

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Frau Prof. Dr. Tanja Fehm

**Ist der Uterus als immunkompetentes Organ bei Endometriose-
Patientinnen assoziiert mit Infertilität?**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Nadine Freitag

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Alexandra Bielfeld

Zweitgutacher: Prof. Dr. med. Thomas Höhn

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Freitag, N., Pour, S.J., Fehm, T.N., Toth, B., Markert, U.R., Weber, M., Togawa, R., Kruessel, J.S., Baston-Buest, D.M., Bielfeld, A.P., (2020), Are uterine natural killer and plasma cells in infertility patients associated with endometriosis, repeated implantation failure, or recurrent pregnancy loss? *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 302(6):1487-1494, doi: 10.1007/s00404-020-05679-z.

Freitag, N., Baston-Buest, D.M., Kruessel, J.S., Markert, U.R., Fehm, T.N., Bielfeld, A.P., (2022), Eutopic endometrial immune profile of infertility-patients with and without endometriosis, *Journal of Reproductive Immunology*, 150(3):103489, doi: 10.1016/j.jri.2022.103489

Meinen beiden wundervollen Kindern Magnus und Mats-Isa

Zusammenfassung

Die ungewollte Kinderlosigkeit belastet weltweit etwa jedes zehnte Paar. Frauen, die an einer Endometriose erkranken, zeigen ein doppelt so hohes Risiko für das Auftreten einer Infertilität im Vergleich zu gesunden Frauen. Der kausale Zusammenhang zwischen einer Endometriose als chronisch-inflammatorische Erkrankung und der Infertilität bleibt weiterhin unklar. Einen Erklärungsansatz bieten immunologische und vaskuläre Veränderungen des eutopen Endometriums, die mit einer gestörten Embryoimplantation einhergehen können. Die immunologische Ursachenabklärung bei unerfülltem Kinderwunsch umfasst in vielen Kliniken bereits die Untersuchung uteriner natürlicher Killerzellen (uNK-Zellen) und Plasmazellen sowie eine Reduktion mit *Intralipid*[®] oder *Doxycyclin* im Falle erhöhter endometrialer Zellzahlen. Die vorliegende Dissertationsarbeit geht der Frage nach, ob die Endometriose-assoziierte Infertilität mit Veränderungen der ortsständigen Immunität sowie dem Gefäßwachstum im eutopen Endometrium korreliert und welche Auswirkung die Behandlung mit *Intralipid*[®] und *Doxycyclin* auf die Schwangerschaftsraten hat. Eine Kohorte von 173 Kinderwunschpatientinnen, von denen 67 unter einer Endometriose litten, erhielten im sekretorischen Zyklusabschnitt ein endometriales Scratching und wurden auf das Vorkommen von eutopen uNK- und Plasmazellen, Makrophagen, Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) und CXC-Motiv-Ligand 1 (CXCL1) sowie seiner Rezeptoren CXC-Motiv-Rezeptor 2 (CXCR2) und Syndecan-1 (SDC-1) untersucht. Im ersten Teil der Studie wurden die uNK- und Plasmazellzahlen retrospektiv mit Schwangerschaftsraten und dem Vorkommen von Endometriose korreliert, im zweiten Versuchsaufbau wurden dieselben Endometriumproben auf die o.g. Zellen und Mediatoren immunhistochemisch gefärbt und ebenfalls in Hinblick auf das Vorkommen einer Endometriose analysiert. Frauen mit Endometriose zeigten ein erhöhtes Risiko für das vermehrte Auftreten von uterinen Plasmazellen und damit dem Vorhandensein einer chronischen Endometritis. Die Behandlung mit *Doxycyclin* bei erhöhter Plasmazellzahl konnte die Schwangerschaftsraten verbessern. Bei Endometriose-Patientinnen kamen uNK-Zellen nicht vermehrt vor, jedoch verbesserte die Behandlung mit *Intralipid*[®] bei erhöhten uNK-Zellen die Schwangerschaftsraten. Das Immunprofil von Frauen mit Endometriose zeigte im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv eine erhöhte endometriale Infiltration von Makrophagen sowie eine erhöhte endotheliale Expression des von Makrophagen sezernierten VEGF-A. Die Anzahl der Makrophagen korreliert tendenziell positiv mit der Anzahl an uNK-Zellen, jedoch bleibt die vermehrte Infiltration der Makrophagen bei Endometriose-Patientinnen auch bei simultan erhöhten uNK- und Plasmazellen bestehen. Über die gesamte Kohorte hinweg war eine fehlende stromale Syndecan-1-Expression mit dem erhöhten Vorkommen von uNK-Zellen assoziiert. Das eutope Endometrium von Frauen mit Endometriose scheint im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv dahingehend verändert zu sein, dass verstärkt Zellen der Inflammation und Mediatoren der Angiogenese vorhanden sind. Eine unkoordinierte Entzündungsreaktion sowie ein zu schnelles Gefäßwachstum könnten der erfolgreichen Embryoimplantation im Wege stehen und so zur Endometriose-assoziierten Infertilität führen. Weiterführende Studien sollten vor allem die Interaktion zwischen im eutopen Endometrium vorkommenden Makrophagen, uNK-Zellen und VEGF-A weiter in Hinblick auf die Endometriose-assoziierte Infertilität untersuchen.

