

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Der Universität zu Lübeck
Prof. Dr. Klaus Diedrich

**Bestimmung der Cognate Chemokin Rezeptor 1 messenger Ribonukleinsäure
Expression im peripheren Blut als diagnostischer Test für Endometriose**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
Der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Mirka Rehbein
aus Bad Oldesloe

Lübeck 2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	4
2.1. Material	4
2.1.1 .Probengewinnung und Patientenkollektiv	4
2.1.2. Geräte	6
2.1.3. Chemikalien	6
2.2. Methoden	8
2.2.1. RNA-Extraktion	8
2.2.2. Messen der optischen Dichte	11
2.2.3. Schreiben der c-DNA	11
2.2.4. quantitative Realtime PCR	11
3. Ergebnisse	15
4. Diskussion	25
5. Zusammenfassung	34
6. Anhang	35
6.1. Stadieneinteilung der Endometriose	35
6.2. Pathogenese der Endometriose	37
7. Literaturverzeichnis	42
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	51
9. Danksagung	52
10. Lebenslauf	53
11. Publikation	55

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Daniela. Hornung

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Andreas Böhle .

Tag der mündlichen Prüfung: 01.04.2009

Zum Druck genehmigt. Lück den 01.04.2009 .

1. Einleitung

Endometriose ist die zweithäufigste benigne, proliferative Erkrankung der Frau (Goldmann und Cramer, 1989). Sie ist durch das Vorkommen von Endometrium außerhalb des Cavum uteri (Sampson 1924) und das dort verursachte chronisch entzündliche Geschehen charakterisiert. Etwa 8-10% der weiblichen Bevölkerung sind während der Phase der Geschlechtsreife von einer Endometrioseerkrankung betroffen (Goldman und Cramer, 1989). Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 15. und 50. Lebensjahr.

Die Pathogenese der Endometriose wird bis heute kontrovers diskutiert. Eine zentrale Rolle, vor allem in Bezug auf die chronisch entzündlichen Veränderungen spielen dabei Chemokine - Cytokine mit sehr geringem Molekulargewicht - und ihre cognate chemokin Rezeptoren (Horuk R. 1994; Rossi D. und Zoltnik A., 2000). Speziell das β -Chemokin RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted), ein Chemoattraktant für Makrophagen und aktivierte T-Zellen, spielt bei der Entstehung einer Endometriose eine entscheidende Rolle (Schall et al., 1990). Die Konzentration dieses Chemokins ist in der Peritonealflüssigkeit an Endometriose erkrankter Frauen im Vergleich zu Frauen ohne Endometriose deutlich erhöht und korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung (Khorram et al., 1993).

Die zentrale Rolle des β -Chemokins RANTES als potenter Chemoattraktant für Makrophagen und Monozyten beruht im Wesentlichen auf der Interaktion mit seinem cognate chemokin Rezeptor CCR1 (Wieser et al., 2005). CCR1 ist ein G-Protein gekoppelter cognate chemokin Rezeptor mit einer hohen Affinität zu RANTES, der auf der Oberfläche von neutrophilen und monozytären Leukozyten exprimiert wird.

Eine Endometrioseerkrankung äußert sich häufig in Form von Dysmenorrhoe, zyklischen Unterbauchschmerzen, Dyspareunie, Defäkationsbeschwerden sowie Sterilität.

Die genaue Häufigkeit der Erkrankungen ist schwer zu ermitteln, da bis heute eine zuverlässige Diagnose nur per Laparoskopie gestellt werden kann.

Es wäre deutlich einfacher, eine Endometriose zu diagnostizieren, wenn es möglich wäre, durch einen Bluttest charakteristische Veränderungen bei Patientinnen mit einer Endometriose nachzuweisen.

Vorausgegangene Studien haben gezeigt, dass die Expression von CCR1 m-RNA auf Makrophagen in der Peritonealflüssigkeit erkrankter Patientinnen deutlich erhöht ist (Wieser et al., 2005).

Ziel dieser Arbeit soll es sein, nachzuweisen, ob die Expression der CCR1-mRNA bei Frauen mit Endometriose im Vergleich zu Frauen ohne Endometriose auch auf Leukozyten im peripheren Blut signifikant erhöht ist und sich damit als diagnostischer Nachweis der Endometriose eignet.

Dazu soll die CCR1 m-RNA-Expression auf Leukozyten im peripheren Blut mittels quantitativer Realtime PCR untersucht werden, um so die exprimierte Menge an CCR1 m-RNA zu quantifizieren.

Blutproben von an Endometriose erkrankten Patientinnen und Blutproben von Kontrollpatientinnen sollen eingesetzt werden. Bestimmt werden sollen die Sensitivität, die Spezifität sowie der positive und der negative prädiktive Wert, um die Verwendbarkeit der CCR1-Expression auf Leukozyten im peripheren Blut als Diagnoseparameter für eine Endometrioseerkrankung zu testen.

Auf diese Weise hoffen wir, eine Möglichkeit aufzuzeigen, Endometriose auf einem nicht invasiven Weg zuverlässig zu diagnostizieren, um so betroffene Frauen schneller einer adäquaten Therapie zuführen zu können.

Es ist erwiesen, dass eine frühere Diagnosestellung und Therapie einen günstigeren Einfluss auf Verlauf, Prognose und Rezidivhäufigkeit dieser gynäkologischen Erkrankung haben.

Sollte es möglich sein, eine signifikante und diagnostisch nutzbare Erhöhung der CCR1-mRNA-Expression auf Leukozyten im peripheren Blut an Endometriose erkrankter Patientinnen nachzuweisen, würde dies neue Perspektiven in der nicht invasiven Diagnostik dieser Erkrankung eröffnen.

Auf diesem Weg wäre es möglich, in vielen Fällen eine Erkrankung sehr viel früher zu erkennen und zu behandeln. Somit wäre eine deutliche Verbesserung der Prognose dieser Krankheit zu erreichen, da man die Patientinnen schneller einer suffizienten Therapie mittels einer laparoskopischen Operation zuführen könnte. Bei frühzeitigem Erkennen der Krankheit ist diese Operation deutlich einfacher durchzuführen. Auch die Rezidivhäufigkeit ließe sich bei rechtzeitiger Diagnose reduzieren.

Insgesamt wäre es also möglich, eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität betroffener Frauen zu erreichen.

2.1. Material

2.1.1. Probengewinnung und Patientinnenkollektiv

Sämtliche Proben wurden in der Zeit von März 2005 bis Januar 2006 an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Lübeck entnommen.

Dazu wurden PAXgene Blood RNA Röhrchen (PreAnalytix, Qiagen, Hilden) benutzt. Die speziellen Röhrchen enthielten eine patentgeschützte Substanz, welche sowohl die Zellen lysierte als auch die freigesetzte RNA stabilisierte. Aus diesen Vollblutproben von Patientinnen wurde die RNA isoliert. Proben von Frauen ohne Endometriose wurden als Kontrollgruppe verwendet.

Alle Proben wurden entnommen, bevor die Patientinnen sich einer anästhesiologischen und laparoskopischen Behandlung unterzogen.

Die Sicherung der Diagnose Endometriose und die Einteilung in die Schweregrade I-IV nach der rAFS-Klassifikation wurde durch erfahrene Oberärzte durchgeführt. Als Kontrollpatientinnen wurden Frauen der gleichen Altersgruppe ohne Endometriose, Schwangere mit komplikationslosem Schwangerschaftsverlauf, Karzinompatientinnen, Patientinnen mit rheumatoider Arthritis und Patientinnen mit Adnexitis und Endometritis herangezogen.

Alle Patientinnen hatten zuvor eine von der Ethikkommission geprüfte Einwilligungserklärung der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Lübeck unterschrieben. Nach Gewinnung wurden die Proben ein bis fünf Tage bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank bei 4 Grad gelagert.

Verteilung der eingesetzten Proben

n=163	Gesamtanzahl der eingesetzten Proben.
n=83	Frauen mit laparoskopisch gesicherter Endometriose-Diagnose im Alter von 24 bis 51 Jahren.
n=51	Frauen ohne Endometriose, die aus anderen Gründen operiert wurden im Alter von 18 bis 70 Jahren (Subseröses Leiomyom, Sterilisation etc.).
n=6	Frauen mit gynäkologischer Krebserkrankung im Alter von 50 bis 72 Jahren
n=13	Schwangere Frauen im Alter von 24 bis 32 Jahren.
n=4	Frauen mit akuter Adnexitis oder Endometritis im Alter von 19 bis 26 Jahren.
n=6	Frauen in der akuten Phase der rheumatoiden Arthritis im Alter von 49 bis 77 Jahren.

Tab.1 Verteilung der eingesetzten Proben

2.1.2 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Verwendungszweck</u>
eppendorf Photometer	Messung der optischen Dichte zur RNA-Gehaltsbestimmung der Proben
Heraeus Biofuge fresco	Zentrifugieren der Proben im Verlauf der RNA-Extraktion
Vortex Genie 2 (scientific industries)	Gründliches Mischen einzelner Komponenten im Verlauf der RNA-Extraktion

2.1.3 Chemikalien

<u>Eingesetzte Chemikalie</u>	<u>Verwendungszweck</u>
100% Ethanol (Hausapotheke, Universität Lübeck)	RNA-Extraktion, RNA-Reinigung
PAXgene Blut-RNA Kit PreAnalytix, QIAGEN, Hilden	Blut-Entnahme, RNA-Isolierung
PAXgene Blood RNA Röhrchen	Blutentnahme, Transport, RNA-Stabilisierung, Aufbewahrung, Zentrifugation
Puffer BR1	RNA-Extraktion, Resuspensionspuffer
Puffer BR 2	RNA-Extraktion, Bindungspuffer
Puffer BR 3	RNA-Extraktion, Waschpuffer
Puffer BR 4	RNA-Extraktion, Waschpuffer
Puffer BR 5	RNA-Extraktion, Elutionspuffer

Eingesetzte Chemikalien

Verwendungszweck

RNase-freies Wasser

RNA-Extraktion, Resuspension

Proteinkinase K

RNA-Extraktion, Proteinolyse

SuperSkript™ II Reverse Transkriptase

c-DNA Synthese

Invitrogen life technologies, Karlsruhe

Oligo(dT) 12-18 Primer

c-DNA Synthese

Invitrogen life technologies, Karlsruhe

Platinum® SYBR® Green qPCR

Real-time Polymerase chain

Super Mix UDG

reaction von CCR1 und dem

Invitrogen life technologies, Karlsruhe

Housekeeping Gen (HPRT)

RNaseOUT™

Recombinant Ribonuclease Inhibitor

Real-time Polymerase chain

Invitrogen life technologies, Karlsruhe

reaction

Primer RT Mix

Invitrogen life technologies, Karlsruhe

Real-time Polymerase chain

reaction

Human CCR1 Primer Pair™

Quantitative Real-time

R+D Systems, Wiesbaden

Polymerase chain reaction

HPRT Primer

Quantitative Real-time

Metabion, Martinsried

Polymerase chain reaction

2.2. Methoden

2.2.1. RNA-Extraktion

Zu Beginn des Arbeitsvorgangs wurde der Arbeitsplatz mit Ethanol gereinigt.

Nachdem die Blutproben zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden, um eine vollständige Lyse der Zellen zu garantieren, wurden sie zehn Minuten bei 4000 g in einem Schwingrotor zentrifugiert, um die Zellkomponente vom Plasma zu trennen.

Anschließend wurde der flüssige Überstand der Probe verworfen und das am Boden verbliebene Pellet mit fünf Milliliter RNA-ase freiem Wasser resuspendiert und auf einem Vortexer bis zur vollständigen Lösung gemischt. Darauf folgten weitere zehn Minuten Zentrifugation bei 4000 g im Schwingrotor.

Wieder wurde der Überstand verworfen und das Pellet nun mit 360 µl des BR 1 Resuspensionspuffers resuspendiert. Anschließend wurden die Proben auf dem Vortexer bis zur vollständigen Lösung des Pellets gemischt.

Als nächstes wurde der Inhalt des Röhrchens in ein autoklaviertes 1,5 ml Eppendorf Gefäß transferiert.

Daraufhin wurden 300 µl BR 2 RNA-Bindungspuffer und 40 µl Proteinkinase K hinzugefügt. Um eine vollständige mechanische Zerstörung der genomischen DNA zu gewährleisten, wurden die Proben dann zehn Minuten im Schüttelheizblock bei 55° C und 1400 rpm inkubiert.

Anschließend wurden die Proben 3 Minuten bei 13000 g in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert, um die flüssige Phase von den verbliebenen Zelltrümmern zu trennen.

Der Überstand wurde daraufhin in ein neues autoklaviertes 1,5 ml Eppendorf Gefäß transferiert und dann mit 350 µl 100% Ethanol absolut versetzt. Jetzt fiel die RNA in weißlichen Fäden aus.

