiven Techniken lassen sich unter Umständen Endometriome sowie tief infiltrierende Läsionen, durch Adhäsionen verdrehte bzw. retroflexierte Organe wie der Uterus oder Läsionen in der Vagina sowie der Zervix feststellen (Brosens et al. 2004; Kennedy et al. 2005). Den diagnostischen Goldstandard stellt jedoch die Laparoskopie dar, mit welcher sich makroskopisch auch kleinste Läsionen und Adhäsionen darstellen lassen, um anschließend die Diagnose über ein histologisch untersuchtes Biopat zu sichern (Abbott et al. 2003; Kennedy et al. 2005; Marchino et al. 2005). Nach dem Auftreten der ersten Symptome kommt es aufgrund des mannigfaltigen Krankheitsbildes und der aufwändigen Diagnostik zu einer durchschnittlichen Verzögerung der Diagnosestellung von 6,7 Jahren bei Frauen im Alter von 18 bis 45 Jahren (Nnoaham et al. 2011).

### 2.5. Therapie der Endometriose

Aufgrund mangelnder Kenntnis der Pathogenese der Endometriose fehlen zurzeit noch kausal-therapeutische Behandlungsansätze und so zeigen rund 60 % der Endometriose-Patientinnen trotz Behandlung Symptome und bleiben demnach anhaltend therapiebedürftig (Kuohung et al. 2002).

Da Schmerzen und Infertilität die zentralen zu behandelnden Symptome darstellen, sind die meisten Behandlungsformen auf Schmerzlinderung sowie Erhalt bzw. Förderung der

Fertilität ausgerichtet (Dai et al. 2018). Abhängig von der Schwere der Symptome kann die Einnahme von Schmerzmitteln wie nichtsteroidalen Antiphlogistika in Kombination mit Prostagainen (*Progesterone Only Pills*, POP), *Gonadotropin-Releasing-Hormon* (GnRH)-Analoge sowie oralen Kontrazeptiva (Pille) oder lokalen hormonfreisetzenden intrauterinen Systemen (*Intrauterine Device*) Linderung schaffen (Surrey und Hornstein 2002; Cobellis et al. 2004; Bedaiwy et al. 2017; Ebert et al. 2017). Wenn jedoch die Symptome persistieren, eine finale Diagnose gestellt werden soll und ektope Läsionen entfernt werden müssen, so ist die laparoskopische Operation das Mittel der Wahl (Abbott et al. 2003; Chapron et al. 2003). Diese beinhaltet die Exzision und Ablation des ektopten endometrialen Gewebes und bei Bedarf Adhäsiolyse mit Hilfe unterschiedlicher chirurgischer Techniken (Golfier und Sabra 2007; Jacobson et al. 2009; Practice Committee of the American Society for Reproductive 2012). Die chirurgischen Sanierungen stellen eine effektive Methode zur deutlichen Linderung der Unterbauchschmerzen sowie der Dysmenorrhoe dar und trotzdem liegt die Rezidivrate nach fünf Jahren bei 40 bis 50 % (Guo 2009; Kaiser et al. 2009). Daher sollte sich die konservative Behandlung mit oralen Kontrazeptiva, wie POP, anschließen, um Rezidiven sowie erneut auftretenden Symptomen vorzubeugen bzw. diese zu minimieren (Vercellini et al. 2008; Gong et al. 2015; Park et al. 2016).

## 2.6. Ätiologie und Pathogenese der Endometriose

Gegenwärtig existiert eine Vielzahl an Konzepten und Theorien, welche eine mögliche Erklärung für die Entstehung der Endometriose liefern, jedoch ist die Ursache bis heute ungeklärt. Im Folgenden wird eine Auswahl der relevanten theoretischen Ansätze für die zugrunde liegenden Mechanismen dargelegt.

### 2.6.1. Implantationstheorie nach Sampson

Die im Jahre 1927 von John A. Sampson aufgestellte Implantationstheorie findet noch heutzutage Akzeptanz (Sampson 1927). Sie besagt, dass es während der Menstruation zu einem Rückfluss von menstruellem Blut über die Eileiter in die Peritonealhöhle kommt (retrograde Menstruation). Über diesen Weg mitgeschwemmte Endometriumzellen sollen sich oberflächlich im Bereich des Peritoneums und der angrenzenden Organe des kleinen Beckens implantieren und anschließend zu Endometrioseherden entwickeln (Sampson 1927). Bekannt ist, dass Menstruationsblut vitales endometriales Gewebe beinhaltet und so

konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass im rückfließenden Blut existente endometriale Zellen in der Lage sind, ektope Läsionen auszubilden (D'Hooghe et al. 1995; Koks et al. 1997). Diese Erkenntnisse stützen Sampsons Theorie. Dass es bei bis zu 90 % der Frauen mit durchgängigen Tuben im Rahmen des Zyklus zum Rückfluss von Menstruationsblut kommt, ist ebenfalls bewiesen (Halme et al. 1984). Warum allerdings nur einige Frauen unter der retrograden Menstruation eine Endometriose entwickeln, bleibt fraglich und führt zu der Erkenntnis, dass der Rückfluss allein nicht für die Entwicklung dieser Erkrankung verantwortlich sein kann (Vinatier et al. 2001). In der Regel ist das Immunsystem in der Lage, die zurückgeschwemmten Zellen abzubauen und so eine Implantation zu verhindern. Dieser Mechanismus scheint bei Endometriose-Patientinnen nicht zu greifen und so wird, gegebenenfalls unter dem Einfluss von unterschiedlichen bisher unbekanntem Faktoren, die Pathogenese der Erkrankung durch Immunkomponenten unterstützt (Vinatier et al. 2001). Auch das Auftreten von Endometriose bei jungen Mädchen vor der Menarche oder Frauen unter Amenorrhö, bei Männern, die sich aufgrund eines Prostatakarzinoms mit Östrogenen behandeln ließen sowie an Lokalisationen außerhalb der Beckenhöhle (z. B. Thorax) lässt sich nicht mit Sampsons Theorie begründen (Clark 1948; Schrodt et al. 1980; Suginami 1991; Jabeen und Raees 2015).

### 2.6.2. Coelom-Metaplasie-Theorie

Die Coelom-Metaplasie-Theorie nach Robert Meyer liefert eine weitere mögliche Erklärung für die offenen Fragen in Sampsons Theorie, indem sie auf der metaplastischen Differenzierung von embryonalen Coelomzellen zu Endometriumszellen basiert. Hormonelle, inflammatorische und andere Komponenten stehen im Verdacht, diese Metaplasien zu initiieren (Meyer 1919). Es gibt jedoch einige Punkte, welche gegen diese Theorie sprechen, zumal Endometriose bei Männern und außerhalb der Beckenhöhle selten zu verzeichnende Phänomene darstellen (Samartzis 2012).

### 2.6.3. Tissue Injury and Repair Concept (TIAR)

G. Leyendecker et al. (Leyendecker et al. 1998; Leyendecker et al. 2009) legen der Endometriose ein anderes, die Implantationstheorie erweiterndes Konzept zugrunde. Das *Tissue Injury and Repair Concept* (TIAR) geht davon aus, dass Endometriose eine uterine Erkrankung darstellt, bei der Östrogen- und Oxytocin-abhängig, zunehmende uterine Peristaltik Mikroverletzungen an der Grenzfläche zwischen Endometrium und Myometrium

nahe der fundo-cornualen Raphe verursacht. Daraufhin wird der TIAR-Mechanismus aktiviert, welcher aufgrund einer Aromatase-Überexpression lokal in uterinem Gewebe zu unkontrollierter Erhöhung des Östrogenspiegels führt, folglich in chronischer Hyperperistaltik mündet und weitere Mikrotraumatisierungen bewirkt. Endometriale Zellen mit Stammzellcharakter können somit aus dem Stratum basale des Uterus in die Beckenhöhle gelangen und sich in Endometrioseläsionen differenzieren oder tief in das Myometrium infiltrieren, anschließend proliferieren und eine Adenomyose bilden. Ein Auslöser während der frühen reproduktiven Phase der Patientinnen könnte diese spezifischen biochemischen und zellulären Reaktionen verursachen und so den sich selbst aufrechterhaltenden Kreislauf initiieren (Leyendecker et al. 1998; Leyendecker et al. 2009).

Diese Theorie stützend, demonstrierten Ibrahim et al., dass die endometriale-myometriale junctionale Zone von Adenomyose-Patientinnen multiple Ultramikro-Rupturen aufweist. Diese ermöglichen sogenannten nicht-leukozytären *Pale cells*, abhängig von ihrer exzentrischen oder konzentrischen Lokalisation in den basalen endometrialen Drüsen, aktiv über das Stroma des basalen Endometriums in das Myometrium oder über die uterine Höhle in die Peritonealhöhle einzuwandern und sich in Form einer Adenomyose bzw. peritonealen Endometriose zu manifestieren (Ibrahim et al. 2015). Intraepitheliale ortständige *Pale cells* waren auch in den Uteri von Adenomyose-freien Patientinnen nachzuweisen, jedoch blieb hier eine Migration aus (Ibrahim et al. 2015).

### 2.6.4. Veränderte Immunkomponenten und zellmedierte Immunität der Endometriose

#### 2.6.4.1. Molekulare Mechanismen

Es ist bereits bekannt, dass sich Frequenzen, Morphologien und Funktionen von Immunzellen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren, sowie lokale Hormonkonzentrationen im Peritoneum, im Gewebe und in der Peritonealflüssigkeit der an Endometriose erkrankten Frauen verändert darstellen und an der Entstehung der Endometriose beteiligt sein können (Ebert 2019). Warum allerdings die Immunreaktion bei den Patientinnen in Bezug auf die Abwehr von ektopen endometrialen Zellen unzureichend ausfällt, ist bis heute unklar.

Die endometriumartigen Zellen, welche entweder über die retrograde Menstruation oder auf anderen, unbekanntem Wegen das Äußere des Uterus erreichen, müssten regulär durch zelluläre und humorale Komponenten des Immunsystems erkannt und folglich abgewehrt werden (*Clearance*) (Burney und Giudice 2012). Stattdessen verbleiben die regurgitierten

endometrialen Zellen und Fragmente in der peritonealen Höhle der Endometriose-Patientinnen und lösen dort u.a. über rekrutierte Immunzellen, wie z. B. Makrophagen, eine Entzündungsreaktion aus (Cao et al. 2004). Die inflammatorischen Prozesse sollten normalerweise die Abwehr und Beseitigung des ektopen Gewebes bewirken, jedoch greifen diese Mechanismen, möglicherweise aufgrund einer gestörten Immunüberwachung (*Immunosurveillance*), bei diesen Frauen nicht (Christodoulakos et al. 2007). Eine potenziell veränderte zytotoxische Aktivität der T-Zellen könnte die Erklärung für die defekte *Clearance* sein (Steele et al. 1984). Ergänzend dazu scheinen sich die endometrialen Zellen selbst über unbekannte lösliche Faktoren anti-zytotoxisch auf die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) auszuwirken und so den Aufräummechanismen des Immunsystems zu entgehen (Somigliana et al. 1996).

Andere pro-inflammatorische und angiogene Faktoren wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), *Tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) und *Transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) werden vermehrt von den ektopen Läsionen und den Immunzellen gebildet und konnten erhöht in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen nachgewiesen werden (Pizzo et al. 2002; Wu und Ho 2003; Mier-Cabrera et al. 2011). Entgegen ihrer eigentlichen Aufgabe, das Etablieren der Endometrioseherde durch Immunmechanismen zu verhindern, scheinen diese Botenstoffe die Adhäsion der endometrialen Zellen an die peritoneale Oberfläche zu steigern, wie *in vitro* in einem Endometriose-Modell bestätigt werden konnte (Beliard et al. 2003).

Darüber hinaus bilden chemotaktische Zytokine (Chemokine) wie *Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted* (RANTES), *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) oder Eotaxin Immunkomponenten, welche über das Anlocken von Immunzellen wie NK-Zellen, Granulozyten oder Monozyten die Immunantwort mitbestimmen und durch ihre pro-inflammatorische Wirkung ebenfalls mit der Endometriose assoziiert werden (Hornung et al. 1997; Akoum et al. 2000; Hornung et al. 2000; Mier-Cabrera et al. 2011).

RANTES ist nachweislich ein regulärer Bestandteil des eutopen Endometriums von Endometriose-Patientinnen, wird zudem auch durch Stromazellen in den ektopen Läsionen synthetisiert und könnte somit maßgeblich an der lokalen Rekrutierung peritonealer Leukozyten beteiligt sein (Hornung et al. 1997). TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stimulieren u.a. die Synthese von IL-8, MCP-1 und Eotaxin, welchen eine Beteiligung an der Adhäsion und Proliferation der ektopen endometrialen Zellen zugesprochen wird (Hornung et al. 1997; Gao et al. 1999; Iwabe et al. 2000; Mier-Cabrera et al. 2011). MCP-1 wirkt *in vitro* bekanntermaßen neben seiner chemotaktischen Aktivität u.a. durch die Induktion der Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 oder IL-6 (Jiang et al. 1992).

Interessanterweise zeigten Borrelli et al., dass MCP-1 gemeinsam mit IL-8 und *Macrophage inflammatory protein-3 $\beta$*  (MIP-3 $\beta$ ), welches ebenfalls chemotaktisch auf Immunzellen wie Monozyten wirkt, in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen ein potentielles diagnostisches Marker-Profil bildet (Borrelli et al. 2015).

Weiterhin könnten auch Wachstumsfaktoren wie der *Platelet-derived growth factor beta polypeptide* (PDGF-BB) eine Rolle in der Pathogenese der Endometriose spielen. Er bildet einen wichtigen Faktor während Wundheilungsprozessen und ist über das Anlocken aktivierter Makrophagen und Fibroblasten an Gewebereparaturmechanismen beteiligt (Pierce et al. 1989). Zudem wurde *in vitro* gezeigt, dass PDGF-BB maßgeblich Funktionen wie Proliferation und Motilität von endometrialen Stromazellen in der perimenstruellen Phase zu beeinflussen scheint (Matsumoto et al. 2005).

Da antiangiogene Wirkstoffe ektipe Läsionen in ihrer Entwicklung hemmen konnten, wird der Angiogenese und somit den an ihr beteiligten Immunzellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Endometriose zugesprochen (Hull et al. 2003). Es zeigte sich, dass größere endometriale Fragmente (> 1 mm) ein höheres Implantationsvermögen als einzelne endometriale Zellen haben (Nap et al. 2003). Diese kompakten Zellverbände benötigen nach der Invasion des Gewebes ein Gefäßsystem, welches die Sauerstoff- sowie Nährstoffzufuhr gewährleistet und ein Etablieren und Fortbestehen der Herde ermöglicht (Groothuis et al. 2005). Der unter anderem durch aktivierte Makrophagen synthetisierte *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) beispielsweise wurde in erhöhter Konzentration in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen nachgewiesen (McLaren et al. 1996; Lin et al. 2006). Im Zusammenspiel mit anderen Wachstumsfaktoren wie Vertretern der *Fibroblast growth factor* (FGF)-Familie, gilt VEGF bekanntermaßen als ein wichtiger Mediator der Angiogenese und fördert somit die Genese unterschiedlicher (z. B. tumoröser) Erkrankungen (Presta et al. 2005). Zudem fördert die Präsenz von dendritischen Zellen (DC) in Endometriose-Patientinnen über die Expression von *Vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR2) die Vaskularisation und das Wachstum der Läsionen (Fainaru et al. 2008). Passend dazu wurden anti-angiogene Botenstoffe wie *Interferon gamma-induced protein 10* (IP-10) im Serum von Endometriose-Patientinnen in reduzierter Konzentration vorgefunden (Malutan et al. 2017). Insgesamt konnte in einem *Chorio-allantoic membrane assay* eine erhöhte angiogene Aktivität der Peritonealflüssigkeit in Endometriose gezeigt werden (Oosterlynck et al. 1993).

Somit könnte ein möglicher therapeutischer Schlüssel darin liegen, einzelne Immunzellen sowie spezielle inflammatorische Botenstoffe in ihren Aktivitäten zu hemmen, um so die Migration, Invasion, Adhäsion, Angiogenese und Proliferation der ektopen Endometriumzellen zu unterbinden und damit die Etablierung ektoper Herde zu verhindern.

Auch eine Autoimmunkomponente wird bezüglich der Endometriose in Betracht gezogen. Eine erhöhte Anzahl an Autoantikörpern legt den Verdacht nahe, dass ein verändertes Immunsystem eine Rolle in der Pathogenese der Endometriose spielt (Fernandez-Shaw et al. 1993). So zeigen Untersuchungen, dass sie häufig mit Autoimmunerkrankungen wie Hypothyreose, Sjorgens Syndrom oder systemischem Lupus erythematoses assoziiert ist (Sinaii et al. 2002). Somit könnte Interleukin-4 (IL-4) eine weitere entscheidende Rolle in der Genese der Endometriose spielen, da dieser Faktor bereits im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen bekannt ist (Singh 2003). Es handelt sich hierbei um ein Molekül, welches in ektopen Läsionen präsent ist (OuYang et al. 2008). In diesen induziert es zum einen *in vitro* die Eotaxin-Synthese, wodurch die Angiogenese gefördert werden könnte und zum anderen trägt es zur Proliferation von endometrialen Stromazellen bei (OuYang et al. 2008; Ouyang et al. 2010).

### 2.6.4.2. Makrophagen

Makrophagen sind gewebeständige Phagozyten, die entweder gewebezpezifisch angelegt sind oder sich aus einwandernden Monozyten differenzieren. Über *Human leukocyte antigen-* (HLA)-DR oder *Intercellular adhesion molecule* (ICAM-) 1 und gemeinsam mit anderen ko-stimulatorischen Molekülen (z. B. *Cluster of differentiation* (CD) 80 und CD86) präsentieren sie Antigene und beteiligen sich an der Aktivierung von T-Zellen (van Seventer et al. 1991; Damle et al. 1992; Kusume et al. 2005). Entsprechend lässt die Präsenz solcher Moleküle auf peritonealen Makrophagen Rückschlüsse auf den Aktivierungsstatus dieser CD14-positiven Zellen zu (Zarif et al. 2016).

Darüber hinaus agieren die Makrophagen als Masterregulatoren der angeborenen Immunantwort, indem sie zum einen als klassisch aktivierte Makrophagen (M1) in der inflammatorischen Immunantwort (Typ 1, T-Helfer-(T<sub>H</sub>)1-Antwort unterstützend) Zellproliferation inhibieren sowie gewebeschädigend wirken und zum anderen als alternativ aktivierte Makrophagen (M2) Zellproliferation sowie Gewebereparaturmechanismen stimulieren und in die anti-inflammatorische Immunantwort (Typ 2, T<sub>H</sub>2-Antwort unterstützend) involviert sind (Mills et al. 2000; Lawrence und Natoli 2011; Mills 2012). Über Phagozytose und die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wird den Makrophagen eine enorme Rolle in der Regulation der inflammatorischen Reaktion zugesprochen (Na et al. 2008). Peritoneale Makrophagen von Endometriose-Patientinnen allerdings weisen eine reduzierte Phagozytoseaktivität auf (Chuang et al. 2009). Darüber hinaus soll es aufgrund einer verringerten *Human Leukocyte Antigen-DR isotype* (HLA-DR) Expression auf

Makrophagen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen zu einer gestörten Immunreaktion kommen (Kusume et al. 2005).

Die genaue pathophysiologische Rolle der einzelnen Subpopulationen in der Pathogenese der Endometriose ist noch weitestgehend ungeklärt. Endometriose-assoziierte Makrophagen sind ein seit Jahren bekanntes Phänomen (Hever et al. 2007). Na et al. zeigten *in vitro*, dass die Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen die Differenzierung von peripheren Monozyten, nach Verlassen der Blutbahn, vermehrt zu Makrophagen statt zu DC fördert (Na et al. 2008).

Erreicht endometriales Gewebe z. B. über die retrograde Menstruation die Peritonealhöhle, erliegen die ektopen Zellen aufgrund lokaler Hypoxie und Progesteronabfall nach einiger Zeit dem zyklischen Zelltod und in Konsequenz werden Zelldebris, Erythrozyten sowie Hämgebundenes Eisen in die Peritonealhöhle freigegeben (Capobianco und Rovere-Querini 2013). Makrophagen wandern in die Umgebung der Herde ein, erkennen die teils apoptotischen ortsfremden, endometrialen Zellen und Fragmente zwar, sind jedoch scheinbar aufgrund ihrer reduzierten Phagozytoseaktivität unfähig, ihrer Rolle als Effektorzellen adäquat gerecht zu werden und wirken u.a. über fehlgesteuerte reparative Wundheilungsprozesse (Chuang et al. 2009; Capobianco und Rovere-Querini 2013). Desweiteren könnte das erhöhte Aufkommen an Erythrozyten bzw. Eisen in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen die peritonealen Makrophagen überfordern (Capobianco und Rovere-Querini 2013). Sie sind zwar im Gegensatz zu den Makrophagen von Kontroll-Patientinnen deutlich mit Ferritin beladen, stoßen aber möglicherweise an ihre kapazitiven Grenzen, wodurch das restliche Eisen in der peritonealen Höhle der Patientinnen verbleibt (Lousse et al. 2009).

Von Makrophagen synthetisierte, pro-inflammatorische sowie chemotaktische und proangiogene Botenstoffe wie z. B. VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-8 in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen, scheinen die chronisch entzündlichen Prozesse und die Etablierung der Endometriose entscheidend zu beeinflussen (Koch et al. 1992; McLaren et al. 1996; Pizzo et al. 2002; Mulayim et al. 2004; Montagna et al. 2008; Arango Duque und Descoteaux 2014). Des Weiteren wurde gezeigt, dass sie über VEGF maßgeblich befähigt sind, die Neovaskularisation und damit die Etablierung der ektopen Läsionen zu medieren (Lebovic et al. 2000). Weiterhin halten im Mausmodell alternativ aktivierte Tie2-exprimierende Makrophagen mit erhöhter pro-angiogener Aktivität die Funktionsfähigkeit neu gebildeter Gefäße in Endometrioseläsionen aufrecht (Capobianco et al. 2011). Ergänzend dazu zeigte die Depletion von Makrophagen im Tiermodell eine reduzierte Formierung sowie Etablierung der Läsionen und die Gabe von BEVACIZUMAB

(rekombinanter-humanisierter monoklonaler VEGF-A Antikörper) inhibierte die Zellproliferation, reduzierte die Vaskularisierung und erhöhte die Apoptoserate der endometrialen Zellen (Bacci et al. 2009; Haber et al. 2009; Ricci et al. 2011). Die Empfänglichkeit des eutopen sowie ektopen endometrialen Gewebes scheint für spontane Apoptose im Rahmen der Endometriose signifikant verringert und somit wird möglicherweise durch eine gestörte Immunreaktion eine Implantation der ektopen Zellen nicht verhindert (Gebel et al. 1998; Dmowski et al. 2001; Dmowski und Braun 2004).

Darüber hinaus produzieren aktivierte Makrophagen und von Monozyten abstammende DC D-erythro-1',2',3-Trihydroxypropylpterin (Neopterin) (Huber et al. 1984; Wirleitner et al. 2002). Entsprechend handelt es sich hierbei um einen Botenstoff, dessen Konzentration in körperlichen Kompartimenten wie Blut oder Peritonealflüssigkeit den Aktivierungsstatus von Makrophagen widerspiegeln kann. Neopterin gilt als Marker für unterschiedliche infektiöse und inflammatorische Erkrankungen, da die Produktion dieses Botenstoffs über T<sub>H</sub>1-produzierte Zytokine (v. a. über Interferon (IFN)- $\gamma$ ) gesteigert und ihm somit eine maßgebliche Beteiligung an inflammatorischen Prozessen zugesprochen wird (Hoffmann et al. 2003). Obwohl im Blut und der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen eine veränderte Konzentration dieses Aktivierungsmarkers festgestellt wurde, herrscht bis heute kein Konsens über das Vorkommen und die potentielle Rolle bei den erkrankten Frauen (Kondera-Anasz et al. 2004; Riley et al. 2007).

Eine erhöhte Anzahl an Makrophagen allgemein konnte sowohl im eutopen Endometrium als auch in ektopen Läsionen von Endometriose-Patientinnen nachgewiesen werden (Tran et al. 2009; Takebayashi et al. 2015; Scheerer et al. 2016). Siehe dazu auch Abbildung 1. In der Peritonealflüssigkeit der erkrankten Frauen zeigten sich die Frequenzen entweder ohne Unterschied oder erhöht (Zhang et al. 2006; Itoh et al. 2013).

Im Kontext der Endometriose scheinen die Subpopulationen der Makrophagen in Richtung M2 verschoben zu sein und so zeigten Bacci et al. im Jahr 2009 neben einer signifikanten Erhöhung von angiogenen CD163<sup>+</sup> und CD206<sup>+</sup> M2 in der Peritonealflüssigkeit und in ektopen Läsionen von Endometriose-Patientinnen auch, dass die Injektion von M2 im Balb/C Mausmodell die Entwicklung der Endometrioseläsionen förderte, M1-Injektion hingegen bewahrte die Mäuse vor der Etablierung der Herde (Bacci et al. 2009). Auch in ektopen Läsionen von Rhesusmakaken mit Endometriose konnte M2-Polarisation festgestellt werden (Smith et al. 2012) und *in vitro* steigerte die Kokultivierung mit Typ-2-Makrophagen die Proliferation von endometrialen Stromazellen (Itoh et al. 2013). Die Depletion von Interleukinen wie IL-10, welches *in vitro* nachweislich verstärkt von M2 produziert wird, führte im Mausmodell zu signifikanten Reduzierungen von Endometrioseläsionen (Bacci et al.

2009; Suen et al. 2014). Die IL-10-Injektion wiederum förderte das Wachstum der Herde (Suen et al. 2014).

Es wird deutlich, dass Makrophagen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Endometriose spielen könnten und dennoch ist unklar, wie genau sie sich in das Gesamtgeschehen einfügen. So ist es wahrscheinlich, dass die genaue Charakterisierung bzw. Quantifizierung der einzelnen Subpopulationen und der von ihnen produzierten inflammatorischen Zytokine Rückschlüsse auf ihre Beteiligung an der Entstehung und Pathophysiologie dieser Erkrankung erlaubt.

### 2.6.4.3. Dendritische Zellen

DC gehören zu den Leukozyten, bilden als potente antigenpräsentierende Zellen eine wichtige Schnittstelle zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem und spielen so eine entscheidende Rolle in der Immunantwort (Collin und Bigley 2018). Im Knochenmark aus lympho-myeloiden hämatopoetischen Stammzellen gebildet, sind unreife DC gewebständig und in der Lage, Pathogene durch rezeptorvermittelte Endozytose zu internalisieren, wodurch es im Rahmen einer Entzündung zu ihrer Aktivierung und Mobilisierung kommt (Banchereau und Steinman 1998; Collin und Bigley 2018). Die Antigene werden prozessiert und als Peptide in *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Klasse I bzw. II eingebaut, woraufhin der MHC-Peptid-Komplex an der Zelloberfläche exprimiert und anschließend zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) bzw. T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>) präsentiert wird, um diese zu stimulieren und so eine Immunantwort hervorzurufen (Banchereau und Steinman 1998). Reife DC sind u.a. über die Produktion von IL-12 in der Lage, T- und NK-Zellen zu aktivieren sowie das Wachstum der B-Zellen und deren Antikörperbildung zu modulieren (Dubois et al. 1997; Reis e Sousa et al. 1997; Fernandez et al. 1999). Veränderungen in der DC-Population könnten also auch zu Veränderungen der übrigen Leukozytenpopulationen sowie folglich der Zytokine führen und entsprechend entscheidend die Entwicklung der Endometriose beeinflussen (Schulke et al. 2009).

Auch über das Einfangen und Präsentieren von Autoantigenen, die Deletion autoreaktiver T-Zellen sowie über die Induktion von regulatorischen T-Zellen sind DC maßgeblich an der Immuntoleranz beteiligt und so zeigte ihre Depletion in Mäusen die Entwicklung einer spontanen Autoimmunantwort (Jonuleit et al. 2000; Hawiger et al. 2001; Steinman und Nussenzweig 2002; Ohnmacht et al. 2009). Somit stehen Veränderungen des Phänotyps oder der Anzahl dieser Leukozyten im Verdacht, Einfluss auf die Entwicklung von

Autoimmunkrankheiten zu nehmen (Carvalho et al. 2012). Da auch im Kontext der Endometriose eine Autoimmunkomponente vermutet wird, könnten die DC über ähnliche, die Immunantwort modulierende Mechanismen die Entstehung der Erkrankung fördern (Sinai et al. 2002). Diese Funktion in der Toleranzinduktion könnte also einen Ansatzpunkt zur kausaltherapeutischen Therapie darstellen.

Die Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose fördert *in vitro* die Differenzierung von peripheren Monozyten vermehrt zu Makrophagen statt zu DC (Na et al. 2008). Schulke et al. fanden in Endometrioseläsionen sowie dem umliegenden Peritoneum von Patientinnen vermehrt unreife DC (CD1a<sup>+</sup>) (Schulke et al. 2009). Reife DC sind kaum nachgewiesen worden und im gesunden Peritoneum von Kontroll-Patientinnen waren weder reife noch unreife DC zu finden (Schulke et al. 2009). Im Mausmodell sind passend dazu unreife DC in ektopen Läsionen präsent, die eine hohe angiogene Aktivität aufweisen und im Gegensatz zu den reifen DC das Wachstum der Herde über die Steigerung der Angiogenese fördern (Fainaru et al. 2008). Darüber hinaus führte die Ablation von DC im Mausmodell zu reduzierter Größe der Läsionen, wodurch eine entscheidende Beteiligung dieser Zellgruppe an der Entwicklung der Endometriose naheliegt (Pencovich et al. 2014). Eine andere Arbeitsgruppe hingegen kam zu dem gegenteiligen Ergebnis und demonstrierte, dass die Depletion von DC zur Proliferation der Läsionen führte und schlussfolgerte, dass bei den Endometriose-Patientinnen über DC aktivierte T-Zellen entweder über die Synthese von Zytokinen und/oder direkte Zytotoxizität das Wachstum der Läsionen gehemmt wird (Stanic et al. 2014). Verglichen mit Kontroll-Patientinnen zeigte sich die Zahl an DC in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen reduziert (Tariverdian et al. 2009).

#### 2.6.4.4. T-Zellen

T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) gehören zu den Lymphozyten, werden im Knochenmark gebildet, wandern dann in den Thymus ein und reifen dort heran. Sie bilden gemeinsam mit den B-Lymphozyten einen entscheidenden Anteil innerhalb der erworbenen Immunität und erkennen Antigene, welche auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden. T-Zellen lassen sich in T-Helferzellen (T<sub>H0</sub>; CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) und in zytotoxische T-Zellen (T<sub>c</sub>; CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) einteilen. Die T<sub>H0</sub> wiederum sind in der Lage, sich zu T-Helfer-1-Zellen (T<sub>H1</sub>), T-Helfer-2-Zellen (T<sub>H2</sub>), T-Helfer-17-Zellen (T<sub>H17</sub>) und regulatorischen T-Zellen (T<sub>Reg</sub>) zu differenzieren (Tscharke et al. 2015; DuPage und Bluestone 2016).

Die  $T_H1$  (Typ-1-Immunantwort) sekretieren vor allem pro-inflammatorische Zytokine wie IL-2 und IFN- $\gamma$  und aktivieren neben Monozyten und Makrophagen auch  $T_c$  (Mosmann et al. 1986; DuPage und Bluestone 2016). Die  $T_c$  sind ebenfalls in der Lage Makrophagen zu aktivieren, allerdings eliminieren sie darüber hinaus virusinfizierte Zellen und wirken gegen Tumore (Tschärke et al. 2015).

Durch die Expression von pro-inflammatorischem IL-17 unterstützen auch  $T_H17$  Zellen die Typ-1-Immunantwort (Harrington et al. 2005). Die  $T_H2$  Zellen (Typ-2-Immunantwort) induzieren die Differenzierung von B-Zellen zu antikörperbildenden Plasmazellen, bilden Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 und wirken eher anti-inflammatorisch (Mosmann und Sad 1996). Einige Proteine wie *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) oder TNF- $\alpha$  werden durch beide T-Helfer-Subpopulationen synthetisiert (Mosmann und Sad 1996). Die  $T_{Reg}$  ( $CD4^+CD25^+$ ) regulieren unter anderem über IL-10 die inflammatorische Immunantwort und halten die antigenspezifische T-Zell-Toleranz aufrecht (Sakaguchi 2000). Eine weitere Subpopulation der T-Zellen bilden die Natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen;  $CD3^+CD56^+$ ). Sie wirken u.a. über die Produktion von IFN- $\gamma$  sowie IL-4, können somit sowohl auf die Typ-1- als auch die Typ-2-Immunreaktion Einfluss nehmen und verknüpfen demnach das angeborene und erworbene Immunsystem (Guo et al. 2012).

Schon lange wird vermutet, dass Veränderungen in den einzelnen T-Zell-Subpopulationen entscheidend in der Genese der Endometriose mitwirken. Vergleicht man die Ergebnisse bezüglich des Aufkommens der T-Zell-Populationen in den verschiedenen Kompartimenten der Patientinnen, so zeigen sich gegensätzliche Ergebnisse. Einige Arbeitsgruppen konnten eine Erhöhung, andere wiederum eine Erniedrigung oder auch gar keinen Unterschied im Vergleich zu Kontroll-Patientinnen feststellen und ein ebenso kontroverses Bild ergaben die Untersuchungen der T-Zell-Subpopulationen (Badawy et al. 1989; Gagne et al. 2003; Gallinelli et al. 2004; Mier-Cabrera et al. 2011).

Mills (Mills 2012) postulierte, dass die  $T_H1$  und M1 (Typ-1-Immunantwort) sowie  $T_H2$  und M2 (Typ-2-Immunantwort) häufig im Rahmen von Erkrankungen miteinander interagieren. Somit hemmen die von  $T_H1$  und  $T_H2$  synthetisierten Zytokine die Aktivität von M2 bzw. M1 (Mills 2012). Diese Verlinkung der beiden Immunzellpopulationen ist auch im Rahmen der Endometriose von Interesse, wobei bis heute Unklarheit über die genaue Beteiligung der einzelnen T-Zell-Populationen herrscht. Die Erhöhung der  $T_H1$  im Blut der Endometriose-Patientinnen lässt eher auf eine Typ-1-Immunreaktion schließen, wohingegen im ektopen Gewebe und der Peritonealflüssigkeit die  $T_H2$ -synthetisierten Zytokine und demnach die Typ-2-Immunreaktion dominieren sollen (OuYang et al. 2008; Mier-Cabrera et al. 2011; Takamura et al. 2015). Andere Studien zeigten im Gegensatz dazu neben der verringerten

oder ausbleibenden Produktion an  $T_H1$ -Zytokinen wie IL-2 auch eine gesteigerte Konzentration an  $T_H2$ -Zytokinen sowohl durch peritoneale als auch periphere Zellen und bei weiteren Untersuchungen blieb jeglicher Unterschied aus (Antsiferova et al. 2005; Andreoli et al. 2011). Entsprechend besteht noch kein Konsens darüber, ob unter der Endometriose die Typ-1- oder Typ-2-Immunantwort dominiert. Die Analyse, der im Rahmen der Endometriose vorherrschenden  $T_H1$ - und  $T_H2$ -abhängigen Zytokin-Profile, könnte demnach entscheidend zum Verständnis der Pathogenese beitragen.

Die Analysen der  $T_{Reg}$  in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen zeigten eine deutliche Erhöhung, wobei auch gegenteilige Daten erhoben wurden (Tariverdian et al. 2009; Olkowska-Truchanowicz et al. 2013). Durch ihre generellen Funktionen in der Unterdrückung einer Immunantwort, könnte diese Subpopulation auch im Rahmen der chronisch-entzündlichen Prozesse der Endometriose einen interessanten Aspekt bilden.

Scheerer et al. zeigten, dass speziell bei peritonealer sowie ovarieller Endometriose die  $T_c$  in größerer Anzahl und Größe, verglichen zu anderen Subgruppen immunkompetenter Zellen oder auch anderen Endometrioseformen, in den Endometriose-assoziierten Immunzellinfiltraten vorkommen (Scheerer et al. 2016). Allerdings zeigen die Untersuchungen von Blut und Peritonealflüssigkeit erkrankter Frauen neben erhöhten, auch unveränderte Zahlen an  $T_c$  (Zhang et al. 2006). Die Frequenz der  $T_c$  im Blut gesunder Frauen steigt in der lutealen Phase an und sinkt in der folliculären Phase ab, wobei solche phasenabhängigen Veränderungen bei Endometriose-Patientinnen nicht zu verzeichnen sind (Slabe et al. 2013). Außerdem ist die zytotoxische Aktivität autologen endometrialen Zellen gegenüber signifikant reduziert (Steele et al. 1984). *In vitro* konnte jedoch die Zugabe von IL-2 die Aktivität der T-Zellen gegenüber den endometrialen Zellen stimulieren (Melioli et al. 1993).

Bis heute wurde den NKT-Zellen im Kontext der Endometriose erst wenig Aufmerksamkeit gewidmet. Es gelang jedoch sowohl im Blut als auch der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen eine vergleichsweise geringe Frequenz an NKT-Zellen sowie IL-4 und IFN- $\gamma$  festzustellen, wobei die Frequenzen bzw. Konzentrationen aller drei Faktoren umgekehrt proportional mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierten (I>II>III>IV) (Guo et al. 2012). Es wird demnach spekuliert, dass NKT-Zellen möglicherweise in der Lage sind, das Fortschreiten der Endometriose einzudämmen (Guo et al. 2012; Lagana et al. 2016).

#### 2.6.4.5. B-Zellen

B-Lymphozyten sind CD20<sup>+</sup>, an der humoralen Immunantwort beteiligt, indem sie sich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren, wenn sie auf T-Zell-abhängige, an DC gebundene Antigene treffen und gehören zum adaptiven Immunsystem (Stashenko et al. 1980; LeBien und Tedder 2008).

Im Jahre 1980 wurde erstmalig die Erhöhung der B-Zell-Reaktivität in Endometriose-Patientinnen beschrieben (Startseva 1980). Fünf Jahre darauf gelang es mit indirekter Immunfluoreszenz anti-endometriale Antikörper im Serum von Endometriose-Patientinnen nachzuweisen (Wild und Shivers 1985). Zudem wurde eine erhöhte Konzentration im Vergleich zu den Sera von Kontroll-Patientinnen demonstriert und so liegt der Verdacht nah, dass B-Zellen die Entstehung der Endometriose über die Bildung von Autoantikörpern fördern (Fernandez-Shaw et al. 1993). Darüber hinaus ließ sich eine erhöhte Frequenz an B-Zellen in den Immuzellinfiltraten von Läsionen, dem Endometrium sowie in der Peritonealflüssigkeit (hier speziell der Subtyp B-1) und im Blut von Frauen mit Endometriose finden (Chishima et al. 2000; Antsiferova et al. 2005; Scheerer et al. 2016). Im Gegensatz dazu wurde allerdings auch schon ein geringeres Vorkommen der B-Zellen bei den Endometriose-Patientinnen gezeigt (Gagne et al. 2003). Darüber hinaus wurde im Blut und der Peritonealflüssigkeit sogar das Ausbleiben jeglicher Veränderungen der B-Zellen im Rahmen der Endometriose postuliert (Zhang et al. 2006). Dies verdeutlicht, dass noch kein Konsens bezüglich der Veränderungen der B-Zellen im Kontext der Endometriose besteht. Allerdings ergaben durchflusszytometrische Analysen von ektopem endometriotischen Gewebe, neben einer erhöhten Frequenz, eine erhöhte Aktivität der B-Zellen (Antsiferova et al. 2005).

Speziell die B-1-Zellen (CD20<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) treten vermehrt bei Endometriose-Patientinnen im peripheren Blut unter der Präsenz von antinukleären Antikörpern (ANA) auf, verglichen zu denen ohne ANA oder mit den gesunden Kontroll-Patientinnen (Chishima et al. 2000). Auch in der Peritonealflüssigkeit und den ektopen Läsionen wurde eine Erhöhung der über T<sub>H</sub>2-Zytokine aktivierten B-1-Zellen festgestellt, sodass sich über diese Komponenten die These einer Autoimmunkomponente in der Entwicklung der Endometriose stützen lässt (Chishima et al. 2000; Antsiferova et al. 2005). Zudem konnte eine Erhöhung von B-Zell-aktivierenden Zytokinen, wie z. B. der durch Makrophagen synthetisierte B-Lymphozytenstimulator, welcher die Entwicklung und Differenzierung von B- zu Plasmazellen stimuliert, im Serum der an Endometriose erkrankten Frauen festgestellt werden (Schiemann et al. 2001; Hever et al. 2007). Passend dazu findet sich eine hohe Anzahl an antikörpersynthetisierenden Plasmazellen in Endometriose-Läsionen (Hever et al. 2007). Auch im Rahmen von

Autoimmunkrankheiten wurde ein erhöhtes Vorkommen des B-Lymphozytenstimulators festgestellt und somit könnte das Zytokin einen geeigneten Angriffspunkt innerhalb therapeutischer Maßnahmen gegen Erkrankungen, welchen ein B-Zell-Defekt zugrunde liegt, darstellen (Krivosikova et al. 2009). Trotz der Gemeinsamkeiten ist es allerdings noch nicht möglich, Endometriose als Autoimmunkrankheit zu bezeichnen, da bis heute gewisse Kriterien wie beispielsweise genetische Komponenten nicht nachgewiesen wurden (Maxwell et al. 1989).

### 2.6.4.6. Natürliche Killerzellen

NK-Zellen sind CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> Lymphozyten und als Effektorzellen des angeborenen Immunsystems maßgeblich an der Immunantwort beteiligt, nehmen jedoch über zytotoxische Aktivität und die Bildung von Botenstoffen wie TNF- $\beta$  und IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-13 etc. Einfluss auf das erworbene Immunsystem (Cooper et al. 2001; Riccio et al. 2018). Ihre Einteilung erfolgt demnach in CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK-Zellen, welche hohe Mengen an Zytokinen synthetisieren und regulatorisch wirken (ca. 10 %) und in zytotoxische CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK-Zellen (ca. 90 %) (Lanier et al. 1986; Cooper et al. 2001).

Trotz unveränderter Anzahl an peripheren und peritonealen NK-Zellen bei den Endometriose-Patientinnen, steht eine verringerte zytotoxische Aktivität dieser Lymphozyten im Verdacht, für eine unzureichende Eliminierung der regurgitierten endometrialen Zellen verantwortlich zu sein (Oosterlynck et al. 1992; Ho et al. 1995; Jeung et al. 2016). Die Peritonealflüssigkeit von insbesondere an hochgradiger Endometriose erkrankten Patientinnen scheint über ein erhöhtes Vorkommen von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und über andere hemmende Stoffe die Zytotoxizität der NK-Zellen bei betroffenen Frauen deutlicher zu suprimieren als bei Gesunden (Oosterlynck et al. 1993; Kang et al. 2014). Der gleiche Effekt konnte in Bezug auf endometriale Zellen beobachtet werden, welche scheinbar durch eine antizytotoxische Wirkung auf die NK-Zellen und durch die Abgabe von ICAM-1 das Immunsystem umgehen (*Immunoescaping*) (Somigliana et al. 1996; Somigliana et al. 1996). Des Weiteren zeigte sich das endometriale Gewebe gegenüber der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen allgemein resistenter als das Gewebe von gesunden Frauen (Oosterlynck et al. 1991).

Zytokine wie beispielsweise IL-2 erhöhten *in vivo* die Aktivität (z. B. Zytotoxizität) der NK-Zellen gegenüber infizierten sowie malignen Zellen und so konnte schon im Mausmodell gezeigt werden, dass die intraperitoneale Injektion von IL-2-aktivierten NK-Zellen der

## Literatur

Formierung von Endometrioseherden entgegen wirkt (Robertson et al. 1992; Montenegro et al. 2015). Darüber hinaus synthetisieren NK-Zellen speziell unter hochgradiger Endometriose mehr TNF- $\alpha$  sowie IFN- $\gamma$  im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen und so scheint die Proliferation und Angiogenese der endometrialen Zellen maßgeblich von diesen Effektorzellen gefördert zu werden (Funamizu et al. 2014).

Physiologischerweise sind NK-Zellen durch die Eliminierung von Autoantigen-präsentierenden Zellen (z. B. DC) auch an der Autoimmunität beteiligt (Carbone et al. 1999). Im Kontext der Endometriose jedoch wirken sie durch die herabgesetzte zytotoxische Aktivität unfähig, DC, welche endometriale Autoantigene tragen, anzugreifen und so könnte dies einen Grund für die gesteigerte Autoimmunreaktivität im Kontext dieser Erkrankung darstellen (Matarese et al. 2003).

## 2.6.4.7. Veränderungen der Immunzellen: Übersicht

Im Folgenden wird eine Übersicht über das Vorkommen ausgewählter Immunzellpopulationen in verschiedenen Kompartimenten von Endometriose-Patientinnen gegeben (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Veränderungen einzelner Immunzellpopulationen in der Peritonealflüssigkeit (PF), peripherem Blut (PB), ektopen Endometrioseläsionen (EL) und eutopem endometrialen Gewebe (EU) von Endometriose-Patientinnen

Immunzellpopulation	Kompartiment	Veränderung	Literatur*
<b>Monozyten/ Makrophagen (CD14<sup>+</sup>)</b>	PF	↑	1
		↔	2, 3, 25
		↓	10 (EM Grad III und IV)
	PB	↔	2, 3, 4, 25
<b>Makrophagen</b>	PF	↑	5, 6, 28 (EM Grad I und II)
	EU	↑	7, 8 (in prol. Phase)
	EL	↑	2, 9, 30
<b>M1</b>	PF	↑	28 (EM Grad I und II)
		↔	2, 25
		↓	27
	PB	↔	2, 25
	EL	↑	26 (Progressive Verringerung von EM Grad I zu IV)
<b>M2</b>	PF	↑	2, 28 (EM Grad I und II)
		↔	6, 27
	PB	↔	2
	EU	↓	7
	EL	↑	2, 26 (Progressive Erhöhung von EM Grad I zu IV)
<b>DC</b>	PF	↑	28 (EM Grad I)
		↔	10 (Vergleich: K mit milder und schwerer EM)
	EU	↑	11 (Unreife DC, Lamina basalis, prol. Phase)
		↓	11 (Reife DC)
<b>NK</b>	PF	↔	3, 13, 20 (EM Grad III und IV)
		↓	28 (EM Grad I)
	PB	↔	3, 4, 13, 20 (EM Grad III und IV)
	EL	↓	22 (Vergleich: EL und prol. und sekr. EU von EM-Patientinnen)
<b>Zytotoxische NK-Zellen</b>	PF	↓	3, 19, 20 (EM Grad III und IV)
	PB	↓	3, 19

EM, Endometriose; K, Kontrollen; prol., proliferativ; sekr., sekretorisch; M1, Typ-1-Makrophagen; M2, Typ-2-Makrophagen; DC, Dendritische Zellen; NK, Natürliche Killerzellen. ↑: Erhöht; ↔: Kein Unterschied; ↓: Erniedrigt. EM Grad: *American Society for Reproductive Medicine Revised Classification of Endometriosis (rASRM) - Score*, \*Quellen siehe Tabelle 2.