Summary

Involuntary childlessness is a disconsolating situation that about one in ten couples worldwide suffer from. Women who are diagnosed with endometriosis experience twice the risk of infertility compared to healthy controls. Despite extensive research, the causal relationship between endometriosis as a chronic-inflammatory condition and infertility remains unclear. Immunological and vascular changes in the eutopic endometrium, which may lead to an impaired embryo implantation, offer a possible explanation. In many fertility centers, the immunological diagnostics of infertility patients already includes the examination of eutopic uterine natural killer (uNK) and plasma cells. Additionally, cell reduction with *Intralipid*[®] or *doxycycline* retrospectively is performed in the case of increased cell count. The present dissertation investigates whether endometriosis-associated infertility correlates with changes in the local immune profile and vascular growth in the eutopic endometrium, and which effect treatment with *Intralipid*[®] and *doxycycline* has on pregnancy rates. A cohort of 173 fertility patients, 67 of whom had endometriosis, received endometrial scratching in the secretory phase of the menstrual cycle and were assessed for the presence of eutopic uNK and plasma cells, macrophages, vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and CXC motif ligand 1 (CXCL1) as well as its receptors CXC motif receptor 2 (CXCR2) and syndecan-1. In the first section of the study, uNK and plasma cell counts were retrospectively correlated with pregnancy rates and the presence of endometriosis. In the second experimental design, the same endometrial samples were immunohistochemically stained for the above-mentioned cells and mediators and analysed for the presence of endometriosis. Women with endometriosis showed an increased risk for the increased occurrence of uterine plasma cells and thus the presence of chronic endometritis. Treatment with *doxycycline* for increased plasma cell counts improved pregnancy rates. Endometriosis patients did not have increased uNK cell counts, but treatment with *Intralipid*[®] for increased uNK cells improved pregnancy rates. The immune profile of women with endometriosis showed increased endometrial infiltration of macrophages and increased endothelial expression of VEGF-A secreted by macrophages compared to the healthy control population. The number of macrophages tended to correlate positively with the number of uNK cells, but the increased infiltration of macrophages in endometriosis patients persisted even with simultaneously increased uNK or plasma cells. Across the cohort, lack of stromal syndecan-1 expression was associated with the increased presence of uNK cells. The eutopic endometrium of women with endometriosis appears to be altered compared to the healthy control population. We found an increased presence of inflammatory cells and mediators of angiogenesis in the endometrium of endometriosis-patients. An uncoordinated inflammatory reaction as well as too rapid vascular growth could stand in the way of successful embryo implantation and thus lead to endometriosis-associated infertility. Further studies should investigate the interaction between macrophages, uNK cells and VEGF-A in the eutopic endometrium regarding the development of endometriosis-associated infertility.