In den nächsten zwei Schritten wurden je 700 µl der Probe auf eine Säule gegeben, deren Siliconmembran bei einminütiger Zentrifugation mit 11000 g selektiv die RNA band.

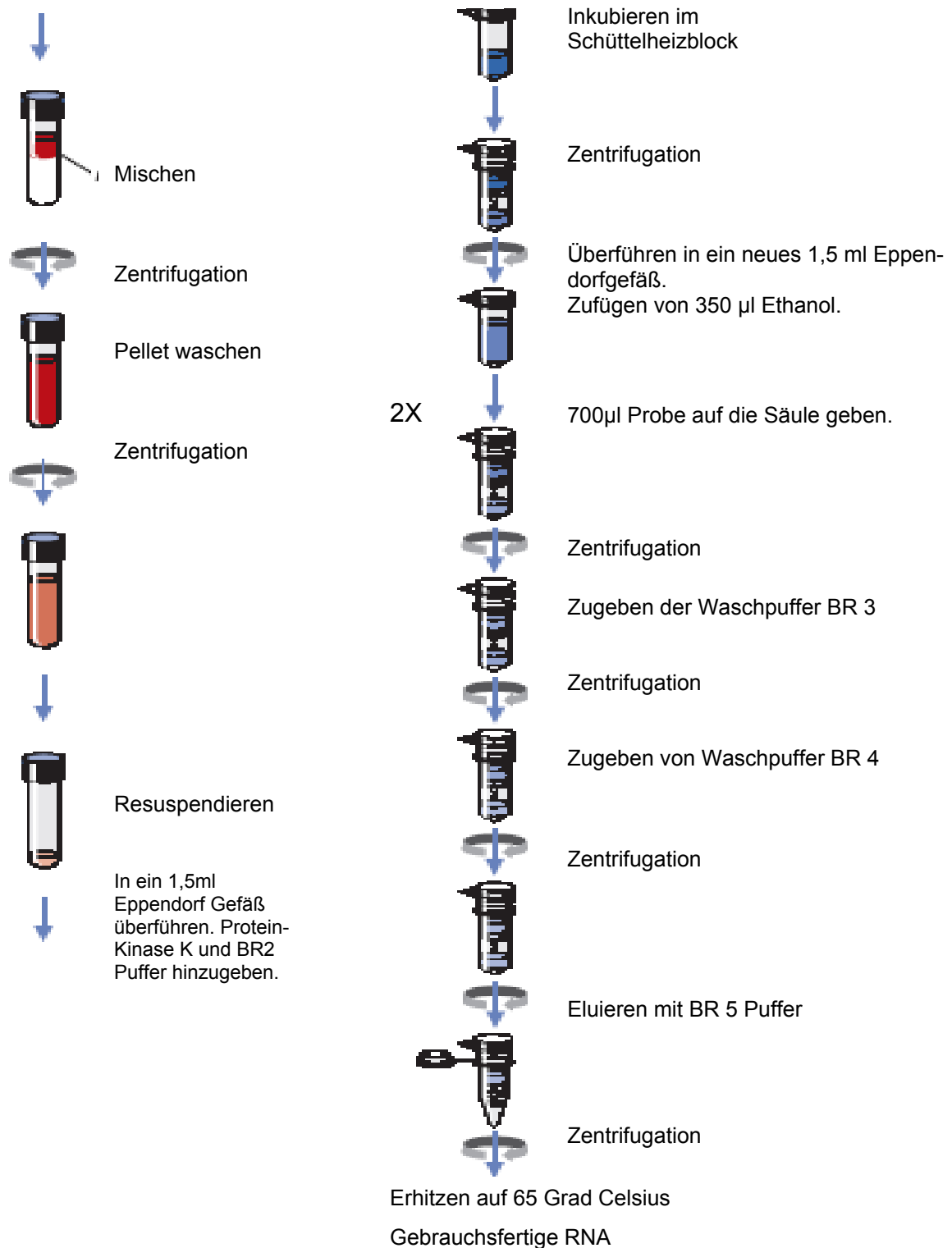
Anschließend wurde die RNA unter Zugabe der Waschpuffer BR 3 und 4 in drei Schritten mittels Zentrifugation von verbliebenen Verunreinigungen getrennt und abschließend noch einmal eine Minute bei 11000 g trocken zentrifugiert.

Die so aufgereinigte RNA wurde nun in einem letzten Schritt mit 40 µl des BR 5 Puffers eluiert, daraufhin für fünf Minuten bei 65° C inkubiert und sofort auf Eis gestellt.

2 µl der Probe wurden dann mit 98 µl DEPC Wasser verdünnt und der RNA-Gehalt sowie die Reinheit der Probe mittels Photometrie bestimmt.

Danach wurden die Proben bei – 80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Abbildung 1



2.2.2. Messung der optischen Dichte

Die in der Lösung befindliche RNA-Menge wurde durch die Messung der optischen Dichte bestimmt. Dazu wurden jeweils 2 µl Probenlösung mit 98 µl sterilem RNase-freiem Wasser auf insgesamt 100 µl aufgefüllt.

Anschließend wurde die optische Dichte mit dem Photometer bei 230 nm Wellenlänge gemessen.

2.2.3. Schreiben der c-DNA

Um die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben, wurde zuerst die benötigte Menge der RNA Probe berechnet, die verwendet werden musste, damit 1µg RNA für die Umschreibung zur Verfügung stand.

Anschließend wurde je 1µl Primer Oligo dT vorgelegt, dann wurde die berechnete Menge der RNA Probe hinzugefügt, um die Probe mit sterilem RNase freiem Wasser auf 10 µl aufzufüllen.

Insgesamt lagen dann 11 µl Probe vor, welche 10 Minuten bei 70 Grad Celsius inkubiert, anschließend auf 4 Grad Celsius abgekühlt und zur weiteren Verarbeitung gelagert wurden.

2.2.4. quantitative Realtime PCR

Die quantitative Realtime PCR nutzen wir zur Vervielfältigung der gewonnen DNA-Fragmente. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von einer Fluoreszenzmessung während eines PCR-Zyklusses durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Wir verwendeten für die Quantifizierung der PCR-Produkte den DNA-Farbstoff SYBR Green. SYBR Green ist ein asymmetrischer Cyanin Farbstoff, der doppelsträngige DNA bindet.

Der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei $\lambda_{\text{max}}=489$ nm und grünes Licht bei $\lambda_{\text{max}}522$ nm.

Der SYBR Green Farbstoff lagert sich in die entstehenden DNA-Fragmente ein und die Fluoreszenz steigt an (Abb.2). Die Zunahme der entstehenden DNA-Fragmente korrelierte mit der Zunahme der Fluoreszenz.

Durch Realtime-PCR spezifische Störfaktoren wie unterschiedliche DNA Ausgangsmengen und Unterschiede in der Transkription kann es zur Fehlinterpretation der ermittelten DNA Mengen kommen. Um eine reliable Quantifizierung zu erreichen, ist daher eine Korrektur dieser Faktoren nötig.

Diese Korrektur erfolgte durch das Co-Amplifizieren eines internen Standards. Wir normalisierten zu diesem Zweck die Expression des CCR1-Gens zur Expression des Housekeeping Gens HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferrase). Das heißt, in derselben Probe wurde die Expression des CCR1-Gens und des Housekeeping Gens parallel erfasst und die ermittelten Werte des CCR1-Gens relativ zu der internen Kontrolle durch das Housekeeping Gen angegeben.

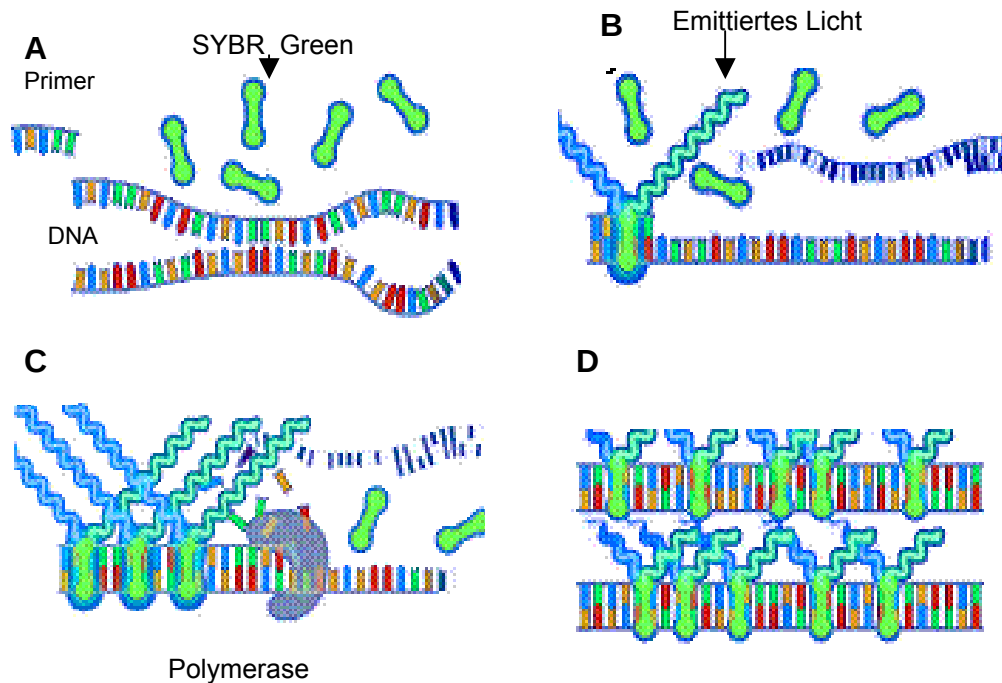
Um eine absolute Quantifizierung der gewonnenen DNA-Mengen möglich zu machen, verwendeten wir zusätzlich einen externen Standard. Dabei handelte es sich um eine DNA-Probe, die ebenfalls die CCR1-Zielsequenz enthielt, allerdings in bekannter Konzentration. Eine Verdünnungsreihe dieser Probe führten wir in der Realtime-PCR mit und konnten so eine Standardkurve erstellen, mit der wir die absoluten Werte der Proben mit unbekannter Konzentration ermitteln konnten.

Aufgrund der Schmelztemperaturen konnte man zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren oder Mutationen unterscheiden, da Primerdimere bzw. Mutationen bei geringeren Temperaturen schmelzen als die spezifischen, größeren PCR-Produkte (Abb. 3).

2.2.5.Statistische Auswertung

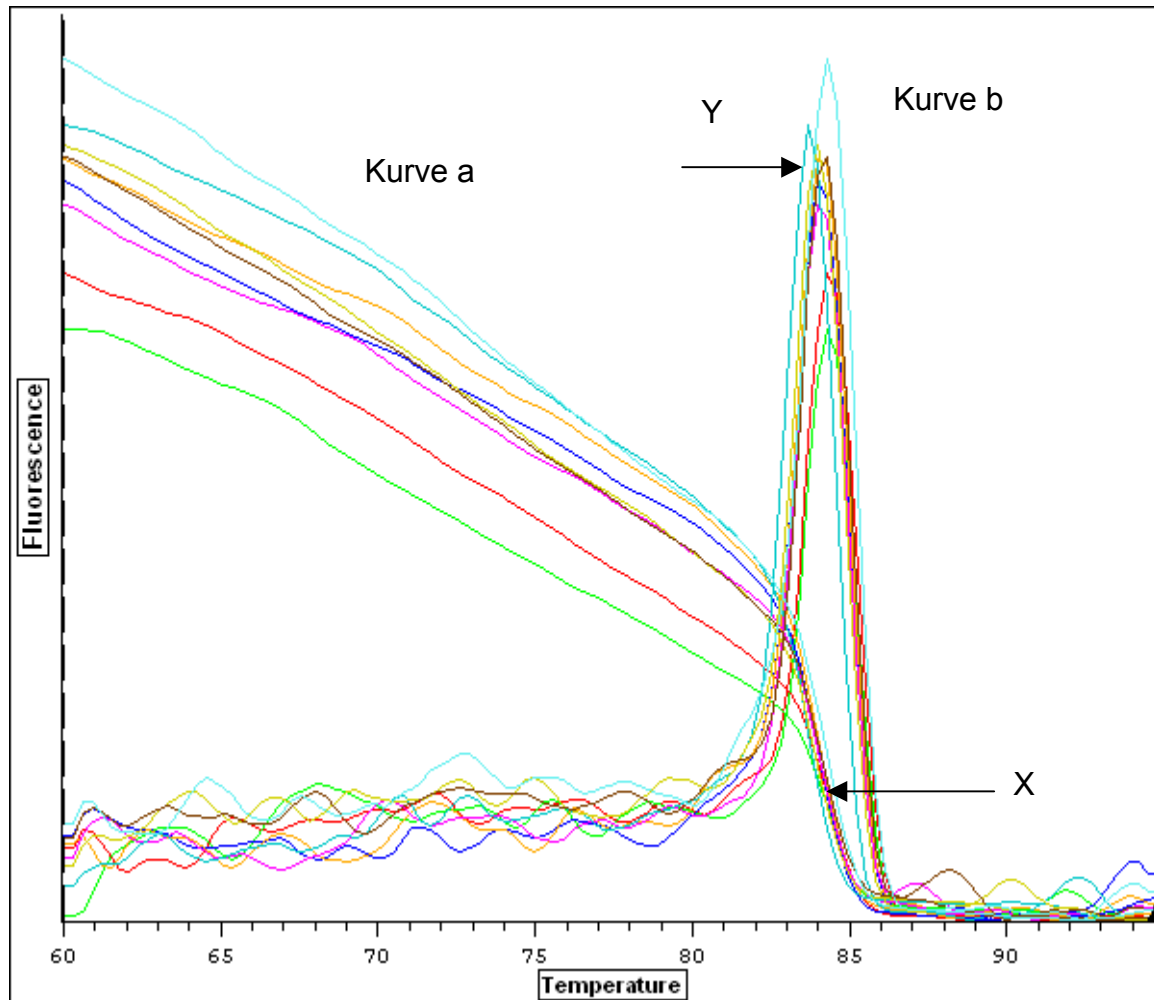
Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt. Die Ergebnisse sind in als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD) ausgedrückt. Normalverteilte Daten wurden mit ANOVA ausgewertet.