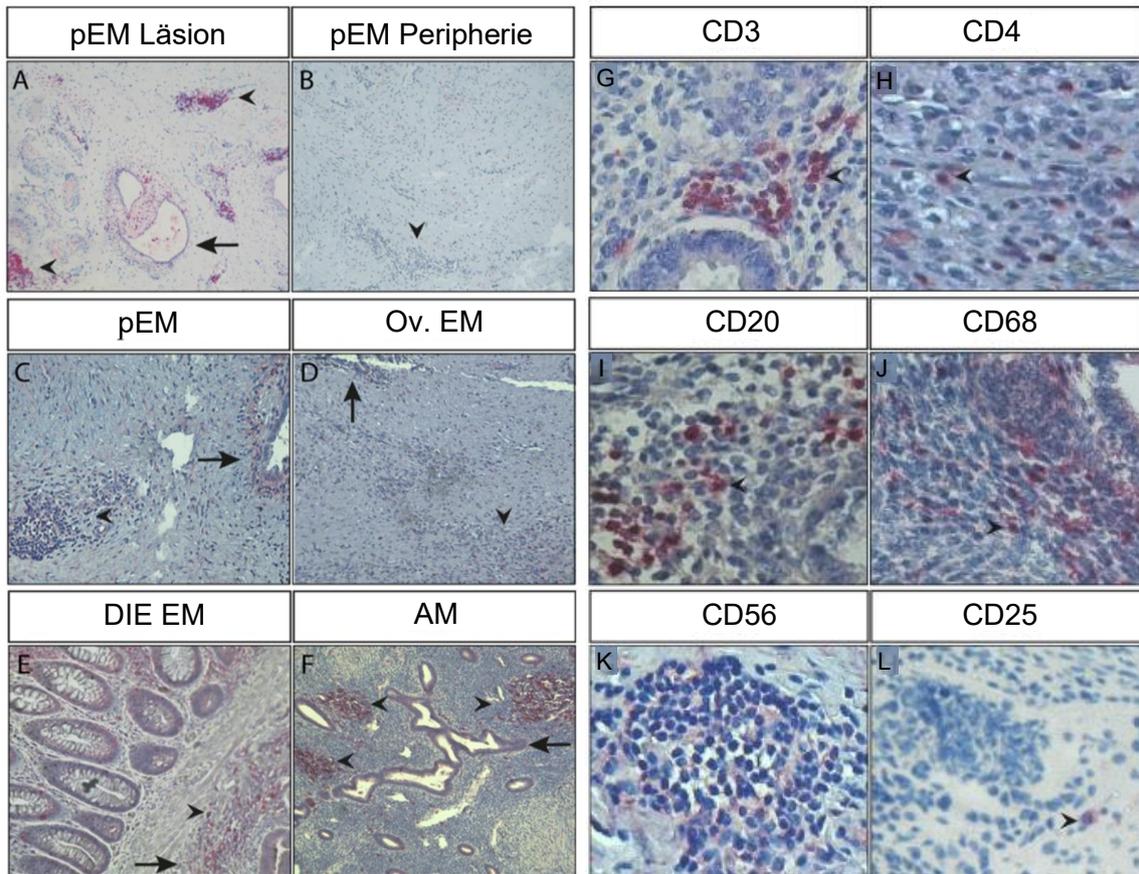
Fortsetzung von **Tabelle 1:**

<b>Immunzellpopulation</b>	<b>Kompartiment</b>	<b>Veränderung</b>	<b>Literatur*</b>
<b>T-Zellen</b>	PF	↑	12
		↔	3, 13
		↓	28 (EM Grad I und II)
	PB	↑	12
		↔	3, 13
	EL	↓	4
		↑	22 (Vergleich: EL und prol. und sekr. EU von EM-Patientinnen), 30
<b>T<sub>H</sub></b>	PF	↑	28
		↔	3, 13
		↓	23
	PB	↑	24 (TH1)
		↔	3,4,13, 24 (TH2 & TH17)
	EL	↑	22 (Vergleich: EL und prolif. und sekr. EU von EM-Patientinnen), 24 (TH17), 30
		↔	24 (TH2)
		↓	24 (TH1)
<b>T<sub>Reg</sub></b>	PF	↑	15, 21, 29 (Ovarielle EM, Grad III/IV)
		↔	14
		↓	10 (EM Grad I und II)
	PB	↑	15
		↔	14, 24
			↓
EU	↑	17 (in sekr. Phase), 18	
EL	↑	18	
		↔	24
<b>T<sub>c</sub></b>	PF	↑	28
		↔	3, 13
		↓	15, 23
	PB	↔	3, 4, 13
		↓	15
	EL	↑	22 (Vergleich: EL und prol. und sekr. EU von EM-Patientinnen), 30
<b>B-Zellen</b>	PF	↑	12
		↔	3, 13
		↓	28 (EM Grad I und II)
	PB	↑	12
		↔	3, 13, 16
			↓
EU	↑	16	
EL	↑	16, 30	

EM, Endometriose; prol., proliferativ; sekr., sekretorisch; TH, T-Helfer-Zellen; T<sub>Reg</sub>, Regulatorische T-Zellen; T<sub>c</sub>, Zytotoxische T-Zellen; NK, Natürliche Killerzellen. ↑: Erhöht; ↔: Kein Unterschied; ↓: Erniedrigt. EM Grad: American Society for Reproductive Medicine Revised Classification of Endometriosis (rASRM) - Score, \*Quellen siehe Tabelle 2.

**Tabelle 2:** Quellen zu Tabelle 1

1 (Gogacz et al. 2017)	11 (Schulke et al. 2009)	21 (Podgaec et al. 2012)
2 (Bacci et al. 2009)	12 (Badawy et al. 1989)	22 (Witz et al. 1994)
3 (Zhang et al. 2006)	13 (Mier-Cabrera et al. 2011)	23 (Gallinelli et al. 2004)
4 (Gagne et al. 2003)	14 (Gogacz et al. 2014)	24 (Takamura et al. 2015)
5 (Montagna et al. 2008)	15 (Iwasaki et al. 1993)	25 (Kusume et al. 2005)
6 (Itoh et al. 2013)	16 (Antsiferova et al. 2005)	26 (Lagana et al. 2019)
7 (Takebayashi et al. 2015)	17 (Beric et al. 2010)	27 (Nie et al. 2018)
8 (Beric et al. 2009)	18 (Barbosa et al. 2012)	28 (Guo et al. 2020)
9 (Tran et al. 2009)	19 (Oosterlynck et al. 1992)	29 (Olkowska-Truchanowicz et al. 2013)
10 (Tariverdian et al. 2009)	20 (Ho et al. 1995)	30 (Scheerer et al. 2016)



**Abbildung 1: Endometriose-assoziierte Immuneinfiltrate (EMaZI) in Läsionen verschiedener Endometriose-Typen (Immunhistochemie, IHC)** (Übernommen von, übersetzt und modifiziert nach Scheerer et al. 2016). **A.** Ansicht einer Endometriose-Läsion mit EMaZI lokalisiert im Peritoneum (IHC) (x10), **B.** Ansicht des Peritoneums in der Peripherie einer Endometriose-Läsion (IHC) (x10), **C.** EMaZI unmittelbar lokalisiert im umliegenden Gewebe peritonealer Endometriose (IHC) (x20), **D.** EMaZI unmittelbar lokalisiert im umliegenden Gewebe ovarieller Endometriose (IHC) (x20), **E.** EMaZI unmittelbar lokalisiert im umliegenden Gewebe rektovaginaler Endometriose (IHC) (x20) und **F.** EMaZI lokalisiert im umliegenden Gewebe einer Adenomyose (IHC) (x10). **G. – L.** Immunhistochemische Färbungen von Immuneinfiltraten in peritonealen Endometriose-Läsionen. Die Rotfärbung zeigt verschiedene T-Lymphozyten (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>), B-Lymphozyten (CD20<sup>+</sup>) und Makrophagen (CD68<sup>+</sup>), welche sich als Immuneinfiltrate in großen Clustern in peritonealer Endometriose zeigen. **G.** CD3<sup>+</sup>, **H.** CD 4<sup>+</sup>, **I.** CD20<sup>+</sup>, **J.** CD68<sup>+</sup>, **K.** CD56<sup>+</sup> und **L.** CD25<sup>+</sup>. Pfeile: Endometrioseläsionen. Pfeilspitzen: EMaZI. EM, Endometriose; pEM, peritoneale Endometriose; AM, Adenomyose; Ov., Ovarielle; DIE, Tief infiltrierende Endometriose; CD, *Cluster of differentiation*.

Trotz diverser Theorien sind sowohl die Grundlagen der Pathogenese als auch die der Schmerzentstehung weitestgehend ungeklärt. Viele Aspekte der Entstehung, Etablierung und des variablen Verlaufs der Endometriose konnten bereits erkannt, beobachtet und beschrieben werden, jedoch bleibt bis heute ungeklärt, ob sie sich als Ursache, Auslöser oder Folge in das Gesamtgeschehen einfügen. Das fehlende Verständnis der Pathomechanismen stellt ein erhebliches klinisches Problem dar und macht kausale Therapieansätze zurzeit noch unmöglich. Darüber hinaus besteht Unkenntnis über valide Biomarker, wodurch eine definitive Diagnosestellung nur durch einen laparoskopischen Eingriff möglich ist.

## 2.7. Peritonealflüssigkeit

Die Peritonealflüssigkeit wird auch Douglasflüssigkeit genannt, da sie sich in der *Excavatio rectouterina*, dem sogenannten Douglasraum der Frau, sammelt. Eine taschenförmige Aussackung des Peritoneums bildet die *Excavatio rectouterina*, welche den tiefsten Punkt der weiblichen Peritonealhöhle bildet und durch die Uterusrück- und Rektumvorderwand begrenzt ist (Kirsch 2020). Das Peritoneum ist mit circa 2 m<sup>2</sup> die größte seröse Membran der Körpers und wird aus der *Tunica serosa* (Mesothelschicht mit *Lamina basalis* und *Lamina propria*) und der *Tela subserosa* (enthält Bindegewebe, elastische und kollagene Fasern sowie Fettzellen) gebildet (Schiebler 2005). Über das Mesothel findet zum einen ein Austausch von Flüssigkeiten und Elektrolyten statt, zum anderen können Immunzellen in die Peritonealhöhle gelangen (Schiebler 2005).

Die Peritonealflüssigkeit umspült die Bauchorgane und somit auch Beckenorgane wie Ovarien und Eileiter und verhindert so Reibung zwischen den Organen und dem Peritoneum (Oral et al. 1996; Young et al. 2013). Die unter physiologischen Bedingungen seröse strohfarbene Peritonealflüssigkeit wird vorrangig durch Exsudation der Ovarien und aus Plasmatranssudat gebildet und enthält zudem phasenweise Produkte der retrograden Menstruation (Koninckx et al. 1980; Oral et al. 1996). Ihr Volumen kann zyklusabhängig variieren und es lassen sich individuell von Frau zu Frau Schwankungen von 5 ml bis über 200 ml verzeichnen (Koninckx et al. 1980; Koninckx et al. 1998). Ob unter präsenster Endometriose eine leichte Erhöhung des Flüssigkeitsvolumens die Regel ist oder die Volumina mit denen von gesunden Patientinnen vergleichbar sind, ist noch umstritten (Drake et al. 1980; Koninckx et al. 1980; Chryssicopoulos et al. 1991). Außerdem beeinflusst die Zirkulation der Peritonealflüssigkeit maßgeblich die Verteilung der Endometrioseläsionen (Bricou et al. 2008). Bei Endometriose-Patientinnen induziert die Peritonealflüssigkeit die Proliferation von Stromazellen *in vitro* (Surrey und Halme 1991) und zeigt darüber hinaus eine erhöhte Expression von Interleukinen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Giudice et al. 1994; Bedaiwy et al. 2002; Fan et al. 2018). Auch die Frequenz an Immunzellen wie Makrophagen, T- sowie NK-Zellen und deren Subpopulationen sowie deren Aktivitätsstatus sollen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen verändert sein (siehe Tabelle 1). Somit stellt sie ein optimales Medium dar, um die immunologischen Veränderungen und Prozesse, die möglicherweise der Endometriose zugrunde liegen, zu untersuchen bzw. nachzuweisen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materialübersicht

##### 3.1.1. Auflistung der Geräte

**Tabelle 3:** Geräte

Geräte	Hersteller
Bio-Plex® 200 system (Analysator)	Bio-Rad Laboratories, Incorporated, Hercules, USA
Biofuge primo R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Deckgläschen 24 x 40, Menzel-Gläser	Fisher Scientific, Hampton, USA
ELISA-READER Thermo Scientific Multiskan FC	Unity Lab Services part of Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FACS Canto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Gefrierschrank Ultra low, -80 °C	Sanyo, Osaka, Japan
Gefrierschrank, -20 °C	Liebherr, Bulle FR, Schweiz
Hand-Held Magnetic Plate Washer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IKA™ MTS 2/4 digitaler Schüttler für Mikrotiterplatten	Fisher Scientific, Hampton, USA
Kryoboxen weiße Pappe 136x136x50	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kühlschrank, 4 °C	Liebherr, Bulle FR, Schweiz
Mikroskop Axiovert 40c	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Multifuge 1 s-r	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Multikanalpipetten (100 µl/300 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Henneberg-Sander GmbH, Giessen-Lützellinden, Deutschland
Research Pipetten (2,5 µl/10 µl/100 µl/200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexgerät (Vortex Genie 2)	Scientific Industries, Bohemia, USA

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4:** Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Cellstar® conical tubes (50 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Falcon® conical tubes (15 ml)	Corning Incorporated, New York, USA
Flat-Bottom-Plate (96-well)	Bio-Rad Laboratories, Incorporated, Hercules, USA
Nitril-Handschuhe (puderfrei), Nitra-Touch™	Ansell, Richmond, Australien
Pasteur Pipetten, Plastik, 3 ml/5 ml	RatioLab, Dreieich, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen gestopft 100 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen gestopft 2,5/10/200 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße Eppendorf Röhrchen (1,5 ml/2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rundbodenröhrchen (5 ml)	Corning Incorporated, New York, USA

3.1.3. Reagenzien und Chemikalien

**Tabelle 5:** Reagenzien, Chemikalien und Assays

<b>Reagenzien, Chemikalien und Assays</b>	<b>Hersteller</b>
Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay- LOT 64104297	Bio-Rad Laboratories, Incorporated, Hercules, USA
Neopterin ELISA Kit- LOT ENO225	IBL International, Hamburg, Deutschland
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Bovines Serum Albumin 0,5 %	Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, USA
DAPI Solution	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Dulbecco's PBS 1x without Calcium plus Magnesium	Fisher Scientific, Hampton, USA
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Red Blood Cell Lysis Buffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
SYTOX™ Green Ready™ Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypan Blau, 0,5 %	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
UltraComp eBeads, Compensation Beads	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.4. Ausgewählte CD-Antigene: Zelluläre Expression und Funktion

Im Folgenden wird eine Übersicht über die CD-Antigene gegeben, welche in der Studie genutzt wurden, um ausgewählte Immunzellen zu charakterisieren (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Antigene und deren zelluläre Expression sowie Funktion

CD-Antigen	Zelluläre Expression	Funktion des Proteins
<b>CD3</b>	T-Zellen	Mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert, Signaltransduktion (Weiss und Littman 1994)
<b>CD4</b>	T-Helferzellen	T-Zell-Korezeptor, bindet an MHC II, Signaltransduktion (Weiss und Littman 1994)
<b>CD11c</b>	u.a. präsent auf dendritischen Zellen und Monozyten/Makrophagen	Komplementrezeptor (Schütt und Bröker 2009)
<b>CD16</b>	u.a. präsent auf Monozyten und Natürlichen Killerzellen	FcγRIII bindet an opsonierte Zielzellen, Signaltransduktion, involviert in zelluläre Zytotoxizität (Mandelboim et al. 1999)
<b>CD20</b>	B-Zellen	Regulierung der B-Zell-Aktivierung und Proliferation (Tedder und Engel 1994)
<b>CD45</b>	Leukozyten	Wird als Tyrosinphosphatase zur Aktivierung & Regulierung von T- und B-Zellen benötigt (Weiss und Littman 1994)
<b>CD56</b>	Natürliche Killerzellen	<i>Neural adhesion molecule</i> ; Adhäsion, Marker für (zytotoxische) Aktivität (Van Acker et al. 2017)
<b>CD14</b>	Monozyten/Makrophagen	Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS Aktivierung), Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen, Expression von Zytokinen in Monozyten (Thomas et al. 2002)
<b>CD80 und CD86</b>	Antigenpräsentierende Zellen, v.a. klassisch aktivierte Makrophagen (M1)	Ko-Stimulation, Induktion und Regulation der Immunantwort über die Aktivierung von T-Zellen (Lanier et al. 1995)
<b>CD163</b>	Monozytäre Zellen, v.a. alternativ aktivierte Makrophagen (M2)	<i>Haemoglobin scavenger receptor</i> ; Marker für alternative Aktivierung der Makrophagen. Steht im Verdacht an der Regulation der Funktion von Monozyten und Makrophagen beteiligt zu sein (Buechler et al. 2000).
<b>CD206</b>	v.a. alternativ aktivierte Makrophagen (M2)	<i>Macrophage Mannose Receptor</i> (MMR), Antigenpräsentation, Zellmigration, intrazelluläre Signaltransduktion, Phagozytose (Stein et al. 1992; Bouhrel et al. 2007)
<b>HMM</b>	Reife Makrophagen	Unterscheidung Monozyten von Makrophagen (Pilling et al. 2009)
<b>HLA-DR</b> ( <i>Human leukocyte antigen class II</i> )	Monozyten/Makrophagen, B-Zellen, dendritische Zellen, aktivierte T-Zellen	Aktivierung von CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten (Fleury et al. 1995)

3.1.5. Software

**Tabelle 7:** Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
EndNote X8	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
Skant Software 3.0 (Research Edition for Multiskan FC)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FACSDiva 6.1.3	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
FlowJo V10 Windows	Tree Star, Ashland, USA
Bio-Plex Software 6.1	Bio-Rad Laboratories, Incorporated, Hercules, USA
SAP R3	SAP SE, Walldorf, Deutschland
SPSS Version 25	IBM Corporation, Armonk, USA
Microsoft Office 2011, Version 14.0	Microsoft Corporation, Redmond, USA

### 3.2. Auswahl und Charakterisierung des Patientinnenkollektivs

Zur Charakterisierung der Immunzellen und inflammatorischen Zytokine in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen wurden Frauen im reproduktiven Alter (prämenopausal) mit und ohne Endometriose ausgewählt. Die Auswahl der Patientinnen erfolgte anhand des klinischen Befundes intraoperativ, welcher anschließend histologisch gesichert wurde. Alle laparoskopisch assistierten Eingriffe wurden in der Charité Campus Benjamin Franklin, in der Charité Campus Virchow-Klinikum und im Vivantes Auguste-Viktoria-Klinikum in Berlin durchgeführt. Das Ethik-Komitee der Charité-Universitätsmedizin Berlin stimmte der Durchführung dieser Studie durch das Ethikvotum (EA4/036/12) zu und die Patientinnen erklärten sich nach ausführlicher Aufklärung durch ihre Unterschrift zur Teilnahme an dieser Studie bereit.

Das Patientinnenkollektiv wurde in zwei Gruppen aufgeteilt (Endometriose-Gruppe und Kontroll-Gruppe).

#### 3.2.1. Endometriose-Patientinnen

Die Patientinnen (n = 50) wurden aufgrund von Symptomen wie Dysmenorrhoe, zyklischen Unterbauchschmerzen oder anderen gynäkologischen Beschwerden laparoskopiert. Patientinnen mit akuten Peritonitiden oder anderen als endometriosebedingten chronischen Entzündungen, malignen Tumoren und bakteriellen Infektionen wurden von der Studie ausgeschlossen. Zudem wurden sieben Proben im Verlauf der Studie verworfen. Gründe hierfür waren Zustand nach Hysterektomie, Zustand nach Endometriose, ohne sichtbare peritoneale Läsionen oder die Kontamination der Peritonealflüssigkeit durch frisches Blut nach Schnitt. Die tatsächlich analysierte Kohorte wurde demnach aus 43 Patientinnen gebildet. Das Alter der Frauen betrug im Median 30,65 (18 – 44) Jahre. Der Grad der Endometriose wurde während der Operation anhand des ASRM-Scores erhoben (rASRM I, II, III, IV) (ASRM 1997). Abhängig vom Schweregrad der Endometriose erfolgte die Gruppierung von 22 (51,16 %) Patientinnen mit "milder Endometriose" (rASRM I und II) und 21 (48,84 %) Patientinnen mit "schwerer Endometriose" (rASRM III und IV). Die Patientinnen hatten einen regulären Menstruationszyklus und befanden sich bis auf drei Patientinnen, welche orale Kontrazeptiva einnahmen und eine Patientin, welche Progesteron-Zäpfchen nutzte, mindestens drei Monate vor der Operation nicht unter Einnahme von Steroidhormonen. Vier Patientinnen machten keine Angaben zu Hormoneinnahmen. Zum Zeitpunkt der Operation befanden sich 14 Patientinnen in der proliferativen Phase, 17 Patientinnen in der sekretorischen Phase und bei neun Patientinnen liegen keine Angaben

vor. Angaben zu den klinischen Symptomen und die Charakterisierung der einzelnen Kohorten finden sich in Tabelle 8 bzw. Tabelle 9.

**Tabelle 8:** Symptome der Endometriose-Patientinnen

	Endometriose														
	Dysmenorrhoe			Dyschezie			Dysurie			Dyspareunie			Unterbauchschmerzen		
	Ja	Nein	k.A.	Ja	Nein	k.A.	Ja	Nein	k.A.	Ja	Nein	k.A.	Ja	Nein	k.A.
<b>FACS P1</b>	16	1	0	7	10	0	2	15	0	8	6	3	15	1	1
<b>FACS P2</b>	15	1	0	6	10	0	1	15	0	8	6	2	14	1	1
<b>LUMINEX</b>	35	6	1	16	21	5	8	29	5	22	13	6	37	4	1
<b>ELISA</b>	20	1	0	10	9	2	6	13	2	13	4	4	21	0	0

FACS, *Fluorescence-activated cell sorting*; ELISA, *Enzyme-linked immunosorbent assay*, P1, Panel 1; P2, Panel 2; k.A., keine Angaben

### 3.2.2. Kontroll-Patientinnen

Die Kontroll-Patientinnen (n = 16) wurden aufgrund eines *Uterus myomatosus* (6), nicht Endometriose-assoziiertes Zysten (z. B. Dermoidzysten) (5), der Kombination eines *Uterus myomatosus* und eines Teratoms (1), Hydrosalpingiose (1), peritonealisierten Weichgewebes (1), unklarer Unterbauchschmerzen (1= Zustand nach Appendizitis; Netzadhäsionen) oder eines unerfüllten Kinderwunsches (1) laparoskopiert. Eine Endometriose sowie akute Peritonitiden oder chronische Entzündungen, maligne Tumoren und bakterielle Infektionen wurden anhand des klinischen und des histologischen Befundes ausgeschlossen. Das Alter der Frauen betrug im Median 36,13 (21 – 44) Jahre. In Bezug auf das Alter gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll- und Endometriose-Patientinnen (Mann-Whitney-U-Test:  $p = 0,052$ ). Die Kontroll-Patientinnen hatten einen regulären Menstruationszyklus und befanden sich bis auf zwei Patientinnen, welche orale Kontrazeptiva einnahmen und eine, welche mindestens sieben Wochen vor der Operation die oralen Kontrazeptiva absetzte, mindestens drei Monate vor der Operation nicht unter

## Material und Methoden

Einnahme von Steroidhormonen. Sechs Patientinnen machten keine Angaben zu Hormoneinnahmen. Zum Zeitpunkt der Operation befanden sich vier Patientinnen in der proliferativen Phase, zwei in der sekretorischen Phase und bei acht liegen keine Angaben vor. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Kohorten finden sich in Tabelle 9.

3.2.3. Charakterisierung der einzelnen Kohorten

**Tabelle 9:** Charakterisierung der Patientinnenkollektive

	Endometriose													Kontrollen								
	Total	Alter#	rASRM				Hormone			Zyklusphase				Total	Alter#	Hormone			Zyklusphase			
			I mild	II	III schwer	IV	Ja	Nein	k.A.	pro	sek	OC	k.A.			Ja	Nein	k.A.	pro	sek	OC	k.A.
<b>FACS P1</b>	17	30,8 (18,6-42,1)	6	4	4	3	2	14	1	4	9	2	2	10	33,9 (21,1-43,8)	1	6	3	4	1	1	4
<b>FACS P2</b>	16	31,0 (18,6-42,1)	5	4	4	3	2	13	1	4	8	2	2	10	35,0 (24,2-43,8)	1	5	4	3	1	1	5
<b>LUMINEX</b>	42	31,2 (18,1-43,6)	11	11	8	12	3*	35	4	14	17	2	9	12	34,7 (21,1-44,4)	1	6	5	2	3	1	6
<b>ELISA</b>	21	29,8 (18,1-42,1)	3	7	3	8	2**	16	3	6	10	1	4	11	34,5 (21,1-44,4)	0	7	4	3	3	0	5

rASRM, American Society for Reproductive Medicine Revised Classification of Endometriosis – Score; k.A., keine Angaben; pro, proliferativ; sek, sekretorisch; OC, orale Contraceptiva. #Mittelwert ± Standardabweichung und Spanne. \*1 Patientin im Juni 2017 OC abgesetzt und am 23.8.2017 OP, 1 Patientin OC und eine Patientin Progesteron-Zäpfchen. \*\*1 Patientin OC und 1 Patientin Progesteron-Zäpfchen

### 3.3. Methodik

#### 3.3.1. Gewinnung und Aufbereitung der Peritonealflüssigkeit

Zu Beginn der Operation wurde den Patientinnen mit klinischer Endometriose und endometriosefreien Patientinnen (Kontroll-Patientinnen) zunächst die gesamte pure Peritonealflüssigkeit entnommen. Daraufhin wurde mit 20 ml Natrium-Chlorid (NaCl) der Bauchraum gespült, um im Anschluss die Peritoneallavage mit zwei 10 ml Spritzen aufzunehmen. Anschließend wurden die pure Peritonealflüssigkeit und die Nachspülung umgehend bei 400 g, 10 Minuten und 20 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand der puren Peritonealflüssigkeit wurde sofort in Eppendorf Röhrchen aliquotiert (je 500 µl) und bei -80 °C in Kryoboxen in den Gefrierschrank eingelagert, um diesen im Verlauf für LUMINEX- und ELISA-Analysen zu verwenden. Der Überstand der Nachspülung wurde verworfen.

#### 3.3.2. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung einzelner Zellen. Die Markierung der Zellen über die spezifische Bindung von intra- bzw. extrazellulären Molekülen der Zellen durch antikörpergekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome), ermöglicht eine Differenzierung der einzelnen Zelltypen und deren Subpopulationen. Die Zellen werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom linear angeordnet und passieren einen Laserstrahl einer spezifischen Wellenlänge. Das auf die Zellen treffende Licht wird reflektiert und gestreut. Zudem emittieren die antikörpergekoppelten Fluorochrome das Licht mit einer spezifischen Wellenlänge. Diese Emission wird von Detektoren erfasst. Es ist also möglich, neben Fluorochromen auch über das Vorwärtsstreulicht bzw. *Forward scatter* (FSC) die Größe und über das Seitwärtsstreulicht bzw. *Sideward scatter* (SSC) die Granularität der Zellen zu detektieren (Luttmann et al. 2014).

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer Canto II (BD Biosciences) verfügt über drei Anregungslaser mit den Wellenlängen 405 nm (violett), 488 nm (blau) und 633 nm (rot) und ist in der Lage acht Fluoreszenzkanäle zeitgleich zu messen. Es wurden insgesamt 14 monoklonale Antikörper in zwei Panels eingesetzt (siehe Tabelle 10). Die Ergebnisse werden in der Frequenz und der mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) ausgegeben.

**Tabelle 10:** Verwendete monoklonale anti-humane Antikörper

<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Klon</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>CD3<sup>#</sup></b>	APC-eFlour <sup>®</sup> 780	SK7	eBioscience, San Diego, USA	1:200 ( <b>0,5 µl</b> )
<b>CD4<sup>#</sup></b>	BV510	SK3	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	1:20 ( <b>5 µl</b> )
<b>CD11c<sup>#</sup></b>	PB <sup>™</sup>	3.9	BioLegend <sup>®</sup> , San Diego, USA	1:50 ( <b>2 µl</b> )
<b>CD16<sup>#</sup></b>	PE-Cy <sup>™</sup> 7	3G8	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	1:200 ( <b>0,5 µl</b> )
<b>CD20<sup>#</sup></b>	Per-CP	2H7	Abcam, Cambridge, GB	1:100 ( <b>1 µl</b> )
<b>CD45<sup>#</sup></b>	APC	MEM-28	Abcam, Cambridge, GB	1:200 ( <b>0,5 µl</b> )
<b>CD56<sup>*</sup></b>	PE	REA196	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DEU	1:50 ( <b>2 µl</b> )
<b>CD14<sup>#</sup></b>	APC-Cy7	M5E2	BioLegend <sup>®</sup> , San Diego, USA	1:100 ( <b>1 µl</b> )
<b>CD80<sup>#</sup></b>	FITC	2D10.4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	1:10 ( <b>10 µl</b> )
<b>CD86<sup>#</sup></b>	PE-Cy7	IT2.2	eBioscience, San Diego, USA	1:100 ( <b>1 µl</b> )
<b>CD163<sup>#</sup></b>	PE	GHI/61	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	1:10 ( <b>10 µl</b> )
<b>CD206<sup>#</sup></b>	eFlour <sup>®</sup> 450	19.2	eBioscience, San Diego, USA	1:50 ( <b>2 µl</b> )
<b>HLA-DR<sup>#</sup></b>	PerCP-Cy5.5	LN3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	1:100 ( <b>1 µl</b> )
<b>HMM<sup>#</sup></b>	eFlour <sup>™</sup> 660	eBio25F9	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	1:20 ( <b>5 µl</b> )

CD, Cluster of differentiation; HLA-DR, Human Leukocyte Antigen-DR isotype; HMM, Human mature macrophages; <sup>#</sup>In Maus hergestellter Antikörper; <sup>\*</sup>Rekombinanter Antikörper (Humane Zelllinie).

## Material und Methoden

Mit Hilfe des Panel 1 (gemischtes Panel) wurden die Lymphozyten (CD45<sup>+</sup>) und die jeweiligen Subpopulationen sowie Monozyten/Makrophagen (CD16<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) analysiert. Es wurden T-Zellen (CD3<sup>+</sup>), B-Zellen (CD20<sup>+</sup>), DC (CD11c<sup>+</sup>), sowie NK-Zellen (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) bestimmt. Eine genaue Spezifizierung der NK-Subpopulationen erfolgte über die Klassifizierung von CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> (zytokinproduzierende und regulatorische NK-Zellen) und CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (zytotoxische NK-Zellen). Desweiteren erfolgte eine genaue Differenzierung der T-Zellen, T<sub>H</sub>-Zellen/T<sub>Reg</sub> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), T<sub>C</sub> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>) und NKT-Zellen (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). Da sich die Expression von CD4 und CD8 bei ausdifferenzierten T<sub>H</sub>/T<sub>Reg</sub>- bzw. T<sub>C</sub>-Populationen gegenseitig ausschließt, war eine Identifikation der T<sub>C</sub> mittels CD8 nicht nötig.

Das Panel 2 (Monozyten/Makrophagen-Panel) ermöglichte über CD14 die Identifikation der Monozyten und Makrophagen. Außerdem erfolgte die Differenzierung einzelner Aktivierungsmarker auf der Monozyten- und Makrophagenpopulation.

Die Expression von CD80 und CD86 spiegelte dabei die Typ-1-Aktivität bzw. CD163 und CD206 die Typ-2-Aktivität wider. Darüber hinaus gab HLA-DR Aufschluss über den allgemeinen Aktivierungsstatus (z. B. Antigenpräsentation). Über HMM wurden reife Makrophagen detektiert.

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit fluoreszenzgekoppelter Antikörper wurde das spektrale Emissionsverhalten von *4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid* (DAPI) ausgenutzt, um diesen Farbstoff nicht in seinem typischen Kanal bei einer Wellenlänge von 405 nm zu messen, sondern bei 510 nm. DAPI-positive Zellen wurden zu Beginn der Analysestrategie ausgeschlossen und konnten somit keine falsch-positiven CD206 Signale erzeugen.

Alle Oberflächenmarker waren jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert und wurden unter individuellen Einstellungen gemessen (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Verwendete Fluorochrome, Anregungswellenlängen und Filter

<b>Fluorochrom</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Emission (Maximum)</b>	<b>Verwendete Anregungswellenlänge</b>	<b>Filter</b>
<b>Allophycocyanin</b>	APC	660 nm	633 nm	660/20
<b>eFluor™ 660</b>	eFluor™ 660	668 nm	633 nm	660/20
<b>Allophycocyanin-Cy7</b>	APC-Cy7	775 nm	633 nm	780/60
<b>Allophycocyanin-eFluor® 780</b>	APC-eFluor® 780	780 nm	633 nm	780/60
<b>Brilliant Violet 510</b>	BV510	510 nm	405 nm	510/50
<b>eFluor® 450</b>	eFluor® 450	445 nm	405 nm	450/50
<b>Fluoresceinisothiocyanat</b>	FITC	520 nm	488 nm	530/30
<b>PacificBlue™</b>	PB™	455 nm	405 nm	450/50
<b>CD56/CD163-Phycoerythrin</b>	PE	578 nm	488 nm	585/42
<b>CD16-Phycoerythrin-Cy7</b>	PE-Cy7	785 nm	488 nm	780/60
<b>CD86-Phycoerythrin-Cy7</b>	PE-Cy7	775 nm	488 nm	780/60
<b>Peridinin-Chlorophyll-Protein</b>	PerCP	675 nm	488 nm	670LP
<b>Peridinin-Chlorophyll-Protein-Cy5.5</b>	PerCP-Cy5.5	695 nm	488 nm	670LP
<b>DAPI</b>	-	461 nm	510 nm	510/50
<b>SYTOXGreen</b>	-	523 nm	488 nm	530/30

### 3.3.2.1. Extrazelluläre FACS-Markierung

Die Immunzellen in der Peritonealflüssigkeit von 17 Endometriose-Patientinnen und 10 Kontroll-Patientinnen bzw. 16 Endometriose-Patientinnen und 10 Kontroll-Patientinnen wurden mit dem Panel 1 bzw. dem Panel 2 analysiert.

#### **Mehrfachmarkierungen**

Nachdem der Überstand der reinen Peritonealflüssigkeit eingelagert und der Überstand der Nachspülung verworfen war, wurden die Pellets je in 5 ml phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS, Fisher Scientific) resuspendiert und anschließend, getrennt voneinander, auf je 3 ml Biocoll (Biochrom GmbH) in 15 ml Falcon Tubes (Corning Incorporated) geschichtet. Es folgte ein 25-minütiger Zentrifugationsschritt bei 1200 g, 20 °C und ohne Bremse (um eine Verwirbelung der entstehenden Interphasen zu verhindern). Daraufhin wurden die entstandenen Interphasen sowohl der reinen Peritonealflüssigkeit als auch der Nachspülung in ein 15 ml Tube gepoolt, in 15 ml phosphatgepufferte Salzlösung plus 2 % bovines Serumalbumin (*phosphate buffered saline* plus bovines Serumalbumin, PBSbsa, Sigma Aldrich Corporation) gelöst, 30 s auf dem Rüttler geschüttelt (gevortext) und erneut 7 Minuten, bei 400 g und 4 °C zentrifugiert, um das zytotoxische Biocoll auszuwaschen. Der so entstandene Überstand wurde abpipettiert, das Zellpellet in 10 ml PBSbsa aufgenommen und durch 30 s vortexen gelöst.

Ein zweiter Waschschrift bei den gleichen Einstellungen folgte (7 Minuten, 400 g und 4 °C). Der entstandene Überstand wurde erneut abpipettiert und das Pellet durch kurzes Vortexen (5 s) gelockert. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl Erythrozyten-Lyse-Lösung (Roche Diagnostics GmbH) aufgenommen, 5 s gevortext, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und in dieser Zeit dreimal invertiert. Anschließend wurde die Probe erneut zentrifugiert (500 g, 5 Minuten und 4 °C).

Im weiteren Verlauf wurde erneut der Überstand abpipettiert und das Pellet in 2 ml PBSbsa resuspendiert, um anschließend die Zellzahl zu bestimmen. Hierzu wurden zunächst 20 µl der Zellsuspension in 20 µl Trypanblau (Biochrom GmbH) aufgenommen. 10 µl der Probe wurden in eine klassische Neubauer-Zählkammer (Henneberg-Sander GmbH) pipettiert und je zwei diagonal zueinander positionierte Eckquadrate mit je 16 Kleinquadraten am Lichtmikroskop ausgezählt. Das Trypanblau durchdringt ausschließlich die defekte Zellmembran toter Zellen und so wurden nur die lebenden Zellen ausgezählt. Die

Zellsuspension wurde erneut bei 400 g, 7 Minuten und 4 °C herunterzentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurden die Zellen in 20 µl FcR-Blocking Solution (Miltenyi Biotec) resuspendiert und danach 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Vorbereitung der Mehrfarben-Markierungen wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen in PBSbsa mit den entsprechenden in Tabelle 10 dargestellten Antikörper-Konzentrationen in einem finalen Volumen von 100 µl resuspendiert (Panel 1: CD3, CD4, CD11c, CD16, CD20, CD45, CD56 und Panel 2: CD14, CD80, CD86, CD163, CD206, HLA-DR, HMM).

Anschließend folgte eine Inkubation von 25 Minuten auf Eis (Makrophagen-Panel) sowie 10 Minuten im Kühlschrank bei 4 °C (gemischtes Panel). Im Anschluss erfolgte die Lösung der Suspension in 900 µl PBSbsa, Vortexen (30 s) und anschließendes Zentrifugieren bei 400 g, 7 Minuten und 4 °C. Erneut wurde der Überstand abpipettiert und die Zellen in 200 µl PBSbsa aufgenommen. Für Panel 1 wurden der Suspension 1 µl DAPI (BD Biosciences) und für Panel 2 ein Tropfen SYTOXGreen (SYTOX, Thermo Fisher Scientific) zugesetzt, um die toten Zellen zu markieren und anschließend zu vortexen (10 s). DAPI-markierte Proben wurden sofort und SYTOX-markierte Proben nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Durchflusszytometer Canto II (BD Biosciences) analysiert.

### ***Kompensation***

Um Überlagerungen der emittierten Strahlungen und somit falsch-positiv detektierte Zellen auszuschließen, wurden die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe gegeneinander kompensiert.

Zu diesem Zweck wurden Einzelfärbungen jedes Fluorochroms und gänzlich ungefärbte Zellen gemessen, wodurch der Anteil eines überlagernden Signals definiert und bei den folgenden Messungen abgezogen wurde. Die Software BD FACSDiva (BD Biosciences) erfasste die Messwerte und ermöglichte neben einer automatischen Kompensation auch eine manuelle Nachbearbeitung. Unter Kompensation ist der Vorgang zu verstehen, in welchem die spektrale Überlappung von Streusignalen rechnerisch korrigiert wird. Hierzu wurden Einzelfärbungen aller verwendeter Fluorochrom-gekoppelter Antikörper auf Mikropartikeln aus Polystyren (UltraComp eBeads, ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Die *Kompensationsbeads* binden Antikörper mit hoher Affinität und können entsprechend echte Zellen ersetzen, wenn diese nicht in ausreichender Menge isoliert werden konnten. Die

Totzellfarbstoffe (DAPI und SYTOX) wurden nicht kompensiert, da positive Zellen bereits zu Beginn der Datenanalyse ausgeschlossen wurden.

### ***Einzelmarkierungen***

Die Einzelmarkierungen der *Beads* erfolgten weitgehend nach Protokoll des Herstellers. Die *Beads* wurden 30 s lang gevortext bevor je 25 µl pro Röhrchen (*Tube*) vorgelegt wurden. Daraufhin erfolgte die Zugabe der einzelnen Antikörper (je ein Antikörper in entsprechender Menge pro *Tube*) mit anschließendem Vortexen (10 s). Eine Inkubation von 30 Minuten auf Eis im Dunkeln folgte. Nach Zugabe von 1 ml PBSbsa pro *Tube* erfolgte ein Waschschrift (5 Minuten, 500 g und 20 °C), um die überschüssigen Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 200 µl PBSbsa resuspendiert, danach in FACS-Tubes (Rundbodenröhrchen, Corning Incorporated) überführt und gemessen. Da die verwendeten Kompensations*beads* kleiner sind als die zu analysierenden Zellen, musste der FSC für die Kompensationsmessungen angepasst werden. Je Färbung wurden mindestens 5000 Ereignisse aufgenommen. Die Messung der Zellen erfolgte mit der Software FACS Diva 6.1.3. (BD Biosciences). Die Berechnung der Kompensationsmatrix wurde mit FlowJo V10 (TreeStar) durchgeführt.

### ***Gating Strategie***

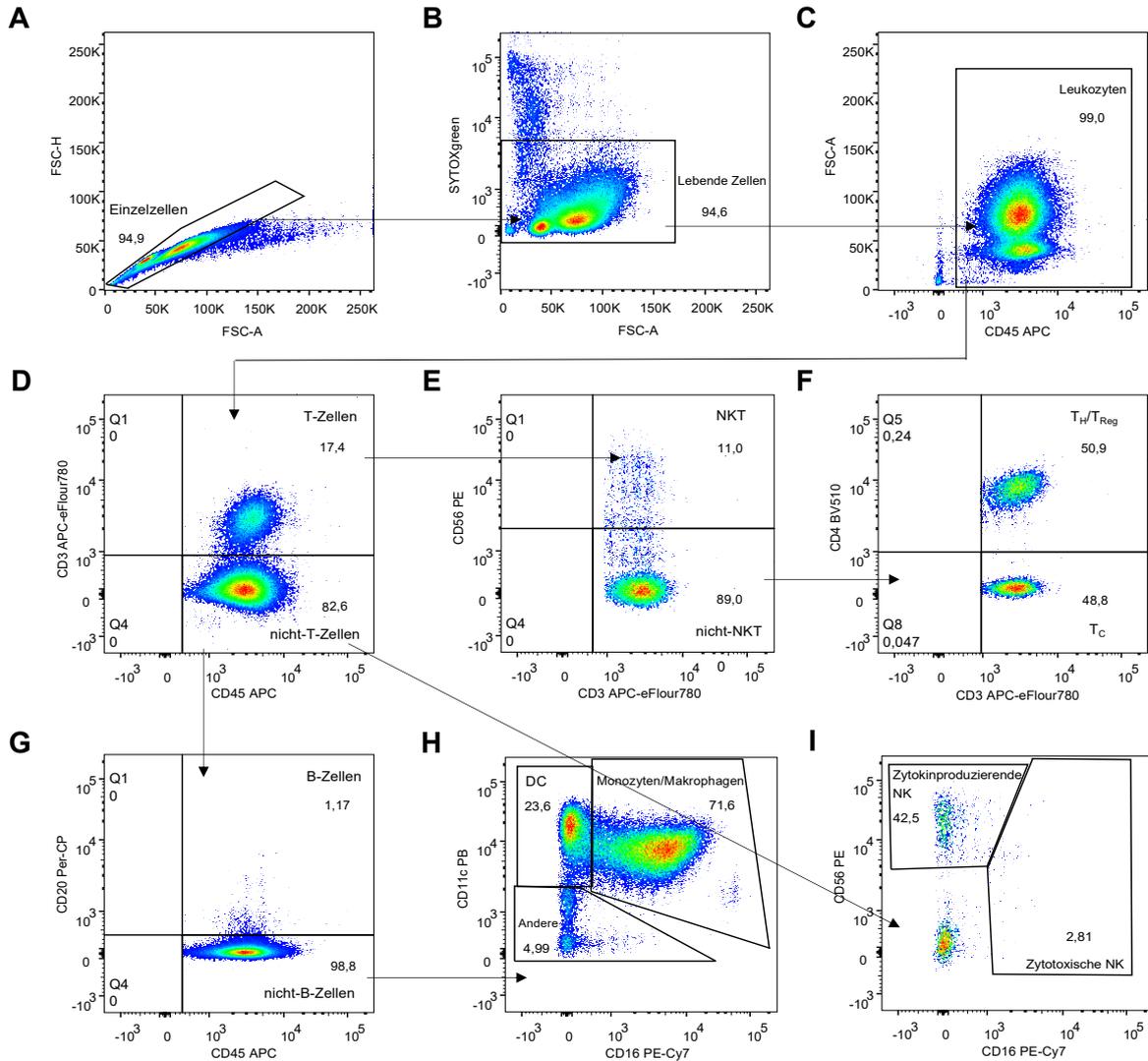
Die Gating Strategie bildet die Basis der Auswertung der durchflusszytometrisch erhobenen Daten und steht exemplarisch für das Vorgehen bei allen gemessenen Proben der Endometriose-Patientinnen und Kontroll-Patientinnen (siehe Abbildung 2 und 3). Sie ist maßgeblich, um die einzelnen Immunzellpopulationen und deren Subpopulationen qualitativ sowie quantitativ zu bestimmen. Hierzu war es zunächst obligatorisch, die Dubletten (adhärierte Zellen) über die FSC-A (x-Achse) gegen die FSC-H (y-Achse) auszuschließen. Im nächsten Schritt wurden die toten Zellen ausgeschlossen, indem die mit DAPI oder SYTOX markierten Zellen gegen den FSC-A dargestellt und ausgeschlossen wurden. Bei DAPI und SYTOX handelt es sich um Fluoreszenzfarbstoffe, welche in der Lage sind, die Plasmamembranen nekrotischer, apoptotischer oder toter Zellen zu durchdringen, an die Desoxyribonukleinsäure des Zellkerns zu binden und Licht im grünen und blauen Bereich des sichtbaren Spektrums zu emittieren. Somit stellen sie sehr gute Indikatoren toter Zellen innerhalb einer Population dar. Abbildung 2 zeigt wie nach dem Ausschluss toter Zellen über SYTOX, auf Grundlage der als CD45-positiv identifizierten Leukozyten die T-Zellen (CD3<sup>+</sup>)

## Material und Methoden

und deren Subpopulationen NKT-Zellen ( $CD3^+CD56^+$ ),  $T_H$ -Zellen/ $T_{Reg}$  ( $CD4^+$ )/ $T_C$  ( $CD8^+$ ) und die B-Zellen ( $CD20^+$ ), DC ( $CD11c^+$ ) und Monozyten/Makrophagen ( $CD16^+CD11c^+$ ) sowie der zytokinproduzierenden und regulatorischen NK-Zellen ( $CD56^{bright}CD16^-$ ) und der zytotoxischen NK-Zellen ( $CD56^{dim}CD16^+$ ) ausgewählt wurden. Abbildung 3 zeigt wie nach dem Ausschluss toter Zellen über SYTOX, auf Grundlage der als CD14-positiv identifizierten Monozyten/Makrophagen deren Subpopulationen M1 ( $CD80^+$ ), Aktivierungsmarker ( $CD86^+$ ) und  $HMM^+$  sowie M2 ( $CD163^+$ ;  $CD206^+$ ) ausgewählt wurden.