Abkürzungsverzeichnis

A

ART · *Assistierte reproduktive Behandlung*

C

CD138 · *Cluster of Differentiation 138*

CD68 · *Cluster of Differentiation 68*

CXCL1 · *CXC motif ligand 1*

CXCR2 · *CXC motif receptor 2*

D

DNA · *deoxyribonucleic acid*

E

E · *Östrogen*

E2 · *Estradiol*

I

IL-6 · *Interleukin-6*

IVF · *In vitro Fertilisation*

M

MHC · *Major Histocompatibility*

mRNA · *messenger ribonucleic acid*

N

NFκB · *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'
of activated B-cells*

NK · *Natürliche Killerzellen*

O

OPR · *Ongoing Pregnancy Rate*

P

P4 · *Progesteron*

R

RIF · *Repeated Implantation Failure*

RPL · *Recurrent Pregnancy Loss*

S

SDC-1 · *Syndecan-1*

U

UniKiD · *Universitäres interdisziplinäres
Kinderwunschzentrum Düsseldorf*

uNK-Zellen · *uterine Natürliche Killerzellen*

V

VEGF · *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFR · *Vascular Endothelial Growth Receptor*

W

WHO · *World Health Organization*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Endometriose	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.2	Pathogenese	1
1.1.3	Klinische Symptome.....	2
1.1.4	Diagnostik	2
1.1.5	Therapie	2
1.2	Die weibliche Infertilität	3
1.3	Endometriose-assoziierte Infertilität.....	4
1.3.1	Verändertes hormonelles Milieu.....	4
1.3.2	Immunologische Dysfunktion und Endometriose-assoziierte Infertilität ...	6
1.3.3	Die Rolle des Uterus als immunkompetentes Organ	7
1.4	Ziele der Arbeit.....	11
2	Publizierte Originalarbeiten	13
2.1	Are uterine Natural Killer and plasma cells in infertility-patients associated with endometriosis, repeated implantation failure or recurrent pregnancy loss?	13
2.2	Endometrial immune profile of infertility-patients with and without endometriosis	15
3	Diskussion	16
3.1	Schlussfolgerungen	25
4	Quellenverzeichnis	28

1 Einleitung

1.1 ENDOMETRIOSE

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die Endometriose ist eine chronische, östrogen(E)-abhängige, inflammatorische Erkrankung, die erstmals durch den deutschen Arzt Daniel Schrön beschrieben wurde. Er bezeichnet sie in seiner 1690 veröffentlichten Dissertation als „weibliche Störung derjenigen, die sexuell reifen“ [1]. Die heute international gültige Definition der Endometriose beschreibt das ektope (außerhalb des Cavum uteri) Vorkommen von Gebärmutter Schleimhaut (Endometrium). Die Endometriumläsionen sind dabei hauptsächlich an den Eierstöcken (Ovarien) und ihrer Grube im kleinen Becken (Fossa ovarica), dem Bandapparat der Gebärmutter (Ligamentum sacrouterinum) oder der Aussackung des Bauchfells zwischen der Gebärmutter und dem Mastdarm (Douglas-Raum) lokalisiert [2]. Es ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen, die etwa 10% aller Frauen im gebärfähigen Alter und damit weltweit etwa 176 Millionen Frauen betrifft [3-5]. Von allen Frauen, die von einer Endometriose betroffen sind, leiden etwa 30-50% an ungewollter Kinderlosigkeit (Infertilität/Subfertilität) [6].

1.1.2 Pathogenese

Die Entstehung der Endometriose ist bis heute nicht hinreichend verstanden. Es haben sich verschiedene Theorien etabliert, von denen Sampsons These der retrograden Menstruation am weitesten verbreitet ist [7]. Dr. John Sampson postulierte 1925, dass abgeschilferte Endometriumzellen während der Menstruation im Rahmen eines Refluxes durch die Eileiter in die Beckenhöhle gelangen [8]. Fraglich ist, weshalb es bei 76-90% aller Frauen zu retrograder Menstruation kommt, jedoch nur 6-10% eine Endometriose entwickeln [9]. Folglich wurde postuliert, dass die Menge endometrialer Zellen in der Bauchhöhle mit dem Risiko assoziiert sei, eine Endometriose zu entwickeln. Klinische Studien untermauern die Theorie, indem sie zeigen, dass Frauen mit Endometriose eine geringere Zykluslänge und eine stärkere (Hypermenorrhoe) sowie verlängerte Periodenblutung (Menorrhagie) haben [10, 11]. Zudem findet man bei Frauen mit Endometriose mehr lebensfähige endometriale Zellreste in ihrer Peritonealflüssigkeit als bei Frauen ohne Endometriose [12].