Abbildung 2



Schematische Darstellung eines PCR Zyklus bei Verwendung von SYBR Green. **A:** Denaturierung der Doppelstrang DNA ; **B:** Anlagern des Primers, so entsteht wieder eine Doppelstrang DNA, der Farbstoff wird angelagert und absorbiert Licht einer bestimmten Wellenlänge; **C:** Elongation durch PCR; **D:** PCR Produkt.

Abbildung 3



Schmelzkurvenanalyse nach Realtime PCR

Nach Abschluss der Realtime PCR wird die entstandene DNA denaturiert. Dabei nimmt die Fluoreszenz mit zunehmendem Zerfall der Moleküle ab (Kurve a). In einem bestimmten Temperaturbereich (X) schreitet der Zerfall rasch fort. In diesem Temperaturbereich zerfällt das amplifizierte Produkt. Kurve b stellt die erste Ableitung von Kurve a dar. Der Peak Y stellt den Schmelzpunkt des amplifizierten Produktes dar. Der einheitliche Schmelzpunkt bei Y spricht für die Reinheit der Produkte.

3. Ergebnisse

Die Ratio der CCR1/HPRT von Patientinnen mit Endometriose ($6,17 \pm 3,51$) war im Vergleich zu Frauen ohne Endometriose ($1,96 \pm 1,31$) signifikant erhöht ($p < 0,001$) (Abb.4). Diese Methode zeigte eine Sensitivität von 90%, eine Spezifität von 74%, einen negativen prädiktiven Wert von 0,85 und einen positiven prädiktiven Wert von 0,82 für die Voraussage einer Endometrioseerkrankung.

Jedoch auch in der Gruppe der Schwangeren war die CCR1 Expression ($5,46 \pm 2,35$) im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($1,96 \pm 1,31$) signifikant erhöht ($p < 0,001$). Die Werte in der Gruppe der Patientinnen mit einer gynäkologischen Krebserkrankung betrugen $5,64 \pm 2,49$. Für die Gruppe der Patientinnen mit Rheumatoider Arthritis ergaben sich folgende Werte: $4,16 \pm 2,31$.

Außerdem fanden wir im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($1,96 \pm 1,31$) signifikant erhöhte Werte der CCR1-Expression im peripheren Blut der Patientinnen mit akuten Entzündungen ($12,63 \pm 6,98$) ($p < 0,001$) (Abb.5).

Wir haben die Patientinnen außerdem in eine symptomatische Gruppe (Patientinnen mit chronischen Unterbauchschmerzen) und eine asymptomatische Gruppe unterteilt. In jeder Gruppe wurde dann nochmals zwischen Patientinnen mit und ohne Endometriose unterschieden.

Für die Gruppe der symptomatischen Patientinnen zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) zwischen Patientinnen mit ($6,09 \pm 3,08$) und ohne ($1,73 \pm 1,65$) Endometriose. Es ergab sich bei einem Cut-off von 3 (der Wert 3 wurde als Grenze zwischen krank und gesund gewählt und für alle folgenden Gruppen als Wert festgelegt) und einem Konfidenzintervall von 69 - 90,9% eine Sensitivität von 81,82% und eine Spezifität von 82,35%. Der positive prädiktive Wert für diese Gruppe betrug 0,54 und der negative prädiktive Wert betrug 0,45 (Abb.6).

In der Gruppe der asymptomatischen Patientinnen war der Unterschied zwischen den Endometriosepatientinnen ($6,67 \pm 4,38$) und den Kontrollen ($1,73 \pm 1,77$) ebenfalls signifikant nachweisbar ($p=0,0003$). Es ergab sich bei einem Konfidenzintervall von 50,61 - 87,93% eine Sensitivität von 72% und eine Spezifität von 85,7%. Der positive prädiktive Wert betrug hier 0,5 und der negative prädiktive Wert 0,5 (Abb 7).

Aufgrund laparoskopischer Befunde war es möglich, die Endometriosepatientinnen anhand der Stadien der Erkrankung noch in vier weitere Gruppen zu unterteilen. In allen vier Gruppen waren die Unterschiede zur Kontrollgruppe signifikant nachweisbar (siehe Abb. 8-11). Wir haben dann gesondert die Sensitivität, die Spezifität, den positiven und den negativen prädiktiven Wert für die einzelnen Stadien bestimmt.

Für die Gruppe der Patientinnen mit einer Endometrioseerkrankung im Stadium I ergaben sich folgende Werte: Sensitivität 50%, Spezifität 88,9%, positiver prädiktiver Wert 0,4 und negativer prädiktiver Wert 0,6 (Abb.8). Das Konfidenzintervall reichte von 18,7 bis 81,2%.

In der Gruppe der Patientinnen mit einer Erkrankung im Stadium II ergab sich eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 88,8%. Der positive prädiktive Wert betrug 0,52 und der negative prädiktive Wert betrug 0,48 (Abb 9). Das Konfidenzintervall reicht hier von 44,4 bis 97,5%.

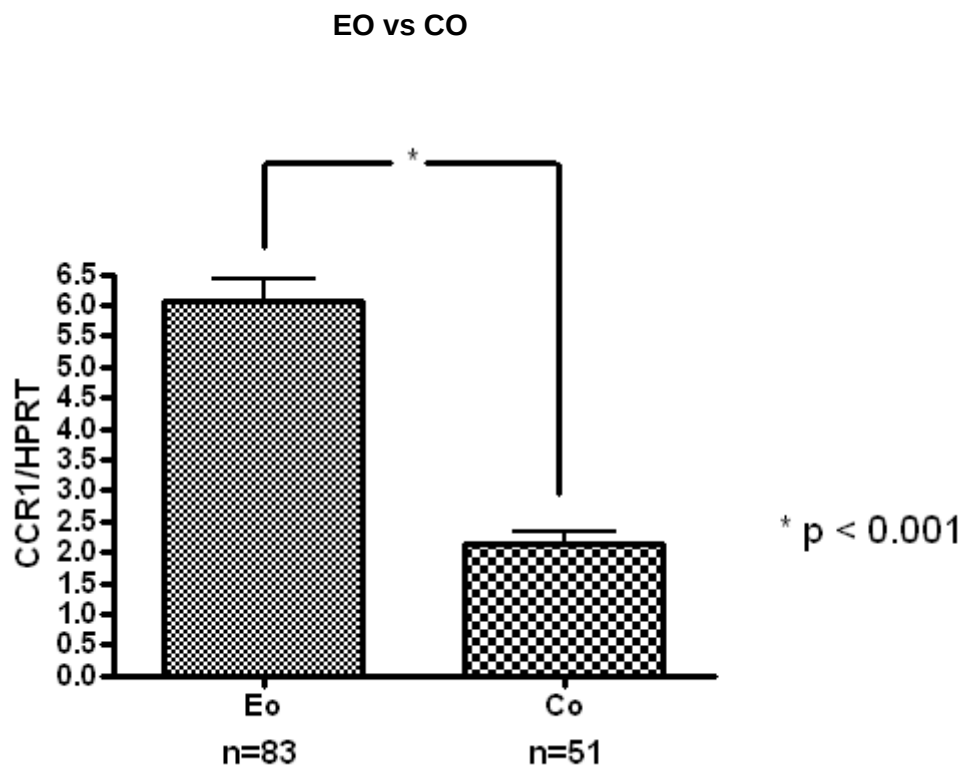
Bei einer Erkrankung im Stadium III ermittelten wir eine Sensitivität von 77,8% und eine Spezifität von 88,9%. In diesem Stadium betrug der positive prädiktive Wert 0,51 und der negative prädiktive Wert 0,49 (Abb.10). Das Konfidenzintervall lag zwischen 52,4 und 93,6%.

Bei einer Erkrankung im Stadium IV ergaben sich eine Sensitivität von 88%, eine Spezifität von 80%, ein positiver prädiktiver Wert von 0,57 und ein negativer prädiktiver Wert von 0,43 (Abb11). Das Konfidenzintervall reichte von 65,3 bis 98,6%.

In einem letzten Schritt haben wir dann die Patientinnen, die an einer Endometriose litten, nochmals in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe umfasste alle Patientinnen, deren Erkrankung als eine Erstmanifestation eingeordnet wurde. Die zweite Gruppe umfasste alle Patientinnen, die an einem Rezidiv einer Endometriose erkrankt waren. Beide Gruppen unterschieden sich signifikant ($p < 0,0001$) von der Kontrollgruppe. Es war jedoch nicht möglich, anhand der gewonnen Werte zwischen einer Erstmanifestation und einem Rezidiv der Erkrankung zu unterscheiden.

(Abb. 12)

Abbildung 4

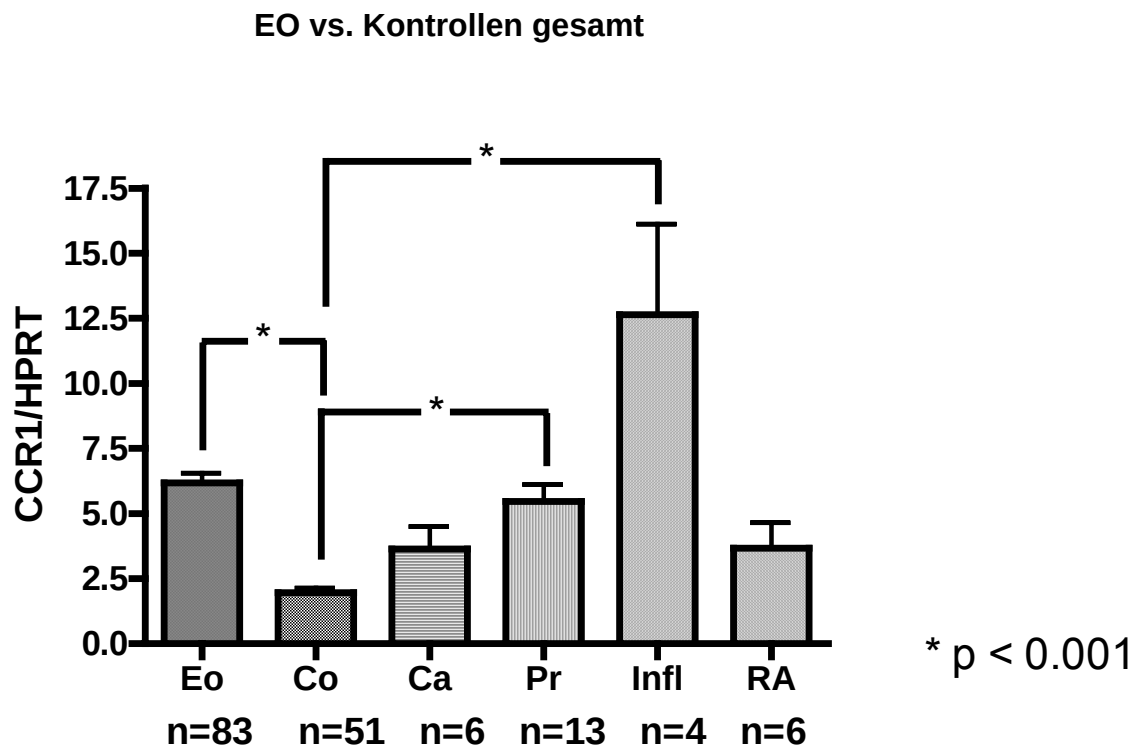


Bestimmung von CCR1 m-RNA-Expression im peripheren Blut von Patientinnen mit Endometriose durch quantitative RT-PCR.

Patientinnen mit einer Endometrioseerkrankung (Eo).