Die Auswertung und die grafische Darstellung der mit dem Durchflusszytometer BD Canto II (BD Biosciences) erfassten Daten erfolgte mit der Software FlowJo V10 (TreeStar).

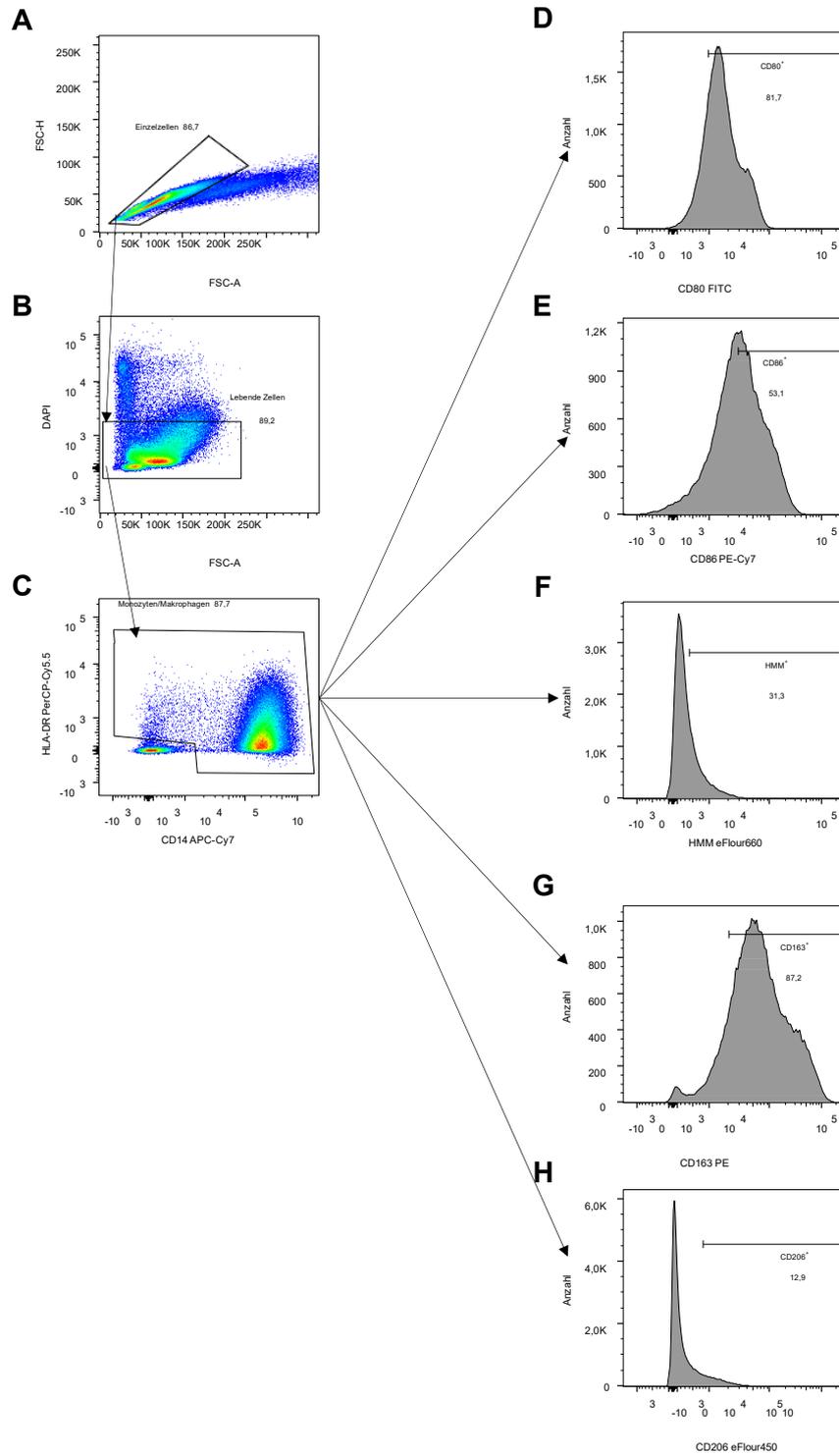
## Material und Methoden



**Abbildung 2: Gating Strategie Panel 1**

**A.** Ausschluss der Dubletten. Einzelzellen verblieben. **B.** Ausschluss toter Zellen. Lebende Zellen verblieben. **C.** CD45-positiv identifizierte Leukozyten **D.** T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) **E.** NKT-Zellen (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) **F.** T<sub>H</sub>-Zellen/T<sub>Reg</sub> (CD4<sup>+</sup>)/T<sub>c</sub> (CD8<sup>+</sup>) **G.** B-Zellen (CD20<sup>+</sup>) **H.** DC (CD11c<sup>+</sup>) und Monozyten/Makrophagen (CD16<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) **I.** zytokinproduzierende und regulatorische NK-Zellen (CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>) und zytotoxische NK-Zellen (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>). CD, Cluster of differentiation.

## Material und Methoden



**Abbildung 3: Gating Strategie Panel 2**

**A.** Ausschluss der Dubletten. Einzelzellen verblieben. **B.** Ausschluss toter Zellen. Lebende Zellen verblieben. **C.** CD14-positiv identifizierte Monozyten/Makrophagen **D.** M1 (CD80<sup>+</sup>), Aktivierungsmarker **E.** (CD86<sup>+</sup>) und **F.** HMM<sup>+</sup> sowie M2 (**G.** CD163<sup>+</sup>; **H.** CD206<sup>+</sup>). CD, *Cluster of differentiation*.

### 3.3.3. Luminex

Die xMAP-Technologie (*multiplex multi-analyte profiling*) ermöglicht die Erfassung von bis zu 100 Protein-Biomarkern in einem sehr geringen flüssigen Probenvolumen (Gressner und Arndt 2019). Die Grundlage bilden Polystyrolkugeln (*Beads*), welche in unterschiedlichen Konzentrationen mit zwei Fluoreszenzstoffen gefärbt und dadurch mit einem spezifischen Farbcode versehen sind, dadurch und durch verschiedene Größen der *Beads* ist eine individuelle Unterscheidung und Identifizierung möglich (Fulton et al. 1997; Gressner und Arndt 2019).

An die *Beads* können Antikörper und Antigene kovalent gekoppelt werden und so spezifisch Proteine gebunden werden. Sie werden von einer Nadel aufgenommen und strömen linear angeordnet aufwärts. Das Luminex-System ähnelt dem eines Durchflusszytometers und weist die jeweilige Antigen-Antikörper-Reaktion auf den einzelnen spezifischen *Beads*-Populationen nach. Somit erfolgt neben der Bestimmung und Klassifizierung der *Beads* die Quantifizierung der spezifisch gebundenen Analyte über die Detektion des eingesetzten Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpers (Kaufmann und Blasczyk 2014).

Es wurden pro Vertiefung der Zellkulturplatte (*Well*) 50 *Beads* pro untersuchten Analyten bzw. *Bead*nummer am Bio-Plex 200 (Bio-Rad Laboratories) gemessen, um eine hohe Messgenauigkeit zu gewährleisten. Das Messergebnis wird in der MFI aller gemessener *Beads* ausgegeben.

Die Zytokinkonzentrationen in den Überständen der Peritonealflüssigkeit von 43 Endometriose-Patientinnen und 12 Kontroll-Patientinnen wurden mit Hilfe der Bio-Plex<sup>®</sup> 200 Luminex Technologie (Luminex Corporation) quantifiziert und anschließend verglichen. Es wurde ein 27-Multiplex (Bio-Plex Pro<sup>™</sup> Human Cytokine 27-Plex Assay, Bio-Rad Laboratories) genutzt, welches IL-1 $\beta$  und den IL-1 Rezeptor-Antagonisten (IL-1Ra), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17 $\alpha$ , IP-10, Eotaxin, FGF-b, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF- $\alpha$  und VEGF umfasst (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Namen, Abkürzungen und Stoffklassen der untersuchten Botenstoffe

<b>Stofffamilien</b>	<b>Vollständiger Name</b>	
<b>Chemokine</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 2 oder Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)	
	Chemokine (C-C motif) ligand 3 oder Macrophage Inflammatory Protein-1-alpha (MIP-1 $\alpha$ )	
	Chemokine (C-C motif) ligand 4 oder Macrophage Inflammatory Protein-1-beta (MIP-1 $\beta$ )	
	Chemokine (C-C motif) ligand 5 oder Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES)	
	Chemokine (C-C motif) ligand 11 oder Eosinophil chemotactic protein (Eotaxin)	
	Interleukin-8 (IL-8) oder Chemokine (C-X-C motif) ligand 8 (CXCL8)	
	Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) oder (C-X-C motif) Chemokine 10 (CXCL10)	
<b>Wachstumsfaktoren</b>	Basic Fibroblast growth factor (FGF-basic oder FGFb)	
	Platelet-derived growth factor beta polipeptide (PDGF-BB)	
	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	
<b>Hematopoetine</b>	Interleukin-1 (IL-1)	Interleukin-7 (IL-7)
	Interleukin-2 (IL-2)	Interleukin-9 (IL-9)
	Interleukin-4 (IL-4)	Interleukin-13 (IL-13)
	Interleukin-5 (IL-5)	Interleukin-15 (IL-15)
	Interleukin-6 (IL-6)	
	Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)	
	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	
<b>Interferon</b>	Interferon gamma (IFN- $\gamma$ )	
<b>Tumor necrosis factor</b>	Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )	
<b>Unklassifiziert</b>	Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra)	Interleukin-12 (p70) (IL-12 (p70))
	Interleukin-10 (IL-10)	Interleukin-17 alpha (IL-17 $\alpha$ )

### **Protokoll**

Zunächst wurden der *Bio-Plex-Assay Buffer*, der Waschpuffer und das *Bio-Plex-Sample Diluent* auf Raumtemperatur gebracht und die anderen benötigten Materialien auf Eis gelagert, bis sie eingesetzt wurden. Die aliquotierten und bei -80 °C gelagerten Überstände der Peritonealfüssigkeiten wurden anschließend langsam auf Eis aufgetaut. Der Waschpuffer wurde im Verhältnis 1:10 (60 ml Waschpuffer und 540 ml destilliertes Wasser) verdünnt.

Eine Standardreihe (zur Quantifizierung jedes Analyten) wurde mit dem Verdünnungsfaktor 4 nach folgendem Schema vorbereitet: Zur Herstellung des Standard 1 (S1) wurde die Standardstammlösung (Stocklösung) in 500 µl 2 %-igem SDS (Probenpuffer) gelöst, 5 Sekunden gevortext und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Herstellung der sieben weiteren Standards (S2-S7) erfolgte, indem je 150 µl *Bio-Plex Standard Diluent* in ein Probenröhrchen (1,5 ml; Eppendorf) vorgelegt wurden und dann je 50 µl des Standardstocks von S2 zu S3, von S3 zu S4 und so weiter, überführt wurden, sodass eine 1 zu 4 Verdünnung stattfand. Für die zwei *Blank*-Proben (S8) wurden ausschließlich je 50 µl *Bio-Plex Standard Diluent* vorgelegt.

Die mit *Capture-Antibody* markierten magnetischen *Beads* wurden anschließend 30 Sekunden lang gevortext. 575 µl der *Beads* wurden dann in 5175 µl *Bio-Plex-Assay Buffer* gelöst. Die gelösten *Beads* wurden 15 Sekunden lang gevortext und anschließend je 50 µl der Lösung pro *Well* in eine 96-*Well* Platte (flacher Boden, Bio-Rad Laboratories) überführt. Die Platte wurde zweimal mit je 100 µl *Bio-Plex-Wash buffer* pro *Well* mit Hilfe eines magnetischen Mikroplattenwaschgeräts (*Hand Held Magnetic Plate Washer*; Thermo Fisher Scientific) gewaschen, indem sie auf dem Mikroplattenwaschgerät befestigt und der Überstand nach einer Minute abgekippt wurde. Die Proben, *Standards* und *Blanks* wurden je 5 Sekunden gevortext und jeweils 50 µl in jedes *Well* zu den magnetischen *Beads* gegeben. Daraufhin wurde die Platte mit einer Aluminiumfolie versiegelt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur bei 850 rpm auf dem Laborschüttler inkubiert. 10 Minuten vor Ende der Inkubationszeit wurde der 10-fach gelöste *Detection antibody* 5 Sekunden lang gevortext und 300 µl mit 2700 µl *Detection antibody-Diluent* zu einer 1-fach Konzentration verdünnt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte dreimal mit je 100 µl Waschpuffer pro *Well* wie oben beschrieben gewaschen. Anschließend wurden nach 5 Sekunden langem Vortexen je 25 µl der 1-fach gelösten Detektionsantikörper in jedes *Well* pipettiert, die Platte wieder mit einer Aluminiumfolie versiegelt und erneut 30 Minuten lang bei Raumtemperatur bei 850 rpm auf dem Laborschüttler inkubiert. 10 Minuten vor Ablauf der Inkubationszeit, wurde der Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) für 5 Sekunden gevortext und dann 60 µl des Farbstoffs in 5940 µl *Bio-Plex Assay-Buffer* verdünnt. Diese 1-prozentige SA-PE Lösung wurde vor

Licht geschützt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte erneut dreimal mit je 100 µl Waschpuffer wie oben beschrieben gewaschen. Die 1-fache SA-PE Lösung wurde 5 Sekunden lang gevortext und je 50 µl in jedes *Well* überführt. Die Platte wurde ein drittes Mal mit einer Aluminiumfolie versiegelt und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur und 850 rpm geschüttelt. Nach Ende der letzten Inkubationszeit wurde die Platte erneut dreimal, wie oben beschrieben, gewaschen. Anschließend wurden die *Beads* in je 125 µl Bio-Plex-Assay-Puffer pro *Well* resuspendiert. Die Platte wurde erneut versiegelt und 30 Sekunden lang bei 850 rpm bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Platte wurde im letzten Schritt im Bio-Plex 200 System (Bio-Rad Laboratories) mit dem vorprogrammierten Protokoll ausgelesen. Die Bio-Plex Software 6.1 (Bio-Rad Laboratories) berechnete die einzelnen Standardkurven der Zytokine und ermittelte damit die Konzentrationen (pg/ml) der Zytokine in den Proben.

### 3.3.4. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*-Analyse von Neopterin im Überstand der Peritonealflüssigkeit

Das Neopterin-ELISA ist ein analytisches System, welches den Nachweis und die direkte quantitative Bestimmung eines spezifischen Antigens über die Bindung von Antikörpern in einer flüssigen Probe ermöglicht (Kaufmann und Blasczyk 2014). Die Neopterin-Konzentration in der Peritonealflüssigkeit von 21 Endometriose-Patientinnen und 12 Kontroll-Patientinnen wurde mit Hilfe des Neopterin ELISA Kits (IBL International) und der SkanIt Software 3.0 (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert und verglichen.

Zunächst wurden 20 µl von jedem Standard (SA bis SF), von jeder Kontrolle (C1 und C2) und von jeder unverdünnten Probe (Überstand der Peritonealflüssigkeit) jeweils zweimal in die entsprechenden *Wells* der Mikrotiterplatte (96-*Well*-Platt, ELISA-Kit IBL International) vorgelegt (Doppelbestimmungen). Dann wurden mit einer 8-Kanal-Pipette (Eppendorf) je 100 µl Enzymkonjugat in jedes *Well* pipettiert und anschließend je 50 µl des Neopterin Antiserums in jedes *Well* gegeben. Daraufhin wurde die Platte mit einer schwarzen Haftklebefolie abgeklebt, um die Proben im Dunkeln für 90 Minuten bei Raumtemperatur und 500 rpm auf einem Laborschüttler zu inkubieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Haftfolie entfernt und die Inkubationslösung verworfen. Die Platte wurde daraufhin vier Mal mit 20-fach gelöstem Waschpuffer gewaschen und danach die restliche Flüssigkeit auf Papiertüchern ausgeklopft, bis die *Wells* vollends trocken waren. Danach wurden je 150 µl TMB Substratlösung in jedes *Well* pipettiert. Anschließend wurde die Platte 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Substratreaktion wurde daraufhin durch die Zugabe von je 150 µl TMB Stopplösung pro *Well* gestoppt und die Platte abschließend für 10 Sekunden

geschüttelt. Die Substratlösung und die Stopplösung wurden mit einer 8-Kanal-Pipette pipettiert. Direkt nach der Substratreaktion wurde im ELISA-READER Thermo Scientific Multiskan FC (Unity Lab Services) die optische Dichte bei 450 nm automatisch gemessen. Die optische Dichte ist umgekehrt proportional zur Neopterin-Konzentration. Die Proben wurden anhand der Standardkurven ausgewertet und die Neopterin-Konzentration bestimmt.

### 3.4. Statistik

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit der Software SPSS Version 25 (IBM Corporation). Die Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests und dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung (Gauß-Verteilung) getestet. Anschließend wurden geeignete Tests ausgewählt, um auf statistische Signifikanz zu überprüfen. Da sich die Daten nicht normalverteilt zeigten, wurde ein Mann-Whitney U-Test durchgeführt, um die Immunzellpopulationen und inflammatorischen Zytokine in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose- und Kontroll-Gruppe zu analysieren und zu vergleichen. Zum Vergleich der Kontroll-Patientinnen mit Endometriose-Patientinnen mit leichter und schwerer Endometriose wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche verwendet. Ein  $p$ -Wert von  $< 0,05$  wurde als signifikant (\*), ein  $p$ -Wert von  $< 0,01$  als hoch signifikant (\*\*) und ein  $p$ -Wert von  $< 0,001$  als höchst signifikant (\*\*\*) angenommen. Unterstützend wirkte das Institut für Veterinär-Epidemiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Marcus G. Doherr.

Bei der FACS-Analyse konnten, beispielsweise aufgrund von Lieferengpässen, bei vereinzelt Durchläufen einzelne Antikörper nicht gemessen werden. Somit stand in Einzelfällen eine geringere gesamte Maximalzahl an Messpunkten pro Antikörper (z. B. CD206 statt 26 nur 24) zur Verfügung.

Bei der Bewertung der Ergebnisse des LUMINEX und des ELISA-Versuchs muss in Betracht gezogen werden, dass in den Proben, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen, nicht angenommen werden kann, dass keine biologisch wirksame Menge des Analyten vorlag. Darum wurde in der statistischen Analyse der Effekt getestet, entsprechende Werte durch 0 oder den niedrigst gemessenen Wert minus 0,01 zu ersetzen. Dieser Vergleich zeigte, dass das Einsetzen von 0 zu einer stärkeren Signifikanz führte. Um die Ergebnisse nicht überzuinterpretieren, wurde entschieden, den niedrigst gemessenen Wert minus 0,01 anzunehmen, um den Abstand zwischen den messbaren und nicht messbaren Proben nicht künstlich zu erhöhen und somit keine falschen Signifikanzen zu erzeugen.

## Material und Methoden

Lag die gemessene Konzentration eines Analyten bei über 20 Proben unterhalb der Nachweisgrenze, wurde der entsprechende Analyt von der Analyse ausgeschlossen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung von Immunzellen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen

Um herauszufinden, ob die Endometriose mit Veränderungen der einzelnen Immunzellpopulationen in der Peritonealflüssigkeit einhergeht, wurden die Frequenzen, Größen und Granularitäten einzelner Subpopulationen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen und von Kontroll-Patientinnen mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt und verglichen.

#### 4.1.1. Monozyten und Makrophagen und deren Subpopulationen

Die Frequenz der Monozyten- und Makrophagen-Population (CD16<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen tendenziell erhöht. Dieses Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz (Median Monozyten/Makrophagen [%]: Endometriose 41,40 Q<sub>1,3</sub> (28,80 – 53,45), Kontrollen 31,75 Q<sub>1,3</sub> (25,10 – 44,73), Abbildung 4A). Der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab keinen signifikanten Unterschied, wobei sich unter milder Endometriose der leicht erhöhte Trend am deutlichsten zeigte (Median Monozyten/Makrophagen [%]: mild 42,25 Q<sub>1,3</sub> (27,90 – 56,13), schwer 35,70 Q<sub>1,3</sub> (29,60 – 48,00)).

Die Frequenz der CD14<sup>+</sup>HMM exprimierenden Monozyten- und Makrophagen-Population zeigte sich im Vergleich der Endometriose- und Kontroll-Gruppe statistisch nicht signifikant verändert, wobei die Endometriose-Gruppe im Median einen leicht erhöhten Trend zeigte (Median HMM<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen [%]: Endometriose 50,40 Q<sub>1,3</sub> (35,98 – 65,60), Kontrollen 44,75 Q<sub>1,3</sub> (12,77 – 66,75), Abbildung 4B). Auch der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied, wobei in der mild erkrankten Endometriose-Gruppe ein leicht erhöhter Trend zu verzeichnen war (Median HMM<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen [%]: mild 54,20 Q<sub>1,3</sub> (39,05 – 71,45), schwer 43,70 Q<sub>1,3</sub> (11,70 – 58,80))

## Ergebnisse

In der CD14<sup>+</sup> Monozyten- und Makrophagen-Population zeigte sich die Frequenz der CD80-exprimierenden Monozyten- und Makrophagen-Population im Vergleich der Endometriose mit der Kontroll-Gruppe unverändert. Lediglich der Median der Endometriose-Gruppe war minimal erhöht. Dieses Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz (Median CD80<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen [%]: Endometriose 65,60 Q<sub>1,3</sub> (61,00 – 83,05), Kontrollen 62,50 Q<sub>1,3</sub> (57,65 – 88,40) Abbildung 4C). Auch der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab keinen signifikanten Unterschied, wobei die Letztere im Median eine leicht erhöhte Tendenz zeigte (Median CD80<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen [%]: mild 63,80 Q<sub>1,3</sub> (62,60 – 81,70), schwer 71,10 Q<sub>1,3</sub> (58,55 – 85,38)).

Die Frequenz der CD86-exprimierenden CD14<sup>+</sup> Monozyten- und Makrophagen-Population zeigte sich im Vergleich der Endometriose- und Kontroll-Gruppe unverändert, wobei in der Endometriose-Gruppe ein tendenziell verminderter Median zu verzeichnen war. Dieses Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz (Median CD86<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen [%]: Endometriose 55,30 Q<sub>1,3</sub> (48,55 – 64,75), Kontrollen 63,45 Q<sub>1,3</sub> (46,50 – 74,23), Abbildung 4D). Auch der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab keinen signifikanten Unterschied, wobei die milde Endometriose-Gruppe im Median die geringste Frequenz aufwies (Median CD86<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen [%]: mild 54,05 Q<sub>1,3</sub> (48,58 – 56,35), schwer 59,70 Q<sub>1,3</sub> (41,23 – 69,30)).

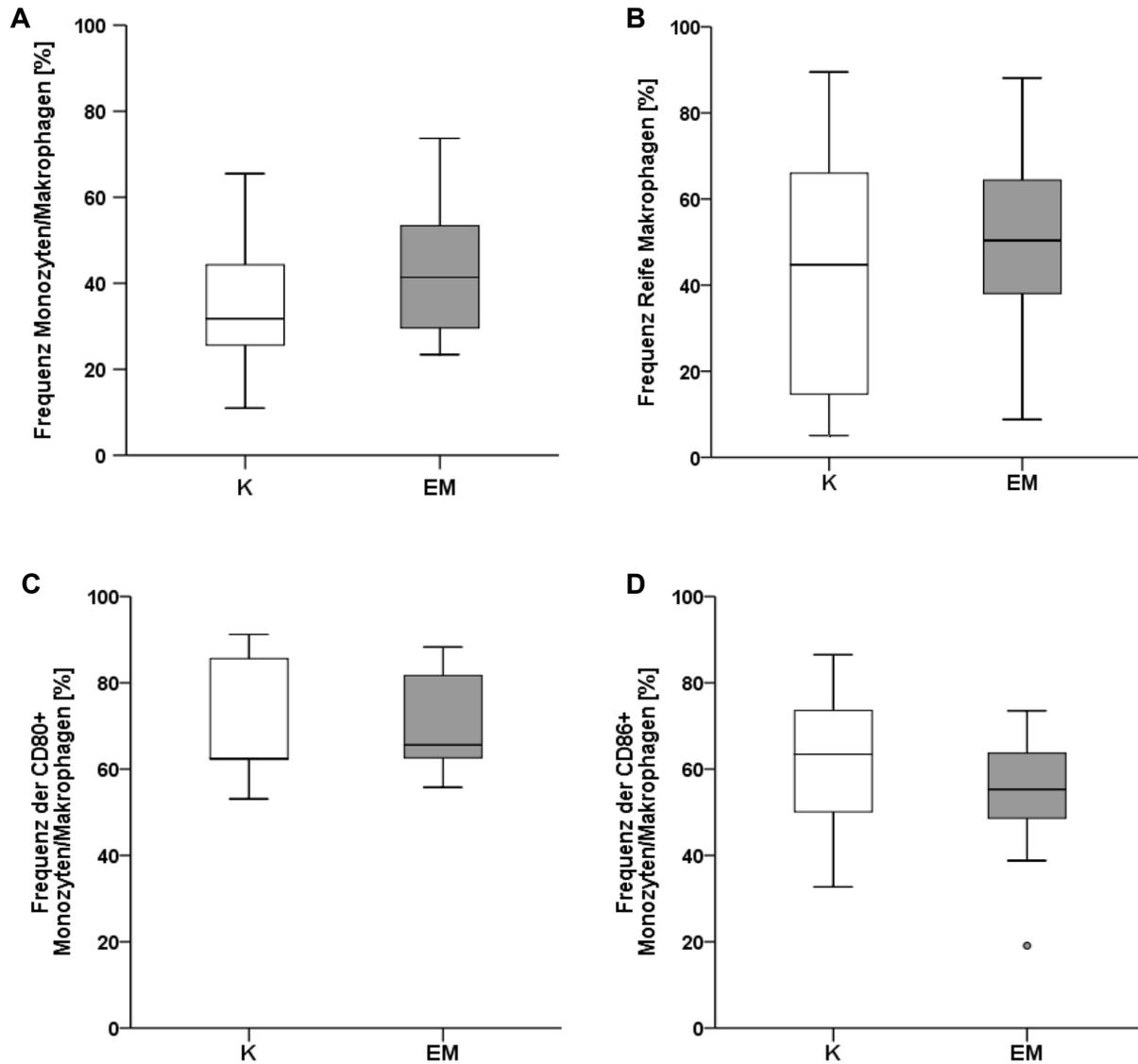
Die Frequenz der CD14<sup>+</sup>CD163-exprimierenden Monozyten- und Makrophagen-Population zeigte in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen einen deutlichen Trend einer Erhöhung. Das Ergebnis erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Median CD163<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen [%]: Endometriose 81,35 Q<sub>1,3</sub> (71,13 – 85,88), Kontrollen 71,20 Q<sub>1,3</sub> (58,95 – 81,00), Abbildung 5A). Auch der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab keinen signifikanten Unterschied, wobei die Frequenzen positiv mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierten (Median CD163<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen [%]: mild 75,90 Q<sub>1,3</sub> (69,90 – 84,45), schwer 84,80 Q<sub>1,3</sub> (72,10 – 89,60)).

Die Frequenz der CD14<sup>+</sup>CD206 exprimierenden Monozyten- und Makrophagen-Population zeigte in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen einen leicht verringerten Trend. Das Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz (Median CD206<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen [%]: Endometriose 35,50 Q<sub>1,3</sub> (22,80 – 47,73), Kontrollen 40,80 Q<sub>1,3</sub> (33,45 – 44,28), Abbildung 5B). Auch der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab keinen signifikanten Unterschied, wobei die schwer erkrankte Gruppe einen tendenziell geringeren Median aufwies als die übrigen Gruppen

## Ergebnisse

(Median CD206<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen [%]: mild 40,80 Q<sub>1,3</sub> (24,00 – 48,25), schwer 29,80 Q<sub>1,3</sub> (22,00 – 48,10)).

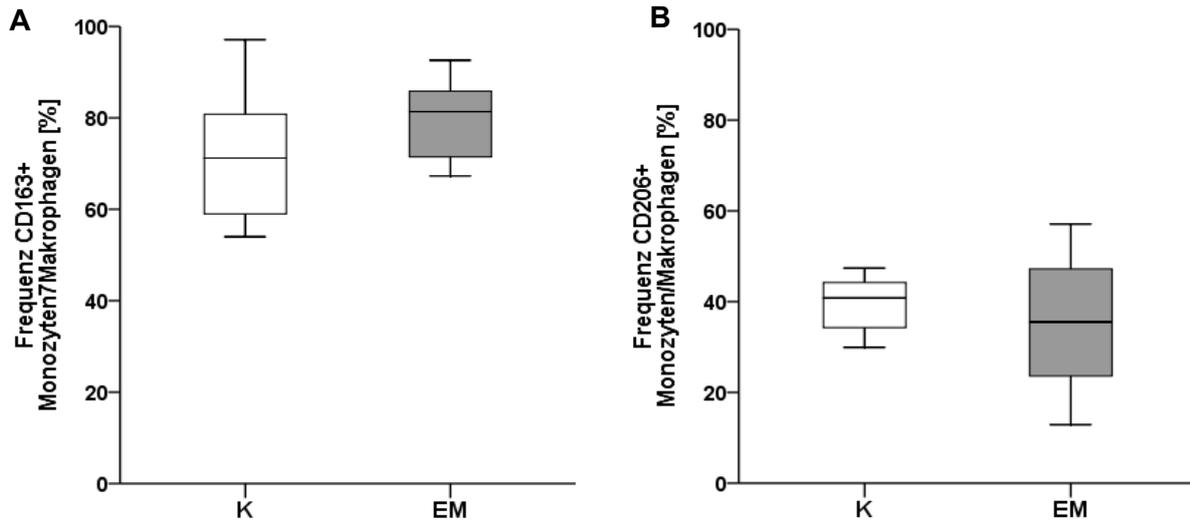
## Ergebnisse



**Abbildung 4: Vergleich der Frequenz und Expression ko-stimulatorischer Moleküle auf Monozyten/Makrophagen [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Frequenz der **A.** Monozyten/Makrophagen (CD16<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) und der **B.** CD14<sup>+</sup>HMM<sup>+</sup>, **C.** CD14<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> und **D.** CD14<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen von Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM). Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

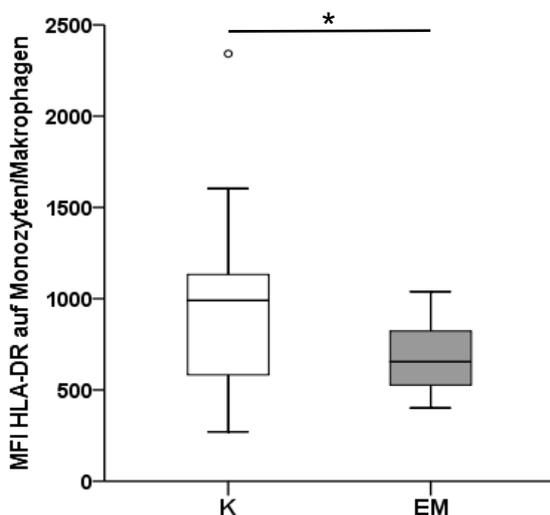
## Ergebnisse



**Abbildung 5: Vergleich der Frequenz und Expression ko-stimulatorischer Moleküle auf Monozyten/Makrophagen [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Frequenz der **A.** CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> und **B.** CD14<sup>+</sup>206<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen von Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM). Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

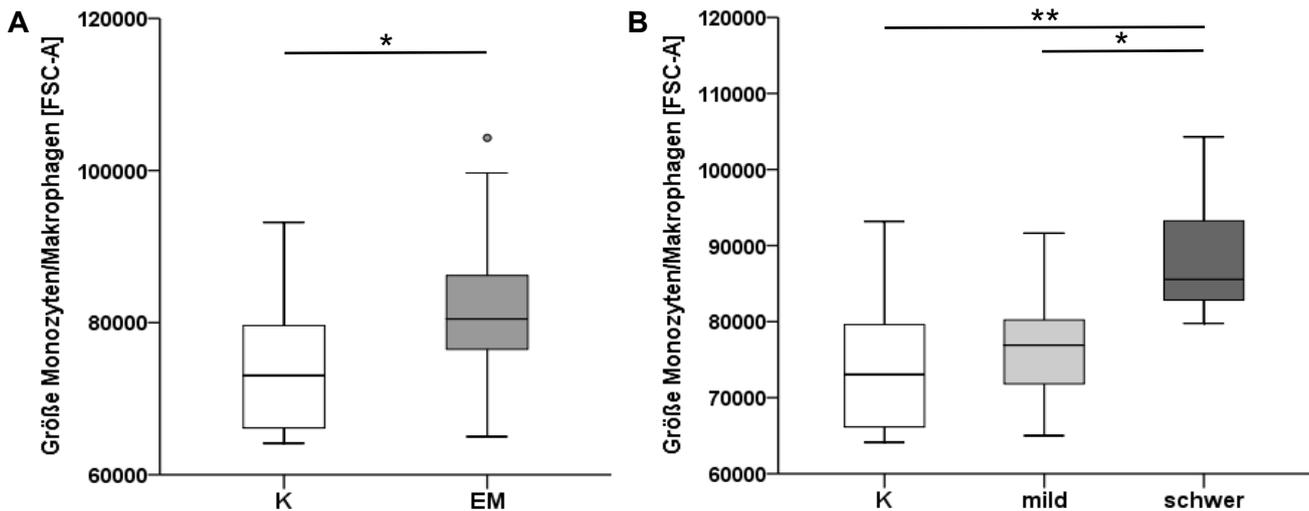
Die MFI von HLA-DR auf den CD14<sup>+</sup> Monozyten- und Makrophagen-Populationen war in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median MFI von HLA-DR auf Monozyten/Makrophagen: Endometriose 654,50 Q<sub>1,3</sub> (521,25 – 825,50), Kontrollen 990,50 Q<sub>1,3</sub> (582,00 – 1250,00). Mann-Whitney-U-Test, \**p* = 0,047, Abbildung 6). Der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen zeigte einen erniedrigten Trend im Median der milden und schweren Endometriose. Dieses Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz (Median MFI HLA-DR Monozyten/Makrophagen: mild 637,00 Q<sub>1,3</sub> (526,50 – 907,00), schwer 672,00 Q<sub>1,3</sub> (457,00 – 828,00)).



**Abbildung 6: Vergleich der Mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) von HLA-DR auf Monozyten/Makrophagen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die MFI von HLA-DR auf CD14<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen von Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM). Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (\**p* < 0,05).

## Ergebnisse



**Abbildung 7: Vergleich der Größe [Forward scatter (FSC-A)] von Monozyten/Makrophagen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

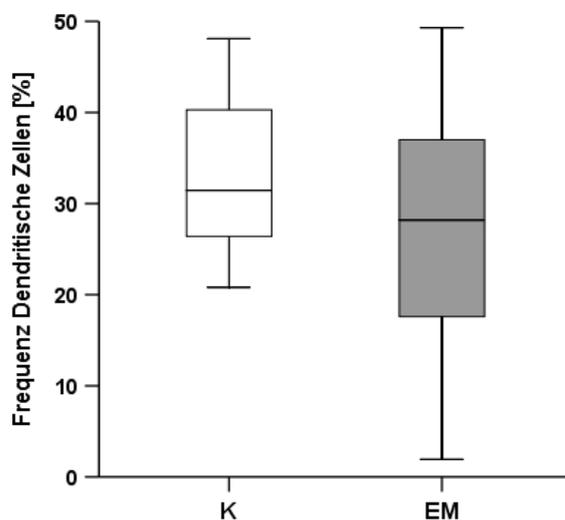
Die Boxplots repräsentieren die Größe der CD14<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen von **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und von **B.** Kontroll-Patientinnen, milder Endometriose (mild) und schwerer Endometriose (schwer). Statistische Analysen wurden mit dem **A.** Mann-Whitney-U-Test ( $*p < 0,05$ ) sowie **B.** Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ) durchgeführt.

Die Größe (FSC-A) der CD14<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen war in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median Größe Monozyten/Makrophagen [FSC-A]: Endometriose 80483,00 Q<sub>1,3</sub> (76309,00 – 86515,75), Kontrollen 73049,00 Q<sub>1,3</sub> (66038,00 – 79970,50). Mann-Whitney-U-Test,  $*p = 0,047$ , Abbildung 7A). Verglichen mit der Kontroll-Gruppe, zeigte sich die Größe der Zellen in der schweren Endometriose-Gruppe hoch signifikant und verglichen mit der milden Endometriose-Gruppe signifikant erhöht (Median Größe Monozyten/Makrophagen [FSC-A]: mild 76888,00 Q<sub>1,3</sub> (71322,50 – 80483,00), schwer 85549,00 Q<sub>1,3</sub> (82616,00 – 99675,00). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur. Vergleich Kontrollen und schwer:  $*p = 0,007$ ; Vergleich mild und schwer:  $*p = 0,045$ , Abbildung 7B).

Die Granularität (SSC-A) der CD14<sup>+</sup> Monozyten- und Makrophagen-Population zeigte sich im Vergleich der Endometriose- und Kontroll-Gruppe statistisch nicht signifikant verändert (Median Monozyten/Makrophagen [%]: Endometriose 40709,50 Q<sub>1,3</sub> (35914,50 – 44220,50), Kontrollen 39411,50 Q<sub>1,3</sub> (33557,75 – 48492,25)). Auch der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied (Median HMM<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen [%]: mild 38352,00 Q<sub>1,3</sub> (35267,00 – 43407,00), schwer 42738,00 Q<sub>1,3</sub> (36018,00 – 44661,00)).

#### 4.1.2. Dendritische Zellen

Die Frequenz der CD11c-exprimierenden DC in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen tendenziell erniedrigt (Abbildung 8). Dieses Ergebnis erreichte keine Signifikanz (Median DC [%]: Endometriose 28,20  $Q_{1,3}$  (15,85 – 38,05), Kontrollen 31,45  $Q_{1,3}$  (25,18 – 41,78), Abbildung 8). Auch der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab außer einem leicht erniedrigten Median in milder und schwerer Endometriose keinen Unterschied (Median DC [%]: mild 28,30  $Q_{1,3}$  (12,47 – 44,73), schwer 28,20  $Q_{1,3}$  (17,60 – 31,70)).



**Abbildung 8: Vergleich der Frequenz von DC [%] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Frequenz der DC (CD11c<sup>+</sup>) von Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM). Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

#### 4.1.3. T-Zellen und deren Subpopulationen

Die Frequenz der CD45- und CD3-exprimierenden T-Zellen zeigte sich, neben einem leicht verminderten Median in der Endometriose-Gruppe, im Vergleich zur Kontroll-Gruppe unverändert (Abbildung 9A). Das Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz (Median T-Zellen [%]: Endometriose 20,00  $Q_{1,3}$  (14,72 – 30,00), Kontrollen 23,16  $Q_{1,3}$  (19,63 – 29,60), Abbildung 9A). Auch der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab keinen signifikanten Unterschied, wobei sich der Median in der milden Gruppe tendenziell erniedrigt und in der schweren Gruppe tendenziell erhöht zeigte (Median T-Zellen [%]: mild 16,50  $Q_{1,3}$  (12,72 – 29,80), schwer 24,80  $Q_{1,3}$  (15,13 – 30,80)).

Die Frequenz der CD4-exprimierenden T<sub>H</sub>-Zellen/T<sub>Reg</sub> zeigte sich in der Endometriose-Gruppe im Median tendenziell leicht vermindert im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Abbildung

## Ergebnisse

9B). Dieses Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz (Median  $T_H$ -Zellen/ $T_{Reg}$  [%]: Endometriose 5,13  $Q_{1,3}$  (3,32 – 9,69), Kontrollen 7,35  $Q_{1,3}$  (4,80 – 26,30), Abbildung 9B). Auch der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab keinen signifikanten Unterschied, wobei sich der Median in der milden Gruppe tendenziell erniedrigt und in der schweren Gruppe tendenziell erhöht zeigte (Median  $T_H$ -Zellen/ $T_{Reg}$  [%]: mild 4,84  $Q_{1,3}$  (2,90 – 7,20), schwer 8,55  $Q_{1,3}$  (3,32 – 12,15)).

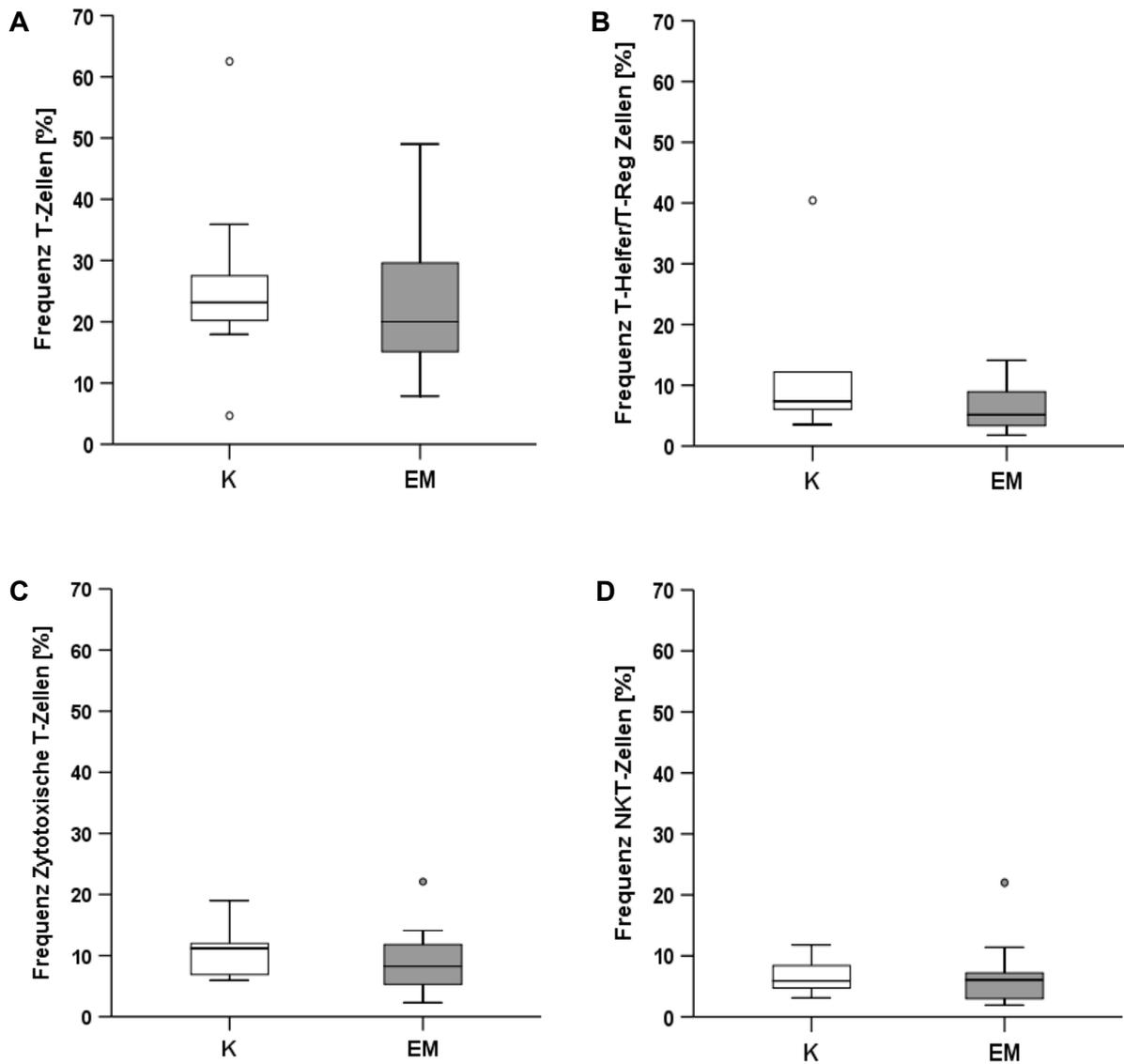
Die Frequenz der CD8-exprimierenden  $T_C$  zeigte sich in der Endometriose-Gruppe im Median tendenziell vermindert im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Abbildung 9C). Dieses Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz (Median  $T_C$  [%]: Endometriose 8,26  $Q_{1,3}$  (4,77 – 12,08), Kontrollen 11,20  $Q_{1,3}$  (6,44 – 15,50), Abbildung 9C). Auch der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied, wobei der niedrigste Median in der milden Gruppe zu finden war (Median  $T_C$  [%]: mild 7,37  $Q_{1,3}$  (3,16 – 11,09), schwer 9,69  $Q_{1,3}$  (5,44 – 13,20)).