Andere Theorien zur Entstehung der Endometriose umfassen unter anderem die Metaplasie von extrauterinen Zellen zu Endometriumzellen [13], die Proliferation von

Endometriumläsionen durch hormonellen Einfluss [14, 15] und eine Immundysfunktion, die eine Adhärenz der Endometriumzellen ektop erlaubt [16, 17].

1.1.3 Klinische Symptome

Entsprechend des unterschiedlichen Vorkommens der ektopen Endometriumzellen sind auch die Symptome umfangreich und unspezifisch. Obwohl viele Patientinnen asymptomatisch sind, zählen zu den Leitsymptomen der Endometriose eine schmerzhafte Regelblutung (Dysmenorrhoe), Schmerzen beim Geschlechtsverkehr (Dyspareunie), Schmerzen beim Wasserlassen (Dysurie) und/oder beim Stuhlgang (Defäkation) sowie die Infertilität [18].

1.1.4 Diagnostik

Besteht die Verdachtsdiagnose einer Endometriose - beispielsweise bei idiopathischer Infertilität - so sollte dies zunächst anamnestisch durch standardisierte Fragebögen und anhand eines transvaginalen Ultraschall weiter abgeklärt werden [19]. Erhärten sich die Hinweise auf eine Endometriose, bedarf es zur Sicherung der Verdachtsdiagnose einer Laparoskopie mit Probenentnahme und histopathologischer Beurteilung [19]. In den letzten Jahren gab es zahlreiche Studien, die dem Versuch nachgingen, einen diagnostischen Test für die Endometriose zu entwickeln. Bislang konnte jedoch kein zuverlässiger Biomarker zur Diagnose der Endometriose identifiziert werden [20]. Auf der Suche nach nicht-invasiver Diagnostik rückt nun zunehmend die Betrachtung des eutopen Endometriums in den Vordergrund, welches auf zelluläre und genetische Veränderungen hin untersucht wird [21]. Die Probenentnahme kann transvaginal bei wacher Patientin durch Aspiration von Endometrium mithilfe einer Pipelle durchgeführt werden [22].

1.1.5 Therapie

Die Therapie der Endometriose gliedert sich in einen medikamentösen und einen operativen Ansatz und umfasst zudem supportive Maßnahmen. Grundsätzlich bestehen keine präventiven oder kurativen Therapieansätze. Alle Vorgehen dienen lediglich der Beschwerdefreiheit und der Vermeidung von Organdestruktionen. Zur medikamentösen Therapie gehört zum einen die hormonelle Behandlung, die eine Amenorrhoe zum Ziel hat, um Endometriose-assoziierten Beschwerden zu reduzieren. Die eingesetzte Leitsubstanz ist ein Gestagen (z. B. Dienogest) [23]. In der Zweitlinientherapie werden kombinierte orale Kontrazeptiva, andere Gestagene und Gonadotropin-Analoga eingesetzt [19]. Da die hormonelle Therapie der Endometriose die Ovulation inhibiert, bedeutet sie gleichermaßen eine Kontrazeption. Daneben gibt

es eine nicht-hormonelle, medikamentöse Therapie, welche vor allem Analgetika, aber auch Statine, Vitamin D oder Pycnogenol, einen NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*)-Inhibitor, umfasst [19].

Eine chirurgische Intervention kann bei persistierenden Beschwerden oder bei Infertilität in Betracht gezogen werden, wobei eine komplette Resektion der ektopen Endometrioseherde über einen laparoskopischen Zugang angestrebt wird. Um das Risiko zu reduzieren, bei einer chirurgischen Resektion die ovarielle Eizellreserve iatrogen zu dezimieren, sollte die Indikation zurückhaltend gestellt werden. Die operative Ausräumung der ektopen Endometrioseherde führt - anders als die medikamentöse Therapie – zu verbesserten Schwangerschaftsraten [24]. Die Endometriose neigt jedoch zu häufigen Rezidiven, sodass die Symptome nach einer Operation in bis zu 67% der Fälle zurückkehren [25]. Liegt ein Rezidiv vor oder besteht eine Infiltration der Ovarien durch die ektopen Endometrioseherde, wird zur Behandlung des Kinderwunsches von einer Operation abgesehen und den Frauen zu einer assistierten reproduktiven Behandlung (*assisted reproductive treatment, ART*) geraten [19].