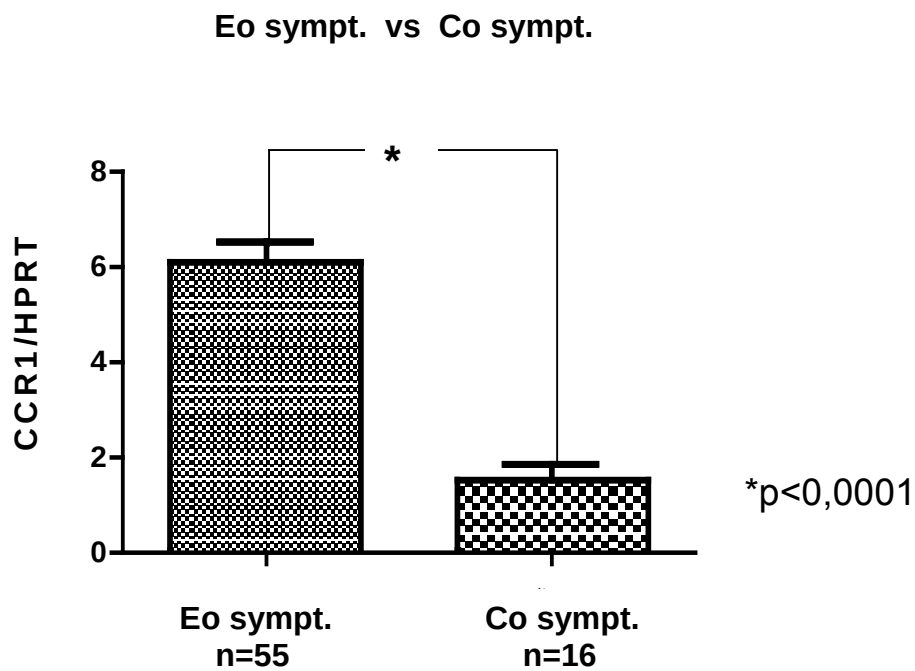
Patientinnen ohne eine Endometrioseerkrankung (Co).

Abbildung 5



Bestimmung von CCR1 m-RNA-Expression im peripheren Blut von Patientinnen mit Endometriose durch quantitative RT-PCR. Patientinnen mit Endometriose (Eo), gesunde Kontrollen (Co), Patientinnen mit Krebs (Ca), schwangere Frauen (Pr), Patientinnen mit akuter Entzündung (Infl) und Patientinnen mit Rheumatoider Arthritis in der akuten Phase (RA).

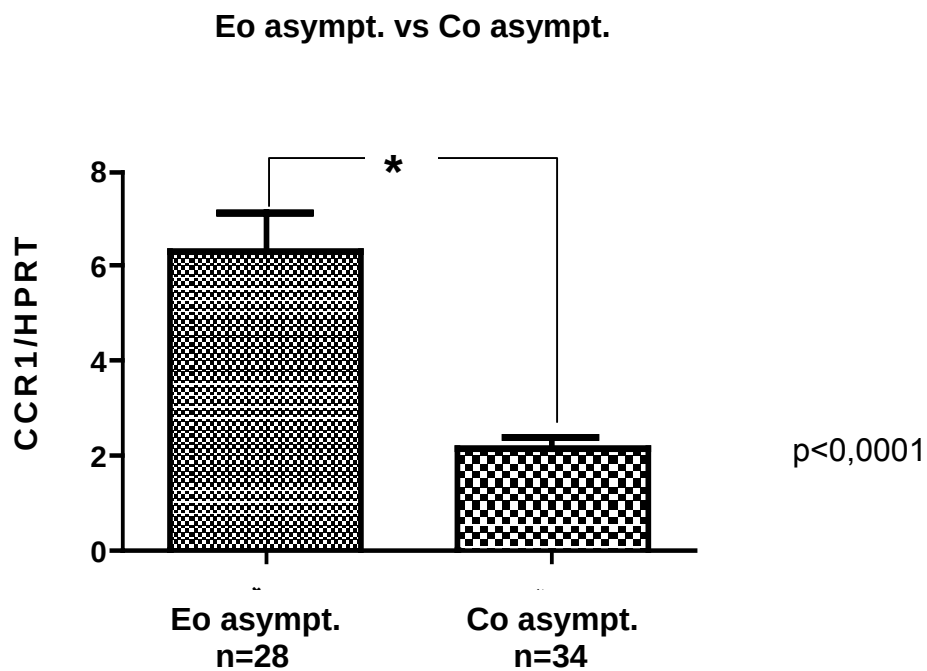
Abbildung 6



Patientinnen, die an einer Endometriose erkrankt sind und symptomatisch mit Unterleibsschmerzen aufgefallen sind (Eo sympt.).

Patientinnen, die symptomatisch mit Unterleibsschmerzen aufgefallen sind, die aber nicht an einer Endometriose erkrankt sind (Co sympt.)

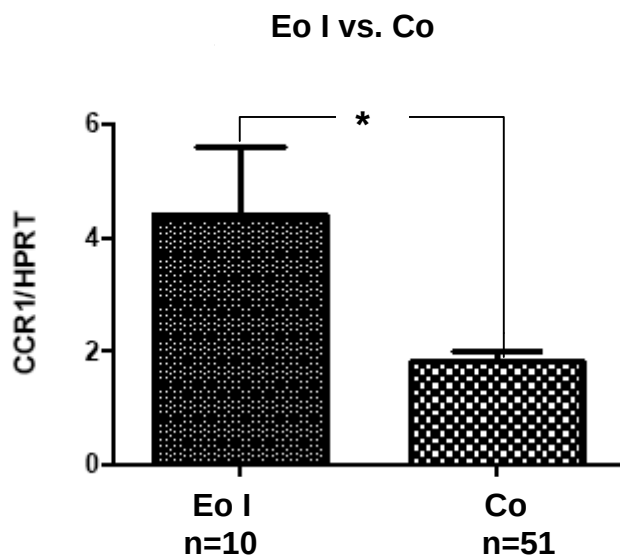
Abbildung 7



Patientinnen, bei denen eine Endometriose diagnostiziert wurde, ohne dass sie symptomatisch durch Unterleibsschmerzen aufgefallen sind (Eo asympt).

Patientinnen, die nicht an Unterleibsschmerzen litten und bei denen keine Endometriose diagnostiziert werden konnte (Co asympt).

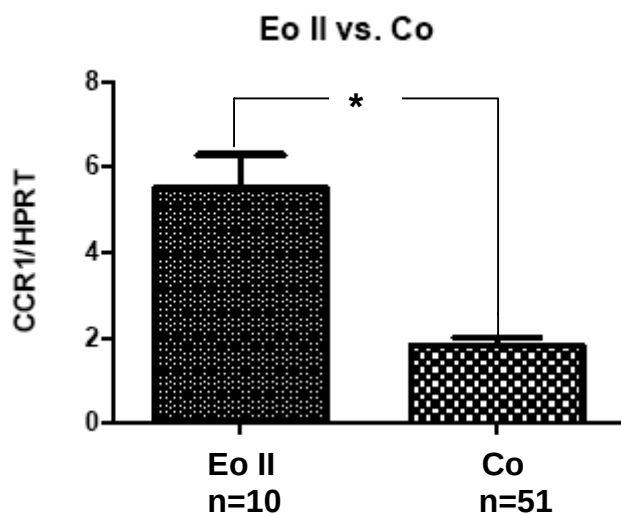
Abbildung 8



* $p = 0,0003$

Patientinnen mit einer laparoskopisch diagnostizierten Endometriose im Stadium I (Eo I). Gruppe der gesunden Kontrollen (CO).

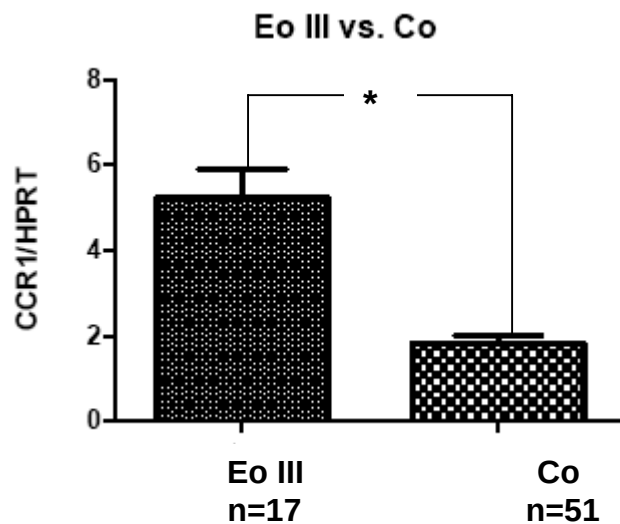
Abbildung 9



* $p < 0,0001$

Patientinnen mit einer laparoskopisch diagnostizierten Endometriose im Stadium II (Eo II). Gruppe der gesunden Kontrollen (CO).

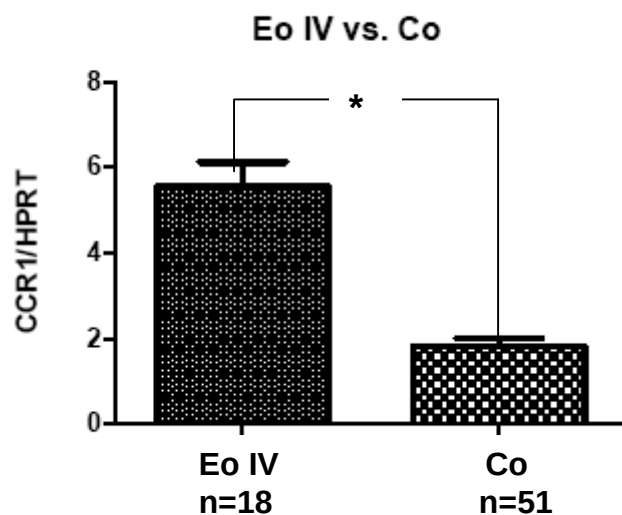
Abbildung 10



* $p < 0,0001$

Patientinnen mit einer laparoskopisch diagnostizierten Endometriose im Stadium III (Eo III). Gruppe der gesunden Kontrollen (Co).

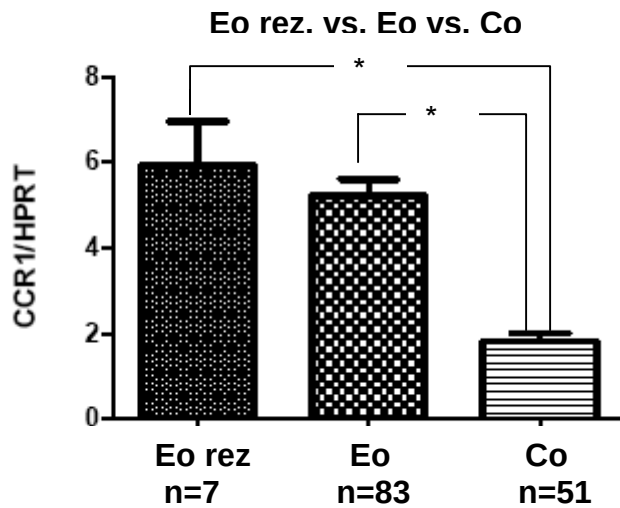
Abbildung 11



* $p < 0,0001$

Patientinnen mit einer laparoskopisch diagnostizierten Endometriose im Stadium IV (Eo IV). Gruppe der gesunden Kontrollen (CO).

Abbildung 12



* $p < 0,0001$

Patientinnen mit einem
Endometrioserezidiv (Eo rez.).
Patientinnen mit einer laparos-
kopisch diagnostizierten
Erstdiagnose Endometriose
(Eo).

Gruppe der gesunden Kon-
trollen (CO).

4. Diskussion

Obwohl Endometriose die zweithäufigste benigne proliferative Erkrankung der Frau ist (Goldman and Cramer, 1989), gibt es bis heute keinen Weg, um die Diagnose im Falle eines Verdachtes zuverlässig zu bestätigen, ohne dass die Patientinnen sich einer Laparoskopie unterziehen müssten.

Um einen diagnostischen Test zu entwickeln, der in Zukunft eine einfachere und schnellere Diagnose im Rahmen einer Endometrioseerkrankung ermöglicht, ist es wichtig, den Pathomechanismus dieser Erkrankung besser zu verstehen. Zahlreiche Studien haben ergeben, dass sich vor allem die biologische Zusammensetzung der Peritonealflüssigkeit im Zuge einer Endometrioseerkrankung vielfältig verändert. Dies gilt besonders im Hinblick auf das lokale Entzündungsgeschehen und die daran beteiligten Zelltypen und Chemokine (siehe Anhang).

In jüngster Zeit wurden verschiedene Studien veröffentlicht, deren Gegenstand es war nachzuweisen, ob sich einige dieser Veränderungen auch systemisch ereignen, und wenn ja, ob diese Veränderungen dann im peripheren Blut so signifikant nachweisbar sind, dass sie sich für die Bestätigung oder den Ausschluss einer Endometrioseerkrankung eignen. Auf diesem Wege wäre es dann möglich, eine Endometriose zuverlässig, vergleichsweise schnell und vor allem ohne einen invasiven Eingriff zu diagnostizieren.