Der CD4/CD8 Quotient lag bei den Endometriose-Patientinnen tendenziell unter dem Quotienten der Kontroll-Patientinnen. Dieses Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz (Median CD4/CD8 Quotient: Endometriose 0,73  $Q_{1,3}$  (0,59 – 0,97), Kontrollen (1,02  $Q_{1,3}$  (0,57 – 1,6)).

### 4.1.4. NKT-Zellen

Die Frequenz der CD3- und CD56-exprimierenden NKT-Zellen zeigte in der Endometriose-Gruppe tendenziell einen leicht verminderten Trend im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Abbildung 9D). Dieses Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz (Median NKT-Zellen [%]: Endometriose 6,08  $Q_{1,3}$  (2,94 – 8,02), Kontrollen 5,90  $Q_{1,3}$  (3,93 – 10,11), Abbildung 9D). Auch der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab keinen signifikanten Unterschied, wobei sich der Median in der milden Gruppe tendenziell erniedrigt und in der schweren Gruppe tendenziell leicht erhöht zeigte (Median NKT-Zellen [%]: mild 4,27  $Q_{1,3}$  (2,85 – 9,67), schwer 6,34  $Q_{1,3}$  (5,08 – 10,51)).

## Ergebnisse



**Abbildung 9: Vergleich der Frequenz von T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen [%] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Frequenz der **A.** T-Zellen (CD3<sup>+</sup>), **B.** T<sub>H</sub>/T<sub>Reg</sub> (CD4<sup>+</sup>), **C.** T<sub>C</sub> (CD8<sup>+</sup>) und **D.** NKT-Zellen (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) von Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM). Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

### 4.1.5. Mittlere Fluoreszenz Intensität von CD3 auf den T-Zellen und deren Subpopulationen

Die MFI von CD3 auf den T-Zellen in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen war im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen signifikant erniedrigt (Median MFI von CD3 auf T-Zellen: Endometriose 2042,50  $Q_{1,3}$  (1826,00 – 2675,50), Kontrollen 3608,50  $Q_{1,3}$  (2245,75 – 3854,00). Mann-Whitney-U-Test,  $*p = 0,041$ , Abbildung 10A). Die nähere Analyse der Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede (Median IL-1Ra [pg/ml]: mild 2036,00  $Q_{1,3}$  (1813,00 – 2618,00), schwer 2049,00  $Q_{1,3}$  (1741,50 – 2702,00)).

Die MFI von CD3 auf der  $T_H$ - und  $T_{Reg}$ -Zell-Population in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen war im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen signifikant erniedrigt (Median MFI von CD3 auf  $T_H$ - und  $T_{Reg}$ -Zellen: Endometriose 1905,00  $Q_{1,3}$  (1700,00 – 2637,25), Kontrollen 3170,00  $Q_{1,3}$  (2300,50 – 4582,00). Mann-Whitney-U-Test,  $*p = 0,019$ , Abbildung 10B). Die nähere Analyse der Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte zwar keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch war der Median bei Patientinnen mit schwerer Endometriose tendenziell erhöht (Median IL-1Ra [pg/ml]: mild 1866,50  $Q_{1,3}$  (1690,00 – 2492,75), schwer 2030,50  $Q_{1,3}$  (1713,25 – 2664,00)).

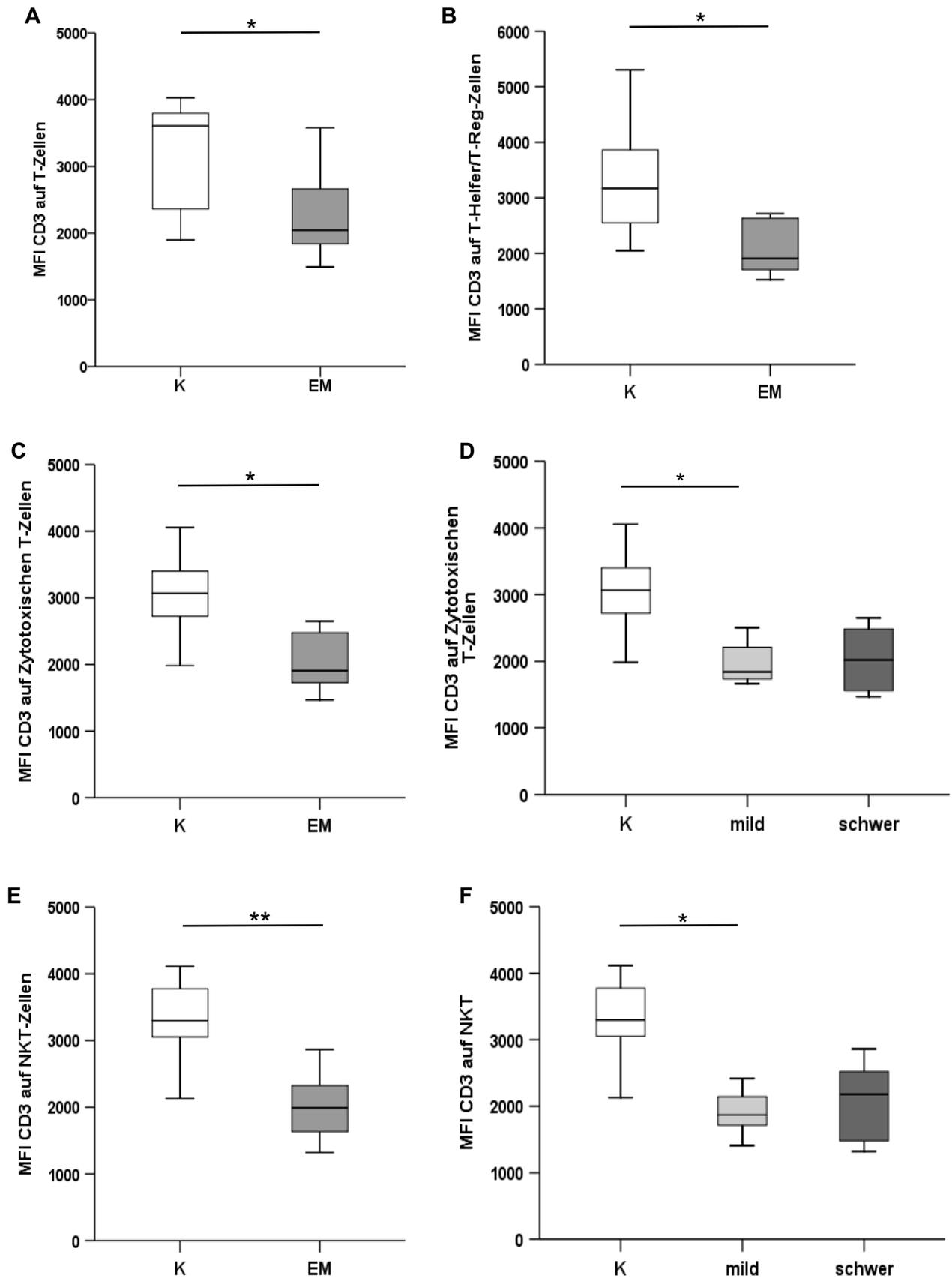
Die MFI von CD3 auf den  $T_C$  in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen war im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen hoch signifikant erniedrigt (Median MFI von CD3 auf  $T_C$ : Endometriose 1905,50  $Q_{1,3}$  (1711,75 – 2479,00), Kontrollen 3068,00  $Q_{1,3}$  (2352,00 – 3729,00). Mann-Whitney-U-Test,  $**p = 0,005$ , Abbildung 10C). Die niedrigste MFI von CD3 war auf den peritonealen  $T_C$ -Zellen der Patientinnen mit milder Endometriose zu detektieren. Dieser Wert erreichte statistische Signifikanz (Median MFI von CD3 auf  $T_C$ : mild 1838,50  $Q_{1,3}$  (1731,75 – 2343,75), schwer 2018,50  $Q_{1,3}$  (1535,50 – 2524,00). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur,  $*p = 0,026$ , Abbildung 10D).

Die MFI von CD3 auf den NKT-Zellen in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen war im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen hoch signifikant erniedrigt (Median MFI von CD3 auf T-Zellen: Endometriose 1989,50  $Q_{1,3}$  (1594,50 – 2348,00), Kontrollen 3298,00  $Q_{1,3}$  (2593,00 – 3945,50). Mann-Whitney-U-Test,  $**p = 0,003$ , Abbildung 10E).

## Ergebnisse

Die niedrigste MFI von CD3 war auf den peritonealen NKT-Zellen der Patientinnen mit milder Endometriose zu detektieren. Dieser Wert erreichte statistische Signifikanz (Median MFI von CD3 auf T-Zellen: mild 1870,50  $Q_{1,3}$  (1674,00 – 2177,50), schwer 2180,50  $Q_{1,3}$  (1440,00 – 2608,25). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur,  $*p = 0,017$ , Abbildung 10F).

## Ergebnisse

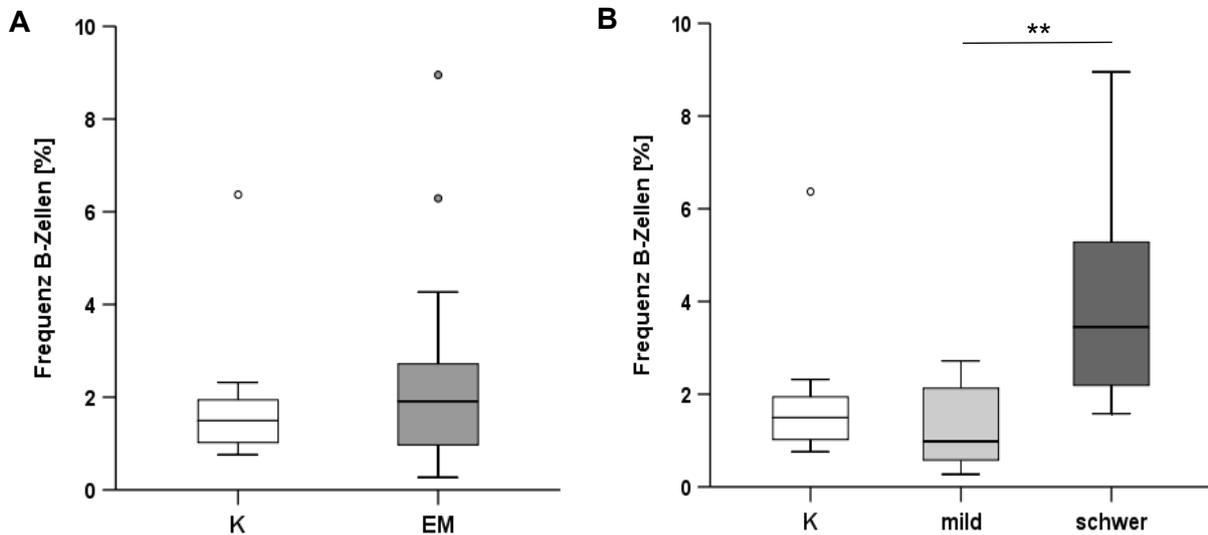


**Abbildung 10: Vergleich der Mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) von CD3 auf T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**  
 Die Boxplots repräsentieren die MFI von CD3 auf **A.** T-Zellen **B.** T<sub>H</sub>/T<sub>Reg</sub> **C.** T<sub>C</sub> **E.** NKT-Zellen von Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **D.** T<sub>C</sub> und **F.** NKT-Zellen von Kontroll-Patientinnen und Endometriose-Patientinnen (mild und schwer). Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (\* $p < 0,05$ ).

4.1.6. B-Zellen

Die Frequenz der CD20-exprimierenden B-Zellen zeigte sich in der Endometriose-Gruppe tendenziell erhöht im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Dieses Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz (Median B-Zellen [%]: Endometriose 1,91  $Q_{1,3}$  (0,87 – 3,09), Kontrollen 1,50  $Q_{1,3}$  (1,01 – 2,04), Abbildung 11A).

Der Vergleich der milden und schweren Endometriose-Gruppen ergab eine signifikant erhöhte B-Zell-Frequenz in der Peritonealflüssigkeit der schwer Erkrankten (Median B-Zellen [%]: mild 0,99  $Q_{1,3}$  (0,53 – 2,22), schwer 3,45  $Q_{1,3}$  (1,91 – 6,29). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur,  $**p = 0,009$ , Abbildung 11B).



**Abbildung 11: Vergleich der Frequenz von B-Zellen [%] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Frequenz der B-Zellen (CD20<sup>+</sup>) in **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **B.** Kontroll-Patientinnen (K), milder Endometriose (mild) und schwerer Endometriose (schwer). Statistische Analysen wurden mit dem **A.** Mann-Whitney-U-Test sowie **B.** Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $**p < 0,01$ ) durchgeführt.

### 4.1.7. Natürliche Killerzellen und deren Subpopulationen

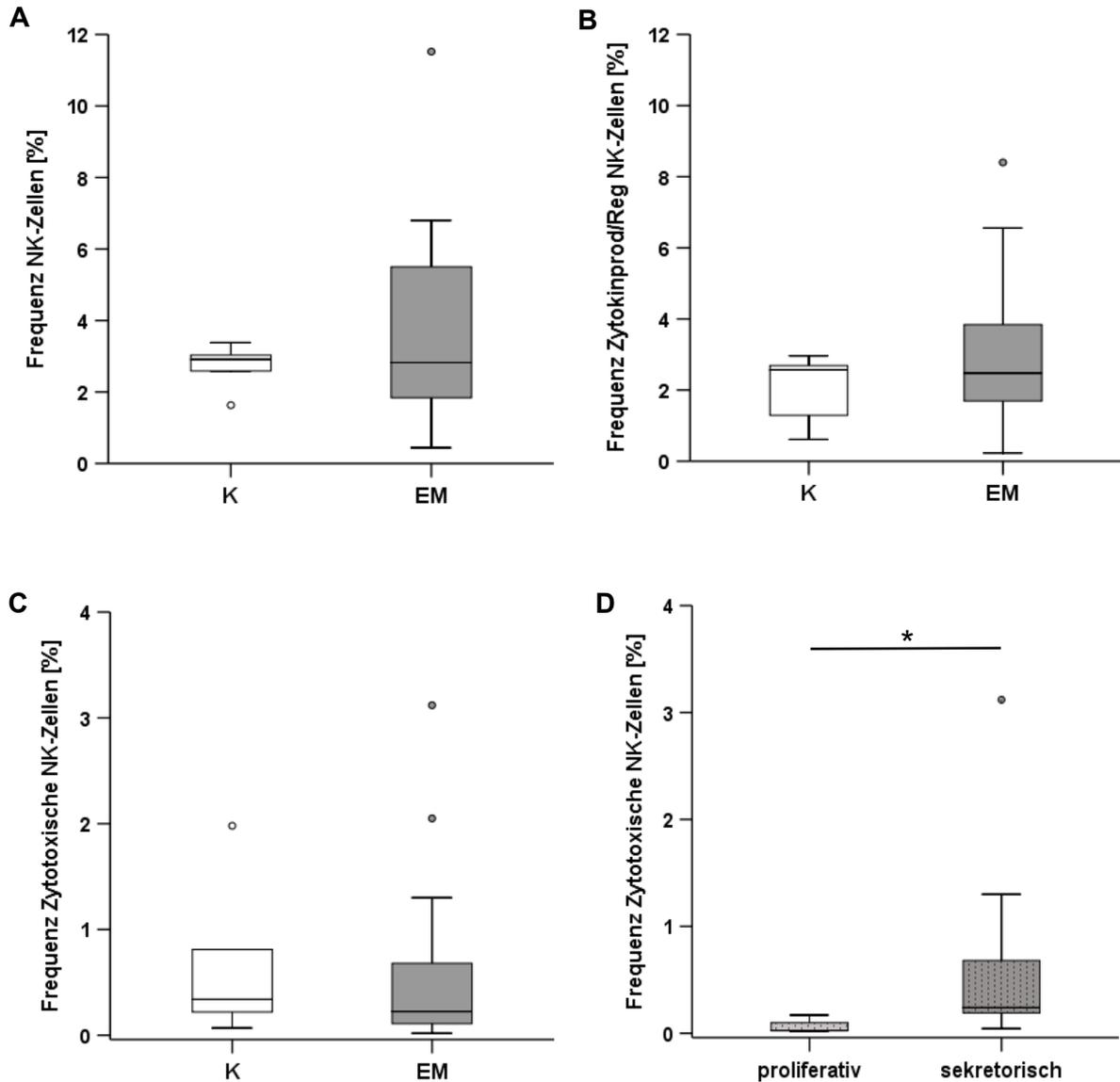
Die Frequenz der CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-Zellen zeigte im Vergleich der Endometriose- und der Kontroll-Gruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied (Median NK-Zellen [%]: Endometriose 2,83 Q<sub>1,3</sub> (1,74 – 5,64), Kontrollen 2,91 Q<sub>1,3</sub> (2,11 – 3,20), Abbildung 12A). Auch der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied (Median NK-Zellen [%]: mild 3,07 Q<sub>1,3</sub> (1,21 – 5,92), schwer 2,68 Q<sub>1,3</sub> (1,77 – 6,74)).

Die Frequenz der CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> zytokinproduzierenden und regulatorischen NK-Zellen zeigte sich in der Endometriose-Gruppe tendenziell erhöht im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Dieses Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz (Median CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK-Zellen [%]: Endometriose 2,48 Q<sub>1,3</sub> (1,62 – 4,26), Kontrollen 2,57 Q<sub>1,3</sub> (0,95 – 2,83), Abbildung 12B). Auch der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab eine leichte Tendenz einer erhöhten Frequenz in der milden Gruppe. Die schwere Gruppe zeigte einen minimal geringeren Median als die Kontroll-Gruppe. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied (Median CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> NK-Zellen [%]: mild 2,73 Q<sub>1,3</sub> (1,15 – 5,00), schwer 2,26 Q<sub>1,3</sub> (1,62 – 4,98)).

Die Frequenz der CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> zytotoxischen NK-Zellen zeigte sich in der Endometriose-Gruppe tendenziell erniedrigt im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. Dieses Ergebnis erreichte keine statistische Signifikanz (Median zytotoxische NK-Zellen [%]: Endometriose 0,23 Q<sub>1,3</sub> (0,09 – 0,84), Kontrollen 0,34 Q<sub>1,3</sub> (0,14 – 1,40), Abbildung 12C). Auch der Vergleich der milden und schweren Endometriose mit den Kontrollen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied, wobei sich der Median in der schweren Endometriose-Gruppe leicht verringert darstellte (Median zytotoxische NK-Zellen [%]: mild 0,23 Q<sub>1,3</sub> (0,06 – 0,63), schwer 0,44 Q<sub>1,3</sub> (0,13 – 1,76)).

Der Vergleich der proliferativen und der sekretorischen Zyklusphase der Endometriose-Gruppe ergab eine signifikante Erhöhung der zytotoxischen NK-Zellen in der sekretorischen Phase (Median zytotoxische NK-Zellen [%]: Endometriose proliferativ 0,03 Q<sub>1,3</sub> (0,02 – 0,17) Endometriose sekretorisch 0,24 Q<sub>1,3</sub> (0,15 – 0,99). Mann-Whitney-U-Test, \**p* = 0,036, Abbildung 12D).

## Ergebnisse

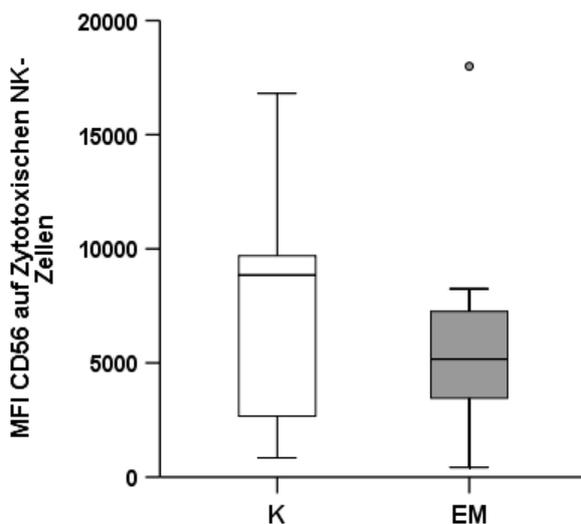


**Abbildung 12: Vergleich der Frequenz [%] der NK-Zellen und NK-Zell-Subpopulationen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Frequenz der **A.** NK-Zellen ( $CD3^+CD56^+$ ), **B.** zytokinproduzierenden und regulatorischen NK-Zellen ( $CD56^{bright}CD16^-$ ), **C.** zytotoxischen NK-Zellen ( $CD56^{dim}CD16^+$ ) von Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **D.** Endometriose-Patientinnen in der proliferativen und sekretorischen Zyklusphase. Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.1.8. Mittlere Fluoreszenz Intensität von CD56 auf den zytotoxischen NK-Zellen

Die MFI von CD56 auf den zytotoxischen NK-Zellen in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen war im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen tendenziell erniedrigt. Das Ergebnis erreichte keine Signifikanz (Median MFI von CD56 auf zytotoxischen NK-Zellen: Endometriose 5165,50  $Q_{1,3}$  (3207,50 – 7339,75), Kontrollen 8845,00  $Q_{1,3}$  (1754,50 – 13253,00), Abbildung 13). Die nähere Analyse der Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte zwar keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch war der Median in den Patientinnen mit schwerer Endometriose tendenziell erhöht (Median MFI CD56 auf zytotoxischen NK-Zellen [pg/ml]: mild 3991,50  $Q_{1,3}$  (2708,50 – 6920,50), schwer 6179,50  $Q_{1,3}$  (4159,75 – 9943,00)).



**Abbildung 13: Vergleich der Mittleren Fluoreszenz Intensität (MFI) von CD56 auf zytotoxischen NK-Zellen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die MFI von CD56 auf Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM). Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

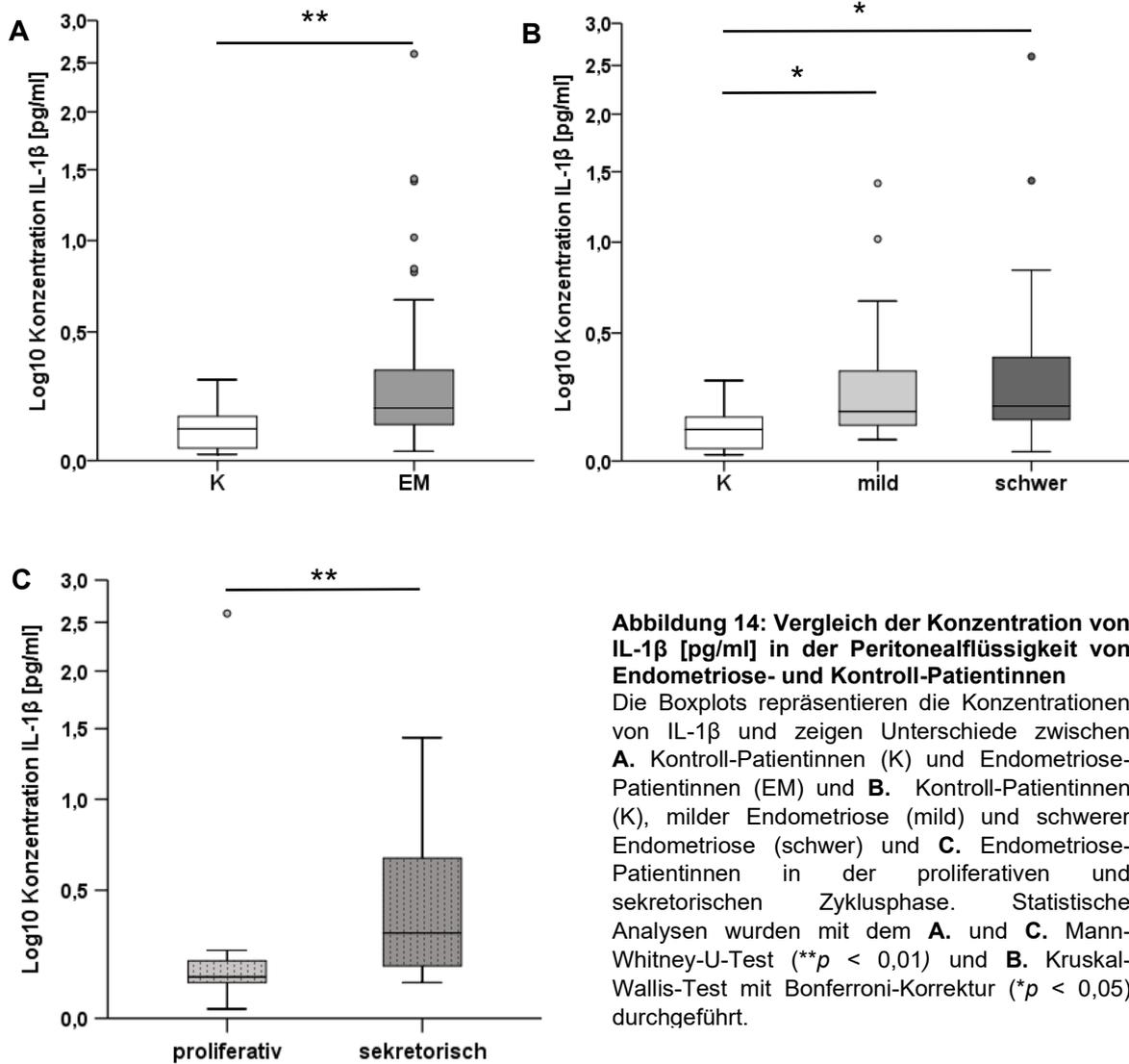
## 4.2. Konzentration von Zytokinen, Interleukinen und Wachstumsfaktoren in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen

Um herauszufinden, ob die Endometriose mit Veränderungen von inflammatorischen Zytokinen, Interleukinen und Wachstumsfaktoren einhergeht, wurde die Konzentration von 27 Botenstoffen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen und von Kontroll-Patientinnen mit Hilfe der LUMINEX Technologie bestimmt und verglichen (Tabelle 12).

### 4.2.1. IL-1 $\beta$

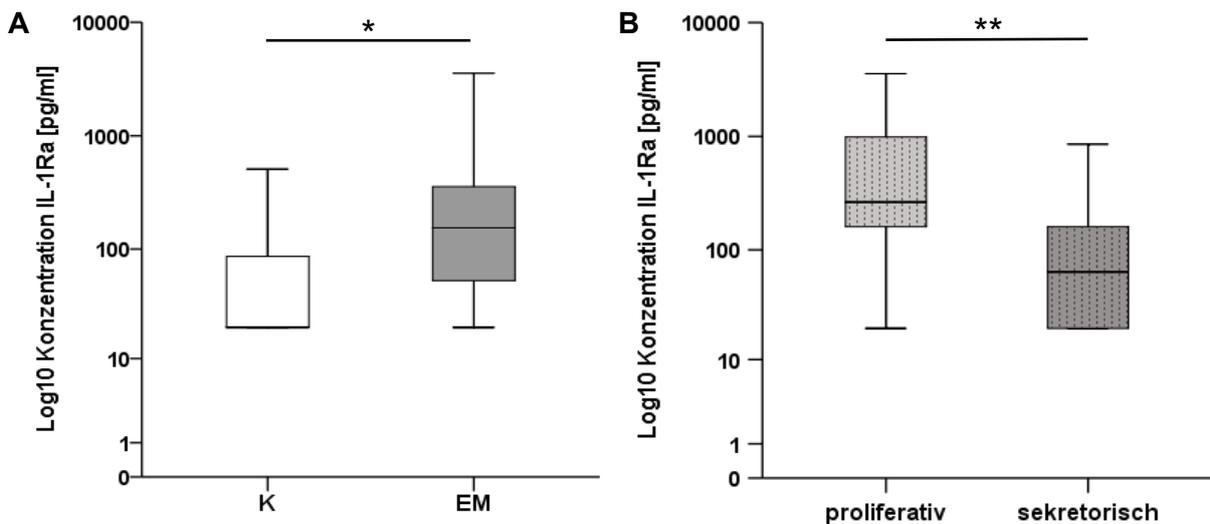
Die Konzentration von IL-1 $\beta$  in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich hoch signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median IL-1 $\beta$  [pg/ml]: Endometriose 0,18 Q<sub>1,3</sub> (0,12 – 0,36), Kontrollen 0,11 Q<sub>1,3</sub> (0,04 – 0,17). Mann-Whitney-U-Test, \*\* $p$  = 0,003, Abbildung 14A). Auch die nähere Analyse der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte sich jeweils signifikant erhöht (Median IL-1 $\beta$  [pg/ml]: mild 0,17 Q<sub>1,3</sub> (0,12 – 0,36), schwer 0,19 Q<sub>1,3</sub> (0,13 – 0,42). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur, mild: \* $p$  = 0,034 und schwer: \* $p$  = 0,013, Abbildung 14B). Die Analyse der IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in den einzelnen Zyklusphasen der Endometriose-Patientinnen ergab eine hoch signifikante Erhöhung in der sekretorischen Phase (Median IL-1 $\beta$  [pg/ml]: proliferativ 0,14 Q<sub>1,3</sub> (0,12 – 0,21), sekretorisch 0,31 Q<sub>1,3</sub> (0,18 – 0,82). Mann-Whitney-U-Test \*\* $p$  = 0,008, Abbildung 14C).

## Ergebnisse



## 4.2.2. IL-1Ra

Die Expression von IL-1Ra in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median IL-1Ra [pg/ml]: Endometriose 154,21  $Q_{1,3}$  (46,72 – 413,14), Kontrollen 19,68  $Q_{1,3}$  (19,67 – 93,01). Mann-Whitney-U-Test,  $*p = 0,023$ , Abbildung 15A). Die nähere Analyse der IL-1Ra-Konzentrationen in Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte zwar keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch war der Median in den Patientinnen mit schwerer Endometriose tendenziell erhöht (Median IL-1Ra [pg/ml]: mild 141,84  $Q_{1,3}$  (55,08 – 691,49), schwer 154,21  $Q_{1,3}$  (45,55 – 263,69)). Die Analyse der IL-1Ra-Konzentrationen in den einzelnen Zyklusphasen der Endometriose-Patientinnen ergab eine hoch signifikante Erhöhung in der proliferativen Phase (Median IL-1Ra [pg/ml]: proliferativ 263,69  $Q_{1,3}$  (157,34 – 1100,52), sekretorisch 123,20  $Q_{1,3}$  (19,67 – 185,97). Mann-Whitney-U-Test,  $**p = 0,003$ , Abbildung 15B).



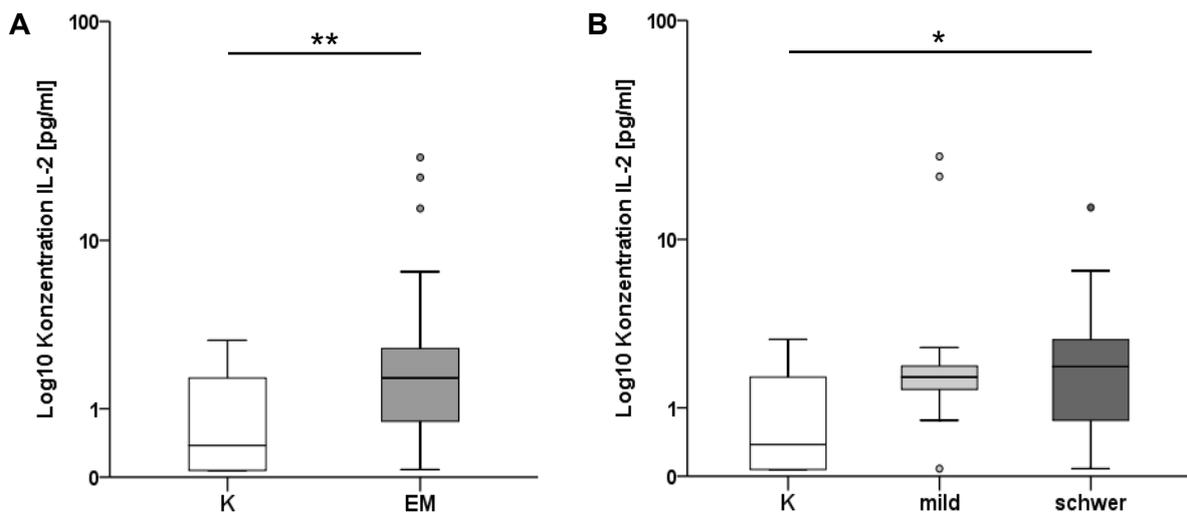
**Abbildung 15: Vergleich der Konzentration von IL-1Ra [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von IL-1Ra und zeigen Unterschiede zwischen **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **B.** Endometriose-Patientinnen in der proliferativen und sekretorischen Zyklusphase. Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ) durchgeführt.

## 4.2.3. IL-2

Die Konzentration von IL-2 in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich hoch signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median IL-2 [pg/ml]: Endometriose 1,73  $Q_{1,3}$  (0,76 – 2,68), Kontrollen 0,42  $Q_{1,3}$  (0,07 – 1,73). Mann-Whitney-U-Test,  $**p = 0,008$ , Abbildung 16A).

Unter milder Endometriose zeigte sich keine signifikant erhöhte IL-2-Konzentration, jedoch eine deutliche Tendenz zu höheren Konzentrationen im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median IL-2 [pg/ml]: mild 1,73  $Q_{1,3}$  (1,25 – 2,09)). Speziell die Frauen mit schwerer Endometriose wiesen eine signifikant höhere peritoneale Konzentration an IL-2 verglichen mit den Kontroll-Patientinnen auf (Median IL-2 [pg/ml]: schwer 2,05  $Q_{1,3}$  (0,76 – 3,15). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur, mild:  $p = 0,062$  und schwer:  $*p = 0,037$ , Abbildung 16B).

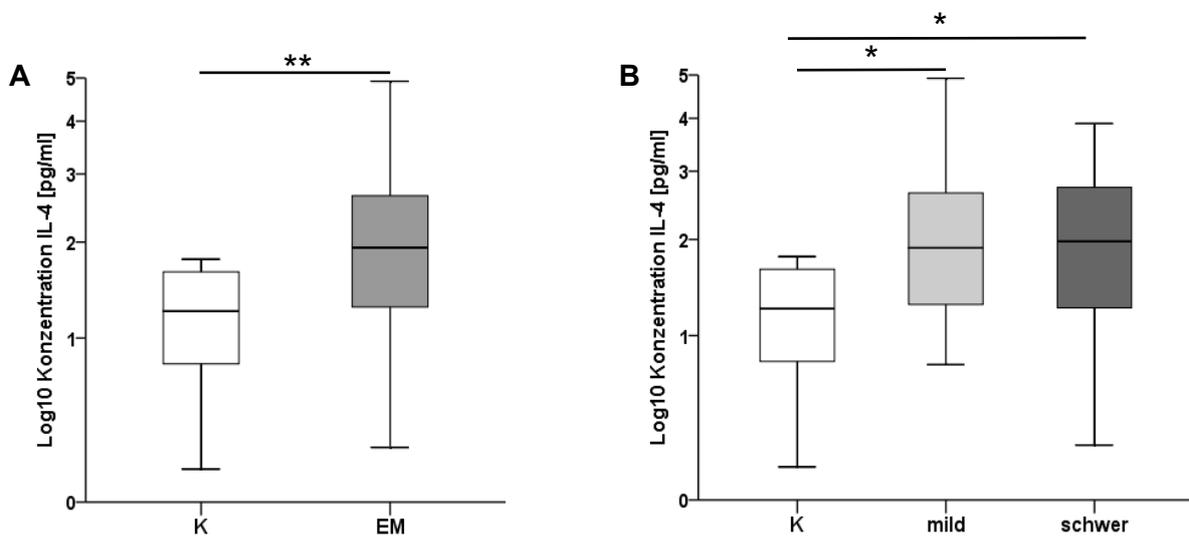


**Abbildung 16: Vergleich der Konzentration von IL-2 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von IL-2 und zeigen Unterschiede zwischen **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **B.** Kontroll-Patientinnen (K), milder Endometriose (mild) und schwerer Endometriose (schwer). Statistische Analysen wurden mit dem **A.** Mann-Whitney-U-Test ( $**p < 0,01$ ) und **B.** Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $*p < 0,05$ ) durchgeführt.

## 4.2.4. IL-4

Die Konzentration von IL-4 in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich hoch signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median IL-4 [pg/ml]: Endometriose 1,93  $Q_{1,3}$  (1,25 – 2,67), Kontrollen 1,25  $Q_{1,3}$  (0,76 – 1,65). Mann-Whitney-U-Test,  $**p = 0,003$ , Abbildung 17A). Auch die nähere Analyse der IL-4-Konzentrationen in Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte sich jeweils signifikant erhöht. (Median IL-4 [pg/ml]: mild 1,90  $Q_{1,3}$  (1,25 – 2,67), schwer 1,98  $Q_{1,3}$  (1,20 – 2,86). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur, mild:  $*p = 0,017$  und schwer:  $*p = 0,022$ , Abbildung 17B).



**Abbildung 17: Vergleich der Konzentration von IL-4 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von IL-4 und zeigen Unterschiede zwischen **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **B.** Kontroll-Patientinnen (K), milder Endometriose (mild) und schwerer Endometriose (schwer). Statistische Analysen wurden mit dem **A.** Mann-Whitney-U-Test ( $**p < 0,01$ ) und **B.** Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $*p < 0,05$ ) durchgeführt.

## 4.2.5. IL-5

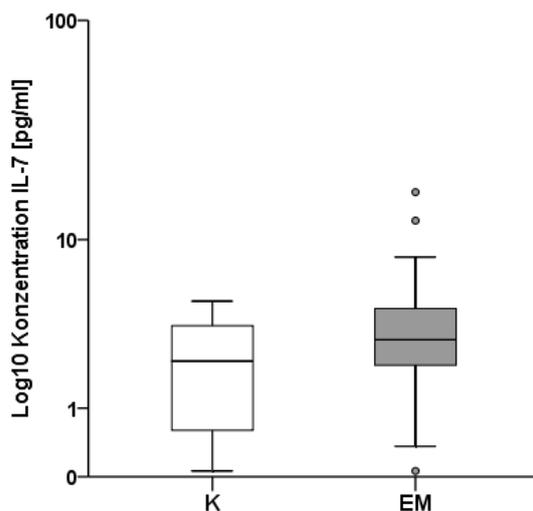
Die gemessene Konzentration von IL-5 lag bei 40 von 55 Proben unterhalb der Nachweisgrenze. Deswegen wurde IL-5 von der Analyse ausgeschlossen.

#### 4.2.6. IL-6

Die gemessene Konzentration von IL-6 lag bei 25 von 55 Proben unterhalb der Nachweisgrenze. Deswegen wurde IL-6 von der Analyse ausgeschlossen.

#### 4.2.7. IL-7

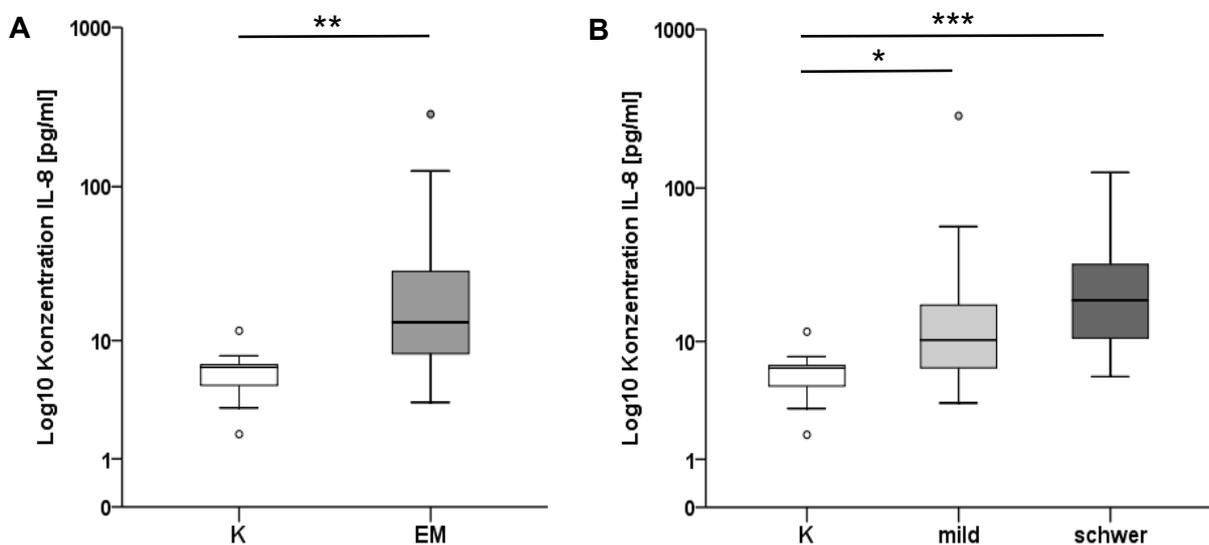
Die Konzentration von IL-7 in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen tendenziell erhöht. Dieses Ergebnis erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Median IL-7 [pg/ml]: Endometriose 3,00  $Q_{1,3}$  (1,97 – 4,55), Kontrollen 2,23  $Q_{1,3}$  (0,49 – 3,66), Abbildung 18). Auch die nähere Analyse der einzelnen Endometriosestadien ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied (Median IL-7 [pg/ml]: mild 2,97  $Q_{1,3}$  (2,15 – 3,62), schwer 3,33  $Q_{1,3}$  (1,74 – 5,18)).



**Abbildung 18: Vergleich der Konzentration von IL-7 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**  
Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von IL-7 in Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM). Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

## 4.2.8. IL-8

Die Konzentration von IL-8 in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich höchst signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median IL-8 [pg/ml]: Endometriose 13,31  $Q_{1,3}$  (8,04 – 28,85), Kontrollen 6,48  $Q_{1,3}$  (4,41 – 6,77). Mann-Whitney-U-Test,  $***p = 0,000$ , Abbildung 19A). Auch die nähere Analyse der IL-8-Konzentrationen in Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte sich ebenfalls jeweils signifikant bzw. höchst signifikant erhöht. (Median IL-8 [pg/ml]: mild 10,23  $Q_{1,3}$  (6,37 – 20,46), schwer 18,94  $Q_{1,3}$  (10,50 – 34,71). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur, mild:  $*p = 0,032$  und schwer:  $***p = 0,000$ , Abbildung 19B).



**Abbildung 19: Vergleich der Konzentration von IL-8 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

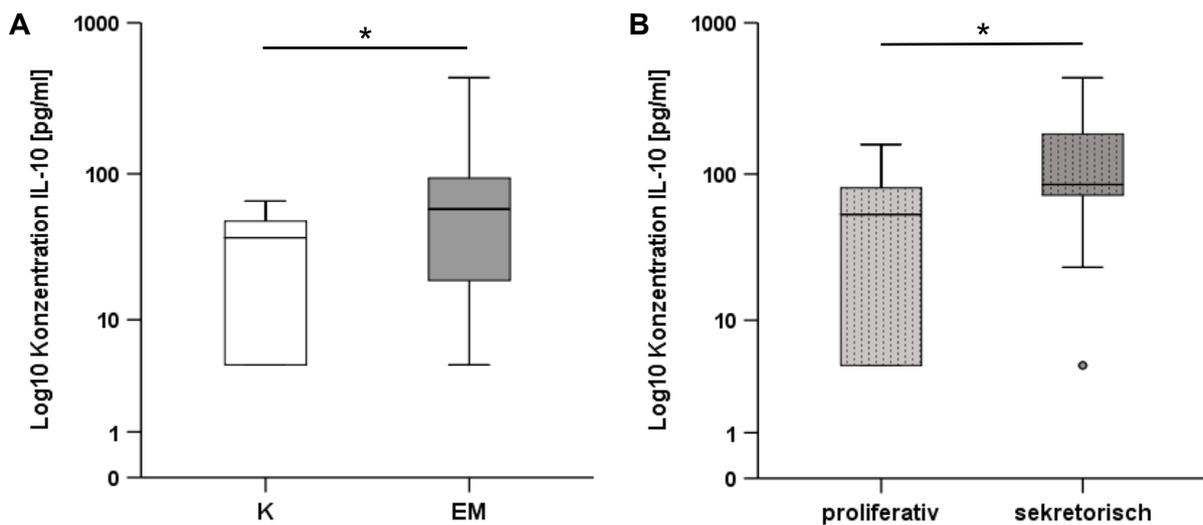
Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von IL-8 und zeigen Unterschiede zwischen **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **B.** Kontroll-Patientinnen (K), milder Endometriose (mild) und schwerer Endometriose (schwer). Statistische Analysen wurden mit dem **A.** Mann-Whitney-U-Test ( $***p < 0,001$ ) und **B.** Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $*p < 0,05$ ;  $***p < 0,001$ ) durchgeführt.

## 4.2.9. IL-9

Die gemessene Konzentration von IL-9 lag bei 26 von 55 Proben unterhalb der Nachweisgrenze. Deswegen wurde IL-9 von der Analyse ausgeschlossen.

## 4.2.10. IL-10

Die Konzentration von IL-10 in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich signifikant höher im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median IL-10 [pg/ml]: Endometriose 58,12  $Q_{1,3}$  (17,81 – 97,44), Kontrollen 37,16  $Q_{1,3}$  (4,55 – 49,34). Mann-Whitney-U-Test,  $*p = 0,022$ , Abbildung 20A). Die nähere Analyse der IL-10-Konzentrationen in Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied (Median IL-10 [pg/ml]: mild 53,75  $Q_{1,3}$  (4,55 – 97,44), schwer 66,82 (30,31 – 110,71)). Die Analyse der IL-10-Konzentrationen in den einzelnen Zyklusphasen der Endometriose-Patientinnen ergab eine signifikante Erhöhung in der sekretorischen Phase (Median IL-10 [pg/ml]: proliferativ 53,75  $Q_{1,3}$  (4,55 – 81,93), sekretorisch 108,61  $Q_{1,3}$  (76,55 – 191,40). Mann-Whitney-U-Test  $*p = 0,021$ , Abbildung 20B).