1.2 DIE WEIBLICHE INFERTILITÄT

Infertilität wird laut Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization, WHO*) als eine Erkrankung des Reproduktionssystems definiert, bei der trotz eines regelmäßigen ungeschützten Geschlechtsverkehr über mindestens 12 Monate eine klinische Schwangerschaft ausbleibt [26]. Die primäre Infertilität wird von der sekundären abgegrenzt. Sekundär infertil ist eine Frau dann, wenn sie bereits nachweislich schwanger war oder zu einem früheren Zeitpunkt die Fähigkeit dazu vorlag [27]. Zur diagnostischen Abklärung der Infertilität wird zusätzlich zwischen wiederholtem Implantationsversagen (*Repeated Implantation Failure, RIF*) und wiederholten Spontanaborten (*Recurrent Pregnancy Loss, RPL*) unterschieden. In unserer Kohorte lag ein wiederholtes Implantationsversagen dann vor, wenn mindestens zweimal hochwertige Embryonen übertragen wurden, ohne dass eine klinische Schwangerschaft eintrat [28]. Die Patientinnen wurden mit wiederholten Spontanaborten diagnostiziert, wenn mindestens zwei Aborte nach der 7. Schwangerschaftswoche auftraten [29].

Weltweit leiden etwa 9% der Paare an unerfülltem Kinderwunsch [30]. Die weibliche Infertilität ist dabei in 33-41% ursächlich, die männliche in 25-39% und gemeinsame bzw. ungeklärte Ursachen liegen in 9-39% vor [31]. Eine systematische Analyse von 277 Gesundheitsumfragen aus 190 Ländern ermittelte eine primäre weibliche Infertilität

von 2,3% und eine sekundäre Infertilität von 18% bei Frauen im Alter von 20-44 Jahren [27].

Weibliche Ursachen für die Infertilität umfassen Ovulationsstörungen (z. B. polyzystisches Ovarialsyndrom, hypothalamische Dysfunktion), tubare Infertilität, uterine und/oder zervikale Ursachen (z. B. Zervixstenose, Polypen, Tumore) und – wie oben beschrieben - die Endometriose [32]. Auch der Lebensstil und das Verhalten scheinen eine Rolle zu spielen, so haben z.B. Nikotin- oder Alkoholkonsum sowie Unter- oder Übergewicht einen negative Einfluss auf die männliche und weibliche Fertilität [33]. Je nach Studie und deren Einschlusskriterien werden am Ende einer ätiologischen Abklärung 8-20% als unklare oder idiopathische Infertilität bezeichnet [32].

1.3 ENDOMETRIOSE-ASSOZIIERTE INFERTILITÄT

Es gibt einen Zusammenhang zwischen Endometriose und Infertilität, der – abgesehen von einer Beeinträchtigung der funktionellen pelvinen Anatomie in fortgeschrittenen Stadien – bisher nicht ausreichend geklärt ist. Die Vielzahl von Erklärungsansätzen für die Pathogenese der Endometriose-assoziierten Infertilität leiten sich aus den durch die Endometriose hervorgerufenen Pathologien ab.

Bekannt ist, dass es bei Frauen mit unbehandelter Endometriose pro Monat in 2-10% zu einer Konzeption kommt [34]. Gesunde Paare haben im Vergleich eine monatliche Fruchtbarkeitsrate von 15-20% [35]. Im Verlauf der Schwangerschaft stellt die Endometriose einen Risikofaktor für frühe Aborte und spätere Schwangerschaftskomplikationen dar [36]. Auch die *in-vitro*-Fertilisation (IVF) hat bei Frauen mit Endometriose schlechtere Implantations- und Schwangerschaftsraten zur Folge als bei gesunden Patientinnen [37]. Grundsätzlich liegt die Inzidenz der Endometriose bei infertilen Frauen zwischen 25 und 50% [6].

1.3.1 Verändertes hormonelles Milieu

Eine Reihe von klinischen Beobachtungen zeigen, dass das hormonelle Milieu für die Entstehung der Endometriose eine zentrale Rolle spielt. Zunächst sind fast ausschließlich Frauen im gebärfähigen Alter von einer Endometriose betroffen [38]. Das Auftreten vor der Menarche wurde bisher nicht beobachtet und nach der Menopause weist die Erkrankung einen Rückgang auf [38]. Folglich scheint die Erkrankung von dem Vorkommen weiblicher Sexualhormone (Östrogene und Gestagene) abhängig zu sein.