Ein Versuch, einen im peripheren Blut messbaren Parameter für die Endometriosedagnostik heranzuziehen, ist die Messung der Serumkonzentration des Luteinisierenden Hormons (LH) per Enzymimmunoassay (Illera et al., 2001).

LH ist beteiligt an der Regulation des Menstruationszyklus, der Follikelreifung, der Ovulation, der Befruchtung und der Implantation einer befruchteten Eizelle.

Allerdings schwankt die LH-Konzentration im Serum während der einzelnen Zyklusphasen beachtlich. Aus diesem Grund gaben Illera et al. an, zur Messung die absoluten LH-Werte benutzt zu haben, die unabhängig vom Menstruationszyklus sein sollten. Es ergaben sich signifikant höhere Werte für Frauen mit einer Endometrioseerkrankung ($13,67 \pm 7,21$ ng/ml) als für Frauen ohne

diese Erkrankung ($4,52 \pm 1,03$ ng/ml) ($p < 0,001$). Der positive prädiktive Wert betrug 94% und der negative prädiktive Wert 82%.

Für die Verwendung dieser Methode spricht, dass der Enzymimmunoassay im Vergleich zu anderen Assays eine verhältnismäßig günstige Möglichkeit der Werterfassung darstellt.

Außerdem wird die LH Messung bereits in der Diagnostik von anderen Krankheiten, vor allem im Zusammenhang mit Infertilität und dem Polyzystischen Ovar Syndrom (Jones and Madrigal Castro 1970; Homburg 1996) genutzt. Aufgrund dieser Tatsachen scheint die LH Konzentration im peripheren Blut ein interessanter Ansatzpunkt für die Entwicklung eines nicht invasiven Diagnoseverfahrens zu sein.

Allerdings weist die Studie einige gravierende Schwachstellen auf, welche die Zuverlässigkeit der gewonnenen Daten in Frage stellen. So ist insgesamt vor allem das retrospektive Studiendesign zu kritisieren. Außerdem ist das Patientenkollektiv mit $n=32$ in der Endometriosegruppe und $n=20$ in der Kontrollgruppe relativ klein, zumal diese Patientinnen dann auch noch anhand der Zyklusstadien (frühe Proliferationsphase, Proliferationsphase und Sekretionsphase) in drei Gruppen unterteilt wurden. Vor allem aber wird nicht dargestellt, welche tatsächlich gemessenen Werte den Ergebnissen zu Grunde gelegt werden, wie genau sich also die absoluten LH Werte zusammensetzen. Die Blutproben wurden außerdem im Rahmen der Laparoskopie entnommen. Auf diesem Wege ist nicht sichergestellt, dass nicht anästhesiologische oder auch chirurgische Maßnahmen einen verfälschenden Einfluss auf die gemessenen Werte genommen haben. Auch sind keine Patientinnen mit differenzialdiagnostisch wichtigen Erkrankungen wie zum Beispiel der Adnexitis in die Studie aufgenommen worden.

2002 wurde eine Studie von Vigano et al. veröffentlicht, in der nachgewiesen werden sollte, dass sich eine Bestimmung der Serumspiegel des Adipozyten Hormons Leptin als Diagnoseparameter für eine Endometrioseerkrankung eignen würde. Da Leptin in der Pathogenese der Endometriose eine Rolle bei der Angiogenese und bei der Immunantwort zu spielen scheint (Sarraf et al., 1997; Mantzoros et al., 1997), verfolgten Vigano et al. diese Theorie weiter und versuchten, einen signifikanten

Unterschied bei den Serumspiegeln von Endometriosepatientinnen und Kontrollpatientinnen aufzuzeigen.

An der Studie nahmen 67 Patientinnen teil. Die Endometriosegruppe umfasste 42 Patientinnen, davon 17 Patientinnen mit einer Endometriose im Stadium I, 2

Patientinnen mit einer Erkrankung im Stadium II, 16 Patientinnen mit einer Erkrankung im Stadium III und 7 Patientinnen mit einem Endometriosestadium IV.

In der Kontrollgruppe befanden sich 4 Patientinnen mit diagnostizierten Myomen, 7 Patientinnen mit idiopathischer Infertilität oder Unterleibsschmerzen, 7 Frauen mit einer Dermoidzyste, 3 Patientinnen mit serösen Zysten und 4 Frauen mit einer muzinösen Zyste.

Die Auswertung der Ergebnisse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Auch innerhalb der Endometriosegruppe ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Stadien der Erkrankung. Diese Ergebnisse bestätigten die Erfahrungen aus einer 2000 veröffentlichten Studie von Matalliotakis et al.. Sie widersprechen aber den Ergebnissen der Studie von Matarese et al., die ebenfalls 2000 veröffentlicht wurde und in der ein signifikanter Unterschied in der Serumleptinkonzentration zwischen Patientinnen mit Endometriose (30.3 ± 14.8 ng/ml) und ohne Endometriose (15.6 ± 8.4 ng/ml $p < 0.05$) festgestellt werden konnte.

Diese kontroverse Datenlage zeigt, dass die Bestimmung der Leptinserumspiegel zumindest zum jetzigen Zeitpunkt keine Möglichkeit der nicht invasiven Endometriosedagnostik darstellt.

Bedaiwy et al. veröffentlichten 2002 eine Studie, die nachweisen sollte, welche Marker aus Serum und Peritonealflüssigkeit signifikante Unterschiede zwischen Endometriosepatientinnen und einer Kontrollgruppe aufweisen. Signifikante Unterschiede ergaben sich in dieser Studie nur für Serum-Interleukin-6 und Serum-Tumornekrosefaktor α . Die Werte waren sowohl für Interleukin-6 (Median 21,58 pg/ml) ($P = 0,001$), als auch für Tumornekrosefaktor α (Median 8,33 pg/ml) signifikant ($P = 0,003$) höher als in der Kontrollgruppe (IL-6: 0 pg/ml; TNF α : 1,37 pg/ml).

In einer Metaanalyse aller Serummarker jedoch erwies sich nur die Interleukin-6 Konzentration als geeignet, um zwischen Patienten mit und ohne Endometriose zu unterscheiden. Keiner der anderen Marker machte eine solche Unterscheidung möglich (Bedaiwy et al., 2002).

Für die Messung des Serum-Interleukin-6 Spiegels ergab sich ein hoher Wert für die diagnostische Voraussage mit einer „Area under the curve“ von 87%. Bei einem Interleukin-6 Schwellenwert von 2 pg/ml beträgt die Sensitivität 90% und die Spezifität 67%.

Ist der Schwellenwert 4 pg/ml, beträgt die Sensitivität 85% und die Spezifität 80%. Bei einem Schwellenwert von 7,5 pg/ml beträgt die Sensitivität 80% und die Spezifität 87% (Bedaiwy et al, 2002).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sich Serum-Interleukin-6 bei einer hohen Spezifität und Sensitivität eignet, um zwischen Patientinnen mit und ohne Endometriose zu unterscheiden. Die Tatsache, dass diese Werte von der Phase des Menstruationszyklus unabhängig sind, macht diesen Serummaker potentiell für die Entwicklung eines nicht invasiven Diagnoseverfahrens nutzbar. Trotzdem bedarf es noch größer angelegter Studien, um die Datenlage zu bestätigen.

2004 veröffentlichten Somigliana et al. dann eine Studie mit dem Ziel, die bis dahin vorliegenden Daten zu CA-125, CA 19-9 und Interleukin-6 zu ergänzen, und den tatsächlichen Wert diese drei Parameter für die Diagnose einer Endometriose-erkrankung zu ermitteln. An der Studie nahmen 80 Patientinnen teil. Bei 45 von ihnen wurde eine Endometriose diagnostiziert. Die übrigen 35 Patientinnen bildeten die Kontrollgruppe. Innerhalb dieser Gruppe gab es unterschiedliche Diagnosen, unter anderem 22 Patientinnen mit Ovarialzysten, deren Ursache nicht Endometriose war und 6 Patientinnen mit einem entzündlichen Geschehen im kleinen Becken.

Die Studie ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Patientinnen mit und ohne Endometriose für CA 19-9 (9,8 IU/ml, [4,5-20,8] vs. 7,4 IU/ml [2,8-11,5], $p=0,09$). Auch für Interleukin-6 konnte im Gegensatz zu der Studie von Bedaiwy 2002 kein signifikanter Unterschied festgestellt werden: 0,6 pg/ml (0 -1,4) vs. 1,0 pg/ml (0,4-1,9) ($p=0,11$).

Lediglich für CA-125 konnten signifikante Unterschiede zwischen Patientinnen mit einer Endometriose (23,4 IU/ml (13,3-37,6)) und den gesunden Kontrollen (11,4 IU/ml (9,1-18,5) ($p < 0,001$)) festgestellt werden. Für die CA-125 Werte ergab sich damit eine Sensitivität von 27% und eine Spezifität von 97%.

Der Versuch, in Kombination mit allen drei Parametern eine Voraussage für das Vorhandensein einer Endometriose zu machen, erwies sich als nicht ausreichend, da sich nur eine Sensitivität von 42% und eine Spezifität von 71% ergab. (Somigliana et al., 2004). Trotzdem hielten Somigliana et al. CA-125 für einen vielversprechenden Weg, einen spezifischen Serummarker für eine Endometrioseerkrankung zu finden.

Ferreira do Amaral et al. veröffentlichten dann 2006 eine Studie, deren Ziel es sein sollte, die CA-125 Konzentration im Serum und in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit und ohne Endometriose zu vergleichen. Auf diesem Wege wollten sie die Verwendbarkeit von CA-125 als diagnostischen Parameter für eine Endometrioseerkrankung belegen.

An der Studie nahmen 52 Frauen teil, die sich auf Grund von Infertilität, Sterilisation oder Unterleibsschmerzen einer Laparoskopie unterzogen. Die Blutproben wurden während der Laparoskopie entnommen.

Die Frauen wurden anhand der Diagnose Endometriose in zwei Gruppen unterteilt. Die Gruppe der Frauen mit Endometriose umfasste 35 Patientinnen, die Kontrollgruppe 17. Ferreira do Amaral et al. konnten einen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höheren Wert für CA-125 in Serum bei den Endometriosepatientinnen nachweisen. Für diese Gruppe ergaben sich CA-125 Werte zwischen 8,3 und 115,3 U/ml. Für die Kontrollgruppe ergaben sich Werte von 2,7 bis 25 U/ml. Aus diesen Werten ergab sich ein signifikant messbarer Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($P = 0,005$).

Ferreira do Amaral et al. stellten auch eine positive Korrelation zwischen den CA-125 Werten im Serum und in der Peritonealflüssigkeit der Endometriosepatientinnen fest (Korrelations Koeffizient (r)=0,488). Zudem ergab die Studie eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und der Höhe des CA-125 Wertes vor allem für die Stadien III und IV, so dass ein Monitoring der Serum CA-125 Werte

möglicherweise Aufschluss über den Schweregrad einer Endometrioseerkrankung geben könnte.

Damit ergibt sich ein Nutzen der CA-125 Werte im Serum vor allem für die Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung. Ob sich dieser Marker jedoch auch für die Diagnostik der Endometriose nutzen lässt, erscheint auch Ferreira do Amaral et al. letztendlich fraglich.

Leider waren in dieser Studie weder die Sensitivität noch die Spezifität für die CA-125 Werte angegeben. Auch lässt sich kritisieren, dass sich diese Studie auf ein relativ kleines Patientenkollektiv bezieht ($n=25$), und dass die Entnahme der Blutproben im Zuge der Laparoskopie durchgeführt wurde, wodurch vor allem die zur Anästhesie verwendeten Medikamente und chirurgische Maßnahmen die Ergebnisse verfälscht haben könnten.

Die von uns durchgeführte Studie zur Expression von CCR1 m-RNA auf Leukozyten im peripheren Blut ergab einen signifikant erhöhten Wert für Frauen mit einer Endometrioseerkrankung ($6,17 \pm 3,51$) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ($1,69 \pm 1,31$), ($p < 0,001$). Es ergab sich eine Spezifität von 74% und eine Sensitivität von 90%. Der positive prädiktive Wert für die Voraussage einer Endometrioseerkrankung betrug 0,82 und der negative Prädiktive Wert ergab 0,85.

Die Ergebnisse der weiteren Kontrollgruppen ergaben, dass die CCR1 m-RNA Werte der Leukozyten im peripheren Blut auch im Rahmen einer akuten Entzündung, wie zum Beispiel der Adnexitis stark erhöht sind ($12,63 \pm 6,98$). Auch schwangere Frauen haben wir in unsere Studie miteingeschlossen. In diesen Fällen ergaben sich ebenfalls signifikant höhere Werte ($5,46 \pm 2,35$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($1,69 \pm 1,31$).