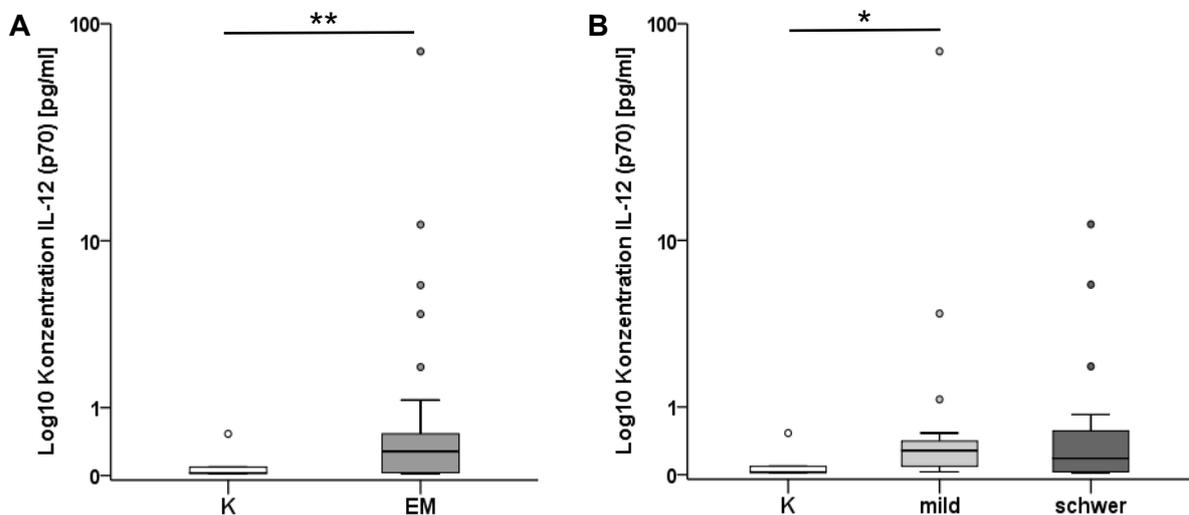


**Abbildung 20: Vergleich der Konzentration von IL-10 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von IL-10 und zeigen Unterschiede zwischen **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **B.** Endometriose-Patientinnen in der proliferativen und sekretorischen Zyklusphase. Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ( $*p < 0,05$ ) durchgeführt.

## 4.2.11. IL-12 (p70)

Die Konzentration von IL-12 (p70) in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich hoch signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median IL-12 (p70) [pg/ml]: Endometriose 0,28  $Q_{1,3}$  (0,03 – 0,53), Kontrollen 0,03  $Q_{1,3}$  (0,02 – 0,09). Mann-Whitney-U-Test,  $**p = 0,007$ , Abbildung 21A). Die Frauen mit milder Endometriose wiesen eine signifikant höhere peritoneale Konzentration an IL-12 (p70) verglichen mit den Kontroll-Patientinnen auf (Median IL-12 (p70) [pg/ml]: mild 0,28  $Q_{1,3}$  (0,08 – 0,44)). Unter schwerer Endometriose zeigte sich keine signifikant erhöhte IL-12 (p70)-Konzentration. (Median IL-12 (p70) [pg/ml]: schwer 0,19 (0,03 – 0,58). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur, mild:  $*p = 0,013$  und schwer:  $p = 0,133$ , Abbildung 21B).

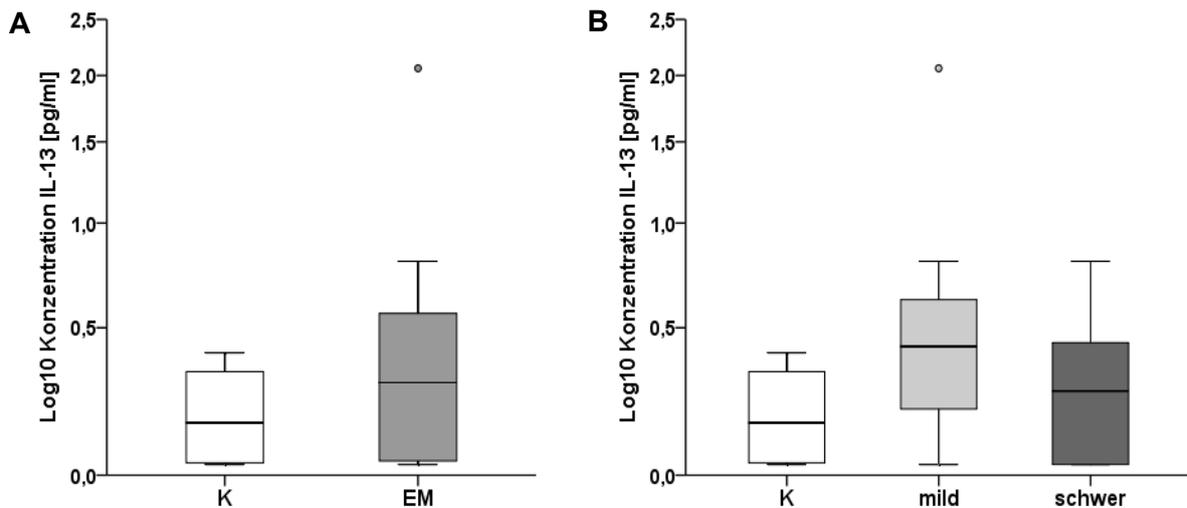


**Abbildung 21: Vergleich der Konzentration von IL-12 (p70) [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von IL-12 (p70) und zeigen Unterschiede zwischen **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **B.** Kontroll-Patientinnen (K), milder Endometriose (mild) und schwerer Endometriose (schwer). Statistische Analysen wurden mit dem **A.** Mann-Whitney-U-Test ( $**p < 0,01$ ) und **B.** Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $*p < 0,05$ ) durchgeführt.

## 4.2.12. IL-13

Der Vergleich der Konzentration von IL-13 in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen und Kontroll-Patientinnen zeigte eine deutliche Erhöhung in der Endometriose-Gruppe, jedoch erreichte das Ergebnis keine Signifikanz (Median IL-13 [pg/ml]: Endometriose 0,29  $Q_{1,3}$  (0,04 – 0,58), Kontrollen 0,16  $Q_{1,3}$  (0,03 – 0,35). Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,086$ , Abbildung 22A). Die Frauen mit milder Endometriose wiesen eine höhere peritoneale Konzentration an IL-13 verglichen mit den Kontroll-Patientinnen auf, welche knapp keine statistische Signifikanz erreichte (Median IL-13 [pg/ml]: mild 0,43  $Q_{1,3}$  (0,19 – 0,64). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur,  $p = 0,053$ , Abbildung 22B). Unter schwerer Endometriose zeigte sich kein Unterschied zu der Kontroll-Gruppe (Median IL-13 [pg/ml]: schwer 0,26  $Q_{1,3}$  (0,03 – 0,46). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur,  $p = 1,000$ , Abbildung 22B).



**Abbildung 22: Vergleich der Konzentration von IL-13 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

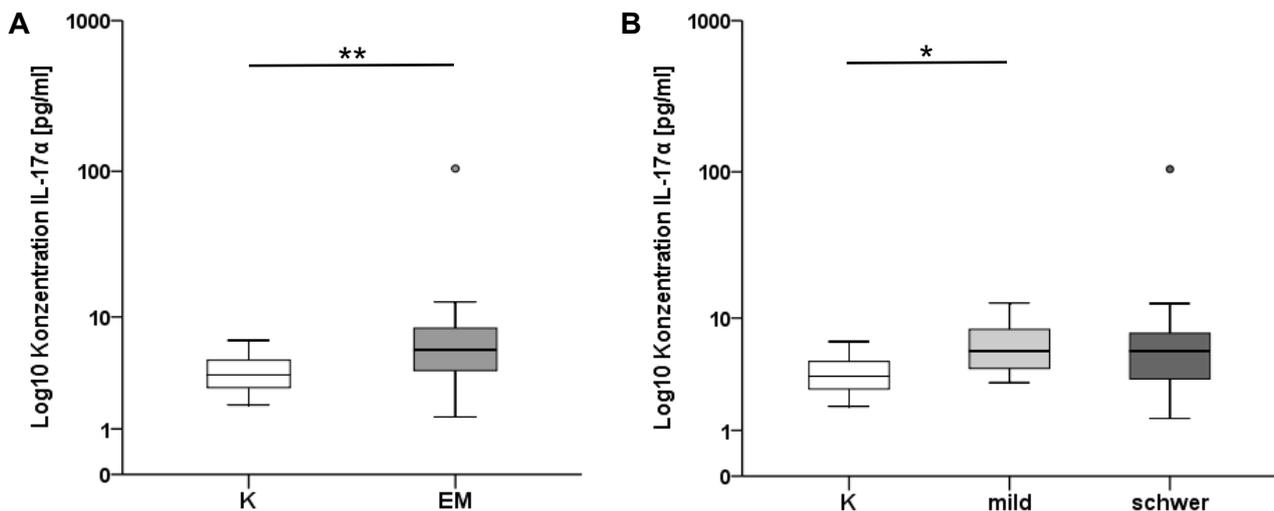
Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von IL-13 in **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **B.** Kontroll-Patientinnen (K), milder Endometriose (mild) und schwerer Endometriose (schwer). Statistische Analysen wurden mit dem **A.** Mann-Whitney-U-Test und **B.** Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

## 4.2.13. IL-15

Die gemessene Konzentration von IL-15 lag bei 53 von 55 Proben unterhalb der Nachweisgrenze. Deswegen wurde IL-15 von der Analyse ausgeschlossen.

4.2.14. IL-17 $\alpha$ 

Die Konzentration von IL-17 $\alpha$  in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich hoch signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median IL-17 $\alpha$  [pg/ml]: Endometriose 5,67  $Q_{1,3}$  (3,81 – 8,28), Kontrollen 3,56  $Q_{1,3}$  (2,69 – 4,86). Mann-Whitney-U-Test,  $**p = 0,009$ , Abbildung 23A). Die Frauen mit milder Endometriose wiesen eine signifikant höhere peritoneale Konzentration an IL-17 $\alpha$  verglichen mit den Kontroll-Patientinnen auf (Median IL-17 $\alpha$  [pg/ml]: mild 5,67  $Q_{1,3}$  (4,06 – 8,28)). Unter schwerer Endometriose zeigte sich kein Unterschied zu der Kontroll-Gruppe (Median IL-17 $\alpha$  [pg/ml]: schwer 5,67  $Q_{1,3}$  (3,25 – 8,02). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur, mild:  $*p = 0,031$  und schwer:  $p = 0,096$ , Abbildung 23B).

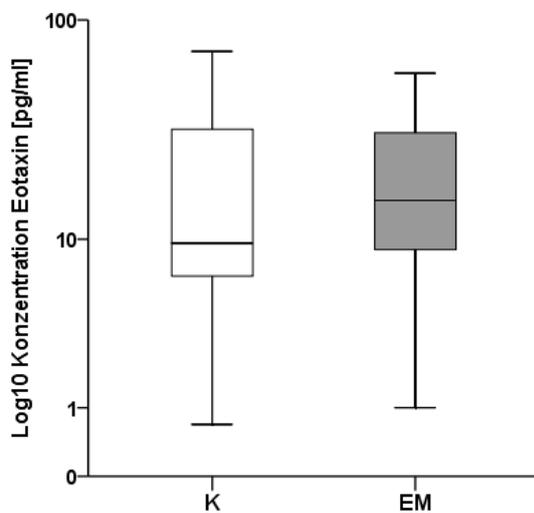


**Abbildung 23: Vergleich der Konzentration von IL-17 $\alpha$  [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von IL-17 $\alpha$  und zeigen Unterschiede zwischen **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **B.** Kontroll-Patientinnen (K), milder Endometriose (mild) und schwerer Endometriose (schwer). Statistische Analysen wurden mit dem **A.** Mann-Whitney-U-Test ( $**p < 0,01$ ) und **B.** Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $*p < 0,05$ ) durchgeführt.

## 4.2.15. Eotaxin

Die Konzentration von Eotaxin in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median Eotaxin [pg/ml]: Endometriose 15,31  $Q_{1,3}$  (8,89 – 32,26), Kontrollen 9,57  $Q_{1,3}$  (6,22 – 36,21). Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,382$ , Abbildung 24). Die nähere Analyse der Eotaxin-Konzentrationen in Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte keine signifikanten Unterschiede (Median Eotaxin [pg/ml]: mild 9,23  $Q_{1,3}$  (7,05 – 27,37), schwer 18,80  $Q_{1,3}$  (11,81 – 38,38)).

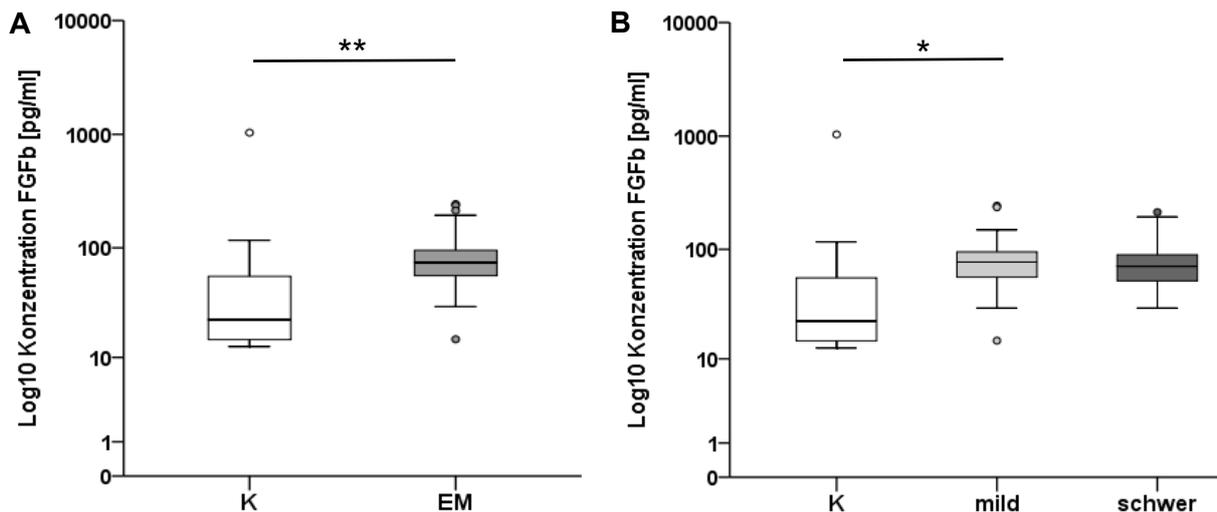


**Abbildung 24: Vergleich der Konzentration von Eotaxin [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von Eotaxin in Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM). Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

## 4.2.16. FGFb

Die Konzentration des FGFb in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich hoch signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median FGFb [pg/ml]: Endometriose 73,91  $Q_{1,3}$  (54,44 – 95,11), Kontrollen 23,46  $Q_{1,3}$  (13,84 – 59,95). Mann-Whitney-U-Test.  $**p = 0,004$ , Abbildung 25A). Speziell die Frauen mit milder Endometriose wiesen eine signifikant höhere peritoneale Konzentration an FGFb verglichen mit den Kontroll-Patientinnen auf (Median: mild 77,17  $Q_{1,3}$  (54,44 – 100,44)). Unter schwerer Endometriose zeigte sich knapp kein signifikanter Unterschied zu der Kontroll-Gruppe, jedoch zeigte sich der Median deutlich erhöht. (Median FGFb [pg/ml]: schwer 70,65  $Q_{1,3}$  (50,48 – 89,36). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur, mild:  $*p = 0,014$  und schwer:  $p = 0,058$ , Abbildung 25B).

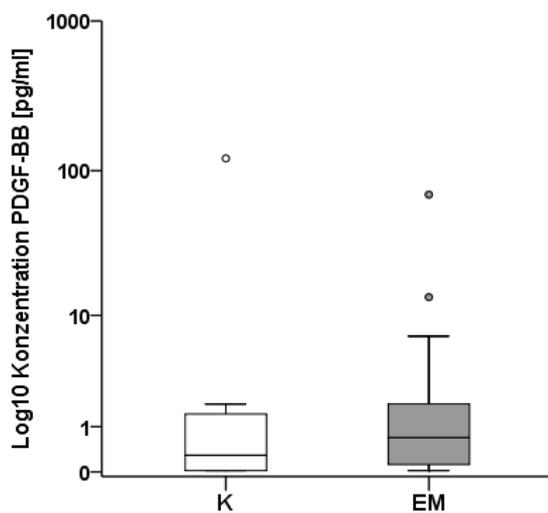


**Abbildung 25: Vergleich der Konzentration von FGFb [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von FGFb und zeigen Unterschiede zwischen **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **B.** Kontroll-Patientinnen (K), milder Endometriose (mild) und schwerer Endometriose (schwer). Statistische Analysen wurden mit dem **A.** Mann-Whitney-U-Test ( $**p < 0,01$ ) und **B.** Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $*p < 0,05$ ) durchgeführt.

## 4.2.17. PDGF-BB

Die Konzentration von PDGF-BB in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median PDGF-BB [pg/ml]: Endometriose 0,69  $Q_{1,3}$  (0,12 – 1,83), Kontrollen 0,33  $Q_{1,3}$  (0,02 – 1,43), Abbildung 26). Die nähere Analyse der PDGF-BB-Konzentrationen in Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte keine signifikanten Unterschiede (Median PDGF-BB [pg/ml]: mild 0,69  $Q_{1,3}$  (0,24 – 1,25), schwer 0,69  $Q_{1,3}$  (0,12 – 2,84)).

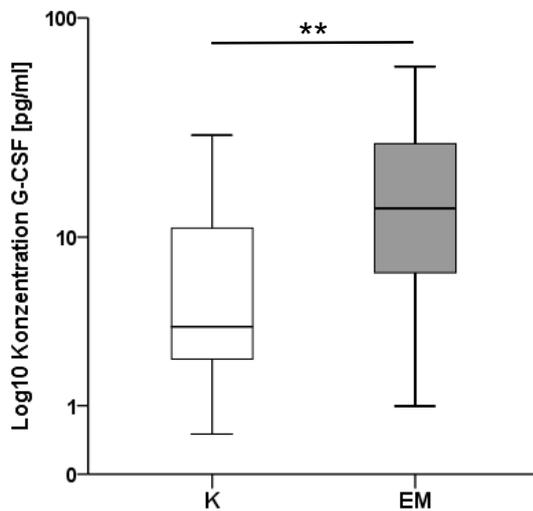


**Abbildung 26: Vergleich der Konzentration von PDGF-BB [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von PDGF-BB in Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM). Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

## 4.2.18. G-CSF

Die Konzentration des G-CSF in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich hoch signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median G-CSF [pg/ml]: Endometriose 13,70  $Q_{1,3}$  (6,50 – 27,38), Kontrollen 3,44  $Q_{1,3}$  (2,18 – 12,09). Mann-Whitney-U-Test,  $**p = 0,006$ , Abbildung 27). Die nähere Analyse der G-CSF-Konzentrationen in Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte sich ebenfalls jeweils signifikant erhöht. (Median G-CSF [pg/ml]: mild 14,02  $Q_{1,3}$  (6,57 – 22,96), schwer 12,46  $Q_{1,3}$  (6,17 – 31,02). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur, mild:  $*p = 0,033$  und schwer:  $*p = 0,044$ ).



**Abbildung 27: Vergleich der Konzentration von G-CSF [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**  
Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von G-CSF und zeigen Unterschiede zwischen Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM). Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ( $**p < 0,01$ ) durchgeführt.

## 4.2.19. GM-CSF

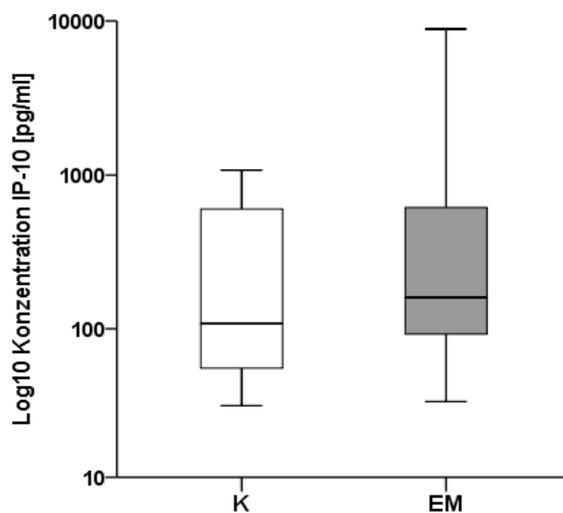
Die gemessene Konzentration von GM-CSF lag bei 44 von 55 Proben unterhalb der Nachweisgrenze. Deswegen wurde GM-CSF von der Analyse ausgeschlossen.

4.2.20. IFN- $\gamma$ 

Die gemessene Konzentration von IFN- $\gamma$  lag bei 21 von 55 Proben unterhalb der Nachweisgrenze. Deswegen wurde IFN- $\gamma$  von der Analyse ausgeschlossen.

## 4.2.21. IP-10

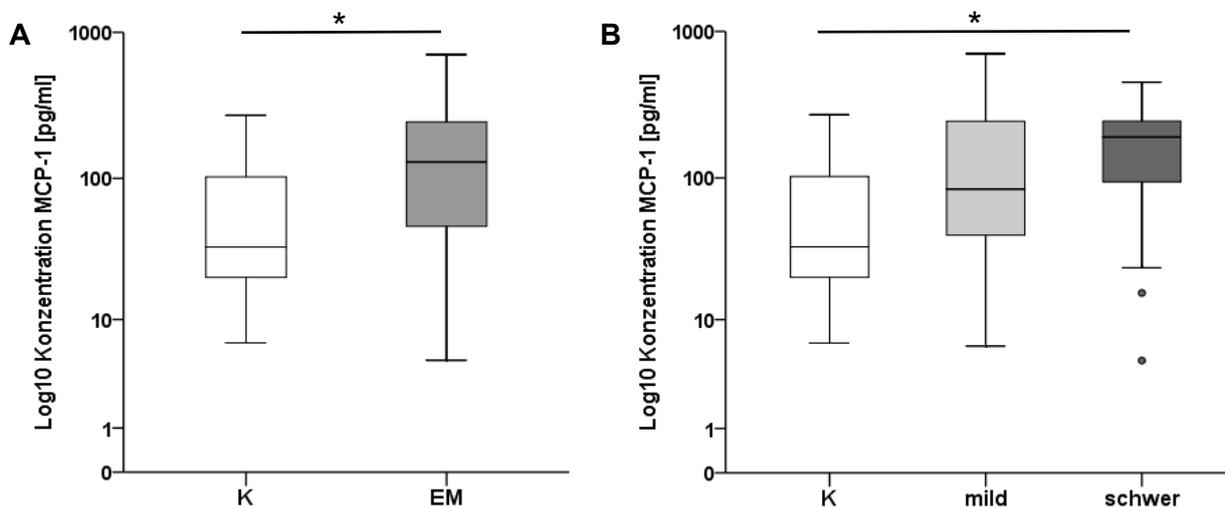
Die Konzentration von IP-10 in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median IP-10 [pg/ml]: Endometriose 160,21  $Q_{1,3}$  (88,10 – 626,03), Kontrollen 108,32  $Q_{1,3}$  (54,92 – 638,56), Abbildung 28). Die nähere Analyse der IP-10-Konzentrationen in Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte keine signifikanten Unterschiede (Median IP-10 [pg/ml]: mild 151,71  $Q_{1,3}$  (97,89 – 576,18), schwer 204,63  $Q_{1,3}$  (79,69 – 1257,32)).



**Abbildung 28: Vergleich der Konzentration von IP-10 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**  
Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von IP-10 in Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM). Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

## 4.2.22. MCP-1

Die Konzentration des MCP-1 in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich signifikant höher im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median MCP-1 [pg/ml]: Endometriose 130,88  $Q_{1,3}$  (44,97 – 245,59), Kontrollen 34,08  $Q_{1,3}$  (19,71 – 105,94). Mann-Whitney-U-Test,  $*p = 0,034$ , Abbildung 29A). Speziell die Frauen mit schwerer Endometriose wiesen eine signifikant höhere peritoneale Konzentration an MCP-1 verglichen mit den Kontroll-Patientinnen auf (Median MCP-1 [pg/ml]: schwer 190,91  $Q_{1,3}$  (91,95 – 247,75)). Unter milder Endometriose zeigte sich kein Unterschied zu der Kontroll-Gruppe (Median MCP-1 [pg/ml]: mild 83,73  $Q_{1,3}$  (40,04 – 249,72) Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur, mild:  $p = 0,513$  und schwer:  $*p = 0,036$ , Abbildung 29B).

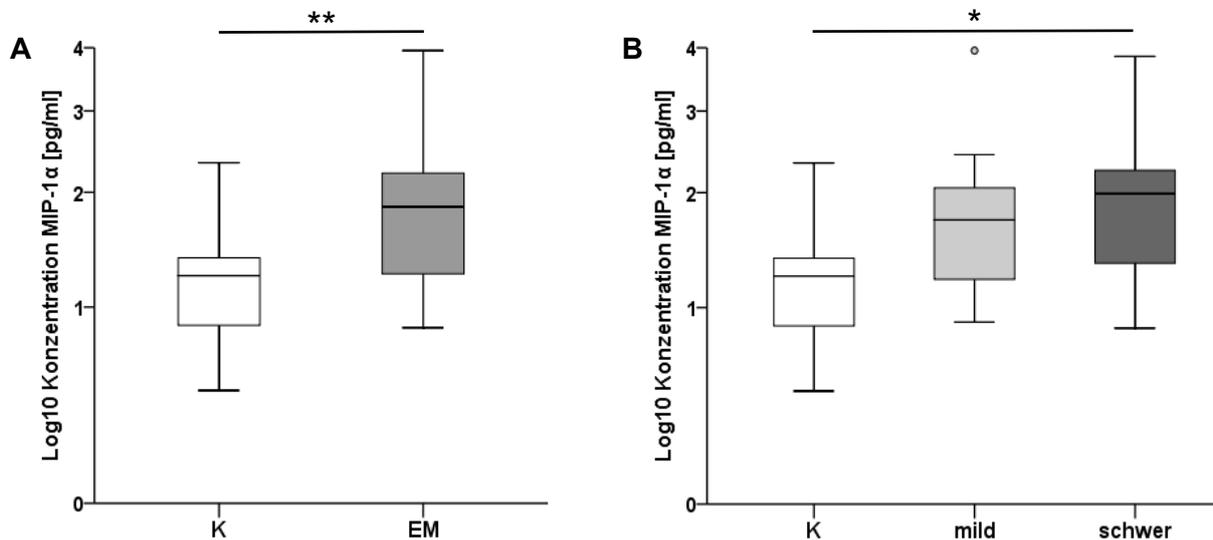


**Abbildung 29: Vergleich der Konzentration von MCP-1 [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von MCP-1 und zeigen Unterschiede zwischen **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **B.** Kontroll-Patientinnen (K), milder Endometriose (mild) und schwerer Endometriose (schwer). Statistische Analysen wurden mit dem **A.** Mann-Whitney-U-Test sowie **B.** Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt ( $*p < 0,05$ ).

4.2.23. Mip-1 $\alpha$ 

Die Konzentration des MIP-1 $\alpha$  in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich hoch signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median MIP-1 $\alpha$  [pg/ml]: Endometriose 1,85  $Q_{1,3}$  (1,24 – 2,22), Kontrollen 1,24  $Q_{1,3}$  (0,86 – 1,40). Mann-Whitney-U-Test,  $**p = 0,009$ , Abbildung 30A). Speziell die Frauen mit schwerer Endometriose wiesen eine signifikant höhere peritoneale Konzentration an MIP-1 $\alpha$  verglichen mit den Kontroll-Patientinnen auf (Median MIP-1 $\alpha$  [pg/ml]: schwer 1,99  $Q_{1,3}$  (1,32 – 2,25)). Unter milder Endometriose zeigte sich kein Unterschied zu der Kontroll-Gruppe (Median MIP-1 $\alpha$  [pg/ml]: mild 1,73  $Q_{1,3}$  (1,19 – 2,07). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur, mild:  $p = 0,135$  und schwer:  $*p = 0,018$ , Abbildung 30B).

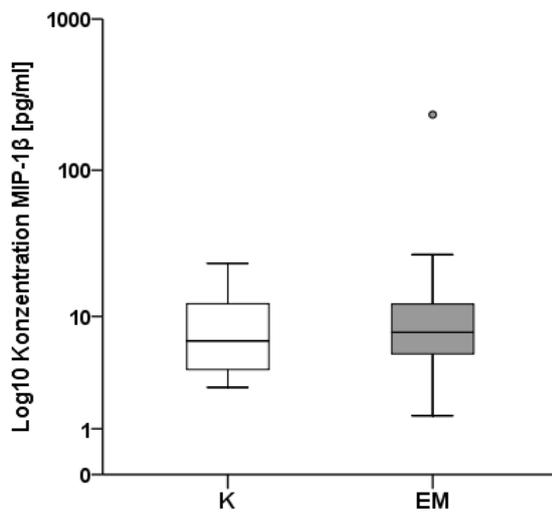


**Abbildung 30: Vergleich der Konzentration von MIP-1 $\alpha$  [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von MIP-1 $\alpha$  und zeigen Unterschiede zwischen **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **B.** Kontroll-Patientinnen (K), milder Endometriose (mild) und schwerer Endometriose (schwer). Statistische Analysen wurden mit dem **A.** Mann-Whitney-U-Test ( $**p < 0,01$ ) und **B.** Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $*p < 0,05$ ) durchgeführt.

4.2.24. MIP-1 $\beta$ 

Die Konzentration von MIP-1 $\beta$  in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median MIP-1 $\beta$  [pg/ml]: Endometriose 7,65  $Q_{1,3}$  (5,13 – 12,34), Kontrollen 6,58  $Q_{1,3}$  (3,55 – 12,44), Abbildung 31). Die nähere Analyse der MIP-1 $\beta$ -Konzentrationen in Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte keine signifikanten Unterschiede (Median MIP-1 $\beta$  [pg/ml]: mild 7,42  $Q_{1,3}$  (4,40 – 11,84), schwer 8,18  $Q_{1,3}$  (5,90 – 13,68)).

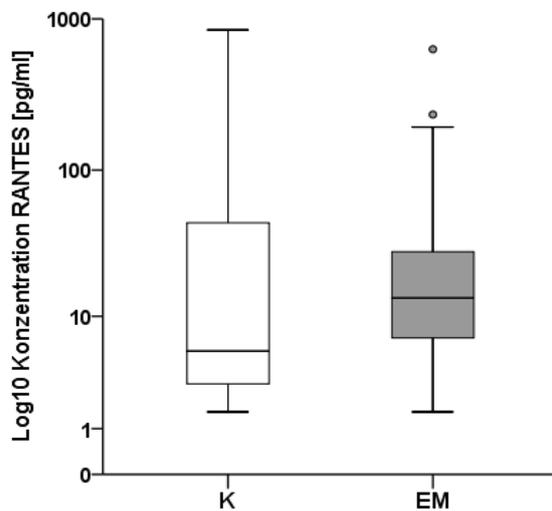


**Abbildung 31: Vergleich der Konzentration von MIP-1 $\beta$  [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von MIP-1 $\beta$  in Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM). Statistische Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

## 4.2.25. RANTES

Die Konzentration von RANTES in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median RANTES [pg/ml]: Endometriose 13,54  $Q_{1,3}$  (6,88 – 30,06), Kontrollen 5,49  $Q_{1,3}$  (2,83 – 46,11), Abbildung 32). Die nähere Analyse der RANTES-Konzentrationen in Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte keine signifikanten Unterschiede (Median RANTES [pg/ml]: mild 14,70  $Q_{1,3}$  (6,44 – 27,21), schwer 12,08  $Q_{1,3}$  (7,67 – 64,54)).

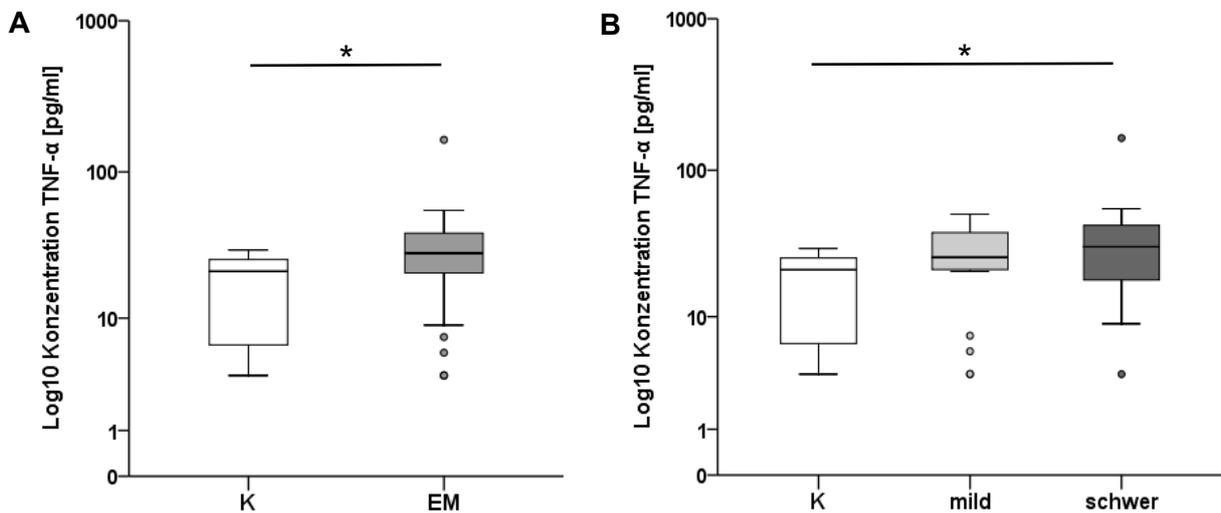


**Abbildung 32: Vergleich der Konzentration von RANTES [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von RANTES in Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM). Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

4.2.26. TNF- $\alpha$ 

Die Konzentration des TNF- $\alpha$  in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median TNF- $\alpha$  [pg/ml]: Endometriose 28,45  $Q_{1,3}$  (20,32 – 39,70), Kontrollen 21,43  $Q_{1,3}$  (5,95 – 26,06). Mann-Whitney-U-Test, \* $p = 0,013$ , Abbildung 33A). Speziell die Frauen mit schwerer Endometriose wiesen eine signifikant höhere peritoneale Konzentration an TNF- $\alpha$  verglichen mit den Kontroll-Patientinnen auf (Median MIP-1 $\alpha$  [pg/ml]: schwer 30,77  $Q_{1,3}$  (17,86 – 43,30)). Unter milder Endometriose zeigte sich kein Unterschied zu der Kontroll-Gruppe (Median TNF- $\alpha$  [pg/ml]: mild 26,06  $Q_{1,3}$  (21,27 – 38,48). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur, mild:  $p = 0,149$  und schwer: \* $p = 0,031$ , Abbildung 33B).



**Abbildung 33: Vergleich der Konzentration von TNF- $\alpha$  [pg/ml] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und zeigen Unterschiede zwischen **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **B.** Kontroll-Patientinnen (K), milder Endometriose (mild) und schwerer Endometriose (schwer). Statistische Analysen wurden mit dem **A.** Mann-Whitney-U-Test sowie **B.** Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt (\* $p < 0,05$ ).

## 4.2.27. VEGF

Die gemessene Konzentration von VEGF lag bei 40 von 55 Proben unterhalb der Nachweisgrenze. Deswegen wurde VEGF von der Analyse ausgeschlossen.

## Ergebnisse

**Tabelle 13:** Konzentrationen der Analyten in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen (Luminex)

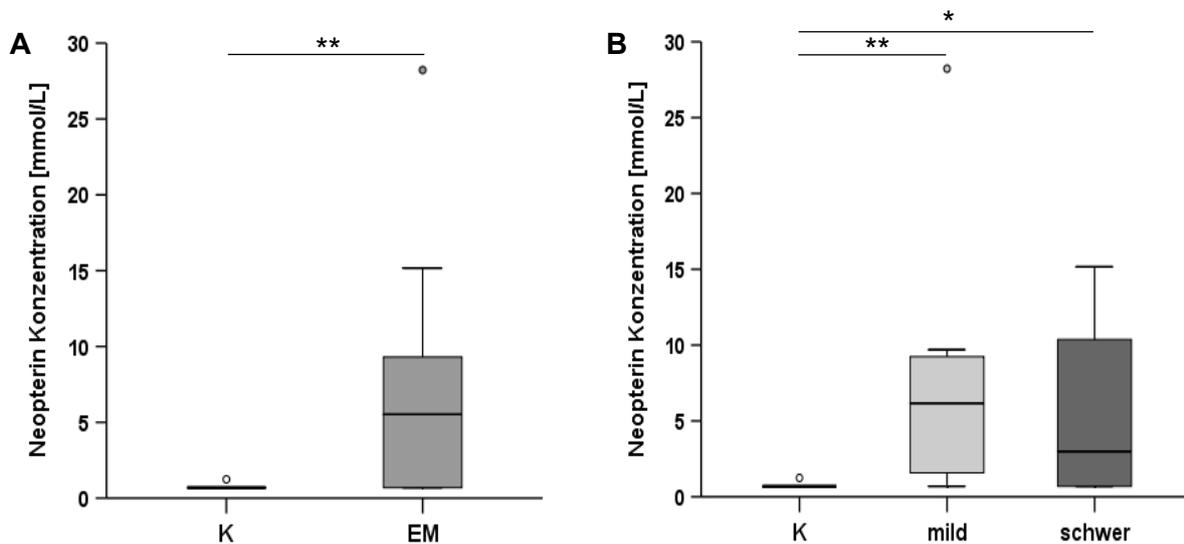
Analyten	Kontrollen	Endometriose	p-Wert <sub>EM</sub>	Mild	p-Wert <sub>Mild</sub>	Schwer	p-Wert <sub>Schwer</sub>
<b>IL-1β</b>	0,11 (0,04; 0,17)	0,18 (0,12; 0,36)	0,003**	0,17 (0,12; 0,36)	0,034*	0,19 (0,13; 0,42)	0,013*
<b>IL-1Ra</b>	19,68 (19,67; 93,01)	154,21 (46,72; 413,14)	0,023*	141,84 (55,08; 691,49)	NS	154,21 (45,55; 263,69)	NS
<b>IL-2</b>	0,42 (0,07; 1,73)	1,73 (0,76; 2,68)	0,008**	1,73 (1,25; 2,09)	NS	2,05 (0,76; 3,15)	0,037*
<b>IL-4</b>	1,25 (0,76; 1,65)	1,93 (1,25; 2,67)	0,003**	1,90 (1,25; 2,67)	0,017*	1,98 (1,20; 2,86)	0,022*
<b>IL-7</b>	2,23 (0,49; 3,66)	3,00 (1,97; 4,55)	NS	2,97 (2,15; 3,62)	NS	3,33 (1,74; 5,18)	NS
<b>IL-8</b>	6,48 (4,41; 6,77)	13,31 (8,04; 28,85)	0,000***	10,23 (6,37; 20,46)	0,032*	18,94 (10,5; 34,71)	0,000***
<b>IL-10</b>	37,16 (4,55; 49,34)	58,12 (17,81; 97,44)	0,022*	53,75 (4,55; 97,44)	NS	66,82 (30,31; 110,71)	NS
<b>IL-12 (p70)</b>	0,03 (0,02; 0,09)	0,28 (0,03; 0,53)	0,007**	0,28 (0,08; 0,44)	0,013*	0,19 (0,03; 0,58)	NS
<b>IL-13</b>	0,16 (0,03; 0,35)	0,29 (0,04; 0,58)	NS	0,43 (0,19; 0,64)	NS	0,26 (0,03; 0,46)	NS
<b>IL-17α</b>	3,56 (2,69; 4,86)	5,67 (3,81; 8,28)	0,009**	5,67 (4,06; 8,28)	0,031*	5,67 (3,25; 8,02)	NS
<b>Eotaxin</b>	9,57 (6,22; 36,21)	15,31 (8,89; 32,26)	NS	9,23 (7,05; 27,37)	NS	18,80 (11,81; 38,38)	NS
<b>FGFb</b>	23,46 (13,84; 59,95)	73,91 (54,44; 95,11)	0,004**	77,17 (54,44; 100,44)	0,014*	70,65 (50,48; 89,36)	NS
<b>G-CSF</b>	3,44 (2,18; 12,09)	13,70 (6,50; 27,38)	0,006**	14,02 (6,57; 22,96)	0,033*	12,46 (6,17; 31,02)	0,044*
<b>IP-10</b>	108,32 (54,92; 638,56)	160,21 (88,10; 626,03)	NS	151,71 (97,89; 576,18)	NS	204,63 (79,69; 1257,32)	NS
<b>MCP-1</b>	34,08 (19,71; 105,94)	130,88 (44,97; 245,59)	0,034*	83,73 (40,04; 249,72)	NS	190,91 (91,95; 247,75)	0,036*
<b>MIP-1α</b>	1,24 (0,86; 1,40)	1,85 (1,24; 2,22)	0,009**	1,73 (1,19; 2,07)	NS	1,99 (1,32; 2,25)	0,018*
<b>MIP-1β</b>	6,58 (3,55; 12,44)	7,65 (5,13; 12,34)	NS	7,42 (4,40; 11,84)	NS	8,18 (5,90; 13,68)	NS
<b>TNF-α</b>	21,43 (5,95; 26,06)	28,45 (20,32; 39,70)	0,013*	26,06 (21,27; 38,48)	NS	30,77 (17,86; 43,30)	0,031*
<b>PDGF-BB</b>	0,33 (0,02; 1,43)	0,69 (0,12; 1,83)	NS	0,69 (0,24; 1,25)	NS	0,69 (0,12; 2,84)	NS
<b>RANTES</b>	5,49 (2,83; 46,11)	13,54 (6,88; 30,06)	NS	14,70 (6,44; 27,21)	NS	12,08 (7,67; 64,54)	NS

EM, Endometriose; IL, Interleukin; FGFb, *Basic fibroblast growth factor*; G-CSF, *Granulocyte-colony stimulating factor*; IP, *Interferon gamma-induced protein*; MCP, *Monocyte chemoattractant protein*; MIP, *Macrophage inflammatory protein*; TNF, *Tumor necrosis factor alpha*; PDGF-BB, *Platelet-derived growth factor beta polipeptide*; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; NS, Nicht signifikant. Angaben der Konzentrationen als Median (Quartil 1; Quartil 2).

#### 4.3. Expression von Neopterin in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen

Um herauszufinden, ob Neopterin in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen und Kontroll-Patientinnen vorhanden ist, bzw. ob dieser Marker für die Aktivierung des zellulären Immunsystems erhöht oder erniedrigt vorkommt, wurde ein ELISA durchgeführt.

Die Konzentration von Neopterin in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen zeigte sich hoch signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen (Median Neopterin [nmol/L]: Endometriose 5,53  $Q_{1,3}$  (0,69 – 9,50), Kontrollen 0,69  $Q_{1,3}$  (0,69 – 0,69). Mann-Whitney-U-Test,  $**p = 0,003$ , Abbildung 34A). Auch die nähere Analyse der Neopterin-Konzentrationen in Patientinnen mit milder und schwerer Endometriose verglichen mit den Kontroll-Patientinnen zeigte sich jeweils hoch signifikant bzw. signifikant erhöht (Median Neopterin [nmol/L]: mild: 6,16  $Q_{1,3}$  (1,36 – 9,35) und schwer: 2,99  $Q_{1,3}$  (0,69 – 11,42). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur, mild:  $**p = 0,003$  und schwer:  $*p = 0,047$ , Abbildung 34B).



**Abbildung 34: Vergleich der Konzentration von Neopterin [nmol/L] in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen**

Die Boxplots repräsentieren die Konzentrationen von Neopterin und zeigen Unterschiede zwischen **A.** Kontroll-Patientinnen (K) und Endometriose-Patientinnen (EM) und **B.** Kontroll-Patientinnen (K), milder Endometriose (mild) und schwerer Endometriose (schwer). Statistische Analysen wurden mit dem **A.** Mann-Whitney-U-Test ( $**p < 0,01$ ) und **B.** Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ) durchgeführt.

## 5. Diskussion

### 5.1. Immunreaktion: Monozyten/Makrophagen allgemein

Endometriose-assoziierte Monozyten und Makrophagen sind ein seit Jahren bekanntes Phänomen, wobei die genaue pathophysiologische Rolle der einzelnen Subpopulationen bis heute ungeklärt ist (Hever et al. 2007). Schon lange ist die Typisierung der an der Pathogenese beteiligten Makrophagen und der von ihnen produzierten pro- und anti-inflammatorischen Zytokine Gegenstand der Endometrioseforschung, an welche die vorliegende Arbeit durch Verwendung detaillierter Makrophagen-Analysepanels anknüpfen soll. In den Untersuchungen zeigte sich die Monozyten- und Makrophagenpopulation als am stärksten vertretene Immunzellfraktion in der Peritonealflüssigkeit von Kontroll-Patientinnen und an Endometriose erkrankten Frauen. Im Vergleich zu der Peritonealflüssigkeit der Kontroll-Gruppe zeigte die Endometriose-Gruppe zwar eine tendenzielle Erhöhung der Monozyten- und Makrophagenpopulation, diese erreichte aber keine statistische Signifikanz. Diese Ergebnisse werden durch andere Studien gestützt, welche ebenfalls keinen signifikanten Unterschied der CD14<sup>+</sup> Monozyten- und Makrophagenfrequenz zwischen der Kontroll- und Endometriosepopulation in Peritonealflüssigkeit oder Blut feststellten (Gagne et al. 2003; Zhang et al. 2006).

Im Gegensatz dazu berichteten Gogacz et al. über eine signifikante Erhöhung dieser Zellen in der Peritonealflüssigkeit im Speziellen von mild erkrankten Endometriose-Patientinnen (Gogacz et al. 2017). Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Frauen zeichnete sich ebenfalls ein leicht erhöhter Trend in der milden Endometriose-Gruppe ab, erreichte aber keine statistische Signifikanz. Die Ursachen dieser unterschiedlichen Ergebnisse könnten in dem unterschiedlichen Studiendesign liegen. Im Unterschied zu Gogacz et al. wurde eine geringere Anzahl an mild erkrankten Patientinnen untersucht und in einer anderen Zyklusphase rekrutiert (follikulär bis luteal in der vorliegenden Arbeit versus mittel-follikulär bei Gogacz et al.). Auch die verwendeten Analysemarker variierten im Vergleich beider Studien (CD45/CD11c/CD16 in der vorliegenden Arbeit versus CD45/CD14 bei Gogacz et al.).