Es ist bislang nicht eindeutig geklärt, über welchen Pathomechanismus das veränderte Vorkommen der Östrogene und Gestagene Einfluss auf die Entstehung der Endometriose nimmt [7]. Es wird vermutet, dass ein verändertes hormonelles Milieu einerseits zur vermehrten Proliferationsfähigkeit endometrialer Zellen beiträgt [39]. Andererseits ist es vorstellbar, dass die Anheftung der endometrialen Zellen am Mesothel des Uterus durch hormonelle Veränderungen beeinträchtigt wird, wodurch eine Ablösung und Migration in die freie Bauchhöhle erleichtert wird [3]. Weiterhin geht man davon aus, dass die immungesteuerte Beseitigung ektooper Endometriumzellen durch die veränderte Homöostase der Sexualhormone umgangen wird [40]. Der Einfluss von Östrogenen auf die Entstehung einer Endometriose wird auch in der Therapie anderer gynäkologischer Erkrankungen deutlich: die Entfernung der Ovarien (Ovariectomie) oder die Gabe von Gonadotropin-Agonisten führt zu einer Unterdrückung der körpereigenen Östrogenproduktion, woraufhin ein Rückgang der Endometrioseherde beobachtet werden kann [38]. Wird die Therapie mit Gonadotropin-Agonisten abgebrochen; oder werden postmenopausale Frauen mit einer Östrogensatztherapie behandelt, kommt es häufig zum Rezidiv der Erkrankung [38].

Endometrioseherde zeigen darüber hinaus - im Vergleich zum eutopen Endometrium - eine erhöhte Expression des Enzyms Aromatase und eine verminderte Expression von 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, was zu einer erhöhten lokalen Verfügbarkeit von dem Östrogen Estradiol (E2) führt [41]. Neben der Östrogenabhängigkeit stellt sich zunehmend auch eine Progesteron(P4)-Resistenz als ursächlicher Faktor in der Entstehung einer Endometriose heraus. Unter dem Einfluss von P4 kommt es in der zweiten Zyklushälfte zu einer Differenzierung des Endometriums und bei Ausbleiben einer Schwangerschaft zur Nekrose des funktionellen Endometriums und zur Menstruation. Endometrioseherde zeigen eine reduzierte Expression der P4-Rezeptoren und ein vollständiges Fehlen des P4-Rezeptors B [42, 43], wodurch möglicherweise ein längeres Überleben der Endometriumzellen gewährleistet wird.

Die P4-Resistenz besteht bei Frauen mit Endometriose jedoch nicht nur in den ektooper Endometrioseherden, sondern auch im eutopen Endometrium selbst [44]. Das verminderte Vorkommen von P4 bzw. die fehlende endometriale Antwort gegenüber dem Hormon führen zu einer reduzierten Rezeptivität des Endometriums [43]. P4 führt während der sekretorischen Phase des weiblichen Zyklus zur Rekrutierung spezialisierter Immunzellen in das Endometrium, die eine erfolgreiche Embryoimplantation unterstützen [45]. Bei Abfall der P4-Wirkung steigt im Endometrium die Anzahl pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine [46], welche im regelhaften

Zyklus dann zur Nekrose des funktionellen Endometriums und zur Menstruation führen. Liegt jedoch wie bei der Endometriose eine chronische Entzündung und eine zyklusübergreifende reduzierte P4-Wirkung vor, ist die Dezidualisierung und die Implantation des Embryos beeinträchtigt.

Insgesamt ist die Endometriose also eine hormonabhängige Erkrankung; der genaue Einfluss der Sexualhormone auf ihre Entstehung bedarf jedoch weitere Untersuchung.

1.3.2 Immunologische Dysfunktion und Endometriose-assoziierte Infertilität

Immunologisch betrachtet ist die Endometriose eine chronisch-inflammatorische Erkrankung, bei der das dysfunktionale Immunsystem eine wichtige Rolle in der Entstehung und Erhaltung endometrialer Läsionen spielt [47-51]. Ein Erklärungsansatz hierfür ist die mangelnde Fähigkeit des Immunsystems, vitale Zellen an der retrograden Menstruation und an ihrer Invasion und Adhäsion am Peritoneum zu hindern [52].