Um die Zuverlässigkeit der CCR1 Werte in der Endometriosedagnostik noch genauer zu untersuchen, haben wir gesondert die Daten der Patientinnen ausgewertet, die symptomatisch mit Unterleibsschmerzen aufgefallen sind. Diese Gruppe gesondert zu betrachten erschien uns besonders wichtig, da viele Frauen mit Endometriose durch eben diese Beschwerden zum ersten Mal auffällig werden. Es ergab sich eine Sensitivität von 81,8% und eine Spezifität von 82,3%.

Auch bei asymptomatischen Patientinnen erwies sich eine Unterscheidung zwischen erkrankten und gesunden Patientinnen anhand der CCR1 Werte mit einer Sensitivität von 72% und einer Spezifität von 85,7% als möglich.

Es erschien uns des Weiteren sinnvoll, die Zuverlässigkeit der CCR1 Werte, auch für die einzelnen Endometriosestadien genauer zu untersuchen. Anhand der Operationsberichte wurden die Patientinnen in die Endometriosestadien I-IV eingeteilt (siehe Abb.13).

Es zeigte sich, dass die CCR1 Werte auch in den verschiedenen Stadien gut geeignet sind, um zwischen Patientinnen mit und ohne Endometriose zu unterscheiden. In allen vier Stadien war der Unterschied zu den gesunden Kontrollen signifikant. In den Stadien II-IV lag die Sensitivität befriedigend hoch im Bereich deutlich über 70%. Lediglich im Stadium I erscheinen die CCR1 Werte trotz des signifikanten Unterschieds zu den gesunden Kontrollen bei einer Sensitivität von nur 50% bedingt geeignet, um eine Erkrankung in einem so frühen Stadium eindeutig zu diagnostizieren. Die Spezifität hingegen lag in allen vier Stadien deutlich über 80%. Die CCR1 Werte erwiesen sich damit in unser Studie als geeignet, sowohl die frühen Stadien der Endometrioseerkrankung als auch eine fortgeschrittene Erkrankung zu erkennen. Aufgrund der geringen Sensitivität des Tests im Stadium I ist aber eine zuverlässige Diagnose erst ab dem Stadium II zu vermuten.

Aufgrund der hohen Rezidivrate bei betroffenen Patientinnen erschien es uns sinnvoll, auch diese Patientinnen in die Studie miteinzubeziehen. Unsere Ergebnisse zeigten, dass auch Rezidiverkrankungen mit einem signifikanten Anstieg der CCR1 Werte einhergehen. Leider war es aber nicht möglich, anhand der CCR1 Werte zwischen Rezidiverkrankungen und der Erstmanifestation eine Endometriose zu unterscheiden.

Insgesamt weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass sich die Erfassung der CCR1 Expression im peripheren Blut eignet, um eine Endometriose zu diagnostizieren oder auszuschließen. Allerdings ist es nötig, vorher zum Beispiel mit Hilfe einer β HCG-Bestimmung eine Schwangerschaft auszuschließen. Auch ein akutes Entzündungsgeschehen wie eine akute Adnexitis sollte beispielsweise mittels der CRP-Werte und der Leukozytenwerte ausgeschlossen werden. Ferner sollten maligne Erkrankungen und Autoimmun-Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis ausgeschlossen werden.

Nach Ausschluß oben genannter anderer Ursachen für eine Erhöhung der CCR1 Werte im peripheren Blut birgt die Bestimmung dieser Werte die Möglichkeit, auf nicht invasivem Wege eine Endometriose ab dem Stadium II zu diagnostizieren und ist somit ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu einem schnelleren Erkennen dieser Erkrankung.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Bestimmung von Serummarkern, deren Konzentration sich im Zuge einer Endometrioseerkrankung verändert, ein vielversprechender Weg ist, eine Endometriose auf nicht-invasivem Weg zu diagnostizieren.

Die Ergebnisse der verschiedenen Studien lassen jedoch vermuten, dass es nicht ausreichend ist, nur die Werte eines einzelnen Markers zu diesem Zweck heranzuziehen.

Die pathologischen Veränderungen im Rahmen einer Endometrioseerkrankung sind zu komplex, um sie mit der Veränderung eines einzigen Markers zuverlässig erfassen zu können.

Aus diesem Grund erscheint es uns sinnvoll, in Zukunft den Nachweis von Veränderungen in der Konzentration verschiedener Marker in einem Test zu kombinieren. Zu diesem Zweck könnte beispielsweise eine Kombination von CA 125 und CCR1 sinnvoll sein, da diese Marker in verschiedenen Studien einen signifikanten Unterschied zwischen Endometriosepatientinnen und Kontrollgruppen aufwiesen, jeder für sich genommen aber nicht ausreichte, um eine endgültige zuverlässige Diagnosestellung zu ermöglichen.

Vor allem in Bezug auf Sensitivität und Spezifität der einzelnen Serummarker ergänzen sich CA-125 und CCR1 optimal, da sich in der Studie von Somigliana et al. von 2004 für CA-125 allein als diagnostischer Test eine Spezifität von 97% ergab die Sensitivität jedoch nur 27% betrug.

In unserer Studie zu CCR1 als diagnostischer Testparameter für eine Endometrioseerkrankung ergab sich hingegen eine Spezifität von nur 74%, aber dafür eine Sensitivität von 90%. Daraus ergibt sich, dass für sich genommen CA-125 vor allem geeignet ist, um eine Endometriose auszuschließen, da bei einer Spezifität von 97% einen Großteil der gesunden Patientinnen auch anhand der CA-125 Wertes als gesund erkannt wurden. Wohingegen das Diagnostizieren einer vorliegenden

Endometrioseerkrankung mittels dieses Wertes eher unzuverlässig ist, da zu viele erkrankte Patientinnen nicht durch den CA-125 Wert ermittelt werden können.

An dieser Stelle könnte sich eine Kombination mit den CCR1-Werten anbieten, da unsere Studie eine Sensitivität von 90 % im Bezug auf eine vorliegende Endometrioseerkrankung ergab. Die CCR1 Werte sind also vor allem geeignet, eine vorliegende Endometriose zu bestätigen. Es wäre also ggfs. möglich, durch das Erfassen beider Werte eine noch zuverlässigere Diagnose zu erzielen

Es erscheint uns außerdem sinnvoll, auch die MCP-1-Serum-Werte in einen Test miteinzubeziehen, da auch für diesen Serummarker die Datenlage zum jetzigen Zeitpunkt vielversprechend erscheint.

Wir halten die Suche nach einem Kombinationstest für einen sinnvollen Weg, die Endometriosedagnostik auf nicht-invasivem Wege zu ermöglichen. Die CCR1 m-RNA Werte der Leukozyten im peripheren Blut, die CA-125 und MCP-1 Werte im Serum werden wir zu diesem Zwecke genauer untersuchen. Wie hoffen auf diesem Wege, eine Möglichkeit zu finden, diese Krankheit schneller zu erkennen und betroffene Frauen so schneller einer adäquaten Behandlung zu führen zu können.

5. Zusammenfassung

Wir haben die CCR1 m-RNA Konzentration im peripheren Blut von Patientinnen mit und ohne Endometriose untersucht, um auf diesem Wege eine Möglichkeit aufzuzeigen, diese Erkrankung nicht-invasiv zuverlässig zu diagnostizieren.

An der Studie haben 163 Patientinnen teilgenommen, die eine von der Ethikkommission der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Lübeck genehmigte Einverständniserklärung unterschrieben haben.

Die Blutentnahme wurde bei allen nicht-schwangeren, nicht-postmenopausalen Patientinnen in der proliferativen Phase des Menstruationszyklus durchgeführt. Die Blutentnahme fand immer statt, bevor sich die Patientinnen einer anästhesiologischen und chirurgischen Behandlung unterzogen.

Die Ratio der CCR1/HPRT von Patientinnen mit Endometriose ($6,17 \pm 3,51$) war im Vergleich zu Frauen ohne Endometriose ($1,96 \pm 1,31$) signifikant erhöht ($p < 0,001$). Auch in der Gruppe der Schwangeren war die CCR1 Expression ($5,46 \pm 2,35$) im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($1,96 \pm 1,31$) signifikant erhöht ($p < 0,001$). Außerdem fanden wir im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($1,96 \pm 1,31$) signifikant erhöhte Werte der CCR1 Expression im peripheren Blut der Patientinnen mit akuten Entzündungen ($12,63 \pm 6,98$) ($p < 0,001$). Diese Methode zeigte eine Sensitivität von 90%, eine Spezifität von 74%, einen negativen prädiktiven Wert 85% und einen positiven prädiktiven Wert von 82% für die Voraussage einer Endometrioseerkrankung.

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die Erfassung der CCR1 Expression auf Leukozyten im peripheren Blut eignet, um eine Endometriose zu diagnostizieren oder auszuschließen und somit einen wichtigen Schritt auf dem Weg zu einem schnelleren Erkennen dieser Erkrankung darstellt.

6. Anhang

6.1 Stadieneinteilung der Endometriose

Es werden, je nach Lokalisation, drei verschiedene Formen der Endometriose unterschieden.

Endometriosis genitalis interna: Endometrioseherd im Bereich des kleinen Beckens.

Endometriosis genitalis interna: Endometrioseinseln innerhalb des Myometriums (Adenomyosis uteri).

Endometriosis extragenitalis: Endometrioseherde außerhalb des kleinen Beckens.

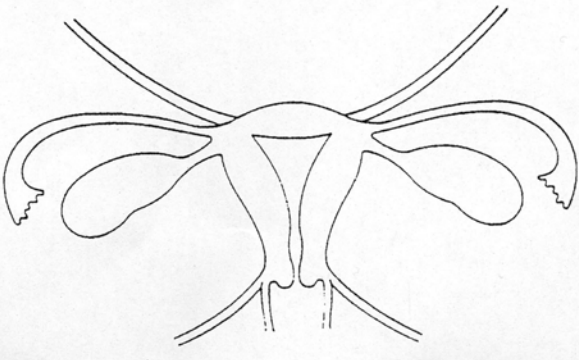
1979 stellte die American Fertility Society (AFS) (seit 1995 in American Society for Reproductive Medicine (ASMR) umbenannt) ein Klassifikationssystem vor, in dem vier Stadien der Endometriose von gering bis schwer unterschieden werden. Anzahl Lokalisation und Ausdehnung der Endometrioseherde sowie Adhäsionen werden dokumentiert. Anhand des ermittelten Punktwertes erfolgt dann die Einteilung in die vier oben genannten Stadien (siehe Abb. 12).

Abbildung 13

Endometriose		<1cm	1-3cm	>3cm	Punktzahl
Peritoneum	oberflächlich	1	2	4	
	tief	2	4	6	
Ovar	rechts oberflächlich	1	2	4	
	rechts tief	4	16	20	
	links oberflächlich	1	2	4	
	links tief	4	16	20	
Douglasobliteration			teilweise	komplett	
			4	40	

Adhäsionen		1/3	2/3	>2/3	
Ovar	rechts zart	1	2	4	
	rechts dicht	4	8	16	
	links zart	1	2	4	
	links dicht	4	8	16	
Tube	rechts zart	1	2	4	
	rechts dicht	4*	8*	16	
	links zart	1	2	4	
	links dicht	4*	8*	16	
* bei komplettem Tubenverschluß ⇒ 16P					
Gesamt-Punkte					

Stadium	Grad I	1 - 5P	☐
	Grad II	6 - 15P	☐
	Grad III	16 - 40P	☐
	Grad IV	>40P	☐

F53/186-11/94 B2

Schema zur Stadieneinteilung einer Endometrioseerkrankung.

6.2 Pathogenese der Endometriose

Die Pathogenese der Endometriose ist bis heute ein viel diskutiertes Thema. Im Folgenden sollen einige der etabliertesten Theorien zur Entstehung dieser Erkrankung dargestellt werden.

Die klassische Transplantationstheorie (Sampson, 1940) beruht auf der Annahme, dass während der Menstruation vitales Endometriumgewebe retrograd durch die Tuben in den Bauchraum gelangt.

Unterstützt wird diese Theorie durch den Nachweis von vitalem endometrialem Drüsengewebe und Stromazellen im Menstruationsblut (Keettel und Stein, 1951), durch das gehäufte Vorkommen von Endometriose bei Frauen mit Störungen der Entwicklung der Müllerschen Gänge und der daraus resultierenden Abflussstörungen des Menstruationsblutes (Sanfilippo et al., 1986) sowie durch die Induzierbarkeit von Endometriose im Tierexperiment mittels künstlich hergestellter utero-pelviner Fisteln (TeLinde und Scott, 1950).

Die retrograde Menstruation ist jedoch nach neueren Erkenntnissen als physiologisch anzusehen. Sie findet sich bei 76-90% der Frauen und ist durch das Vorkommen von vitalem endometrialen Gewebe in der Peritonealflüssigkeit betroffener Frauen gekennzeichnet.