Zudem präsentierten sich die Monozyten und Makrophagen in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Endometriose-Patientinnen korrelierend zum Schweregrad der Erkrankung signifikant vergrößert. Halme et al. unterstützen diese Beobachtungen, indem sie vergrößerte Makrophagen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen vorfanden (Halme et al. 1987). Möglicherweise ist die veränderte Größe dieser Zellen ein Hinweis auf eine veränderte Aktivität der Monozyten- und Makrophagen-Population.

Verschiedene Fluorochrom-Kombinationen innerhalb der Panels und minimale Unterschiede im gesetzten FSC-A/FSC-H-Gate können die Ursache dafür sein, dass sich die Monozyten/Makrophagen nicht in beiden Panels signifikant vergrößert darstellten. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass im Rahmen der Endometriose weniger ein quantitativer als mehr ein funktioneller Unterschied bezüglich veränderter Aktivierung und Funktionen der Monozyten und Makrophagen-Population vorliegt, welcher möglicherweise zu einer gestörten Immunreaktion im Kontext der Erkrankung führen könnte.

Dementsprechend sollte die Einteilung der peritonealen Makrophagen in pro-inflammatorische Typ-1- bzw. anti-inflammatorische Typ-2-Makrophagen (M1 bzw. M2) Aufschluss über die lokal beteiligten Faktoren und resultierenden Immunantworten liefern. Dem von einigen Arbeitsgruppen ausgesprochenen Verdacht, dass im Kontext der Endometriose eine verstärkte Typ-1-Immunantwort vorherrscht, wird von einigen anderen Arbeitsgruppen widersprochen, deren Resultate wiederum für eine dominierende Typ-2-Immunantwort sprechen (Kusume et al. 2005; Bacci et al. 2009; Takebayashi et al. 2015). In den Untersuchungen wurden die CD14-positiven Monozyten/Makrophagen in den Peritonealflüssigkeiten der Patientinnen anhand der Expression typischer M1- sowie M2-Marker (M1: CD80 und CD86; M2: CD163 und CD206), ihres Aktivitätsstatus (HLA-DR) und des Reifestadiums (HMM) unterschieden.

### 5.2. Pro-inflammatorische Aspekte: Monozyten/Makrophagen und ihre Botenstoffe

Die ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 bestimmen, gemeinsam mit dem MHC Klasse II Oberflächen-Rezeptor HLA-DR, maßgeblich die Fähigkeit der Makrophagen, T-Zellen über Antigenpräsentation zu aktivieren (Damle et al. 1992; Kusume et al. 2005). Passend dazu ist bekannt, dass IL-10 *in vitro* die Expression von MHC Klasse II auf aktivierten Makrophagen unterdrücken und entsprechend die Antigenpräsentation inhibieren kann (Chadban et al. 1998). In der vorliegenden Studie zeigte sich die IL-10 Konzentration in der Peritonealflüssigkeit untersuchter Endometriose-Patientinnen im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen signifikant erhöht, während die Expression von CD80 und CD86 auf den CD14<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen unverändert und von HLA-DR signifikant reduziert war. Die signifikant erhöhte Konzentration des anti-inflammatorischen IL-10 in der Peritonealflüssigkeit der untersuchten Endometriose-Patientinnen, könnte über inhibitorische Mechanismen zu ineffektiven Immunreaktionen führen, indem Makrophagen in ihren Aktivitäten gehemmt werden. Diese gestörte Fähigkeit der Makrophagen, Antigene zu präsentieren und entsprechend T-Zellen zu aktivieren, könnte eine mögliche Ursache für die

Etablierung der ortsfremden endometrialen Zellen sein (Zhang et al. 2006). Zudem werden diese Ergebnisse von Kusume et al. unterstützt, welche sowohl in der Peritonealflüssigkeit als auch dem Serum von japanischen Endometriose-Patientinnen keinen Unterschied in der Frequenz von CD80 und CD86 feststellten. Darüber hinaus ermittelten sie ebenfalls eine signifikant geringere HLA-DR-Expressionsintensität in der Peritonealflüssigkeit der japanischen Endometriose-Patientinnen, wohingegen die Untersuchung des Serums interessanterweise keinen Unterschied ergab (Kusume et al. 2005). Die Ergebnisse zeigen demnach, dass die erniedrigte Funktion der Antigenpräsentation durch Makrophagen ein lokales Phänomen darstellen könnte. Bacci et al. stellten keinen Unterschied in der peritonealen CD86- und HLA-DR-Expression fest (Bacci et al. 2009). Die Unterschiede in der HLA-DR-Expression könnten sich dadurch erklären, dass kleinere Kohorten miteinander verglichen wurden und, im Gegensatz zu Bacci et al., die Kontroll-Gruppe aus Frauen mit gynäkologischen Krankheitsbildern verschiedener gutartiger Genese rekrutiert wurde.

Diese Ergebnisse bekräftigen die Vermutung, dass der Aktivitätsstatus der M1 bzw. genauer die Funktionalität ihre antigenpräsentierenden Fähigkeiten betreffend, trotz unveränderter Quantität deutlich gemindert ist.

Betrachtet man die Konzentrationen spezieller pro-inflammatorischer Botenstoffe, so lassen sich zusätzlich Rückschlüsse auf eine veränderte Sekretion von M1-Zytokinen und Chemokinen feststellen.

IL-8 ließ sich in den Untersuchungen in signifikant erhöhter Konzentration in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen finden. Das pro-angiogene IL-8 steht u.a. im Verdacht die Invasion von endometrialen Zellen in das Peritoneum und somit das Etablieren von Endometrioseläsionen zu fördern (Mulayim et al. 2004). Auch Borrelli et al. konnten diese, in ihrem Review gewonnenen Erkenntnisse über ein erhöhtes peritoneales Aufkommen von IL-8 (in 93,75 % aller inkludierten Studien) in den Endometriose-Patientinnen verglichen mit Kontroll-Patientinnen durch eigene experimentelle Untersuchungen stützen (Borrelli et al. 2014; Borrelli et al. 2015). Speziell bei den schwer erkrankten Endometriose-Patientinnen konnte ein höchst signifikanter Unterschied verglichen mit der Kontroll-Gruppe festgestellt werden. Interessanterweise wurde bereits gezeigt, dass die chirurgische Entfernung von Endometrioseläsionen eine Verringerung der IL-8-Konzentration im Plasma der Patientinnen bewirkte und folglich auch die ektopen endometrialen Zellen an einer erhöhten Sekretion dieses multifunktionalen Chemokins beteiligt sein könnten oder dessen Sekretion durch Makrophagen fördern könnten (Monsanto et al. 2016). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass ein proportionaler sowie kausaler Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und einer Veränderung der

IL-8-Konzentration zu bestehen scheint. Pizzo et al. unterstützen diese Beobachtung, indem sie mit Hilfe von ELISA-Analysen eine Hochregulierung der IL-8-Konzentration von rAFS I, über II zu III in der Peritonealflüssigkeit feststellten (Pizzo et al. 2002). Insgesamt wird deutlich, dass künftig ein Augenmerk auf die genauen zugrunde liegenden Mechanismen zu lenken ist.

TNF- $\alpha$  zeigte sich im Vergleich der Peritonealflüssigkeit von Endometriose- und Kontroll-Patientinnen, speziell bei schwerer Endometriose, signifikant erhöht. TNF- $\alpha$  bildet einen weiteren wichtigen pro-inflammatorischen und angiogenen Mediator im Rahmen verschiedener pathologischer Prozesse und wird *in vitro* u.a. verstärkt von Typ-1-Makrophagen gebildet (Bacci et al. 2009). Es könnte demnach eine gesteigerte sekretorische Aktivität der peritonealen Typ-1-Makrophagen bei den Endometriose-Patientinnen vorliegen. Darüber hinaus steigert TNF- $\alpha$  gemeinsam mit dem ebenfalls in der Endometriose-Gruppe (hoch-) signifikant erhöhten IL-1 $\beta$ , über die gesteigerte Produktion von Chemokinen wie IL-8, MCP-1 und Eotaxin, indirekt auch Adhäsion und Proliferation der ektopten endometrialen Zellen (Gao et al. 1999; Hornung et al. 2000; Iwabe et al. 2000; Mier-Cabrera et al. 2011). Passend dazu zeigte sich neben IL-8 auch MCP-1, speziell unter schwerer Endometriose, ebenfalls signifikant erhöht.

Die Tatsache, dass sich die MCP-1-Konzentration in den erkrankten Patientinnen auch insgesamt signifikant erhöht zeigte, stützt weiter die Theorie einer induzierten Typ-1-Immunantwort im Rahmen der Endometriose. Diese Ergebnisse werden von Borrelli et al. unterstützt, welche, im Vergleich zu der vorliegenden Studie, MCP-1 in der Peritonealflüssigkeit einer kleineren Endometriose-Gruppe und einer größeren Kontroll-Gruppe untersuchten (Borrelli et al. 2015). MCP-1 bildet eine Immunkomponente, welche sowohl chemotaktisch auf Monozyten und Makrophagen wirkt als auch u.a. die IL-1-Synthese in diesen Zellen induziert (Jiang et al. 1992). Auf diese Weise bestimmt es die akute pro-inflammatorische Immunreaktion mit und steht darüber hinaus in Verdacht, einen wichtigen Mediator in chronisch entzündlichen Prozessen darzustellen (Jiang et al. 1992). Entsprechend nimmt MCP-1 möglicherweise durch das chronische Aufrechterhalten pro-inflammatorischer Prozesse Einfluss auf die Etablierung der ektopten endometrialen Zellen. In den Endometriose-Patientinnen scheint MCP-1 weniger über die Rekrutierung als mehr über die Aktivierung der Monozyten und Makrophagen zu wirken. *In vitro* durch peritoneale Monozyten und Makrophagen synthetisiert, spricht die erhöhte Konzentration von MCP-1 für eine gesteigerte sekretorische Aktivität der CD14<sup>+</sup> Zellen in den untersuchten Endometriose-Patientinnen (Akoum et al. 2002).

Auch die Konzentration des Chemokins MIP-1 $\alpha$  ist in den untersuchten Frauen, speziell in der schwer erkrankten Gruppe, signifikant erhöht. MIP-1 $\alpha$  wird zyklusabhängig durch endometriales Epithel produziert, woraufhin es v.a. Monozyten und Makrophagen in die Peritonealhöhle rekrutiert (Akiyama et al. 1999). Im Kontext der Endometriose könnte eine Störung dieser geregelt gesteuerten Produktion von MIP-1 $\alpha$  vorliegen. Passend dazu bewirkte im Mausmodell die Implantation uterinen Gewebes eine vermehrte MIP-1 $\alpha$  Sekretion durch peritoneale Makrophagen, die Frequenz der Immunzellen blieb jedoch konstant (Lin et al. 2006). Auch wenn eine andere Studie (möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Kohorten-Größen oder Kohorten-Charakteristika) keinen Unterschied bezüglich der MIP-1 $\alpha$ -Konzentrationen feststellen konnte, machen die vorliegenden und die oben genannten Studienergebnisse anderer Arbeitsgruppen deutlich, dass die Rolle dieser Chemokine in künftigen Forschungsprojekten, auch in Hinblick auf die spezielle Aktivierung von Makrophagen im Kontext der Endometriose, besonders beleuchtet werden sollte (Laudanski et al. 2006).

Auch G-CSF zeigte sich in der Endometriose-Gruppe signifikant erhöht. Dieses Resultat unterstützend, demonstrierten Jorgensen et al., dass G-CSF in der Peritonealflüssigkeit, in Kombination mit weiteren Botenstoffen (SCGF- $\beta$  und IL-13), mit 86 % Sensitivität und 67 % Spezifität mit Endometriose assoziiert ist (Jorgensen et al. 2017). Interessanterweise hat sich im Serum von erkrankten Frauen gezeigt, dass die Entfernung von Endometrioseläsionen einen Abfall der G-CSF-Konzentration bewirkte (Monsanto et al. 2016). Endometriale Stromazellen gesunder Patientinnen produzieren *in vitro* G-CSF (Tanaka et al. 2000). Es ist also möglich, dass ektope endometriale Strukturen u.a. für die erhöhte G-CSF-Konzentration in den Endometriose-Patientinnen verantwortlich sind. Diese könnte entscheidend an den inflammatorischen Prozessen im Kontext der Endometriose beteiligt sein.

Neopterin ist ein weiterer u.a. durch Monozyten und aktivierte Makrophagen produzierter pro-inflammatorischer Botenstoff, welcher *in vitro* den Aktivierungsstatus dieser Zellen widerspiegeln kann (Huber 1984). Die Synthese von Neopterin wird darüber hinaus durch T<sub>H</sub>1-produzierte Zytokine stimuliert (z. B. IFN- $\gamma$ ) (Hoffmann et al. 2003). Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, dass Neopterin auch im Rahmen der Endometriose eine Rolle zu spielen scheint. Die signifikant erhöhte Neopterin-Konzentration in der Peritonealflüssigkeit der untersuchten Endometriose-Patientinnen spricht für eine gesteigerte Aktivierung der Makrophagen und ist ein Indiz für das Vorherrschen stimulierter pro-inflammatorischer Prozesse. Diese Resultate werden von Kondera-Anasz et al. gestützt, welche die Peritonealflüssigkeit und das Serum von Endometriose-Patientinnen in der frühen folliculären Zyklusphase untersuchten und ebenfalls eine signifikant erhöhte Neopterin-Konzentration feststellten (Kondera-Anasz et al. 2004). Dass die gezeigten Ergebnisse im Gegensatz zu

Kondera-Anasz et al. (2004), welche speziell in den schwer erkrankten Patientinnen eine Erhöhung der Neopterin-Konzentration feststellten, zusätzlich eine hoch signifikant gesteigerte Konzentration in den mild Erkrankten aufweisen, könnte daran liegen, dass sie größere Patientinnen-Kohorten in den einzelnen Vergleichsgruppen analysierten. Riley et al. fanden im Gegensatz dazu keinen signifikanten Unterschied der Neopterin-Konzentration zwischen Endometriose-Patientinnen und Kontroll-Patientinnen (Riley et al. 2007). Der Median der vorliegenden Ergebnisse (5,53 nmol/L) unterscheidet sich um 0,33 nmol/L von der Neopterin-Konzentration in der von Riley et al. (2007) untersuchten Endometriose-Gruppe (5,2 nmol/L). Die in der vorliegenden Studie ermittelte Konzentration in der Peritonealflüssigkeit der Kontroll-Gruppe weicht mit einem Median von 0,69 nmol/L deutlich von dem Ergebnis von Riley et al. (2007) ab (Median: 4,4 nmol/L). Ursache hierfür könnten unterschiedliche Krankheitsbilder der Kontroll-Patientinnen oder die Verwendung verschiedener ELISA-Kits sein.

Neopterin ist ein Pteridin, welches in vielen anderen chronischen Erkrankungen als diagnostischer Biomarker Aufschluss geben kann (Hoffmann et al. 2003). In der gängigen Praxis werden Serum- und Urin-Proben auf die Neopterin-Konzentration untersucht. Die durchgeführten Analysen beschränkten sich auf die Peritonealflüssigkeit der Patientinnen, konnten aber auch einen Hinweis auf lokal teils hoch signifikant veränderte Neopterin-Konzentrationen geben.

Künftige Forschungsvorhaben sollten entsprechend ihr Augenmerk auf die Untersuchung anderer Kompartimente wie Urin in Bezug auf die Neopterin-Konzentration lenken, da diese Art der Analysen ein potentielles, nicht-invasives und probates diagnostisches Mittel im Rahmen der Endometriose darstellen könnten.

Ouyang et al. konnten *in vitro* zeigen, dass durch IL-4 stimuliertes Eotaxin Angiogenese-Prozesse in der Entstehung der Endometriose beeinflussen könnte (Ouyang et al. 2010). Die Analysen ergaben eine tendenziell aber nicht signifikant gesteigerte Konzentration dieses pro-inflammatorischen Chemokins in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen und speziell der schwer erkrankten Frauen. Die ermittelten Tendenzen werden durch die Resultate einiger Arbeitsgruppen unterstützt, welche eine signifikant erhöhte Eotaxin-Konzentration in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen feststellten (Hornung et al. 2000; Mier-Cabrera et al. 2011). Die Tendenzen der vorliegenden Resultate unterstützend, stellten Mier-Cabrera et al. (2011) eine signifikant erhöhte Eotaxin-Konzentration in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen fest, während Hornung et al. (2000) keinen Unterschied in der mild erkrankten Gruppe und eine signifikant erhöhte Eotaxin-Konzentration in der schwer erkrankten Gruppe ermittelten. Unterschiede

bezüglich der Signifikanzen könnten auf verschiedenen untersuchten Kohortengrößen basieren. Darüber hinaus analysierten Mier-Cabrera et al. (2011) nur Endometriose-Patientinnen mit mildem Schweregrad und Hornung et al. (2000) verwendeten mit der ELISA-Methode eine andere Analysetechnik.

FGFs gelten im Zusammenspiel mit anderen Wachstumsfaktoren ebenfalls als wichtige Mediatoren der Angiogenese (Presta et al. 2005). Die Untersuchungen des peritonealen FGFb zeigten eine signifikante Erhöhung (v.a. in milder Endometriose) der Konzentration in der Endometriose-Gruppe. Rakhila et al. zeigten eine Erhöhung der FGF-Konzentration, speziell in schwer erkrankten Endometriose-Patientinnen vor allem in der sekretorischen Phase, während Jorgensen et al. keinen Unterschied fanden (Rakhila et al. 2016; Jorgensen et al. 2017). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf differierende Kohortenzahlen zurückzuführen sein. Dennoch unterstützen Rakhila et al. die vorliegenden Ergebnisse mit der Annahme, dass die erhöhte FGF-Konzentration bei der Endometriose ein Indiz für die maßgebliche Beteiligung an der fehlgeleiteten Neovaskularisation im Rahmen der Endometriose ist (Rakhila et al. 2016).

Das IP-10, welches u.a. von Endothelzellen, aktivierten Lymphozyten und eutopen endometrialen Stromazellen synthetisiert wird, zeigt antiangiogene Eigenschaften und ist im Serum von Endometriose-Patientinnen reduziert vorzufinden (Kai et al. 2002; Malutan et al. 2017). Der Vergleich von Endometriose-Patientinnen mit Kontroll-Patientinnen ergab keinen Unterschied der IP-10-Konzentration in der Peritonealflüssigkeit zwischen den Gruppen. Das erhöhte Vorkommen von pro-angiogenen Botenstoffen wie TNF- $\alpha$ , IL-8 und Eotaxin, im Gegensatz zum gleichbleibenden antiangiogenen IP-10, spricht jedoch für eine lokal gesteigerte Neovaskularisation und Proliferation. Die regulierende Wirkung von IP-10 scheint unter Endometriose nicht auszureichen, um diesen fehlgeleiteten Vorgängen entgegenzuwirken.

Die vorher genannten Veränderungen im Mileu der untersuchten Peritonealflüssigkeiten lassen darauf schließen, dass Typ-1-Reaktionen im Kontext der Endometriose vorherrschen. Im Folgenden wird jedoch deutlich, dass sich Typ-2-Mechanismen ebenfalls präsent zeigen und eine entscheidende Rolle in der Pathogenese dieser komplexen Erkrankung zu spielen scheinen.

### 5.3. Anti-inflammatorische Aspekte: Monozyten/Makrophagen und ihre Botenstoffe

Die Analyse der Monozyten/Makrophagen-Population ergab interessanterweise, dass die Frequenz CD163-exprimierender Zellen in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen im Vergleich zu Kontroll-Patientinnen tendenziell erhöht war. Dies deutet auf eine zumindest teilweise M2-Polarisierung hin. Auch wenn die Resultate des CD206 keinen klaren Hinweis auf die Polarisierung geben, spricht die verringerte MFI von HLA-DR auf den CD206<sup>+</sup> Typ-2-Makrophagen für eine verringerte Antigenpräsentation.

Auch in ektopen Läsionen von Makaken und darüber hinaus im Mausmodell und der Peritonealflüssigkeit von Menschen konnte gezeigt werden, dass bei der Endometriose durchaus M2-Polarisation auftritt und anti-inflammatorische CD163<sup>+</sup> und CD206<sup>+</sup> Makrophagen die Etablierung von Endometrioseherden fördern (Bacci et al. 2009; Smith et al. 2012). Des Weiteren spricht die Erhöhung einer Vielzahl von anti-inflammatorischen Zytokinen für eine gesteigerte Aktivität der Typ-2-polarisierten Makrophagen.

Als M2-Aktivator ist IL-4 während inflammatorischer Prozesse von Bedeutung (Kiguchi et al. 2015). Die signifikant erhöhte Konzentration des IL-4 in den Proben der untersuchten Endometriose-Patientinnen könnte ebenfalls für eine vorherrschende Typ-2-Immunreaktion sprechen, welche durch anti-inflammatorische Wirkungsweisen den erforderlichen Abwehrmechanismen in Bezug auf die ektopen endometrialen Zellen entgegenwirkt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass IL-4 in ektopen Läsionen präsent ist und darüber hinaus *in vitro* Eotaxin-Synthese induziert sowie in der Lage ist, zur Proliferation von endometrialen Stromazellen beizutragen (OuYang et al. 2008; Ouyang et al. 2010). Darüber hinaus wird über das Vorherrschen einer Autoimmunkomponente im Rahmen der Endometriose spekuliert (Antsiferova et al. 2005). IL-4 wird als ein potentieller Regulator im Kontext von Autoimmunerkrankungen beschrieben (Singh 2003). Die signifikante Erhöhung dieses Typ-2-Interleukins impliziert demnach einen weiteren interessanten Aspekt im Gesamtgeschehen und sollte künftig in diesem Zusammenhang genauer untersucht werden.

Passend dazu ließ sich auch peritoneales IL-13 deutlich, wenn auch nicht signifikant, erhöht in den Proben der an Endometriose erkrankten Frauen finden. Dieses Interleukin wirkt ebenfalls M2-aktivierend (Arango Duque und Descoteaux 2014). Die vorliegenden Beobachtungen stehen im Gegensatz zu Resultaten einer Studie, welche andere Kohortengrößen miteinander verglich und eine signifikant verringerte Konzentration an IL-13 in den peritonealen Proben der von ihnen untersuchten Endometriose-Gruppe vorfand (Jorgensen et al. 2017). Interessanterweise schlugen sie die Identifikation von Endometriose-Patientinnen durch eine Kombination der Marker SCGF-b, G-CSF und IL-13

bei 86 % Sensitivität und 67 % Spezifität vor. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Endometriose und der potentiellen Beteiligung von IL-13 an anti-inflammatorischen Prozessen in diesem Kontext kann aufgrund der obenstehenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden und sollte weiterhin beleuchtet werden.

Auch das IL-10 ist ein weiterer wichtiger Vermittler der anti-inflammatorischen Immunantwort und wird *in vitro* vor allem von M2 produziert (Bacci et al. 2009). In Mausmodellen zeigte sich, dass sowohl der Transfer von Typ-2-Makrophagen als auch die Injektion von IL-10 das Wachstum von Endometrioseläsionen entscheidend förderte (Bacci et al. 2009; Suen et al. 2014). Die Analysen der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen ergaben eine signifikant erhöhte IL-10-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollen. In der Literatur herrscht derzeit kein Konsens über das Vorkommen dieses Typ-2-Interleukins. Während einige Studien die vorliegenden Ergebnisse unterstützen (Podgaec et al. 2007; Mier-Cabrera et al. 2011), zeigen andere Studien keinen Unterschied zwischen der Endometriose- und der Kontroll-Gruppe (Jorgensen et al. 2017). Die in den Endometriose-Patientinnen beobachtete Verminderung der MHC-Klasse II-Expression auf aktivierten Makrophagen könnte potentiell auch durch IL-10 bewirkt sein (Chadban et al. 1998). Setzt man oben genannte Resultate in Kontext, so scheint ein maßgeblicher Effekt von IL-10 im Rahmen der Endometriose wahrscheinlich.

Vor allem Makrophagen aber auch NK-Zellen, DC und B-Zellen produzieren pro-inflammatorisches IL-1 $\beta$  (Arango Duque und Descoteaux 2014). IL-1 $\beta$  zeigte sich in den analysierten Endometriose-Patientinnen signifikant erhöht exprimiert. Auch war der IL-1Ra in signifikant erhöhter Konzentration in der Peritonealflüssigkeit der erkrankten Frauen zu finden. Peritoneale Makrophagen können im Rahmen der progredienten Endometriose mehr anti-inflammatorisches IL-1Ra und weniger pro-inflammatorisches IL-1 $\beta$  in der Peritonealhöhle erkrankter Patientinnen sekretieren (Mori et al. 1992). Dieser Trend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, wobei das differierende Ergebnis auf eine genauere Endometriose-Klassifizierung in der vorliegenden Analyse zurückzuführen sein könnte.

Da die Funktion des IL-1Ra in der Regulation der pro-inflammatorischen Aktivität von IL-1 $\beta$  besteht, konkurrieren die beiden Stoffe um den IL-1-Rezeptor (IL-1R) (Arango Duque und Descoteaux 2014). Durch die in der vorliegenden Studie hohe peritoneale Konzentration an IL-1Ra ist davon auszugehen, dass IL-1 $\beta$  nicht in umfangreichem Maße in der Lage ist, sich an den inflammatorischen Reaktionen zu beteiligen, da der IL-1Ra lokal die pro-inflammatorischen Reaktionen eindämmt. Kondera-Anasz et al. unterstützen die ermittelten Daten, indem sie ein erhöhtes Vorkommen von IL-1Ra in der Peritonealflüssigkeit und im

Serum von Endometriose-Patientinnen feststellten (Kondera-Anasz et al. 2005). Die Schlussfolgerung liegt nah, dass die Veränderungen der IL-1 Aktivierung in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen eine Rolle im Rahmen der Pathogenesemechanismen der Endometriose spielen könnten.

Interessanterweise scheint ein Zusammenhang zwischen der Zyklusphase und der Expression gewisser Botenstoffe zu bestehen. Die Endometriose-Patientinnen hatten eine signifikant höhere peritoneale Konzentration an IL-1 $\beta$  und IL-10 (Eotaxin, PDGF-BB und IL-2 zeigten einen Trend, erreichten aber keine Signifikanz) in der sekretorischen Phase. Bergqvist et al. stellten passend dazu eine erhöhte IL-1 $\beta$ -Konzentration während der sekretorischen Phase im Endometrium von Endometriose-Patientinnen fest, welche auf erhöhte (sekretorische) Aktivität von Typ-1-Makrophagen zurückzuführen sein könnte (Bergqvist et al. 2001). Jedoch zeigte sich die periphere Konzentration von IL-1 $\beta$  in gesunden Frauen *in vitro* ebenfalls erhöht, was verdeutlicht, dass auch unter physiologischen Bedingungen zyklische Veränderungen von IL-1 $\beta$  auftreten (Willis et al. 2003). Während *in vitro* gezeigt wurde, dass in der sekretorischen Phase gesunder Frauen in der Peripherie keine dominierende Typ-2-Antwort vorherrscht, ist die erhöhte IL-10-Konzentration ein Indiz dafür, dass in dieser Zyklusphase durchaus lokal anti-inflammatorische Prozesse in den Endometriose-Patientinnen hochreguliert sind (Bouman et al. 2001).

### 5.4. Immunreaktion der Dendritischen Zellen

Bis heute sind die Kenntnisse über die Frequenzen der DC in den einzelnen körperlichen Kompartimenten von Endometriose-Patientinnen nicht weitreichend. Die vorliegende Studie beleuchtete die undiskriminierte CD11c<sup>+</sup> DC Population und ergab eine tendenziell, aber nicht signifikant verminderte Frequenz in den untersuchten Patientinnen im Verhältnis zu den Kontrollen. In 2009 wurde eine tendenziell verminderte Anzahl an peritonealen myeloiden DC (lineage<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>) in an Endometriose erkrankten Frauen festgestellt (Tariverdian et al. 2009). Es ist denkbar, dass die DC im Kontext der Endometriose nicht in der Lage sind, ihrer Schlüsselrolle als antigenpräsentierende Zellen ausreichend nachzukommen.

Reife DC wirken im Mausmodell *in vivo* u.a. über die Produktion von IL-12 aktivierend auf Lymphozyten (Reis e Sousa et al. 1997). Die Daten zeigen eine geringe, aber signifikant erhöhte peritoneale IL-12 (p70)-Konzentration in den Endometriose-Patientinnen. Andererseits wird spekuliert, dass anti-inflammatorisches IL-10, welches in den vorliegenden

Ergebnissen in der Endometriose-Gruppe erhöht vorlag, *in vitro* die Reifung und Funktion von DC hemmen kann, was wiederum in verminderter T-Zell-Aktivierung münden könnte (Buelens et al. 1997). Passend dazu lassen sich in peritonealen Läsionen und den angrenzenden Geweben vornehmlich unreife DC vorfinden (Schulke et al. 2009). Die in den Untersuchungen signifikant erhöht vorgefundene Konzentration von IL-10 gemeinsam mit mangelnder Wirkung der DC als Schlüsselzellen des Immunsystems könnte demnach eine mögliche Erklärung für die nur geringfügigen quantitativen Veränderungen der Lymphozyten in der Peritonealflüssigkeit der untersuchten Patientinnen sein. Außerdem wiesen die im Mausmodell in peritonealen Endometrioseherden überwiegend im unreifen Stadium vorgefundenen DC interessanterweise eine hohe angiogene Aktivität auf (Fainaru et al. 2008). Diese Aktivität würde zu den hohen peritonealen Konzentrationen an pro-angiogenen Botenstoffen in den untersuchten Patientinnen passen und könnte maßgeblich die Neovaskularisation ektopter Herde fördern. *In vitro* Versuche zeigten, dass unreife DC zudem die IL-10-Sekretion durch T<sub>Reg</sub> stimulieren (Jonuleit et al. 2000). Demnach scheinen zusätzlich Toleranz induzierende Prozesse durch die anwesenden DC gefördert zu werden.

Des Weiteren bewirkte die Depletion von DC in Mäusen die Entwicklung einer spontanen Autoimmunantwort, welche sich u.a. über die Produktion von Autoantikörpern, einer Erhöhung von T<sub>H1</sub> und T<sub>H17</sub> sowie der Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zeigte (Ohnmacht et al. 2009). Der Zusammenhang zwischen der geringeren Quantität an DC, potentiell erhöhter T<sub>H1</sub>- und T<sub>H17</sub>-Aktivitäten in der Peritonealflüssigkeit der untersuchten Patientinnen sowie einer möglichen Autoimmunkomponente im Kontext der Endometriose, wäre demnach ein interessanter Ansatzpunkt für weitergehende Untersuchungen.

### 5.5. Immunreaktion der T-Zellen

T-Zellen sind unter normalen Umständen befähigt, körperfremde Antigene zu erkennen, die ihnen durch andere Zellen präsentiert werden und spielen so eine entscheidende Rolle innerhalb der Immunantwort. Im Rahmen der Endometriose ergaben Studien kontroverse Ergebnisse in Bezug auf veränderte Quantitäten dieser Lymphozyten in der Peritonealflüssigkeit von erkrankten Frauen (Badawy et al. 1989; Zhang et al. 2006). Die vorliegenden Ergebnisse stellen die Gesamtzahl dieser Immunzellpopulation im Vergleich zu den Kontroll-Patientinnen als unverändert dar und verdeutlichen, dass ein genaueres Augenmerk auf die einzelnen Subpopulationen gelenkt werden sollte, um mehr über diese Lymphozyten im Kontext der Endometriose zu erfahren. Die differenzierte Betrachtung der

einzelnen Subpopulationen weist, vermutlich aufgrund herabgesetzter Aktivität, auf eine mangelnde Immunreaktion dieser Lymphozyten im Rahmen der Endometriose hin. Die Tatsache, dass die Anzahl an  $T_c$  in den untersuchten an Endometriose leidenden Frauen tendenziell leicht vermindert ist, wird unterstützt durch die Beobachtung einer reduzierten Aktivität der T-Zellen gegenüber autologen endometrialen Zellen von Endometriose-Patientinnen (Steele et al. 1984). Eine Erklärung für die tendenziell geringere Anzahl an  $T_c$  könnte der auf endometrialen Stromazellen lokalisierte *Fas ligand* darstellen, welcher über die Bindung von oberflächlich auf den Lymphozyten positionierten *Fas* Rezeptoren den programmierten Zelltod eben dieser Zellen auslösen könnte (Selam et al. 2002). Die in der Peritonealflüssigkeit der untersuchten Patientinnen signifikant erhöht vorkommenden proinflammatorischen Botenstoffe IL-8 und MCP-1, könnten, wie bereits *in vitro* demonstriert, für eine erhöhte Expression von *Fas ligand* bzw. *Fas ligand gene* auf den endometrialen Stromazellen der Patientinnen verantwortlich sein und somit über induzierte Apoptose der T-Lymphozyten eine immuntolerante Umgebung als Grundlage für die Entwicklung der Läsionen schaffen (Selam et al. 2002; Selam et al. 2006).

Die in den Analysen verwendeten FACS-Panel erlaubten zwar keine spezielle Differenzierung der einzelnen  $T_H$ -Zell-Subgruppen ( $T_H1$  und  $T_H2$ ) bzw. der  $T_{Reg}$  über entsprechende spezifische Marker, allerdings lassen die erhobenen Daten bezüglich der Konzentrationen einzelner Botenstoffe dennoch Rückschlüsse auf diese differenzierten  $CD4^+$  Subpopulationen zu.

Die Analysen ergaben einen verringerten  $CD4/CD8$  Quotient in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen. Dies wird durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützt (Gallinelli et al. 2004; Tariverdian et al. 2009). Dass Badawy et al. einen erhöhten Quotienten nachwiesen, könnte u.a. an der Verwendung eines anderen Nachweisverfahrens liegen (Badawy et al. 1989). Der verringerte Quotient verdeutlicht ein gestörtes zytotoxisch-immunoregulatives Verhältnis, was dazu führen könnte, dass sich ektipe Endometrioseläsionen aufbauen können ohne zureichend von Immunzellen angegriffen zu werden.

Die unterschiedlichen, in der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen vorzufindenden Zytokine können Aufschluss hinsichtlich verschiedener T-Helfer-Zell-Aktivitäten ( $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$ ) geben. Kontroverse Forschungsergebnisse lassen bis heute die Frage offen, ob im Kontext der Endometriose eine lokal dominierende  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Immunreaktion vorherrscht (Antsiferova et al. 2005; Takamura et al. 2015; Jorgensen et al. 2017).

Die geringe, aber signifikant erhöhte IL-12 (p70)-Konzentration lässt vermuten, dass speziell in den milden Stadien der Endometriose eine erhöhte Differenzierung der  $T_H0$  zu  $T_H1$  erfolgt (Athie-Morales et al. 2004). Darüber hinaus deutet die signifikant gesteigerte Konzentration an IL-2 darauf hin, dass speziell unter schwerer Endometriose die lokalen  $T_H1$  eine erhöhte sekretorische Aktivität aufweisen, um pro-inflammatorische Immunreaktionen einzuleiten. Auch wenn IFN- $\gamma$  in den analysierten Proben nicht auswertbar war, scheinen pro-inflammatorische  $T_H1$  Komponenten an dem pathologischen Geschehen beteiligt zu sein. Möglicherweise jedoch kommen die  $T_H1$  ihrer Aufgabe, eine zell-medierte Immunantwort über die Stimulation von Makrophagen und inflammatorischen Reaktionen zu induzieren, nicht ausreichend nach, wodurch die ektopen Zellen in der Lage sind, sich in den ortsfremden Regionen anzusiedeln (Wu und Ho 2003).

Da  $T_H2$  neben der Induktion von B-Zellen zu Plasmazellen eher anti-inflammatorisch wirken, könnten diese für eine inadäquate  $T_H1$ -Antwort im Kontext der Endometriose verantwortlich sein (Mosmann und Sad 1996). Das  $T_H2$ -Zytokin-Profil besteht vornehmlich aus Interleukinen wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 (Mosmann und Sad 1996). Als M2-Aktivator und Inhibitor der  $T_H1$ -Antwort ist IL-4 ein klarer Vertreter der anti-inflammatorischen Immunantwort (Kiguchi et al. 2015). Dass IL-4 neben IL-10 und IL-13 in signifikant erhöhter Konzentration in der Peritonealflüssigkeit der untersuchten Endometriose-Patientinnen festgestellt wurde, unterstützt die Annahme einer hochregulierten Typ-2-Immunantwort, welche als Gegenspieler der pro-inflammatorischen Immunmechanismen wirkt. Da die  $T_H2$ -Botenstoffe IL-5, IL-6 und IL-9 nicht in den Peritonealflüssigkeiten zu analysieren waren, kann zwar das Vorherrschen eines komplexen  $T_H2$ -Zytokin-Profiles nicht bestätigt werden, dennoch spiegeln die übrigen signifikant erhöhten Typ-2-Interleukine eine Immunreaktion mit deutlich anti-inflammatorischem Charakter wider. Antsiferova et al. unterstützen die vorliegenden Resultate mit ihren Untersuchungen, indem sie auch in venösem Blut und eutopen und ektopen endometrialen Geweben Indizien einer vorherrschenden Typ-2-Antwort vorfanden (Antsiferova et al. 2005).

Hauptsächlich sind  $T_H17$ -Zellen für die Produktion von pro-inflammatorischem Interleukin IL-17 $\alpha$  verantwortlich. Die signifikant erhöhte Konzentration dieses Botenstoffs in der Peritonealflüssigkeit der untersuchten Endometriose-Patientinnen könnte demnach eine gesteigerte Aktivität der  $T_H17$ -Zellen widerspiegeln. Schon lange wird diesen Zellen eine Rolle im Zusammenhang mit diversen chronischen und auto-immunen Erkrankungen zugesprochen (Onishi und Gaffen 2010). Die Tatsache, dass IL-17 $\alpha$  *in vitro* die Proliferation von ektopen endometriotischen Stromazellen sowie darüber hinaus deren Sekretion von COX-2 und IL-8 stimuliert, könnte auch in den untersuchten Patientinnen eine Erklärung für die erhöhte IL-8-Produktion sowie eine gesteigerte Angiogenese liefern (Hirata et al. 2008).

Interessanterweise ergaben die Untersuchungen von Hirata et al. weiterhin, dass TNF- $\alpha$ , welches in den untersuchten Endometriose-Patientinnen signifikant erhöht vorzufinden war, die IL-17 $\alpha$  induzierte IL-8-Produktion durch die ektopen Stromazellen stimulierte. IL-17 $\alpha$  ist sowohl in eutopem als auch in ektopem Endometrium von Frauen mit Endometriose zu finden und zudem verringerte die chirurgische Entfernung von Endometrioseherden die Plasma-Konzentration des Zytokins (Ahn et al. 2015). Es bleibt also die Frage, ob die erhöhte peritoneale IL-17 $\alpha$ -Konzentration mit der Steigerung von pro-inflammatorischen, proliferativen und angiogenen Mechanismen Ursache oder Folge der Etablierung ektooper Endometrioseläsionen ist.

Dass Fan et al. im Serum von erkrankten Patientinnen eine erniedrigte IL-17 $\alpha$  Konzentration vorfanden, könnte für eine vermehrt lokale Reaktion der T<sub>H</sub>17 Zellen in der Bauchhöhle sprechen (Fan et al. 2018). Die Tatsache, dass Fan et al. in der Peritonealflüssigkeit der von ihnen untersuchten Patientinnen keinen Unterschied an IL-17 $\alpha$  gefunden haben, könnte neben methodischen Differenzen auf unterschiedlichen Kohortengrößen der Vergleichsgruppen oder differierenden Zyklusphasen der Patientinnen beruhen.

Die gesteigerten IL-12 (p70)- und IL-17 $\alpha$ -Konzentrationen weisen auf die Präsenz inflammatorischer Typ-1-Immunprozesse hin. Parallel verdeutlicht das Profil der gesteigerten Konzentrationen von anti-inflammatorischem IL-4, IL-10 und IL-13 eine ebenfalls induzierte Typ-2-Reaktion. Die Interaktion zwischen T<sub>H</sub>1 Zellen und M1 sowie T<sub>H</sub>2 und M2 im Rahmen von Erkrankungen ist ein bekanntes Phänomen (Mills et al. 2000). Entsprechend können sich veränderte Aktivitäten dieser Zellen mit der Konsequenz veränderter Typ-1- und Typ-2-Zytokin-Profile förderlich auf die Entwicklung einer Endometriose auswirken. Das Verständnis über die genaueren Interaktionen zwischen T-Zellen und Makrophagen ist ein wichtiger Bestandteil, um die Pathogenese der Endometriose gänzlich zu verstehen.

Auch in Bezug auf die Rolle der T<sub>Reg</sub> herrscht kein Konsens im Rahmen der Endometrioseforschung (Tariverdian et al. 2009; Olkowska-Truchanowicz et al. 2013). Auch wenn die begrenzten Kapazitäten der durchflusszytometrischen Panels die direkte Charakterisierung der T<sub>Reg</sub> limitierte, kann die signifikant erhöhte Konzentration an IL-10 in den untersuchten Endometriose-Patientinnen Rückschlüsse auf die Präsenz dieser Zellpopulation geben. Neben T<sub>H</sub>2 und M2 wird IL-10 auch durch T<sub>Reg</sub> synthetisiert, um maßgeblich die Immunantwort zu regulieren und antigen-spezifische T-Zell-Toleranz aufrecht zu erhalten (Sakaguchi 2000). Li et al. zeigten, dass die Frequenz der T<sub>Reg</sub> in Abhängigkeit des Schweregrads der Endometriose in der Peritonealflüssigkeit hochreguliert wurde (Li et al. 2014). Da die Analysen eine tendenziell höhere IL-10-Konzentration in den schwer erkrankten Frauen ergaben, unterstützen die Ergebnisse von Li et al. die Vermutung, dass die T<sub>Reg</sub> die Immunreaktion im Rahmen der Endometriose entscheidend mit eindämmen. Die

Toleranzinduktion könnte zu ungestörter Adhäsion, Proliferation und Formierung der Endometrioseherde führen, da die ortsfremden endometrialen Zellen nicht durch entsprechende Effektorzellen erkannt und bzw. oder bekämpft werden. Darüber hinaus gelten  $T_{Reg}$  im Rahmen von Autoimmunerkrankungen als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt und so sollte auch dieser Aspekt in künftige Untersuchungen einfließen (Tanaka et al. 2014). Nichtsdestotrotz weist das veränderte CD4/CD8 Verhältnis auf eine gewisse Reduktion von  $CD4^+$  Zellen und damit auch  $T_{Reg}$  hin, was im Gegensatz zu der Toleranz-induzierenden Funktion dieser regulatorischen Zellen stünde.

Die begrenzten Kapazitäten der durchflusszytometrischen Panels erlaubten zwar die Diskriminierung der  $T_H/T_{Reg}$  als Gesamtpopulation, ermöglichten aber keine genaue Bestimmung der Frequenzen der jeweiligen Einzelpopulationen. Der leichte Trend einer verringerten  $T_H/T_{Reg}$ -Frequenz in der Endometriose-Gruppe kann dennoch auf potentiell verringerte Aktivierung dieser Zellpopulationen hinweisen.

NKT-Zellen waren bis heute nur selten Gegenstand der Endometriose-Forschung. Dieser T-Zell Subpopulation wird jedoch ein großes Potential in Bezug auf das Hemmen fortschreitender Prozesse im Rahmen der Endometriose zugesprochen (Guo et al. 2012). Die Analysen ergaben einen leichten Trend in Richtung einer verringerten Frequenz der NKT-Zellen. Guo et al. wiesen die NKT-Zellen in verringerter Frequenz sowohl im Blut als auch der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen nach (Guo et al. 2012). Sie analysierten mit 60 Endometriose-Patientinnen und 20 Kontroll-Patientinnen eine größere Anzahl an Proben als die vorliegende Studie. Möglicherweise hätte eine größere Kohortenzahl die beobachtete Frequenz zu einem signifikanten Ergebnis bringen können. Im Mausmodell wurden NKT-Zellen bereits mit M2-Polarisierung in einer chronisch entzündlichen Erkrankung (*Chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) in Verbindung gebracht (Kim et al. 2008). Außerdem scheinen Subpopulationen der NKT-Zellen in der Lage zu sein,  $T_H1$ - und  $T_H2$ - Zytokine zu sekretieren und so eine besondere Rolle in der Immunantwort einzunehmen (Lagana et al. 2016).

### 5.6. Immunreaktion der B-Zellen

Die Untersuchung der unterschiedlichen Kompartimente der Endometriose-Patientinnen ergab in der Vergangenheit kontroverse Resultate in Bezug auf die Frequenz der B-Zellen (Badawy et al. 1989; Mier-Cabrera et al. 2011). Die Analysen zeigten, dass die Frequenzen der peritonealen B-Lymphozyten, abgesehen von einem dezenten Trend in Richtung einer erhöhten Frequenz in der Gruppe der Endometriose-Patientinnen, ohne signifikanten

Unterschied in den Peritonealfüssigkeiten beider Gruppen zu finden waren. Darüber hinaus bildeten diese Lymphozyten insgesamt einen sehr kleinen prozentualen Anteil an der Gesamtpopulation aller Immunzellen. Diese Beobachtung deckte sich mit vorangegangenen Untersuchungen oben genannter Arbeitsgruppen (Zhang et al. 2006; Mier-Cabrera et al. 2011). Interessanterweise konnte in der Gruppe der schwer erkrankten Patientinnen eine quantitative Steigerung beobachtet werden, denn hier zeigte sich die Frequenz der B-Zellen signifikant erhöht. So ist zu vermuten, dass erst unter schwerer Endometriose ausreichender Anlass zur Proliferation der B-Zellen gegeben ist. Die Erhöhung der B-Zell-Frequenz scheint jedoch nicht auszureichen, um eine adäquate Immunreaktion auszulösen und so steht eine Dysfunktion in der Antikörperproduktion in Verdacht, die B-Zellen in ihren üblichen Aktivitäten einzuschränken (Osuga et al. 2011). Interessant wäre zu ermitteln, ob die verringerte Expression von HLA-DR auch auf die T- und B-Zellen zutrifft und deren Aktivität unter Endometriose ebenfalls beeinträchtigt ist.