Damit hat die retrograde Menstruation eine deutlich höhere Prävalenz als die Endometriose (Bartosik et al., 1986). Diese Diskrepanz impliziert, dass retrograde Menstruation nicht allein der Grund für das Entstehen einer Endometriose sein kann. Dies führt zu der Annahme, dass zusätzlich zur retrograden Menstruation ein Immundefekt vorliegen muss, der ein Implantieren des endometrialen Gewebes auf dem Peritoneum ermöglicht (Dmowski et al., 1995).

Physiologischerweise ist es die Aufgabe von Makrophagen, Fragmente autologen Endometriumgewebes in der Bauchhöhle zu beseitigen.

Auf der Suche nach dem Fehler im Immunsystem betroffener Frauen ist in den letzten Jahren zunehmend die genaue Zusammensetzung der Peritonealflüssigkeit in den Mittelpunkt des Interesses gerückt.

Die Peritonealflüssigkeit besteht primär aus Plasmatranssudat und Ovarialexsudat.

Sekundär kann sie auch retrograd geflossenes Menstruationsblut und von Makrophagen sezernierte Bestandteile enthalten (Oral et al., 1996).

Die Peritonealflüssigkeit enthält außerdem eine Vielzahl an frei schwimmenden Zellen, unter anderem Makrophagen, natürliche Killerzellen, Lymphozyten, eosinophile Granulozyten, Mesothelialzellen und Mastzellen.

Studien mit Frauen, die an einer Endometriose erkrankt sind, haben ergeben, dass bei diesen Frauen die Menge der Peritonealflüssigkeit deutlich erhöht ist (Oral et al., 1996), und dass es signifikante Veränderungen verschiedener immunologischer Komponenten gibt (Ho et al., 1997a).

So ist zum Beispiel die Anzahl an Makrophagen deutlich erhöht und sie zeigen auch ein höheres Maß an Aktivierung im Vergleich zu gesunden Frauen (Oral et al., 1996).

Aber trotz der dadurch bedingten vermehrten Zytokinausschüttung und T-Zellaktivierung kann sich eine Endometriose entwickeln, wenn das Immunsystem mit der Menge des retrograd geflossenen Menstruationsblutes überfordert ist, oder wenn es aufgrund eines Immundefektes zu unzureichender Beseitigung von vitalem Endometriumgewebe kommt (Dmowski, 1995).

Neuere Daten lassen außerdem vermuten, dass die Makrophagen in der Peritonealflüssigkeit auch eine aktive Rolle in der Entstehung und Persistenz der Endometriose spielen, da sie die Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen induzieren, die an entzündlichen Reaktionen, Gewebsreparaturen und Neovaskularisation der Endometriome beteiligt sind (Senturk und Arici.,1999; McLaren, 2000).

Die natürlichen Killerzellen (NK Zellen) in der Peritonealflüssigkeit an Endometriose erkrankter Frauen weisen eine deutlich reduzierte Zytotoxizität gegenüber autologen Endometrium auf (Oosterlynck et al., 1991). In diesem Fall ist die Veränderung der NK Zellen jedoch nicht auf die Peritonealflüssigkeit beschränkt, sondern auch systemisch im peripheren Blut nachweisbar (Oosterlynck et al., 1992).

Ho et al. wiesen 1995 nach, dass die NK Zellen Zytotoxizität vor allem bei Frauen mit einer Endometriose im Stadium III–IV im Vergleich zu gesunden Frauen signifikant erniedrigt ist.

Diese Erkenntnisse untermauern die Theorie, dass die verminderte NK Zell-zytotoxizität gegenüber ektope Endometrium der eigentliche Grund für das Entstehen einer Endometriose ist, da das ektope Endometrium eine Art chronisch antigenen Stimulus für das Immunsystem darstellt und dadurch eine Toleranzentwicklung bedingt (Hill, 1992).

Eine andere Theorie impliziert, dass die veränderte Differenzierung der NK Zellen eher eine Folge der Implantation von Endometriumfragmenten in der Bauchhöhle ist (Kikuchi et al., 1993).

Ungefähr 30-50% der Zellen in der Peritonealflüssigkeit sind Lymphozyten. Die neuesten Erkenntnisse lassen vermuten, dass es bei Frauen mit Endometriose auch Veränderungen in der zellvermittelten Immunantwort gibt (Ho et al., 1997a).

Zur Erhöhung der absoluten Zellzahlen gibt es in der Literatur widersprüchliche Studien. So wiesen Hill et al. 1988 eine im Vergleich zu T-Zell-Suppressorzellen erhöhte Anzahl von T-Helferzellen nach. Diese Ergebnisse wurden aber 1995 von Ho et al. nicht bestätigt. Sie konnten weder in der Peritonealflüssigkeit, noch im peripheren Blut erkrankter Frauen eine Erhöhung der T-Helferzellen nachweisen.

An der Pathophysiologie der Endometriose scheint vor allem die Zusammensetzung, der von T-Zellen sezernierten Zytokine beteiligt zu sein. So werden von den aktivierten T-Zellen in der Peritonealflüssigkeit betroffener Frauen vermehrt die Th1 Zytokine Interleukin 2, Interferon γ und die Tumornekrosefaktoren α und β sezerniert, die für die zellvermittelte Immunität verantwortlich sind (Ho et al., 1997b).

Auch in der Zusammensetzung der löslichen Bestandteile der Peritonealflüssigkeit gibt es in Verbindung mit einer Endometrioseerkrankung signifikante Veränderungen. So sezernieren die Makrophagen betroffener Frauen deutlich mehr Prostaglandin E2 und Prostaglandin F 2 α als die Makrophagen gesunder Frauen (Krack et al., 1996). Auch die Konzentration von Interleukin 1 in der Peritonealflüssigkeit ist erhöht (Ho et al., 1997a).

Im Bezug auf die Konzentration von Interleukin 6 ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse. Sowohl in der Peritonealflüssigkeit (Punnonen et al., 1996) als auch im peripheren Blut (Koumantakis et al., 1994) wurden erhöhte Werte festgestellt. Diese Ergebnisse konnten aber in der Studie von Rapkin et al., 2000 nicht bestätigt werden. Wohingegen Mahnke et al. 2000 eine höhere Interleukin-6 Konzentration zumindest bei Frauen mit fortgeschrittenem Endometriosestadium nachweisen konnten.

Im frühen Stadium der Endometriose konnte eine erhöhte Interleukin-10 Konzentration nachgewiesen werden (Ho et al., 1997b). In dieser Tatsache vermutet man die Ursache für die verminderte Anzahl von aktivierten T-Helferzellen in der Peritonealflüssigkeit (Punnonen et al., 1996).

Im Gegensatz zu Interleukin 6 und 10 ist die Konzentration des Makrophagen-inhibierenden Interleukins 13 bei erkrankten Frauen deutlich niedriger als bei gesunden Frauen (McLaren et al., 1997).

Die Konzentration des Tumornekrosefaktors α ist bei Frauen mit Endometriose in der Peritonealflüssigkeit ebenfalls erhöht (Richter et al., 1998). Man vermutet außerdem, dass die Konzentration mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (Richter et al., 1998).

Auch die Konzentration des β Chemokin RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted), ein Chemoattraktant für Makrophagen und aktivierte T-Zellen (Schall et al., 1990), ist in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen im Vergleich zu Frauen ohne Endometriose signifikant erhöht und korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung (Khorram et al., 1993).

Das RANTES-Gen kodiert für ein 10kDa intrazelluläres und ein 8kDa sekretiertes Protein (Schall et al., 1988). Das RANTES-Protein ist in den Stromazellen von Endometrioseimplantaten und in Endometriumstromazellen nachweisbar, nicht jedoch in epithelialen Zellen. In vitro sind stromale Zellkulturen vom Endometrium sowohl gesunder als auch an Endometriose erkrankter Frauen nicht in der Lage,

RANTES-m-RNA zu exprimieren, beziehungsweise RANTES-Protein zu sekretieren. Dies erfolgt erst nach einer Stimulation der Zellkulturen mit Tumornekrosefaktor α und Interferon γ (Hornung et al., 1997; Arima et al., 2000).

Auch die Expression des RANTES spezifischen G-Protein gekoppelten Rezeptors CCR1 (Su et al., 1996) auf der Oberfläche von Makrophagen der Peritonealflüssigkeit nahm unter Stimulation mit Tumornekrosefaktor α und Interferon γ in vitro zu (Hornung et al., 2001).

Als Folge all dieser Erkenntnisse geht man heute davon aus, dass eine Kaskade intraperitonealer Zytokine, ausgeschüttet von Makrophagen, die lokale Inflammation verursacht (Calhaz-Jorge et al, 2002). Die Zytokine spielen dabei eine zentrale Rolle in der Regulation der Zellproliferation, Zellaktivierung, Zelladhäsion und Chemotaxis. Die Interleukine (IL) IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-20 und der Tumornekrosefaktor (TNF)- α sind nachweislich an der Pathogenese der Endometriose beteiligt (Keenan et al., 1995; Arici et al., 1996; Punnonen et al., 1996; Ho et al., 1997; McLaren et al., 1997; Gazvani et al., 1998; Koninckx et al., 1998; Küpker et al., 1998, Zyneloglu et al., 1998; Garcia-Velasco and Arici, 1999; Iwabe et al., 2000; Shimoya et al., 2000; Mass et al., 2001).

7. Literaturverzeichnis

- Arici A., Tazuke S.I., Attar E., Kliman HJ., Olive DL. (1996): Inteleukin-8 concentrations in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells. *Mol. Hum. Reprod.* **2**, 40-45.
- Arima K., Nasu K. und Narahara H., Fujigawa K., Matsui N., Miykawa I. (2000): Effects of lipopolysaccharid and cytokines on production of RANTES by cultured humanendometrium. *Gynaecol. Obstet. Invest.* **43**, 245-250.
- Bartosik D., Jacobs S.L. und Kelly L.J. (1986): Endometrial tissue in peritoneal fluid. *Fertil. Steril.* **46**, 796-800.
- Bedaiwy M.A., Falcone T., Sharma R.K., Goldberg J.M., Attaran M., Nelson D.R. und Agrawal A. (2002): Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial. *Hum. Reprod.* **17**, 426-431.
- Calhaz-Jorge C., Costa A.P., Barata M., Santos M.C., Melo A., Palma-Carlos M.C. (2000): Tumor necrosis factor alpha concentration in the peritoneal fluid of infertile women with minimal or mild endometriosis are lower in patients with reg lesions only than in patients with red lesions. *Hum. Reprod.* **15**, 1256-1260.
- Dmowski W.P. (1995): Immunological aspects of endometriosis. *Intern. J. Gynaecol.Obstet.* **50**, Nachtrag **1** 3-10.

- Ferreira do Amaral V., Ferriani R.A., Silva de Sa M.F., Nogueira A.A., Rosa e Silva J.C., Japur de Sá Rosa e Silva A.C. und Dias de Moura M. (2006): Positive correlation between serum and peritoneal fluid CA-125 levels in women with pelvic endometriosis. Sao Paulo Med J. 2006; **124**, 223-227.
- Garcia-Velasco J.A. und Arici A. (1999): Interleukin-8 expression in endometrial stoma cells is regulated by integrin-dependent cell adhesion. Mol. Hum. Reprod. **5**, 1135-1140.
- Gazvani M.R., Christmas S. und Quenby S. (1998): Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in patients with endometriosis: relationship to stage of disease. Hum. Reprod. **13**, 1957-1961.
- Goldmann M.B. und Cramer DW (1998): Current concepts in Endometriosis Prog. Clin. Biol. Res. **323**, 17-23.
- Hill J.N., Faris H.M., Schiff I. und Anderson D.J. (1988): Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. Fertil. Steril. **50**, 216-222
- Hill J.A. (1992): Immunology and endometriosis Fertil. Steril. **58**, 262-264
- Ho H.N., Chao K.H., Chen H.F., Wu M.Y., Yang Y.S. und Lee T.Y. (1995): Peritoneal natural killer cytotoxicity and CD25+ CD3+ lymphocyte subpopulation are decreased in women with stage III-IV endometriosis. Hum. Reprod. **10**, 2671-2675.

- Ho H.N., Wu M.Y. und Xang Y.S. (1997a) Peritoneal cellular immunity and endometriosis.
Am. J. Reprod. Immunol. **38**, 400-412.
- Ho H.N., Wu M.Y., Yang Y.S. und Lee T.Y. (1997b): Peritoneal interleukin 10 increases with activated CD4+ T lymphocytes in women with endometriosis.
Hum. Reprod. **12**, 2528-2533
- Ho H.N., Wu M.Y., Chao K.H. et al. (1997): Peritoneal interleukin-10 increases with decrease in activated CD4+ T lymphocytes in women with endometriosis.
Hum. Reprod. **12**, 1528-2533.
- Homburg R. (1996): Polycystic ovary syndrome from gynaecological curiosity to multisystem endocrinopathy.
Hum. Reprod. **11**, 11-39.
- Hornung D., Bentzien F., Wallwiener W., Kiesel L. und Taylor R.N. (2001): Chemokine bioactivity of RANTES in endometriotic and normal endometrial stroma cells and peritoneal fluid.
Mol. Hum. Reprod. **7** vol.2 163-168.
- Hornung D., Ryan I.P., Chao V.A., Vigne J.-L., Schriock E.D. und Taylor R.N. (1997): Immunolocalisation and regulation of the chemokine RANTES in human endometrial and endometriosis tissues and cells.
J. Clin. Endocrinol. Metab. **82**, 1621-1628.

Horuk R. (1994): Molekular properties of the chemokine receptor family.
Trends Pharmacol Sci **15**, 159-165

Iwabe T., Harada T., Tsudo T., Nagano T., Yoshida S., Tanikawa M., Terakawa N.
(2000): Tumor necrosis factor alpha promotes proliferation of
endometriotic stomal cells by inducing interleikin-8 gene and protein
expression.
J. Clin. Endocrinol. Metab. **85**, 824-829.

Illera J.C., Silvan G., Illera M.J., Munro C.J., Lessey B.A. und Illera M. (2001) :
Measurement of serum and peritoneal fluid LH concentrations as a
diagnostic tool for human endometriosis.
Reproduction **121**, 761-169.

Jones G.S. und Madrigal de Castro V. (1970) : Hormonal findings in association with
abnormal corpus luteum function in the human : the luteal phase defect.
Fertil. Steril. **46**, 1077-1082.

Karck U., Reister F., Schafer W., Zahradnik H.P. und Breckwoldt M. (1996): PGE2
and PGF2 alpha release by human peritoneal macrophages in
endometriosis.
Prostaglandins **51**, 49-60

Keetel W.C. und Stein J.R. (1951): The viability of the cast-off menstrual
endometrium.
Am. J. Obstet. Gynecol. **61**, 440-442.

Keenan J.A., Chen T.T., Chadwell N.L., Torry D.S., Caudle M.R.(1995): IL-1 beta,
TNF-alpha and IL-2in peritoneal fluid and macrophage-conditioned
media of women with endometriosis.
Am. J. Reprod. Immunol. **34**, 381-385.

- Khorram O., Taylor R.N., Ryan I.P., Schall T.J. und Landers D.V. (1993):
Peritoneal fluid concentrations of cytokine RANTES correlate with the
severity of endometriosis.
Am. J. Obstet. Gynaecol. **169**, 157-161.
- Koninckx P.R., Kennedy S.H. and Barlow D.H. (1998): Endometriotic disease: the
role of peritoneal fluid.
Hum. Reprod. Update **4**, 741-751.
- Koumantakis E., Matalliotakis I., Neonaki M., Froudarakis G. und Georgoulas V.
(1994): Soluble serum interleukin-2 receptor, interleukin-6 and
interleukin-1 α in patients with endometriosis and in controls.
Archives of Gynecology and Obstetrics **255**, 107-112.
- Küpker W., Schultze-Mosgau A. und Diedrich K. (1998): paracrine changes in the
peritoneal environment of women with endometriosis.
Hum. Reprod. Update **4**, 719-723.
- Maas J.W., Calhaz-Jorge C., ter Riet G., Dunselman G.A., de Goeij A.F., Struijker-
Boudier H.A. (2001): Tumor necrosis factor- α but not interleukin-1
beta or interleukin-8 concentrations correlate with angiogenic activity of
peritoneal fluid from patients with minimal to mild endometriosis.
Fertil. Steril. **75**, 180-185.
- Mahnke J.L., Dawood M.Y. und Huang J.C. (2000): Vascular endothelial growth
factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis.
Fertil. Steril. **73**, 166-170
- Mantzoros C.S., Moschos S. and Avramopoulos I. (1997): Leptin concentrations in
relation to body mass index and tumor necrosis factor α system in
humans.
J. Clin. Endocrinol. Metab. **82**, 3408-3413.
-

Mataliotakis I.M., Koumantaki Y.G., Neonaki M.A., Goumenou A.G., Koumantakis G.E., Kyriakou D.S. und Koumantakis E.E. (2000): Increase in serum leptin concentrations among women with endometriosis during danazol and leuprolide depot treatments.
Am J Obstet Gynaecol **183**, 58–62.

Matarese G., Alviggi C., Sanna V., Howard J.K., Lord G.M., Curravetta C., Fontana S., Leckler R.I., Bloom S.R. und De Placido G. (2000): Increased leptin levels in serum and peritoneal fluid of patients with pelvic endometriosis.
J. Clin. Endocrinol. Metab. **85**, 2483-2487.

McLaren J., Dealtry G., Prentice A., Chatnock-Jones D.S. und Smith S.K. (1997): Decreased levels of a potent regulator of monocyte/makrophage activation, interleukin 13, in the peritoneal fluid of patients with endometriosis.
Hum. Reprod. **12**, 1307-1310.

McLaren J (2000): Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis.
Human Reproduction Update **6**, 45-55.

Oosterlynck D.J., Cornillie F.J., Waer M., Vandeputte M. und Koninckx P.R. (1991): Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium.
Fertil. Steril. **56**, 778-782

Oosterlynck D.J., Meuleman C., Waer M., Vandeputte M. und Koninckx P.R. (1992): The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis.
Fertil. Steril. **58**, 290-295.

Oral E., Olive D.L. und Arici A. (1996): The peritoneal environment in endometrioses.
Human Reproduction Update **2**, 385-398.

Punnonen J., Teisala K., Ranta H. et al. (1996): Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis.
Am. J. Obstet. Gynaecol. **174**, 1522-1526

Rapkin A., Morgan M., Bonpane C. und Martinez-Maza O. (2000): Peritoneal fluid interleukin-6 in women with chronic pelvic pain.
Fertil. Steril. **74**, 325-328.

Richter O., Mallman P., van der Ven H. und Krebs D. (1998): TNF-alpha secretion by peritoneal makrophages in endometriosis.
Zentralbl. Gynäkologie **120**, 332-336.

Sampson J.A. (1924): Benign and malignant endometrial implants in the peritoneal cavity and their relations to certain ovarian tumors.
Surgery Gynaecology and Obstetrics **38**, 287-311.

Sampson J.A. (1940): The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis.
Am. J. Obstet. Gynecol. **40**, 549-557.

Sanfilippo J.S., Wakin N.G., Schikler K.N. und Yussi-nan M.A. (1986): Endometriosis in assosiation with uterine anomaly.
Am. J. Obstet. Gynecol. **154**, 39-43.

Saraf P., Frederick R.C. und Turner E.M. (1997): Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammation anorexia.

J. Exp. Med. **185**, 171-175.

Schall T.J., Jongstra J., Dyer B.J., Jorgensen J., Clayberger C., Davis M.M. und Krenski A.M. (1988): A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family.

J. Immunol. **141**, 1018-1025

Schall T.J., Bacon K., Yoy K.J. und Goeddel D.V. (1990): Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES.

Nature **347**, 669-671.

Senturk L.M. und Arici A. (1999): Immunology of endometriosis.

J. Reprod. Immunol. **43**, 67-83.

Shimoya K., Moriyama A., Ogata I., Nobunaga T., Koyama M., Azuma C., Murata Y. (2000): Increased concentrations of secretory leukocyte protease inhibitor in peritoneal fluid of women with endometriosis.

Mol. Hum. Reprod. **6**, 829-834.

Somigliana E., Vigano P., Tirelli A.S., Felicetta I., Torresani E., Vignali M., and Di Blasio A.M. (2004): Use of the concomitant serum dosage of CA 125, CA 19-9 and interleukin-6 to detect the presence of endometriosis. Results from a series of reproductive age women undergoing laparoscopic surgery for benign gynaecological conditions

Hum. Reprod. **19**, 1871-1876.

Su S.; Mukaida N., Wang J., Nomura H., Matsushima K. (1996): Preparation of specific polyclonal antibodies to a C-C chemokine receptor, CCR1, and determination of CCR1 expression on various types of leukocytes. J. Leukocyte Biol. **60**, 658-666.

TeLinde R.V. und Scott R.B. (1950): Experimental endometriosis
Am. J. Obstet. Gynecol. **60**, 1147-1173

Vigano P., Somigliana E., Matrone R., Dubini A., Barron C., Vignali M. und di Blasio A.M. (2002): Serum leptin concentrations in endometriosis. J. Clin. Endocrinol. Metab. **87**, 1085-1087.

Wieser F., Dogan S., Klingel K., Diedrich K., Robert N., Taylor R.N. und Hornung D. (2005): Expression and regulation of CCR1 in peritoneal macrophages from women with and without endometriosis. Ferti Steril. **83**(6): 1878-81.

Zeyneloglu H.B., Senturk L.M., Seli E. et al. (1998): The peritoneal fluid levels of interleukin-12 in women with endometriosis. Am. J. Reprod. Immunol. **39**, 152-156.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1</u>	Verteilung der eingesetzten Proben	Seite 5
<u>Abbildung 1</u>	RNA Extraktion mit PAXgene Blut- RNA Kit PreAnalytix, QIAGEN	Seite 10
<u>Abbildung 2</u>	Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus bei Verwendung von SYBR GREEN	Seite 12
<u>Abbildung 3</u>	Schmelzkurvenanalyse bei RT PCR	Seite 14
<u>Abbildung 4</u>	Graphik EO vs. CO	Seite 18
<u>Abbildung 5</u>	Graphik EO vs. Kontrollgruppen gesamt	Seite 19
<u>Abbildung 6</u>	Graphik EO sympt. vs. CO sympt.	Seite 20
<u>Abbildung 7</u>	Graphik EO asymp. vs. CO asymp.	Seite 21
<u>Abbildung 8</u>	Graphik EO I vs. CO	Seite 22
<u>Abbildung 9</u>	Graphik EO II vs. CO	Seite 22
<u>Abbildung 10</u>	Graphik EO III vs. CO	Seite 23
<u>Abbildung 11</u>	Graphik EO IV vs. CO	Seite 23
<u>Abbildung 12</u>	Graphik Eo rez vs. EO vs. CO	Seite 24
<u>Abbildung 13</u>	Schema zur Stadieneinteilung einer Endometrioseerkrankung.	Seite 36

9. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei denen bedanken, die mir bei der Verfassung dieser Arbeit eine große Hilfe waren.

Bei Frau Prof. Dr. med. Daniela Hornung für die Stellung des Themas, die gute Betreuung und die viele Geduld, die sie mit mir hatte.

Bei Frau Constanze Siggel für die Einarbeitung in die angewendeten Labormethoden und die unermüdliche Unterstützung während der Laborarbeiten.

Bei Herrn Admir Agic für die Hilfe bei der statistische Auswertung der gewonnen Daten.

Bei Frau Stefanie Duderstadt für ihren zuverlässigen Rat, Inspiration in den richtigen Momenten und beständige Ermunterung aus dem Zimmer nebenan.

Außerdem möchte ich mich hier auch ganz herzlich bei meiner Mutter bedanken, ohne sie wäre ich niemals soweit gekommen.

10. Lebenslauf

Bildungshintergrund

1987-2001	Grundschule und Gymnasium in Wolfsburg und Hamburg. Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Seit 10/2001	Medizinstudium an der Universität zu Lübeck
08/2004	Physikum
03/05-01/08	Promotion
10/02-12/06	Nebentätigkeit im Operationsbereich der Universitätsfrauenklinik in Lübeck
Herbst 2008	geplant: Staatsexamen

Famulaturen

03/2005	<i>Prof. Dr. med. Diedrich</i> , Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinik Schleswig-Holstein Campus Lübeck
03/2006	<i>Dr. med. Holdkamp</i> , Praxis für Pränataldiagnostik Geburtshilfe und Gynäkologie, Lübeck
08-09/2006	<i>Prof. Dr. med. Sievers</i> , Klinik für Herzchirurgie, Universitätsklinik Schleswig-Holstein Campus Lübeck
08-09/2007	<i>PD Dr. med. Smrcek</i> , Praxis für Pränataldiagnostik Geburtshilfe und Gynäkologie, Lübeck

Praktisches Jahr

08-12/2007	<i>Prof. Dr. med. Bruch</i> Klinik für Chirurgie Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck.
12/07-03/08	<i>Dr. med. Werder</i> Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Kantonsspital Uri, Altdorf
03-07/2008	<i>Prof. Dr. med.. Schunkert</i> , Klinik für Innere Medizin Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck

11. Publikation

Agic A, Xu H, Rehbein M, Wolfler MM, Ebert AD, Hornung D.

Cognate chemokine receptor 1 messenger ribonucleic acid expression in peripheral blood as a diagnostic test for endometriosis.

Fertility and Sterility April 2007; 87 (4): 982-4