### 5.7. Immunreaktion der Natürlichen Killerzellen

NK-Zellen sind Effektorzellen des angeborenen Immunsystems und nehmen über ihre zytotoxische Aktivität und die Bildung von Botenstoffen wie IL-10, IL-13 u.a. Einfluss auf das erworbene Immunsystem (Cooper et al. 2001; Riccio et al. 2018). Es konnte kein Unterschied in der Gesamtzahl der peritonealen NK-Zellen der Endometriose-Patientinnen festgestellt werden. Diese Beobachtung entspricht der durch verschiedene Arbeitsgruppen postulierten Vermutung, dass ein möglicher Defekt der NK-Zellen nicht in quantitativem, sondern in qualitativem Sinne vorzuliegen scheint (Ho et al. 1995; Jeung et al. 2016). Passend dazu zeigte sich im Median tendenziell der Trend einer verringerten Frequenz an CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> zytotoxischen NK-Zellen. Zudem gibt die tendenziell verminderte mittlere Fluoreszenzintensität des CD56 einen weiteren, deutlichen Hinweis auf eine gestörte zytotoxische Aktivität dieser Effektorzellen im Rahmen der Endometriose.

Da bekannt ist, dass sich ein immunsuppressives Milieu *in vitro* reduzierend auf die Aktivität zytotoxischer NK-Zellen auswirkt, könnte die Peritonealfüssigkeit möglicherweise direkt einen negativen Effekt auf die Aktivität der NK-Zellen ausüben (Oosterlynck et al. 1993). Auch wenn das in den untersuchten Endometriose-Patientinnen erhöht vorkommende Zytokin IL-12 *in vitro* zytolytische Funktionen der NK-Zellen steigern kann, bleibt dieses Phänomen unter Endometriose möglicherweise aus (Marcenaro et al. 2005). Da IL-4 *in vitro* und *in vivo* die Zytotoxizität von NK-Zellen senkt, könnte die signifikant erhöhte Konzentration dieses Typ-2-Zytokins in der Peritonealfüssigkeit der erkrankten Frauen eine

mögliche Erklärung für eine inadäquate Reaktion der NK-Zellen im Rahmen der Endometriose darstellen (Brady et al. 2010). Ist die zytotoxische Funktion der NK-Zellen vermindert, so entgehen die ektopen endometrialen Zellen den üblichen Eliminierungsmechanismen dieser Effektorzellen und die Etablierungsprozesse können ungehindert fortschreiten.

Marcenaro et al. zeigten *in vitro*, dass die Stimulation von NK-Zellen mit pro-inflammatorischem IL-12 Reifungsprozesse in DC induzierte, welche zu einer T<sub>H</sub>1-Antwort führen konnten (Marcenaro et al. 2005). Die gleiche Studie zeigte darüber hinaus, dass IL-4 behandelte NK-Zellen nicht in der Lage sind, die Reifung von DC zu induzieren, wodurch eine tolerogene oder auch T<sub>H</sub>2-Immunreaktion gefördert wird. Möglicherweise führen die geringen aber signifikant erhöhten Mengen an IL-12 (p70) zur Induktion der Reifung einiger DC durch NK-Zellen, während ein Großteil der NK-Zellen aufgrund der hohen IL-4-Konzentration nicht in der Lage ist, dieser Aufgabe nachzukommen. Zudem wird möglicherweise durch das erhöhte Vorkommen von anti-inflammatorischem IL-10 in den untersuchten Endometriose-Patientinnen der Reifeinduktion durch die NK-Zellen zusätzlich entgegengewirkt und so bleiben erforderliche, pro-inflammatorische Immunreaktionen an entscheidender Stelle aus und die Typ-2-Antwort dominiert. Interessanterweise zeigte sich die Frequenz der zytotoxischen NK-Zellen in den Endometriose-Patientinnen während der sekretorischen Phase signifikant erhöht. Souza et al. fanden speziell in der folliculären Phase im Blut gesunder Frauen die zytolytische Aktivität dieser Zellen hochreguliert vor (Souza et al. 2001). Demnach scheint in den Endometriose-Patientinnen eine Fehlsteuerung der NK-Zell-Aktivitäten vorzuliegen.

Die Frequenz der zytokinproduzierenden und regulatorischen NK-Zellen stellte sich in den Untersuchungen ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, jedoch mit einer leichten Erhöhung auf Seiten der Endometriose-Patientinnen, dar. Interessanterweise zeigte sich in der Endometriose-Gruppe und hier speziell bei den schwer erkrankten Patientinnen eine signifikant erhöhte Konzentration an angiogenem TNF- $\alpha$ . Dazu passend beschrieben Funamizu et al. eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Produktion durch peritoneale NK-Zellen, speziell in schwerer Endometriose (Funamizu et al. 2014). Die oben erwähnten Ergebnisse könnten demnach auf eine erhöhte Aktivität dieser Effektorzellen und eine Beteiligung an einer unter Endometriose hochregulierten Typ-1-Reaktion hindeuten. Eine gleichbleibende Quantität bei erhöhter Aktivität und folglich ein maßgebliches Mitwirken der zytokinproduzierenden NK-Zellen an der Angiogenese und Proliferation der endometrialen Zellen an den ortsfremden Lokalisationen, sollte daher in Betracht gezogen werden.

Zudem sind zytokinproduzierende NK-Zellen ebenfalls an der Synthese von IL-10 und IL-13 beteiligt (Cooper et al. 2001). Das erhöhte Aufkommen von IL-10 und IL-13 in der untersuchten Endometriose-Gruppe kann also dafürsprechen, dass die NK-Zellen ebenfalls an Typ-2-Immunreaktionen im Rahmen der Endometriose beteiligt sind. Ohne eine gesteigerte zytotoxische Aktivität jedoch, kann die Immunreaktion von Seiten der NK-Zellen nicht ausreichend wirken.

Interessanterweise konnte eine hormonelle Behandlung von Endometriose-Patientinnen mit GnRH Analoga eine Steigerung in der Frequenz sowie der Aktivität der NK-Zellen im Serum hervorrufen, nach der chirurgischen Entfernung ortsfremder Läsionen blieb dieser positive Effekt jedoch aus (Oosterlynck et al. 1994; Hsu et al. 1997; Umesaki et al. 1999). Entsprechend könnte die Stimulation der Funktionen der NK-Zellen (z. B. durch Hormone) einen möglichen therapeutischen Schlüssel darstellen, um die ektopen Zellen effektiv zu bekämpfen (Osuga et al. 2011).

Die nähere Analyse der Peritonealflüssigkeit der Endometriose-Patientinnen ergab für RANTES keinen Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen. Die Ergebnisse einzelner Forschungsprojekte sind kontrovers was dieses chemotaktische Zytokin betrifft (Borrelli et al. 2014). Borelli et al. ermittelten, dass RANTES in 57,2 % der Studien unverändert unter Endometriose zu finden ist (Borrelli et al. 2014). Chemotaktische Zytokine wie RANTES bilden Immunkomponenten, welche über das Anlocken von Immunzellen wie NK-Zellen, Granulozyten oder Monozyten die Immunantwort mitbestimmen und durch ihre pro-inflammatorische Wirkung auch mit der Endometriose assoziiert werden (Hornung et al. 1997). Möglicherweise kommt RANTES im Rahmen der Endometriose seinen regulären Funktionen innerhalb der Immunantwort nicht ausreichend nach.

### 5.8. Fazit und Ausblick

Mit dieser Arbeit ist es über besonders komplexe Methoden und eine neuartige Breite analysierter Werte gelungen, die Typ-1- und Typ-2-Immunreaktion im Rahmen der Endometriose näher zu beleuchten und genauer zu verstehen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Monozyten und Makrophagen die dominierenden Zellen in der Peritonealflüssigkeit der Frauen mit Endometriose sind und die Zellgröße dieser Population positiv mit dem Schweregrad der Endometriose korreliert. Zudem exprimieren sie HLA-DR signifikant geringer. Darüber hinaus sind signifikant erhöhte Konzentrationen an IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-17 $\alpha$ , FGFb, G-CSF, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und Neopterin in der Peritonealflüssigkeit der betroffenen Patientinnen zu finden. Die Konzentrationen von

## Diskussion

IL-12 (p70), IL-17 $\alpha$  und FGFb sind speziell in milder Endometriose signifikant hochreguliert, während IL-2, IL-8, MCP-1, TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$  in schwerer Endometriose die höchsten Konzentrationen erreichen. Erstmals konnten durch eine spezielle und ausgewählte Kombination an Methoden, Kohorten und analysierten Parametern die Typ-1- und Typ-2 Immunreaktionen auf diese Weise aufgearbeitet werden und der Botenstoff Neopterin als potentieller neuartiger diagnostischer Marker in diesem detaillierten Gesamtkontext analytisch betrachtet werden.

Dieses differenziertere Bild der beteiligten Immunzellen und deren Botenstoffen, kann in Zukunft einen entscheidenden Beitrag im Verständnis der komplexen Pathomechanismen dieser hochrelevanten gynäkologischen Erkrankung leisten.

Die vorliegenden Resultate verdeutlichen, dass mehr ein funktioneller als ein quantitativer Unterschied bezüglich veränderter Aktivierung und Funktionen der Immunzellen im Kontext der Endometriose vorliegt. Diese funktionellen Veränderungen könnten die Grundlage einer gestörten Immunreaktion bei Endometriose-Patientinnen bilden. Demnach kann eine verringerte Aktivität der Makrophagen und der DC, Antigene zu präsentieren, einen wesentlichen Schlüsselpunkt in der Entwicklung und Etablierung der Endometriose darstellen, da entscheidende abwehrende Immunmechanismen nicht ausreichend stimuliert werden. Die vergrößerten peritonealen Monozyten/Makrophagen der Endometriose-Patientinnen, deuten zusätzlich auf potentiell veränderte Aktivitäten dieser Zellen hin, welche in Zukunft näher beleuchtet werden sollten.

Die genauere Untersuchung der Typ-1- und Typ-2-Makrophagen und dazugehöriger Zytokine ergab eine gesteigerte angiogene Aktivität im Rahmen pro-inflammatorischer Prozesse sowie parallel hochregulierter Komponenten einer anti-inflammatorischen Immunreaktion. Aufgrund der Koexistenz dieser gegenspielenden Akteure im Rahmen inflammatorischer Prozesse, scheint eine adäquate und effektive Immunreaktion und damit die Eliminierung der ektopen endometrialen Zellen ausbleiben. Auch die vorgefundenen Indizien für parallel hochregulierte pro- und anti-inflammatorische T-Zellreaktionen verdeutlichen, dass weniger die Frage nach einer dominierenden Typ-1- oder Typ-2-Antwort als mehr die nach speziellen, fehlgeleiteten Mechanismen im Einzelnen beleuchtet werden sollte.

Potenziell toleranzinduzierende Komponenten, beispielsweise ausgelöst durch unreife DC oder aktive T<sub>Reg</sub>, könnten die Grundlage für solche gestörten Immunreaktionen darstellen. Eine spezielle Untersuchung der einzelnen DC Subpopulationen und der T<sub>Reg</sub> in der Peritonealflüssigkeit war in den Analysen aufgrund begrenzter Kapazitäten des Durchflusszytometers bzw. der zu messenden Panel nicht möglich. Eine genaue

## Diskussion

Diskriminierung sollte jedoch Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, um die Rolle dieser Leukozyten innerhalb der Pathogenese der Endometriose zu verstehen. Die Funktion dieser Immunzellen in der Toleranzinduktion könnte den Ansatzpunkt einer kausaltherapeutischen Therapie darstellen und darüber hinaus wäre eine antiangiogene Therapie über die Hemmung von unreifen DC oder angiogenen Botenstoffen denkbar.

Darüber hinaus sind weitere und detailliertere Untersuchungen notwendig, um die Funktion der NKT-Zellen im Kontext der Endometriose einzuordnen, da diese Zellen in der Lage sind, sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Komponenten maßgeblich zu beeinflussen.

Des Weiteren scheinen B-Zellen erst unter schwerer Endometriose vermehrt zu proliferieren. Entsprechend sollte der Aspekt einer gestörten Antikörper-Produktion sowie einer potentiellen Autoimmunkomponente künftig Gegenstand detaillierter Untersuchungen sein, um Klarheit in Bezug auf die potentielle Aufgabe der B-Zellen im Rahmen der Pathogenese und des Verlaufs der Endometriose zu gewinnen.

Es ist möglich, dass die gestörte zytotoxische Aktivität der NK-Zellen durch unzureichende Eliminierungsmechanismen einen weiteren maßgeblichen Aspekt in der Entstehung der Endometriose bildet. Demnach sollte ein besonderes Augenmerk auf die genaue Untersuchung hormoneller Therapien zur Stimulation dieser Zellen gelenkt werden.

Neopterin, welches in hohen Konzentrationen in der Peritonealhöhle der Endometriose-Patientinnen zu finden war, sollte unbedingt weiterhin in künftigen Projekten als potentieller Biomarker untersucht werden. Die Konzentrationen in körperlichen Kompartimenten wie Blut und Urin sollten verstärkt beleuchtet werden. So kann evaluiert werden, ob Neopterin, wie schon in anderen chronischen Erkrankungen, über nicht-invasive Methoden als Biomarker fungieren kann.

In Gruppen, bei denen eine geringere Anzahl an Messwerten zur Verfügung stand, ist die Wahrscheinlichkeit grundsätzlich geringer, potentiell mögliche und in der Realität vorhandene Unterschiede als signifikant zu identifizieren. Ein signifikanter Unterschied selbst bei einer kleineren Gruppengröße, deutet demnach auf eine hohe Relevanz hin. Die erhobenen Daten sprechen für eine veränderte, teils unzureichende Immunreaktion der Frauen mit Endometriose.

Um die komplexe immunologische Situation der Endometriose-Patientinnen noch genauer zu erschließen, ist es notwendig, die oben genannten immunologischen Komponenten in künftigen Studien detaillierter zu beleuchten. Folglich könnten der Pathogenese der Endometriose potentiell zugrunde liegende Faktoren und Mechanismen aufgeklärt und kausaltherapeutische Methoden etabliert werden.

## 6. Zusammenfassung

Endometriose (EM) tritt Östrogen-abhängig auf und ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen von Frauen im reproduktiven Alter. Das Auftreten von funktionalem Gewebe des Endometriums (Stroma und endometriale Drüsen) außerhalb der Uterushöhle, meist in Form von peritonealen Läsionen, definiert diese chronisch inflammatorische Erkrankung. Der Pathomechanismus ist ungeklärt und entsprechend sind keine kausal-therapeutischen Methoden etabliert. Es ist bekannt, dass verschiedene Komponenten des Immunsystems die Pathogenese der EM beeinflussen. Zudem zeigten Studien, dass neben endometrialem Gewebe auch Peritonealflüssigkeit immunkompetente Zellen beinhaltet. Ziel dieser Studie war es, die Rolle von Immunzellen und inflammatorischen Zytokinen in der Pathogenese und Etablierung von EM zu untersuchen. Hierzu wurden die Durchflusszytometrie, ein Bio-Plex™ Zytokin Assay und ein ELISA-Kit genutzt. Verschiedene Immunzellpopulationen und 27 Zytokine, Interleukine und Wachstumsfaktoren wurden in der Peritonealflüssigkeit von EM- und Kontroll-Patientinnen (benigne Geschehen wie Ovarialzysten oder Leiomyome) detektiert und charakterisiert. Zudem wurde die Konzentration des pro-inflammatorischen Neopterin, welches in verschiedenen chronischen Erkrankungen als Biomarker eingesetzt wird, analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Monozyten und Makrophagen die dominierenden Zellen in der Peritonealflüssigkeit der Frauen mit EM sind und die Zellgröße dieser Population positiv mit dem Schweregrad der EM korreliert. Zudem exprimieren sie HLA-DR signifikant geringer. Darüber hinaus sind signifikant erhöhte Konzentrationen an IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-17 $\alpha$ , FGFb, G-CSF, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und Neopterin in der Peritonealflüssigkeit der betroffenen Patientinnen zu finden. Die Konzentrationen von IL-12 (p70), IL-17 $\alpha$  und FGFb sind speziell in milder EM signifikant hochreguliert, während IL-2, IL-8, MCP-1, TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$  in schwerer EM die höchsten Konzentrationen erreichen. Diese Resultate korrelieren mit der Annahme, dass veränderte Immunzellaktivitäten die Pathogenese der EM beeinflussen, indem sie die chronische Inflammation, Vaskularisation, Proliferation und Etablierung der EM-Läsionen fördern. Die geringere HLA-DR-Expression und veränderte Zellgröße der Makrophagen in EM zeigen, dass die Veränderungen qualitativer Art sind und diese Population eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der EM spielen könnte. Die erhöhten Konzentrationen der pro- und anti-inflammatorischen Zytokine weisen darauf hin, dass beide immunologischen Komponenten am komplexen Pathomechanismus der EM beteiligt sein könnten. Zudem wurde der Botenstoff Neopterin erstmalig auf diese Weise als neuartiger diagnostischer Marker in diesem detaillierten Gesamtkontext analytisch betrachtet und muss auch in künftigen Studien als potentieller Marker im Rahmen der EM bedacht werden.

## 7. Summary

### **Characterization of immune cells and inflammatory cytokines in the peritoneal fluid of patients with endometriosis**

Endometriosis (EM) is an estrogen-dependent disease and one of the most common benign gynecological disorders of women in reproductive age. The appearance of functional endometrial tissue (stroma and endometrial glands) outside the uterine cavity, mostly as small peritoneal lesions, defines this chronic inflammatory disease. The pathomechanism remains unclear, thus there are no causal therapeutic methods established so far. It is known that different components of the immune system influence the pathogenesis of EM. Furthermore, studies have shown that besides endometriotic tissue, peritoneal fluid also generally contains immunocompetent cells. The aim of this study was to evaluate the potential role of immune cells and their inflammatory cytokines in the pathogenesis and establishment of EM. For this, flow cytometry, a Bio-Plex™ Cytokine Assay and an ELISA-Kit have been used. Different immune cell populations and 27 inflammatory cytokines, interleukins, and growth factors in the peritoneal fluid of EM patients and control patients (benign disorders like ovarian cysts or fibroids) have been detected and characterized. Additionally, the concentration of pro-inflammatory Neopterin, which is used as a biomarker in several chronic diseases, was analyzed. The results show that monocytes and macrophages are the dominating cells in the peritoneal fluid of women with EM and there is a positive correlation of cell size and severity of EM regarding this population. Additionally, their expression of HLA-DR is significantly lower. Furthermore, there are significantly higher levels of IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-17 $\alpha$ , FGFb, G-CSF, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  and Neopterin in the peritoneal fluid of affected patients. Especially the concentrations of IL-12 (p70), IL-17 $\alpha$  and FGFb are significantly upregulated in mild EM, while IL-2, IL-8, MCP-1, TNF- $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$  show the highest levels in women with severe EM. These findings correlate with the assumption that altered immune cell activities influence the pathogenesis of EM by promoting chronic inflammation, vascularization, proliferation, and maintenance of endometriotic lesions. Lower expression of HLA-DR and varying cell size of monocytes and macrophages in women with EM show that there are qualitative alterations, and this population seems to play a crucial role in the pathogenesis of EM. The higher concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines indicate that both components of the immune response seem to take part in the complex pathomechanism of EM. Furthermore, it was the first time that Neopterin was analyzed as a potential new biomarker in this special and detailed context and this messenger has to be considered as a diagnostic parameter for EM in future studies.

## 8. Literaturverzeichnis

Abbott, J. A., J. Hawe, R. D. Clayton und R. Garry (2003). "The effects and effectiveness of laparoscopic excision of endometriosis: a prospective study with 2-5 year follow-up." Hum Reprod **18**(9): 1922-1927.

Adamson, G. D. und D. J. Pasta (2010). "Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system." Fertil Steril **94**(5): 1609-1615.

Ahn, S. H., A. K. Edwards, S. S. Singh, S. L. Young, B. A. Lessey und C. Tayade (2015). "IL-17A Contributes to the Pathogenesis of Endometriosis by Triggering Proinflammatory Cytokines and Angiogenic Growth Factors." J Immunol **195**(6): 2591-2600.

Akiyama, M., H. Okabe, K. Takakura, Y. Fujiyama und Y. Noda (1999). "Expression of macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) in human endometrium throughout the menstrual cycle." Br J Obstet Gynaecol **106**(7): 725-730.

Akoum, A., C. Jolicoeur und A. Boucher (2000). "Estradiol amplifies interleukin-1-induced monocyte chemotactic protein-1 expression by ectopic endometrial cells of women with endometriosis." J Clin Endocrinol Metab **85**(2): 896-904.

Akoum, A., J. Kong, C. Metz und M. C. Beaumont (2002). "Spontaneous and stimulated secretion of monocyte chemotactic protein-1 and macrophage migration inhibitory factor by peritoneal macrophages in women with and without endometriosis." Fertil Steril **77**(5): 989-994.

Aliani, F., M. Ashrafi, A. Arabipoor, E. Shahrokh-Tehraninejad, S. Jahanian Sadatmahalleh und M. R. Akhond (2018). "Comparison of the symptoms and localisation of endometriosis involvement according to fertility status of endometriosis patients." J Obstet Gynaecol **38**(4): 536-542.

Anaf, V., P. Simon, I. Fayt und J. Noel (2000). "Smooth muscles are frequent components of endometriotic lesions." Hum Reprod **15**(4): 767-771.

Andreoli, C. G., V. K. Genro, C. A. Souza, T. Michelon, J. P. Bilibio, C. Scheffel und J. S. Cunha-Filho (2011). "T helper (Th)1, Th2, and Th17 interleukin pathways in infertile patients with minimal/mild endometriosis." Fertil Steril **95**(8): 2477-2480.

Antsiferova, Y. S., N. Y. Sotnikova, L. V. Posiseeva und A. L. Shor (2005). "Changes in the T-helper cytokine profile and in lymphocyte activation at the systemic and local levels in women with endometriosis." Fertil Steril **84**(6): 1705-1711.

Arango Duque, G. und A. Descoteaux (2014). "Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases." Front Immunol **5**: 491.

ASRM (1997). "Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996." Fertil Steril **67**(5): 817-821.

Athie-Morales, V., H. H. Smits, D. A. Cantrell und C. M. Hilkens (2004). "Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development." J Immunol **172**(1): 61-69.

Aurich, C. (2005). Reproduktionsmedizin beim Pferd: Gynäkologie, Andrologie, Geburtshilfe. Stuttgart, Parey - ISBN 3-8304-4102-9.

- Bacci, M., A. Capobianco, A. Monno, L. Cottone, F. Di Puppo, B. Camisa, M. Mariani, C. Brignole, M. Ponzoni, S. Ferrari, P. Panina-Bordignon, A. A. Manfredi und P. Rovere-Querini (2009). "Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease." Am J Pathol **175**(2): 547-556.
- Badawy, S. Z., V. Cuenca, L. Kaufman, A. Stitzel und M. Thompson (1989). "The regulation of immunoglobulin production by B cells in patients with endometriosis." Fertil Steril **51**(5): 770-773.
- Banchereau, J. und R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-252.
- Barbosa, C. P., F. A. Mafra, E. B. Cordts, C. Peluso, D. M. Christofolini und B. Bianco (2012). "Aberrant Foxp3 Gene Expression in Eutopic and Ectopic Endometrium of Infertile Women with Endometriosis." Fertil Steril **98**(3): S219-S219.
- Barcena de Arellano, M. L., J. Gericke, U. Reichelt, A. F. Okuducu, A. D. Ebert, V. Chiantera, A. Schneider und S. Mechsner (2011). "Immunohistochemical characterization of endometriosis-associated smooth muscle cells in human peritoneal endometriotic lesions." Hum Reprod **26**(10): 2721-2730.
- Barrier, B. F., J. Allison, G. B. Hubbard, E. J. Dick, Jr., K. M. Brasky und D. J. Schust (2007). "Spontaneous adenomyosis in the chimpanzee (*Pan troglodytes*): a first report and review of the primate literature: case report." Hum Reprod **22**(6): 1714-1717.
- Bedaiwy, M. A., C. Allaire und S. Alfaraj (2017). "Long-term medical management of endometriosis with dienogest and with a gonadotropin-releasing hormone agonist and add-back hormone therapy." Fertil Steril **107**(3): 537-548.
- Bedaiwy, M. A., T. Falcone, R. K. Sharma, J. M. Goldberg, M. Attaran, D. R. Nelson und A. Agarwal (2002). "Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial." Hum Reprod **17**(2): 426-431.
- Beliard, A., A. Noel, F. Goffin, F. Frankenne und J. M. Foidart (2003). "Adhesion of endometrial cells labeled with 111Indium-tropolonate to peritoneum: a novel in vitro model to study endometriosis." Fertil Steril **79 Suppl 1**: 724-729.
- Berbic, M., A. J. Hey-Cunningham, C. Ng, N. Tokushige, S. Ganewatta, R. Markham, P. Russell und I. S. Fraser (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.
- Berbic, M., L. Schulke, R. Markham, N. Tokushige, P. Russell und I. S. Fraser (2009). "Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis." Hum Reprod **24**(2): 325-332.
- Bergqvist, A., C. Bruse, M. Carlberg und K. Carlstrom (2001). "Interleukin 1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in endometriotic tissue and in endometrium." Fertil Steril **75**(3): 489-495.
- Borrelli, G. M., M. S. Abrao und S. Mechsner (2014). "Can chemokines be used as biomarkers for endometriosis? A systematic review." Hum Reprod **29**(2): 253-266.

- Borrelli, G. M., A. M. Kaufmann, M. S. Abrao und S. Mechsner (2015). "Addition of MCP-1 and MIP-3beta to the IL-8 appraisal in peritoneal fluid enhances the probability of identifying women with endometriosis." J Reprod Immunol **109**: 66-73.
- Bouhlef, M. A., B. Derudas, E. Rigamonti, R. Dievart, J. Brozek, S. Haulon, C. Zawadzki, B. Jude, G. Torpier, N. Marx, B. Staels und G. Chinetti-Gbaguidi (2007). "PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties." Cell Metab **6**(2): 137-143.
- Bouman, A., H. Moes, M. J. Heineman, L. F. de Leij und M. M. Faas (2001). "Cytokine production by natural killer lymphocytes in follicular and luteal phase of the ovarian cycle in humans." Am J Reprod Immunol **45**(3): 130-134.
- Brady, J., S. Carotta, R. P. Thong, C. J. Chan, Y. Hayakawa, M. J. Smyth und S. L. Nutt (2010). "The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation." J Immunol **185**(11): 6679-6688.
- Bricou, A., R. E. Batt und C. Chapron (2008). "Peritoneal fluid flow influences anatomical distribution of endometriotic lesions: why Sampson seems to be right." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **138**(2): 127-134.
- Brosens, I., P. Puttemans, R. Campo, S. Gordts und K. Kinkel (2004). "Diagnosis of endometriosis: pelvic endoscopy and imaging techniques." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **18**(2): 285-303.
- Buczowska, J., R. Kozdrowski, M. Nowak, A. Ras und J. Mrowiec (2014). "Endometriosis--significance for horse reproduction, pathogenesis, diagnosis, and proposed therapeutic methods." Pol J Vet Sci **17**(3): 547-554.
- Buechler, C., M. Ritter, E. Orso, T. Langmann, J. Klucken und G. Schmitz (2000). "Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli." J Leukoc Biol **67**(1): 97-103.
- Buelens, C., V. Verhasselt, D. De Groote, K. Thielemans, M. Goldman und F. Willems (1997). "Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10." Eur J Immunol **27**(8): 1848-1852.
- Bulman-Fleming, J. (2008). "A rare case of uterine adenomyosis in a Siamese cat." Can Vet J **49**(7): 709-712.
- Bulun, S. E. (2009). "Endometriosis." N Engl J Med **360**(3): 268-279.
- Burney, R. O. und L. C. Giudice (2012). "Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis." Fertil Steril **98**(3): 511-519.
- Cao, X., D. Yang, M. Song, A. Murphy und S. Parthasarathy (2004). "The presence of endometrial cells in the peritoneal cavity enhances monocyte recruitment and induces inflammatory cytokines in mice: implications for endometriosis." Fertil Steril **82** Suppl 3: 999-1007.
- Capobianco, A., A. Monno, L. Cottone, M. A. Venneri, D. Biziato, F. Di Puppo, S. Ferrari, M. De Palma, A. A. Manfredi und P. Rovere-Querini (2011). "Proangiogenic Tie2(+) macrophages infiltrate human and murine endometriotic lesions and dictate their growth in a mouse model of the disease." Am J Pathol **179**(5): 2651-2659.

- Capobianco, A. und P. Rovere-Querini (2013). "Endometriosis, a disease of the macrophage." Front Immunol **4**: 9.
- Carbone, E., G. Terrazzano, G. Ruggiero, D. Zanzi, A. Ottaiano, C. Manzo, K. Karre und S. Zappacosta (1999). "Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells." Eur J Immunol **29**(12): 4022-4029.
- Carvalho, T., A. Rodrigues, A. Lopes, L. Ines, I. Velada, A. Ribeiro, A. Martinho, J. A. Silva, M. L. Pais und A. Paiva (2012). "Tolerogenic versus inflammatory activity of peripheral blood monocytes and dendritic cells subpopulations in systemic lupus erythematosus." Clin Dev Immunol **2012**: 934161.
- Chadban, S. J., G. H. Tesch, R. Foti, H. Y. Lan, R. C. Atkins und D. J. Nikolic-Paterson (1998). "Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo." Immunology **94**(1): 72-78.
- Chapron, C., A. Fauconnier, J. B. Dubuisson, H. Barakat, M. Vieira und G. Breart (2003). "Deep infiltrating endometriosis: relation between severity of dysmenorrhoea and extent of disease." Hum Reprod **18**(4): 760-766.
- Chapron, C., A. Fauconnier, M. Vieira, H. Barakat, B. Dousset, V. Pansini, M. C. Vacher-Lavenu und J. B. Dubuisson (2003). "Anatomical distribution of deeply infiltrating endometriosis: surgical implications and proposition for a classification." Hum Reprod **18**(1): 157-161.
- Chishima, F., S. Hayakawa, Y. Hirata, N. Nagai, T. Kanaeda, K. Tsubata und K. Satoh (2000). "Peritoneal and peripheral B-1-cell populations in patients with endometriosis." J Obstet Gynaecol Res **26**(2): 141-149.
- Christodoulakos, G., A. Augoulea, I. Lambrinoudaki, V. Sioulas und G. Creatsas (2007). "Pathogenesis of endometriosis: the role of defective 'immunosurveillance'." Eur J Contracept Reprod Health Care **12**(3): 194-202.
- Chryssicopoulos, A., T. Mantzavinos, A. Kontoravdis, N. Toumbanakis und P. A. Zourlas (1991). "Peritoneal fluid volume parameters in infertile patients." Clin Exp Obstet Gynecol **18**(3): 175-179.
- Chuang, P. C., M. H. Wu, Y. Shoji und S. J. Tsai (2009). "Downregulation of CD36 results in reduced phagocytic ability of peritoneal macrophages of women with endometriosis." J Pathol **219**(2): 232-241.
- Clark, A. H. (1948). "Endometriosis in a young girl." J Am Med Assoc **136**(10): 690.
- Cobellis, L., S. Razzi, S. De Simone, A. Sartini, A. Fava, S. Danero, W. Gioffre, M. Mazzini und F. Petraglia (2004). "The treatment with a COX-2 specific inhibitor is effective in the management of pain related to endometriosis." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **116**(1): 100-102.
- Collin, M. und V. Bigley (2018). "Human dendritic cell subsets: an update." Immunology **154**(1): 3-20.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger und M. A. Caligiuri (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." Trends Immunol **22**(11): 633-640.

- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, S. C. Turner, K. S. Chen, B. A. Ghaeri, T. Ghayur, W. E. Carson und M. A. Caligiuri (2001). "Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset." Blood **97**(10): 3146-3151.
- Cornillie, F. J., D. Oosterlynck, J. M. Lauweryns und P. R. Koninckx (1990). "Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance." Fertil Steril **53**(6): 978-983.
- Cramer, D. W. und S. A. Missmer (2002). "The epidemiology of endometriosis." Ann N Y Acad Sci **955**: 11-22.
- D'Hooghe, T. M., C. S. Bambra, B. M. Raeymaekers, I. De Jonge, J. A. Hill und P. R. Koninckx (1995). "The effects of immunosuppression on development and progression of endometriosis in baboons (*Papio anubis*)." Fertil Steril **64**(1): 172-178.
- D'Hooghe, T. M., C. S. Bambra, B. M. Raeymaekers, I. De Jonge, J. M. Lauweryns und P. R. Koninckx (1995). "Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*)." Am J Obstet Gynecol **173**(1): 125-134.
- D'Hooghe, T. M., C. S. Bambra, B. M. Raeymaekers, A. M. Riday, M. A. Suleman und P. R. Koninckx (1996). "The cycle pregnancy rate is normal in baboons with stage I endometriosis but decreased in primates with stage II and stage III-IV disease." Fertil Steril **66**(5): 809-813.
- D'Hooghe, T. M., C. S. Bambra, M. A. Suleman, G. A. Dunselman, H. L. Evers und P. R. Koninckx (1994). "Development of a model of retrograde menstruation in baboons (*Papio anubis*)." Fertil Steril **62**(3): 635-638.
- D'Hooghe, T. M., C. S. Bambra, L. Xiao, K. Peixe und J. A. Hill (2001). "Effect of menstruation and intrapelvic injection of endometrium on inflammatory parameters of peritoneal fluid in the baboon (*Papio anubis* and *Papio cynocephalus*)." Am J Obstet Gynecol **184**(5): 917-925.
- Dai, Y., X. Li, J. Shi und J. Leng (2018). "A review of the risk factors, genetics and treatment of endometriosis in Chinese women: a comparative update." Reprod Health **15**(1): 82.
- Damle, N. K., K. Klussman, P. S. Linsley und A. Aruffo (1992). "Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+ T lymphocytes." J Immunol **148**(7): 1985-1992.
- Dick, E. J., Jr., G. B. Hubbard, L. J. Martin und M. M. Leland (2003). "Record review of baboons with histologically confirmed endometriosis in a large established colony." J Med Primatol **32**(1): 39-47.
- Dmowski, W. P. und D. P. Braun (2004). "Immunology of endometriosis." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **18**(2): 245-263.
- Dmowski, W. P., J. Ding, J. Shen, N. Rana, B. B. Fernandez und D. P. Braun (2001). "Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis." Hum Reprod **16**(9): 1802-1808.
- do Amaral, V. F., E. A. Dal Lago, W. Kondo, L. C. Souza und J. C. Francisco (2009). "Development of an experimental model of endometriosis in rats." Rev Col Bras Cir **36**(3): 250-255.
- Drake, T. S., S. A. Metz, G. M. Grunert und W. F. O'Brien (1980). "Peritoneal fluid volume in endometriosis." Fertil Steril **34**(3): 280-281.

- Dubois, B., B. Vanbervliet, J. Fayette, C. Massacrier, C. Van Kooten, F. Briere, J. Banchereau und C. Caux (1997). "Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes." J Exp Med **185**(5): 941-951.
- DuPage, M. und J. A. Bluestone (2016). "Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease." Nat Rev Immunol **16**(3): 149-163.
- Ebert, A. D. (2019). Endometriose: Ein Wegweiser für die Praxis. Berlin/Boston, Walter de Gruyter GmbH - ISBN 978-3-11-055978-1.
- Ebert, A. D., L. Dong, M. Merz, B. Kirsch, M. Francuski, B. Bottcher, H. Roman, P. Suvitie, O. Hlavackova, K. Gude und C. Seitz (2017). "Dienogest 2 mg Daily in the Treatment of Adolescents with Clinically Suspected Endometriosis: The VISanne Study to Assess Safety in ADOlescents." J Pediatr Adolesc Gynecol **30**(5): 560-567.
- Eskenazi, B. und M. L. Warner (1997). "Epidemiology of endometriosis." Obstet Gynecol Clin North Am **24**(2): 235-258.
- Fainaru, O., A. Adini, O. Benny, I. Adini, S. Short, L. Bazinet, K. Nakai, E. Pravda, M. D. Hornstein, R. J. D'Amato und J. Folkman (2008). "Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis." FASEB J **22**(2): 522-529.
- Fan, Y. Y., H. Y. Chen, W. Chen, Y. N. Liu, Y. Fu und L. N. Wang (2018). "Expression of inflammatory cytokines in serum and peritoneal fluid from patients with different stages of endometriosis." Gynecol Endocrinol **34**(6): 507-512.
- Fanton, J. W. und G. B. Hubbard (1983). "Spontaneous endometriosis in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)." Lab Anim Sci **33**(6): 597-599.
- Fanton, J. W., G. B. Hubbard und D. H. Wood (1986). "Endometriosis: clinical and pathologic findings in 70 rhesus monkeys." Am J Vet Res **47**(7): 1537-1541.
- Fazleabas, A. T., A. Brudney, B. Gurates, D. Chai und S. Bulun (2002). "A modified baboon model for endometriosis." Ann N Y Acad Sci **955**: 308-317.
- Fernandez, N. C., A. Lozier, C. Flament, P. Ricciardi-Castagnoli, D. Bellet, M. Suter, M. Perricaudet, T. Tursz, E. Maraskovsky und L. Zitvogel (1999). "Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo." Nat Med **5**(4): 405-411.
- Fernandez-Shaw, S., B. R. Hicks, P. L. Yudkin, S. Kennedy, D. H. Barlow und P. M. Starkey (1993). "Anti-endometrial and anti-endothelial auto-antibodies in women with endometriosis." Hum Reprod **8**(2): 310-315.
- Ferreira, R., J. F. C. d. Oliveira, A. Q. Antoniazzi, C. A. Pimentel, J. C. F. Moraes, L. E. Henkes, V. Bordignon und P. B. D. Gonçalves (2008). "Relationship between clinical and postmortem evaluation in repeat breeder beef cows." Ciênc Rural **38**(4): 1056-1060.
- Fleury, S., J. Thibodeau, G. Croteau, N. Labrecque, H. E. Aronson, C. Cantin, E. O. Long und R. P. Sekaly (1995). "HLA-DR polymorphism affects the interaction with CD4." J Exp Med **182**(3): 733-741.
- Fuldeore, M. J. und A. M. Soliman (2017). "Prevalence and Symptomatic Burden of Diagnosed Endometriosis in the United States: National Estimates from a Cross-Sectional Survey of 59,411 Women." Gynecol Obstet Invest **82**(5): 453-461.

- Fulton, R. J., R. L. McDade, P. L. Smith, L. J. Kienker und J. R. Kettman, Jr. (1997). "Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system." Clin Chem **43**(9): 1749-1756.
- Funamizu, A., A. Fukui, M. Kamoi, K. Fuchinoue, M. Yokota, R. Fukuhara und H. Mizunuma (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.
- Gagne, D., M. Rivard, M. Page, K. Shazand, P. Hugo und D. Gosselin (2003). "Blood leukocyte subsets are modulated in patients with endometriosis." Fertil Steril **80**(1): 43-53.
- Gallinelli, A., G. Chiossi, L. Giannella, T. Marsella, A. D. Genazzani und A. Volpe (2004). "Different concentrations of interleukins in the peritoneal fluid of women with endometriosis: relationships with lymphocyte subsets." Gynecol Endocrinol **18**(3): 144-151.
- Gao, Y., L. Luo und F. He (1999). "Effect of IL-1 beta and TNF-alpha on the expression of monocyte chemotactic protein-1 in endometriotic cells." J Tongji Med Univ **19**(3): 212-214.
- Garavaglia, E., L. Pagliardini, I. Tandoi, C. Sigismondi, P. Vigano, S. Ferrari und M. Candiani (2015). "External validation of the endometriosis fertility index (EFI) for predicting spontaneous pregnancy after surgery: further considerations on its validity." Gynecol Obstet Invest **79**(2): 113-118.
- Gebel, H. M., D. P. Braun, A. Tambur, D. Frame, N. Rana und W. P. Dmowski (1998). "Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis." Fertil Steril **69**(6): 1042-1047.
- Giudice, L. C., B. A. Dsupin, S. E. Gargosky, R. G. Rosenfeld und J. C. Irwin (1994). "The insulin-like growth factor system in human peritoneal fluid: its effects on endometrial stromal cells and its potential relevance to endometriosis." J Clin Endocrinol Metab **79**(5): 1284-1293.
- Gogacz, M., K. Galczynski, M. Wojtas, I. Winkler, A. Adamiak, K. Romanek-Piva, T. Rechberger und J. Kotarski (2017). "Fas-Related Apoptosis of Peritoneal Fluid Macrophages in Endometriosis Patients: Understanding the Disease." J Immunol Res **2017**: 3175394.
- Gogacz, M., I. Winkler, A. Bojarska-Junak, J. Tabarkiewicz, A. Semczuk, T. Rechberger und A. Adamiak (2014). "T regulatory lymphocytes in patients with endometriosis." Mol Med Rep **10**(2): 1072-1076.
- Golfier, F. und M. Sabra (2007). "[Surgical management of endometriosis]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **36**(2): 162-172.
- Gong, L., S. Zhang, Y. Han, Q. Long, S. Zou und Y. Cao (2015). "Initiation of GnRH agonist treatment on 3-5 days postoperatively in endometriosis patients: a randomized controlled trial." J Clin Pharmacol **55**(8): 848-853.
- Graham, K. J., F. A. Hulst, L. Vogelnest, I. S. Fraser und C. M. Shilton (2009). "Uterine adenomyosis in an orang-utan (*Pongo abelii/pygmaeus*)." Aust Vet J **87**(1): 66-69.
- Greaves, P. und I. N. White (2006). "Experimental adenomyosis." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **20**(4): 503-510.
- Gressner, A. M. und T. Arndt (2019). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Berlin, Springer - ISBN 978-3-662-48986-4.

Groothuis, P. G., A. W. Nap, E. Winterhager und R. Grummer (2005). "Vascular development in endometriosis." Angiogenesis **8**(2): 147-156.

Guo, M., C. Bafligil, T. Tapmeier, C. Hubbard, S. Manek, C. Shang, F. O. Martinez, N. Schmidt, M. Obendorf, H. Hess-Stumpp, T. M. Zollner, S. Kennedy, C. M. Becker, K. T. Zondervan, A. P. Cribbs und U. Oppermann (2020). "Mass cytometry analysis reveals a distinct immune environment in peritoneal fluid in endometriosis: a characterisation study." BMC Med **18**(1): 3.

Guo, S., Y. Zhang, L. Wang und W. Qiu (2012). "[Association of natural killer T cells with staging of endometriosis]." Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao **32**(9): 1322-1324.

Guo, S. W. (2009). "Recurrence of endometriosis and its control." Hum Reprod Update **15**(4): 441-461.

Haas, D., O. Shebl, A. Shamiyeh und P. Oppelt (2013). "The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses." Acta Obstet Gynecol Scand **92**(1): 3-7.

Haber, E., H. D. Danenberg, N. Koroukhov, R. Ron-El, G. Golomb und M. Schachter (2009). "Peritoneal macrophage depletion by liposomal bisphosphonate attenuates endometriosis in the rat model." Hum Reprod **24**(2): 398-407.

Hadfield, R. M., P. L. Yudkin, C. L. Coe, J. Scheffler, H. Uno, D. H. Barlow, J. W. Kemnitz und S. H. Kennedy (1997). "Risk factors for endometriosis in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a case-control study." Hum Reprod Update **3**(2): 109-115.

Halis, G., S. Mechsner und A. D. Ebert (2010). "The diagnosis and treatment of deep infiltrating endometriosis." Dtsch Arztebl Int **107**(25): 446-456.

Halme, J., S. Becker und S. Haskill (1987). "Altered maturation and function of peritoneal macrophages: possible role in pathogenesis of endometriosis." Am J Obstet Gynecol **156**(4): 783-789.

Halme, J., M. G. Hammond, J. F. Hulka, S. G. Raj und L. M. Talbert (1984). "Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis." Obstet Gynecol **64**(2): 151-154.

Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy und C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-1132.

Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman und M. C. Nussenzweig (2001). "Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo." J Exp Med **194**(6): 769-779.

Hever, A., R. B. Roth, P. Hevezi, M. E. Marin, J. A. Acosta, H. Acosta, J. Rojas, R. Herrera, D. Grigoriadis, E. White, P. J. Conlon, R. A. Maki und A. Zlotnik (2007). "Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(30): 12451-12456.

Hirata, T., Y. Osuga, K. Hamasaki, O. Yoshino, M. Ito, A. Hasegawa, Y. Takemura, Y. Hirota, E. Nose, C. Morimoto, M. Harada, K. Koga, T. Tajima, S. Saito, T. Yano und Y. Taketani (2008). "Interleukin (IL)-17A stimulates IL-8 secretion, cyclooxygenase-2 expression, and cell proliferation of endometriotic stromal cells." Endocrinology **149**(3): 1260-1267.

- Ho, H. N., K. H. Chao, H. F. Chen, M. Y. Wu, Y. S. Yang und T. Y. Lee (1995). "Peritoneal natural killer cytotoxicity and CD25+ CD3+ lymphocyte subpopulation are decreased in women with stage III-IV endometriosis." Hum Reprod **10**(10): 2671-2675.
- Hoffmann, G., B. Wirleitner und D. Fuchs (2003). "Potential role of immune system activation-associated production of neopterin derivatives in humans." Inflamm Res **52**(8): 313-321.
- Hornung, D., K. Dohrn, K. Sotlar, R. R. Greb, D. Wallwiener, L. Kiesel und R. N. Taylor (2000). "Localization in tissues and secretion of eotaxin by cells from normal endometrium and endometriosis." J Clin Endocrinol Metab **85**(7): 2604-2608.
- Hornung, D., I. P. Ryan, V. A. Chao, J. L. Vigne, E. D. Schriock und R. N. Taylor (1997). "Immunolocalization and regulation of the chemokine RANTES in human endometrial and endometriosis tissues and cells." J Clin Endocrinol Metab **82**(5): 1621-1628.
- Horton, J. D., K. J. Dezee, E. P. Ahnfeldt und M. Wagner (2008). "Abdominal wall endometriosis: a surgeon's perspective and review of 445 cases." Am J Surg **196**(2): 207-212.
- Hsu, C. C., Y. S. Lin, S. T. Wang und K. E. Huang (1997). "Immunomodulation in women with endometriosis receiving GnRH agonist." Obstet Gynecol **89**(6): 993-998.
- Huber, C., J. R. Batchelor, D. Fuchs, A. Hausen, A. Lang, D. Niederwieser, G. Reibnegger, P. Swetly, J. Troppmair und H. Wachter (1984). "Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma." J Exp Med **160**(1): 310-316.
- Hull, M. L., D. S. Charnock-Jones, C. L. Chan, K. L. Bruner-Tran, K. G. Osteen, B. D. Tom, T. P. Fan und S. K. Smith (2003). "Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis." J Clin Endocrinol Metab **88**(6): 2889-2899.
- Ibrahim, M. G., V. Chiantera, S. Frangini, S. Younes, C. Kohler, E. T. Taube, J. Plendl und S. Mechsner (2015). "Ultramicro-trauma in the endometrial-myometrial junctional zone and pale cell migration in adenomyosis." Fertil Steril **104**(6): 1475-1483 e1471-1473.
- Itoh, F., Y. Komohara, K. Takaishi, R. Honda, H. Tashiro, S. Kyo, H. Katabuchi und M. Takeya (2013). "Possible involvement of signal transducer and activator of transcription-3 in cell-cell interactions of peritoneal macrophages and endometrial stromal cells in human endometriosis." Fertil Steril **99**(6): 1705-1713.
- Iwabe, T., T. Harada, T. Tsudo, Y. Nagano, S. Yoshida, M. Tanikawa und N. Terakawa (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.
- Iwasaki, K., T. Makino, T. Maruyama, H. Matsubayashi, S. Nozawa und T. Yokokura (1993). "Leukocyte subpopulations and natural killer activity in endometriosis." Int J Fertil Menopausal Stud **38**(4): 229-234.
- Jabeen, S. und M. Raees (2015). "Primary amenorrhea with bilateral endometriotic cysts." J Coll Physicians Surg Pak **25**(5): 372-373.
- Jacobson, T. Z., J. M. Duffy, D. Barlow, P. R. Koninckx und R. Garry (2009). "Laparoscopic surgery for pelvic pain associated with endometriosis." Cochrane Database Syst Rev(4): CD001300.

- Jeung, I., K. Cheon und M. R. Kim (2016). "Decreased Cytotoxicity of Peripheral and Peritoneal Natural Killer Cell in Endometriosis." Biomed Res Int **2016**: 2916070.
- Jiang, Y., D. I. Beller, G. Frendl und D. T. Graves (1992). "Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes." J Immunol **148**(8): 2423-2428.
- Johnson, N. P., L. Hummelshoj, G. D. Adamson, J. Keckstein, H. S. Taylor, M. S. Abrao, D. Bush, L. Kiesel, R. Tamimi, K. L. Sharpe-Timms, L. Rombauts, L. C. Giudice und W. E. S. S. Paulo (2017). "World Endometriosis Society consensus on the classification of endometriosis." Hum Reprod **32**(2): 315-324.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop und A. H. Enk (2000). "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." J Exp Med **192**(9): 1213-1222.
- Jorgensen, H., A. S. Hill, M. T. Beste, M. P. Kumar, E. Chiswick, P. Fedorcsak, K. B. Isaacson, D. A. Lauffenburger, L. G. Griffith und E. Qvigstad (2017). "Peritoneal fluid cytokines related to endometriosis in patients evaluated for infertility." Fertil Steril **107**(5): 1191-1199.e2.
- Kai, K., K. Nasu, S. Nakamura, J. Fukuda, M. Nishida und I. Miyakawa (2002). "Expression of interferon-gamma-inducible protein-10 in human endometrial stromal cells." Mol Hum Reprod **8**(2): 176-180.
- Kaiser, A., A. Kopf, C. Gericke, J. Bartley und S. Mechsner (2009). "The influence of peritoneal endometriotic lesions on the generation of endometriosis-related pain and pain reduction after surgical excision." Arch Gynecol Obstet **280**(3): 369-373.
- Kang, Y. J., I. C. Jeung, A. Park, Y. J. Park, H. Jung, T. D. Kim, H. G. Lee, I. Choi und S. R. Yoon (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.
- Kaufmann, S. H. E. und R. Blasczyk (2014). Antigen-Antikörper-Reaktion: Grundlagen serologischer Methoden. In: Basiswissen Immunologie. Berlin/Heidelberg, Springer - ISBN 978-3-642-40325-5. 47-58.
- Kennedy, S., A. Bergqvist, C. Chapron, T. D'Hooghe, G. Dunselman, R. Greb, L. Hummelshoj, A. Prentice, E. Saridogan, E. S. I. G. f. Endometriosis und G. Endometrium Guideline Development (2005). "ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis." Hum Reprod **20**(10): 2698-2704.
- Kiguchi, N., Y. Kobayashi, F. Saika, H. Sakaguchi, T. Maeda und S. Kishioka (2015). "Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain." Pain **156**(4): 684-693.
- Kim, E. Y., J. T. Battaile, A. C. Patel, Y. You, E. Agapov, M. H. Grayson, L. A. Benoit, D. E. Byers, Y. Alevy, J. Tucker, S. Swanson, R. Tidwell, J. W. Tyner, J. D. Morton, M. Castro, D. Polineni, G. A. Patterson, R. A. Schwendener, J. D. Allard, G. Peltz und M. J. Holtzman (2008). "Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease." Nat Med **14**(6): 633-640.
- Kirsch, J. (2020). Peritoneal- und Lageverhältnisse der Organe im Bauch- und Beckenraum. In: Duale Reihe Anatomie. Stuttgart, Thieme - ISBN 978-3-13-243502-5. 647-663.

- Klemmt, P. A., J. G. Carver, P. Koninckx, E. J. McVeigh und H. J. Mardon (2007). "Endometrial cells from women with endometriosis have increased adhesion and proliferative capacity in response to extracellular matrix components: towards a mechanistic model for endometriosis progression." Hum Reprod **22**(12): 3139-3147.
- Koch, A. E., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, L. A. Harlow, L. A. Dipietro, V. M. Elner, S. G. Elner und R. M. Strieter (1992). "Interleukin-8 as a Macrophage-Derived Mediator of Angiogenesis." Science **258**(5089): 1798-1801.
- Koks, C. A., G. A. Dunselman, A. F. de Goeij, J. W. Arends und J. L. Evers (1997). "Evaluation of a menstrual cup to collect shed endometrium for in vitro studies." Fertil Steril **68**(3): 560-564.
- Kondera-Anasz, Z., J. Sikora, A. Mertas, P. Micinski und B. Bednarz (2004). "Concentrations of neopterin and interleukin-10 in peritoneal fluid and in serum of women with endometriosis." Pteridines **15**(1): 20-27.
- Kondera-Anasz, Z., J. Sikora, A. Mielczarek-Palacz und M. Jonca (2005). "Concentrations of interleukin (IL)-1 alpha, IL-1 soluble receptor type II (IL-1 sRII) and IL-1 receptor antagonist (IL-1 Ra) in the peritoneal fluid and serum of infertile women with endometriosis." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **123**(2): 198-203.
- Koninckx, P. R., I. A. Brosens und W. H. Heyns (1980). "[Peritoneal fluid in female fertility and sterility (author's transl)]." Contracept Fertil Sex (Paris) **8**(2): 145-152.
- Koninckx, P. R., S. H. Kennedy und D. H. Barlow (1998). "Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid." Hum Reprod Update **4**(5): 741-751.
- Koninckx, P. R., C. Meuleman, S. Demeyere, E. Lesaffre und F. J. Cornillie (1991). "Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain." Fertil Steril **55**(4): 759-765.
- Koninckx, P. R., M. Renaer und I. A. Brosens (1980). "Origin of peritoneal fluid in women: an ovarian exudation product." Br J Obstet Gynaecol **87**(3): 177-183.
- Krivosikova, M., T. Dallos, W. Maslinski und M. Buc (2009). "B cell activating factor, its role in autoimmunity, and targeting in autoimmune diseases." Bratisl Lek Listy **110**(3): 137-145.
- Kuohung, W., G. L. Jones, A. F. Vitonis, D. W. Cramer, S. H. Kennedy, D. Thomas und M. D. Hornstein (2002). "Characteristics of patients with endometriosis in the United States and the United Kingdom." Fertil Steril **78**(4): 767-772.
- Kusume, T., N. Maeda, C. Izumiya, Y. Yamamoto, K. Hayashi, H. Oguri, Y. Nishimori und T. Fukaya (2005). "Human leukocyte antigen expression by peritoneal macrophages from women with pelvic endometriosis is depressed but coordinated with costimulatory molecule expression." Fertil Steril **83** Suppl 1: 1232-1240.
- Lagana, A. S., F. M. Salmeri, H. Ban Frangez, F. Ghezzi, E. Vrtacnik-Bokal und R. Granese (2019). "Evaluation of M1 and M2 macrophages in ovarian endometriomas from women affected by endometriosis at different stages of the disease." Gynecol Endocrinol: 1-4.
- Lagana, A. S., O. Triolo, F. M. Salmeri, R. Granese, V. I. Palmara, H. Ban Frangez, E. Vrtcnik Bokal und V. Sofo (2016). "Natural Killer T cell subsets in eutopic and ectopic endometrium: a fresh look to a busy corner." Arch Gynecol Obstet **293**(5): 941-949.

- Lanier, L. L., A. M. Le, C. I. Civin, M. R. Loken und J. H. Phillips (1986). "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes." J Immunol **136**(12): 4480-4486.
- Lanier, L. L., S. O'Fallon, C. Somoza, J. H. Phillips, P. S. Linsley, K. Okumura, D. Ito und M. Azuma (1995). "CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL." J Immunol **154**(1): 97-105.
- Laudanski, P., J. Szamatowicz und M. Oniszczuk (2006). "Profiling of peritoneal fluid of women with endometriosis by chemokine protein array." Adv Med Sci **51**: 148-152.
- Lawrence, T. und G. Natoli (2011). "Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity." Nat Rev Immunol **11**(11): 750-761.
- LeBien, T. W. und T. F. Tedder (2008). "B lymphocytes: how they develop and function." Blood **112**(5): 1570-1580.
- Lebovic, D. I., F. Bentzien, V. A. Chao, E. N. Garrett, Y. G. Meng und R. N. Taylor (2000). "Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta." Mol Hum Reprod **6**(3): 269-275.
- Leyendecker, G., G. Kunz, M. Noe, M. Herbertz und G. Mall (1998). "Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra." Hum Reprod Update **4**(5): 752-762.
- Leyendecker, G., L. Wildt und G. Mall (2009). "The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair." Arch Gynecol Obstet **280**(4): 529-538.
- Li, M. Q., Y. Wang, K. K. Chang, Y. H. Meng, L. B. Liu, J. Mei, Y. Wang, X. Q. Wang, L. P. Jin und D. J. Li (2014). "CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell differentiation mediated by endometrial stromal cell-derived TECK promotes the growth and invasion of endometriotic lesions." Cell Death Dis **5**.
- Lin, Y. J., M. D. Lai, H. Y. Lei und L. Y. Wing (2006). "Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model." Endocrinology **147**(3): 1278-1286.
- Lousse, J. C., S. Defrere, A. Van Langendonck, J. Gras, R. Gonzalez-Ramos, S. Colette und J. Donnez (2009). "Iron storage is significantly increased in peritoneal macrophages of endometriosis patients and correlates with iron overload in peritoneal fluid." Fertil Steril **91**(5): 1668-1675.
- Luttmann, W., K. Bratke, M. Küpper und D. Myrtek (2014). Der Experimentator: Immunologie. Berlin/Heidelberg, Springer - ISBN 978-3-642-41898-3.
- MacKenzie, W. F. und H. W. Casey (1975). "Animal model of human disease. Endometriosis. Animal model: endometriosis in rhesus monkeys." Am J Pathol **80**(2): 341-344.
- Malik, K. (2017). "Unusual case of pyometra in a bichon frise dog." Can Vet J **58**(12): 1326-1328.
- Malutan, A. M., T. Drugan, R. Ciortea, C. Bucuri, M. P. Rada und D. Mihiu (2017). "Endometriosis-associated changes in serum levels of interferons and chemokines." Turk J Med Sci **47**(1): 115-122.

- Mandelboim, O., P. Malik, D. M. Davis, C. H. Jo, J. E. Boyson und J. L. Strominger (1999). "Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5640-5644.
- Marcenaro, E., M. Della Chiesa, F. Bellora, S. Parolini, R. Millo, L. Moretta und A. Moretta (2005). "IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors." J Immunol **174**(7): 3992-3998.
- Marchino, G. L., G. Gennarelli, R. Enria, F. Bongioanni, G. Lipari und M. Massobrio (2005). "Diagnosis of pelvic endometriosis with use of macroscopic versus histologic findings." Fertil Steril **84**(1): 12-15.
- Marki, G., A. Bokor, J. Rigo und A. Rigo (2017). "Physical pain and emotion regulation as the main predictive factors of health-related quality of life in women living with endometriosis." Hum Reprod **32**(7): 1432-1438.
- Matarese, G., G. De Placido, Y. Nikas und C. Alviggi (2003). "Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease?" Trends Mol Med **9**(5): 223-228.
- Matsumoto, H., K. Nasu, M. Nishida, H. Ito, S. Bing und I. Miyakawa (2005). "Regulation of proliferation, motility, and contractility of human endometrial stromal cells by platelet-derived growth factor." J Clin Endocrinol Metab **90**(6): 3560-3567.
- Mattison, J. A., M. A. Ottinger, D. Powell, D. L. Longo und D. K. Ingram (2007). "Endometriosis: clinical monitoring and treatment procedures in Rhesus Monkeys." J Med Primatol **36**(6): 391-398.
- Maxwell, C., D. C. Kilpatrick, R. Haining und S. K. Smith (1989). "No HLA-DR specificity is associated with endometriosis." Tissue Antigens **34**(2): 145-147.
- McLaren, J., A. Prentice, D. S. Charnock-Jones, S. A. Millican, K. H. Muller, A. M. Sharkey und S. K. Smith (1996). "Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids." J Clin Invest **98**(2): 482-489.
- Melioli, G., C. Semino, A. Semino, P. L. Venturini und N. Ragni (1993). "Recombinant interleukin-2 corrects in vitro the immunological defect of endometriosis." Am J Reprod Immunol **30**(4): 218-227.
- Meuleman, C., B. Vandenabeele, S. Fieuws, C. Spiessens, D. Timmerman und T. D'Hooghe (2009). "High prevalence of endometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners." Fertil Steril **92**(1): 68-74.
- Meyer, R. (1919). "Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa." Zbl Gynäkol **43**: 745-750.
- Mier-Cabrera, J., L. Jimenez-Zamudio, E. Garcia-Latorre, O. Cruz-Orozco und C. Hernandez-Guerrero (2011). "Quantitative and qualitative peritoneal immune profiles, T-cell apoptosis and oxidative stress-associated characteristics in women with minimal and mild endometriosis." BJOG **118**(1): 6-16.
- Mills, C. D. (2012). "M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease." Crit Rev Immunol **32**(6): 463-488.

- Mills, C. D., K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman und A. M. Hill (2000). "M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm." J Immunol **164**(12): 6166-6173.
- Monsanto, S. P., A. K. Edwards, J. Zhou, P. Nagarkatti, M. Nagarkatti, S. L. Young, B. A. Lessey und C. Tayade (2016). "Surgical removal of endometriotic lesions alters local and systemic proinflammatory cytokines in endometriosis patients." Fertil Steril **105**(4): 968-977 e965.
- Montagna, P., S. Capellino, B. Villaggio, V. Remorgida, N. Ragni, M. Cutolo und S. Ferrero (2008). "Peritoneal fluid macrophages in endometriosis: correlation between the expression of estrogen receptors and inflammation." Fertil Steril **90**(1): 156-164.
- Montenegro, M. L., R. A. Ferriani und P. H. Basse (2015). "Exogenous activated NK cells enhance trafficking of endogenous NK cells to endometriotic lesions." BMC Immunol **16**: 51.
- Mori, H., M. Sawairi, M. Nakagawa, N. Itoh, K. Wada und T. Tamaya (1992). "Expression of interleukin-1 (IL-1) beta messenger ribonucleic acid (mRNA) and IL-1 receptor antagonist mRNA in peritoneal macrophages from patients with endometriosis." Fertil Steril **57**(3): 535-542.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin und R. L. Coffman (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-2357.
- Mosmann, T. R. und S. Sad (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." Immunol Today **17**(3): 138-146.
- Mulayim, N., A. Savlu, O. Guzeloglu-Kayisli, U. A. Kayisli und A. Arici (2004). "Regulation of endometrial stromal cell matrix metalloproteinase activity and invasiveness by interleukin-8." Fertil Steril **81 Suppl 1**: 904-911.
- Na, Y. J., J. O. Jin, M. S. Lee, M. G. Song, K. S. Lee und J. Y. Kwak (2008). "Peritoneal fluid from endometriosis patients switches differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages." J Reprod Immunol **77**(1): 63-74.
- Nap, A. W., P. G. Groothuis, A. Y. Demir, J. W. Maas, G. A. Dunselman, A. F. de Goeij und J. L. Evers (2003). "Tissue integrity is essential for ectopic implantation of human endometrium in the chicken chorioallantoic membrane." Hum Reprod **18**(1): 30-34.
- Newell-Fugate, A. und E. Lane (2009). "Intrapartum uterine rupture with coincidental uterine adenomyosis in an African wild dog (*Lycaon pictus*)." J Zoo Wildl Med **40**(4): 791-795.
- Nie, M. F., Q. Xie, Y. H. Wu, H. He, L. J. Zou, X. L. She und X. Q. Wu (2018). "Serum and Ectopic Endometrium from Women with Endometriosis Modulate Macrophage M1/M2 Polarization via the Smad2/Smad3 Pathway." J Immunol Res **2018**: 6285813.
- Nisolle, M., F. Casanas-Roux und J. Donnez (2000). "Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice." Fertil Steril **74**(2): 306-312.
- Nnoaham, K. E., L. Hummelshoj, P. Webster, T. d'Hooghe, F. de Cicco Nardone, C. de Cicco Nardone, C. Jenkinson, S. H. Kennedy, K. T. Zondervan und c. World Endometriosis Research Foundation Global Study of Women's Health (2011). "Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries." Fertil Steril **96**(2): 366-373 e368.

- Noble, L. S., K. Takayama, K. M. Zeitoun, J. M. Putman, D. A. Johns, M. M. Hinshelwood, V. R. Agarwal, Y. Zhao, B. R. Carr und S. E. Bulun (1997). "Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells." J Clin Endocrinol Metab **82**(2): 600-606.
- Ohnmacht, C., A. Pullner, S. B. King, I. Drexler, S. Meier, T. Brocker und D. Voehringer (2009). "Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity." J Exp Med **206**(3): 549-559.
- Olkowska-Truchanowicz, J., K. Bocian, R. B. Maksym, A. Bialoszezewska, D. Wlodarczyk, W. Baranowski, J. Zabek, G. Korczak-Kowalska und J. Malejczyk (2013). "CD4(+) CD25(+) FOXP3(+) regulatory T cells in peripheral blood and peritoneal fluid of patients with endometriosis." Hum Reprod **28**(1): 119-124.
- Onishi, R. M. und S. L. Gaffen (2010). "Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease." Immunology **129**(3): 311-321.
- Oosterlynck, D. J., F. J. Cornillie, M. Waer, M. Vandeputte und P. R. Koninckx (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.
- Oosterlynck, D. J., C. Meuleman, H. Sobis, M. Vandeputte und P. R. Koninckx (1993). "Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis." Fertil Steril **59**(4): 778-782.
- Oosterlynck, D. J., C. Meuleman, M. Waer und P. R. Koninckx (1994). "CO2-laser excision of endometriosis does not improve the decreased natural killer activity." Acta Obstet Gynecol Scand **73**(4): 333-337.
- Oosterlynck, D. J., C. Meuleman, M. Waer, P. R. Koninckx und M. Vandeputte (1993). "Immunosuppressive activity of peritoneal fluid in women with endometriosis." Obstet Gynecol **82**(2): 206-212.
- Oosterlynck, D. J., C. Meuleman, M. Waer, M. Vandeputte und P. R. Koninckx (1992). "The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis." Fertil Steril **58**(2): 290-295.
- Oral, E., D. L. Olive und A. Arici (1996). "The peritoneal environment in endometriosis." Hum Reprod Update **2**(5): 385-398.
- Osuga, Y., K. Koga, Y. Hirota, T. Hirata, O. Yoshino und Y. Taketani (2011). "Lymphocytes in endometriosis." Am J Reprod Immunol **65**(1): 1-10.
- OuYang, Z., Y. Hirota, Y. Osuga, K. Hamasaki, A. Hasegawa, T. Tajima, T. Hirata, K. Koga, O. Yoshino, M. Harada, Y. Takemura, E. Nose, T. Yano und Y. Taketani (2008). "Interleukin-4 stimulates proliferation of endometriotic stromal cells." Am J Pathol **173**(2): 463-469.
- Ouyang, Z., Y. Osuga, Y. Hirota, T. Hirata, O. Yoshino, K. Koga, T. Yano und Y. Taketani (2010). "Interleukin-4 induces expression of eotaxin in endometriotic stromal cells." Fertil Steril **94**(1): 58-62.
- Paramonova, N. B., E. A. Kogan, A. V. Kolotovkina und O. V. Burmenskaya (2018). "[The morphological and molecular biological signs of impaired endometrial receptivity in infertility in women suffering from external genital endometriosis]." Arkh Patol **80**(3): 11-18.

- Park, S. Y., S. H. Kim, H. D. Chae, C. H. Kim und B. M. Kang (2016). "Efficacy and safety of dienogest in patients with endometriosis: A single-center observational study over 12 months." Clin Exp Reprod Med **43**(4): 215-220.
- Pelch, K. E., K. L. Sharpe-Timms und S. C. Nagel (2012). "Mouse model of surgically-induced endometriosis by auto-transplantation of uterine tissue." J Vis Exp(59): e3396.
- Pencovich, N., J. Luk, S. Hantisteanu, M. D. Hornstein und O. Fainaru (2014). "The development of endometriosis in a murine model is dependent on the presence of dendritic cells." Reprod Biomed Online **28**(4): 515-521.
- Pierce, G. F., T. A. Mustoe, J. Lingelbach, V. R. Masakowski, G. L. Griffin, R. M. Senior und T. F. Deuel (1989). "Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms." J Cell Biol **109**(1): 429-440.
- Pilling, D., T. Fan, D. Huang, B. Kaul und R. H. Gomer (2009). "Identification of Markers that Distinguish Monocyte-Derived Fibrocytes from Monocytes, Macrophages, and Fibroblasts." Plos One **4**(10): e7475. doi: 10.1371/journal.pone.0007475.
- Pizzo, A., F. M. Salmeri, F. V. Ardita, V. Sofo, M. Tripepi und S. Marsico (2002). "Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis." Gynecol Obstet Invest **54**(2): 82-87.
- Podgaec, S., M. S. Abrao, J. A. Dias, Jr., L. V. Rizzo, R. M. de Oliveira und E. C. Baracat (2007). "Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component." Hum Reprod **22**(5): 1373-1379.
- Podgaec, S., L. V. Rizzo, L. F. Fernandes, E. C. Baracat und M. S. Abrao (2012). "CD4(+) CD25(high) Foxp3(+) cells increased in the peritoneal fluid of patients with endometriosis." Am J Reprod Immunol **68**(4): 301-308.
- The Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine (2008). "Treatment of pelvic pain associated with endometriosis." Fertil Steril **90**(5 Suppl): S260-269.
- The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2012). "Endometriosis and infertility: a committee opinion." Fertil Steril **98**(3): 591-598.
- Presta, M., P. Dell'Era, S. Mitola, E. Moroni, R. Ronca und M. Rusnati (2005). "Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis." Cytokine Growth Factor Rev **16**(2): 159-178.
- Rakhila, H., M. Al-Akoum, M. E. Bergeron, M. Leboeuf, M. Lemyre, A. Akoum und M. Pouliot (2016). "Promotion of angiogenesis and proliferation cytokines patterns in peritoneal fluid from women with endometriosis." J Reprod Immunol **116**: 1-6.
- Redwine, D. B. (2002). "Diaphragmatic endometriosis: diagnosis, surgical management, and long-term results of treatment." Fertil Steril **77**(2): 288-296.
- Reis e Sousa, C., S. Hieny, T. Scharton-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain und A. Sher (1997). "In Vivo Microbial Stimulation Induces Rapid CD40 Ligand-independent Production of Interleukin 12 by Dendritic Cells and their Redistribution to T Cell Areas." J Exp Med **186**(11): 1819-1829.
- Renner, S. P., P. Oppelt, H. Binder und M. W. Beckmann (2006). "Endometriose." Geburtshilfe Frauenheilkd **66**: R61-88.

- Ricci, A. G., C. N. Olivares, M. A. Bilotas, G. F. Meresman und R. I. Baranao (2011). "Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis." Reprod Sci **18**(7): 614-622.
- Riccio, L., P. Santulli, L. Marcellin, M. S. Abrao, F. Batteux und C. Chapron (2018). "Immunology of endometriosis." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **50**: 39-49.
- Riley, C. F., M. H. Moen und V. Videm (2007). "Inflammatory markers in endometriosis: reduced peritoneal neutrophil response in minimal endometriosis." Acta Obstet Gynecol Scand **86**(7): 877-881.
- Robertson, M. J., R. J. Soiffer, S. F. Wolf, T. J. Manley, C. Donahue, D. Young, S. H. Herrmann und J. Ritz (1992). "Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF." J Exp Med **175**(3): 779-788.
- Rush, G. und R. Misajon (2018). "Examining subjective wellbeing and health-related quality of life in women with endometriosis." Health Care Women Int **39**(3): 303-321.
- Sakaguchi, S. (2000). "Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance." Cell **101**(5): 455-458.
- Samartzis, E. P., P. Imesch und D. Fink, (2012). "Pathogenese der Endometriose." Gynecol, **3**, 6-10.
- Sampson, J. A. (1927). "Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation." Am J Pathol **3**(2): 93-110 143.
- Scheerer, C., P. Bauer, V. Chiantera, J. Sehouli, A. Kaufmann und S. Mechsner (2016). "Characterization of endometriosis-associated immune cell infiltrates (EMaICI)." Arch Gynecol Obstet **294**(3): 657-664.
- Schenken, R. S. und R. H. Asch (1980). "Surgical induction of endometriosis in the rabbit: effects on fertility and concentrations of peritoneal fluid prostaglandins." Fertil Steril **34**(6): 581-587.
- Schenken, R. S., R. H. Asch, R. F. Williams und G. D. Hodgen (1984). "Etiology of infertility in monkeys with endometriosis: luteinized unruptured follicles, luteal phase defects, pelvic adhesions, and spontaneous abortions." Fertil Steril **41**(1): 122-130.
- Schiebler, T. H. (2005). Leibeshöhlen und ihre Organe. In: Anatomie: 471-647. Berlin/Heidelberg, Springer - ISBN 978-3-540-21966-8.
- Schiemann, B., J. L. Gommerman, K. Vora, T. G. Cachero, S. Shulga-Morskaya, M. Dobles, E. Frew und M. L. Scott (2001). "An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway." Science **293**(5537): 2111-2114.
- Schrodt, G. R., M. O. Alcorn und J. Ibanez (1980). "Endometriosis of the Male Urinary System - a Case-Report." J Urol **124**(5): 722-723.
- Schulke, L., M. Berbic, F. Manconi, N. Tokushige, R. Markham und I. S. Fraser (2009). "Dendritic cell populations in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis." Hum Reprod **24**(7): 1695-1703.

## Literaturverzeichnis

- Schütt, C. und B. Bröker (2009). Grundwissen Immunologie. Heidelberg, Spektrum - ISBN 978-3-8274-2027-5.
- Selam, B., U. A. Kayisli, G. E. Akbas, M. Basar und A. Arici (2006). "Regulation of FAS ligand expression by chemokine ligand 2 in human endometrial cells." Biol Reprod **75**(2): 203-209.
- Selam, B., U. A. Kayisli, J. A. Garcia-Velasco, G. E. Akbas und A. Arici (2002). "Regulation of fas ligand expression by IL-8 in human endometrium." J Clin Endocrinol Metab **87**(8): 3921-3927.
- Simoens, S., G. Dunselman, C. Dirksen, L. Hummelshoj, A. Bokor, I. Brandes, V. Brodzsky, M. Canis, G. L. Colombo, T. DeLeire, T. Falcone, B. Graham, G. Halis, A. Horne, O. Kanj, J. J. Kjer, J. Kristensen, D. Lebovic, M. Mueller, P. Vigano, M. Wullschlegler und T. D'Hooghe (2012). "The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres." Hum Reprod **27**(5): 1292-1299.
- Sinaii, N., S. D. Cleary, M. L. Ballweg, L. K. Nieman und P. Stratton (2002). "High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis." Hum Reprod **17**(10): 2715-2724.
- Singh, R. R. (2003). "IL-4 and many roads to lupuslike autoimmunity." Clin Immunol **108**(2): 73-79.
- Slabe, N., H. Meden-Vrtovec, I. Verdenik, R. Kosir-Pogacnik und A. Ihan (2013). "Cytotoxic T-Cells in Peripheral Blood in Women with Endometriosis." Geburtshilfe Frauenheilkd **73**(10): 1042-1048.
- Smith, K. A., C. B. Pearson, A. M. Hachey, D. L. Xia und L. M. Wachtman (2012). "Alternative activation of macrophages in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with endometriosis." Comp Med **62**(4): 303-310.
- Somigliana, E., P. Vigano, B. Gaffuri, M. Candiani, M. Busacca, A. M. Di Blasio und M. Vignali (1996). "Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: potential role in endometriosis." Am J Reprod Immunol **36**(5): 295-300.
- Somigliana, E., P. Vigano, B. Gaffuri, D. Guarneri, M. Busacca und M. Vignali (1996). "Human endometrial stromal cells as a source of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 molecules." Hum Reprod **11**(6): 1190-1194.
- Souza, S. S., F. A. Castro, H. C. Mendonca, P. V. Palma, F. R. Morais, R. A. Ferriani und J. C. Voltarelli (2001). "Influence of menstrual cycle on NK activity." J Reprod Immunol **50**(2): 151-159.
- Stanic, A. K., M. Kim, A. K. Styer und B. R. Rueda (2014). "Dendritic cells attenuate the early establishment of endometriosis-like lesions in a murine model." Reprod Sci **21**(10): 1228-1236.
- Startseva, N. V. (1980). "[Clinical immunological aspects of genital endometriosis]." Akush Ginekol (Mosk)(3): 23-26.
- Stashenko, P., L. M. Nadler, R. Hardy und S. F. Schlossman (1980). "Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen." J Immunol **125**(4): 1678-1685.

- Steele, R. W., W. P. Dmowski und D. J. Marmer (1984). "Immunologic aspects of human endometriosis." Am J Reprod Immunol **6**(1): 33-36.
- Stein, M., S. Keshav, N. Harris und S. Gordon (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." J Exp Med **176**(1): 287-292.
- Steinleitner, A., H. Lambert, M. Suarez, N. Serpa, B. Robin und B. Cantor (1991). "Perioovulatory calcium channel blockade enhances reproductive performance in an animal model for endometriosis-associated subfertility." Am J Obstet Gynecol **164**(4): 949-952.
- Steinman, R. M. und M. C. Nussenzweig (2002). "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 351-358.
- Suen, J. L., Y. Chang, P. R. Chiu, T. H. Hsieh, E. Hsi, Y. C. Chen, Y. F. Chen und E. M. Tsai (2014). "Serum level of IL-10 is increased in patients with endometriosis, and IL-10 promotes the growth of lesions in a murine model." Am J Pathol **184**(2): 464-471.
- Suginami, H. (1991). "A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances." Am J Obstet Gynecol **165**(1): 214-218.
- Surrey, E. S. und J. Halme (1991). "Effect of platelet-derived growth factor on endometrial stromal cell proliferation in vitro: a model for endometriosis?" Fertil Steril **56**(4): 672-679.
- Surrey, E. S. und M. D. Hornstein (2002). "Prolonged GnRH agonist and add-back therapy for symptomatic endometriosis: long-term follow-up." Obstet Gynecol **99**(5 Pt 1): 709-719.
- Takamura, M., K. Koga, G. Izumi, T. Hirata, M. Harada, Y. Hirota, O. Hiraike, T. Fujii und Y. Osuga (2015). "Simultaneous Detection and Evaluation of Four Subsets of CD4+ T Lymphocyte in Lesions and Peripheral Blood in Endometriosis." Am J Reprod Immunol **74**(6): 480-486.
- Takebayashi, A., F. Kimura, Y. Kishi, M. Ishida, A. Takahashi, A. Yamanaka, D. Wu, L. Zheng, K. Takahashi, H. Suginami und T. Murakami (2015). "Subpopulations of macrophages within eutopic endometrium of endometriosis patients." Am J Reprod Immunol **73**(3): 221-231.
- Tamada, H., N. Kawate, T. Inaba, M. Kuwamura, M. Maeda, T. Kajikawa und T. Sawada (2005). "Adenomyosis with severe inflammation in the uterine cervix in a dog." Can Vet J **46**(4): 333-334.
- Tanaka, H., W. Zhang, G. X. Yang, Y. Ando, T. Tomiyama, K. Tsuneyama, P. Leung, R. L. Coppel, A. A. Ansari, Z. X. Lian, W. M. Ridgway, T. Joh und M. E. Gershwin (2014). "Successful immunotherapy of autoimmune cholangitis by adoptive transfer of forkhead box protein 3(+) regulatory T cells." Clin Exp Immunol **178**(2): 253-261.
- Tanaka, T., M. Miyama, M. Masuda, K. Mizuno, T. Sakamoto, N. Umesaki und S. Ogita (2000). "Production and physiological function of granulocyte colony-stimulating factor in non-pregnant human endometrial stromal cells." Gynecol Endocrinol **14**(6): 399-404.
- Tariverdian, N., F. Siedentopf, M. Rucke, S. M. Blois, B. F. Klapp, H. Kantenich und P. C. Arck (2009). "Intraperitoneal immune cell status in infertile women with and without endometriosis." J Reprod Immunol **80**(1-2): 80-90.

- Tedder, T. F. und P. Engel (1994). "CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes." Immunol Today **15**(9): 450-454.
- Thomas, C. J., M. Kapoor, S. Sharma, H. Bausinger, U. Zyilan, D. Lipsker, D. Hanau und A. Surolija (2002). "Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an effector of LPS response." FEBS Lett **531**(2): 184-188.
- Tirado-Gonzalez, I., G. Barrientos, N. Tariverdian, P. C. Arck, M. G. Garcia, B. F. Klapp und S. M. Blois (2010). "Endometriosis research: animal models for the study of a complex disease." J Reprod Immunol **86**(2): 141-147.
- Tran, L. V., N. Tokushige, M. Berbic, R. Markham und I. S. Fraser (2009). "Macrophages and nerve fibres in peritoneal endometriosis." Hum Reprod **24**(4): 835-841.
- Tscharke, D. C., N. P. Croft, P. C. Doherty und N. L. La Gruta (2015). "Sizing up the key determinants of the CD8(+) T cell response." Nat Rev Immunol **15**(11): 705-716.
- Tuttlies, F., J. Keckstein, U. Ulrich, M. Possover, K. W. Schweppe, M. Wustlich, O. Buchweitz, R. Greb, O. Kandolf, R. Mangold, W. Masetti, K. Neis, G. Rauter, N. Reeka, O. Richter, A. E. Schindler, M. Sillem, V. Terruhn und H. R. Tinneberg (2005). "[ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis]." Zentralbl Gynakol **127**(5): 275-281.
- Umesaki, N., T. Tanaka, M. Miyama, K. Mizuno, N. Kawamura und S. Ogita (1999). "Increased natural killer cell activities in patients treated with gonadotropin releasing hormone agonist." Gynecol Obstet Invest **48**(1): 66-68.
- Van Acker, H. H., A. Capsomidis, E. L. Smits und V. F. Van Tendeloo (2017). "CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity?" Front Immunol **8**: 892.
- van Seventer, G. A., W. Newman, Y. Shimizu, T. B. Nutman, Y. Tanaka, K. J. Horgan, T. V. Gopal, E. Ennis, D. O'Sullivan, H. Grey und et al. (1991). "Analysis of T cell stimulation by superantigen plus major histocompatibility complex class II molecules or by CD3 monoclonal antibody: costimulation by purified adhesion ligands VCAM-1, ICAM-1, but not ELAM-1." J Exp Med **174**(4): 901-913.
- Vercellini, P., L. Fedele, G. Aimi, G. Pietropaolo, D. Consonni und P. G. Crosignani (2007). "Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients." Hum Reprod **22**(1): 266-271.
- Vercellini, P., E. Somigliana, R. Daguati, P. Vigano, F. Meroni und P. G. Crosignani (2008). "Postoperative oral contraceptive exposure and risk of endometrioma recurrence." Am J Obstet Gynecol **198**(5): 504 e501-505.
- Vinatier, D., G. Orazi, M. Cosson und P. Dufour (2001). "Theories of endometriosis." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **96**(1): 21-34.
- Weiss, A. und D. R. Littman (1994). "Signal transduction by lymphocyte antigen receptors." Cell **76**(2): 263-274.
- Wild, R. A. und C. A. Shivers (1985). "Antiendometrial antibodies in patients with endometriosis." Am J Reprod Immunol Microbiol **8**(3): 84-86.
- Willis, C., J. M. Morris, V. Danis und E. D. Gallery (2003). "Cytokine production by peripheral blood monocytes during the normal human ovulatory menstrual cycle." Hum Reprod **18**(6): 1173-1178.

Wirleitner, B., D. Reider, S. Ebner, G. Bock, B. Widner, M. Jaeger, H. Schennach, N. Romani und D. Fuchs (2002). "Monocyte-derived dendritic cells release neopterin." J Leukoc Biol **72**(6): 1148-1153.

Witz, C. A., I. A. Montoya, T. D. Dey und R. S. Schenken (1994). "Characterization of lymphocyte subpopulations and T cell activation in endometriosis." Am J Reprod Immunol **32**(3): 173-179.

Wu, M. Y. und H. N. Ho (2003). "The role of cytokines in endometriosis." Am J Reprod Immunol **49**(5): 285-296.

Young, V. J., J. K. Brown, P. T. Saunders und A. W. Horne (2013). "The role of the peritoneum in the pathogenesis of endometriosis." Hum Reprod Update **19**(5): 558-569.

Zamah, N. M., M. G. Dodson, L. C. Stephens, V. C. Buttram, Jr., P. K. Besch und R. H. Kaufman (1984). "Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude mice." Am J Obstet Gynecol **149**(6): 591-597.

Zarif, J. C., J. R. Hernandez, J. E. Verdone, S. P. Campbell, C. G. Drake und K. J. Pienta (2016). "A phased strategy to differentiate human CD14+monocytes into classically and alternatively activated macrophages and dendritic cells." Biotechniques **61**(1): 33-41.

Zhang, C., N. Maeda, C. Izumiya, Y. Yamamoto, T. Kusume, H. Oguri, C. Yamashita, Y. Nishimori, K. Hayashi, J. Luo und T. Fukaya (2006). "Killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen expression as immunodiagnostic parameters for pelvic endometriosis." Am J Reprod Immunol **55**(2): 106-114.

Zondervan, K. T., D. E. Weeks, R. Colman, L. R. Cardon, R. Hadfield, J. Schleffler, A. G. Trainor, C. L. Coe, J. W. Kemnitz und S. H. Kennedy (2004). "Familial aggregation of endometriosis in a large pedigree of rhesus macaques." Hum Reprod **19**(2): 448-455.

## Eigene Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits wie folgt veröffentlicht:

Voltolini Velho, R., Halben, N., Chekerov, R., Keye, J., Plendl, J., Sehouli, J., & Mechsner, S. (2021). Functional changes of immune cells: signal of immune tolerance of the ectopic lesions in endometriosis? *Reprod Biomed Online*. 2021 Aug; 43(2): 319-328. doi: 10.1016/j.rbmo.2021.04.012. Epub 2021 Apr 24. PMID: 34103260.

Halben, N., Plendl, J. und Mechsner (2019). Characterization of immune cells and inflammatory cytokines in the peritoneal fluid of endometriosis patients. In: 12. Doktorandensymposium und DRS Präsentationsseminar "Biomedical Sciences" am Fachbereich Veterinärmedizin Berlin an der Freien Universität Berlin, 27. September, Programm und Abstracts. Berlin, Mensch und Buch Verlag- ISBN: 978-3-96729-006-6. 35.

Halben, N., Plendl, J. und Mechsner (2018). Characterization of immune cells and inflammatory cytokines in peritoneal fluid and in peritoneal endometriosis lesions. In: 11. Doktorandensymposium und DRS Präsentationsseminar "Biomedical Sciences" am Fachbereich Veterinärmedizin Berlin an der Freien Universität Berlin, 21. September, Programm und Abstracts: Berlin, Mensch und Buch Verlag- ISBN: 978-3-86387-929-7. 43.

Halben, N., Plendl, J. und Mechsner S. (2018). Characterization of immune cells and inflammatory cytokines in peritoneal liquid and in peritoneal endometriosis lesions. 4th Congress of the Society of Endometriosis and Uterine Disorders, 26. – 28. April, Florenz. Poster.

Halben, N., Plendl, J. und Mechsner S. (2017). Characterization of immune cells and inflammatory cytokines in peritoneal liquid and in peritoneal endometriosis lesions. In: 10. Doktorandensymposium und DRS Präsentationsseminar "Biomedical Sciences" am Fachbereich Veterinärmedizin Berlin an der Freien Universität Berlin, 22. September, Programm und Abstracts. Berlin, Mensch und Buch Verlag- ISBN: 978-3-86387-839-9. 36.

## Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Plendl aus dem Institut für Veterinär-Anatomie der FU Berlin bedanken, welche mich stets mit weit geöffneter Tür und außerordentlicher Erfahrung sowie Expertise unterstützte und mich mit vielen wertvollen Ratschlägen durch diese besondere Zeit begleitete. Vielen Dank für den einmaligen Rückhalt, welchen Sie mir während der gesamten Zeit gaben!

Auch gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Mechsner, welche als meine Betreuerin vor Ort im Labor des Endometriosezentrums der Charité Berlin die Voraussetzungen für optimale Arbeitsbedingungen schuf. Danke, dass du mir zu jeder Zeit mit bereicherndem Rat motivierend zur Seite standst und nicht selten auch zu später Stunde ein offenes Ohr für mich und dieses spannende Projekt hattest!

Dem gesamten Endo-Team und im Speziellen dir, Sabrina Pommer, möchte ich von Herzen danken. Ihr habt euer Wissen und Know-how begeistert geteilt und durch eure motivierende und liebe Art eine Atmosphäre im Labor geschaffen, welche mich über die spannende und aufreibende Zeit dieser Dissertation getragen hat.

Ein weiterer großer Dank geht an das chirurgische Team der Gynäkologie, Charité Campus Virchow Klinikum Berlin. Dr. Radoslav Chekerov, vielen Dank, dass du dieses besondere Projekt so unterstützt hast und dass ihr mir eine Vielzahl an Kontrollproben zur Verfügung gestellt habt. Ein ebenso großer Dank geht an das chirurgische Team der gynäkologischen Abteilung des Vivantes Auguste-Viktoria-Klinikum Berlin unter der Leitung von PD Dr. Mandy Mangler. Vielen Dank für die engagierte Gewinnung und Bereitstellung der Proben! Besonders zu erwähnen ist hier der grandiose passionierte und liebevolle logistische Einsatz von Pierro- du bist einfach der Beste!

Besten Dank auch an die gesamte AG Kaufmann im Fachbereich der Tumورimmunologie der Charité Campus Virchow Klinikum Berlin für die Bereitstellung eurer Gerätschaften. Danke dir, Anna Skof, für deine Zeit, die du mir wie selbstverständlich zuteil werden ließest, den stets bereichernden Austausch und die Einführung in die komplexe Welt des Luminex.

Einen herzlichen Dank richte ich auch an Dr. Rainer Glauben und die Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie, Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin. Vielen Dank für die Einführung in die fabelhafte Welt des Facs und die Bereitstellung eurer Gerätschaften.

## Danksagung

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Marcus G. Doherr, PD Dr. Roswitha Merle und Alexander Bartel aus dem Institut für Veterinär-Epidemiologie und Biometrie der FU-Berlin für die kompetente Unterstützung danken. Ihr habt mir den Weg durch die komplexe Welt statistischer Analyseverfahren gewiesen und mir mit Rat und Tat beiseite gestanden.

Desweiteren danke ich dir, Dr. Tobias Ripp, dass du dein Allroundwissen zu Literaturrecherche, Zitierung und Formatierung teiltest, wodurch die Strukturierung gleich viel leichter fiel und diese Arbeit ihre Form erhielt.

Danke dir, liebe Claudia Göhner, für das Teilen deines umfassenden Wissens, deine Zeit und deine ruhige Art. Durch dich habe ich das Facsen lieben gelernt.

Tausend Dank Felix! Diesen Meilenstein hast du besonders mit gesetzt! Selbstverständlich und unter allen Umständen, unzählige Stunden unterstützt. Mehr geht nicht.

Liebsten Dank an meine Eltern, die mich beide immer begeistert begleiten – Mami, du hast mich durch diese aufregende Zeit getragen!

Zudem gilt mein ausdrücklicher Dank der FAZIT-Stiftung (FAZIT-Stiftung Gemeinnützige Verlagsgesellschaft mbH) sowie der Sonnenfeld Stiftung. Beide Stiftungen glaubten an das wissenschaftliche Vorhaben, schenkten mir ihr Vertrauen und ermöglichten über ein Promotions- bzw. Promotionsabschlussstipendium, die Umsetzung dieser Dissertation.

Diese Arbeit widme ich meinen Großmüttern. Ich danke euch für alles!

## Finanzierungsquellen

Diese Forschungsarbeit wurde finanziell unterstützt von der FAZIT-Stiftung (FAZIT-Stiftung Gemeinnützige Verlagsgesellschaft mbH) und der Sonnenfeld Stiftung.

## Interessenskonflikte

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

## Selbstständigkeitserklärung (eidesstattliche Erklärung)

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 16.01.2024

Nicolette Halben









9 783967 292350

**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-235-0