Es häufen sich zudem Hinweise darauf, dass ein Versagen des Immunsystems auf uterinem, peritonealem und systemischem Niveau relevant zur der Entstehung der Endometriose-assoziierten Infertilität beiträgt [53]. Die mit Endometriose assoziierte chronische Entzündung nimmt auf verschiedenen Wegen Einfluss auf die Fertilität. Es konnte gezeigt werden, dass ovarielle Endometriumläsionen eine Inflammation in nahegelegenen Follikeln auslösen und folglich zu einer reduzierten ovariellen Reaktivität führen [54]. Die pro-inflammatorische Signalsubstanz Interleukin-6 (IL-6) scheint die Spermienmortalität zu reduzieren und kommt in erhöhten Konzentrationen in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose vor [55, 56]. Inflammatorische Mediatoren in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose tragen *in vitro* zu DNA (*deoxyribonucleic acid*) -Schädigungen von Spermien bei [57, 58]. Da die Befruchtung der Eizelle im distalen Ende des Eileiters stattfindet und damit Kontakt zur Peritonealflüssigkeit hat, ist es gut vorstellbar, dass eine Veränderung des Milieus Einfluss auf die natürliche Konzeption nimmt [59, 60].

In zahlreichen Publikationen konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl in den Endometriumläsionen selbst als auch im eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose eine veränderte Mikroumgebung von Immunzellpopulationen und inflammatorischen Mediatoren vorliegt [61-63].

Im Folgenden soll genauer dargestellt werden, was bisher über die Rolle des eutopen Endometriums in der Schwangerschaftsentstehung bei Frauen mit Endometriose in Anbetracht verschiedener Immunzellpopulationen und ihrer sekretorischen Produkte bekannt ist.

1.3.3 Die Rolle des Uterus als immunkompetentes Organ

Das Endometrium ist ein hochreaktives Gewebe, das sich aus Zellen des mesenchymalen Stromas, dem Epithel und dem Knochenmark zusammensetzt und einzigartige Eigenschaften der Selbsterneuerung und Differenzierung aufweist. Die erfolgreiche Entstehung einer Schwangerschaft setzt einen synchronisierten, koordinierten Dialog zwischen dem implantationsfähigen Embryo und dem dafür rezeptivem Endometrium voraus [64].

Um die Implantation zu ermöglichen, sind komplexe Interaktionen zwischen maternalen und embryonalen Zellen im Rahmen parakriner und autokriner Mechanismen nötig. Dabei spielen vor allem Zytokine, Chemokine und genau aufeinander abgestimmte Signalwege eine entscheidende Rolle. Angesichts dieser Komplexität ist es nicht verwunderlich, dass auch kleinste Veränderungen der Zusammensetzung und/oder Funktion von endometrialen Zellen und Signalmolekülen zur Störung oder dem ganzheitlichen Versagen von Implantation und Schwangerschaft (Gestation) führen können. Bei Frauen mit Endometriose scheinen diese Funktionen in vielerlei Hinsicht beeinträchtigt [65].

Während eine akute, kontrollierte Reaktion des Endometriums, die einer Inflammation gleicht, eine Voraussetzung für die erfolgreiche Implantation ist [66, 67], scheint die chronische Inflammation - wie sie auch bei einer Endometriose vorliegt - hinderlich zu sein und relevant zur Entstehung von Infertilität beizutragen [65]. Neben der streng regulierten Entzündungsreaktion spielt auch die erfolgreiche Ausbildung endometrialer Gefäße eine wichtige Rolle bei der Entwicklung eines rezeptiven Endometriums und der gelungenen Implantation [68]. Beide Aspekte – Inflammation und Angiogenese – sollen im Folgenden im Hinblick auf einzelne, relevante Zellpopulationen und Signalmoleküle näher betrachtet werden.

1.3.3.1 Makrophagen

Makrophagen regulieren die initiale Immunantwort und sind einerseits in der Lage, Pathogene, tote und neoplastische Zellen über Toll-like Rezeptoren zu erkennen, diese zu phagozytieren und T-Lymphozyten mithilfe von MHC (*Major Histocompatibility*)-II-Molekülen zu präsentieren. Andererseits initiieren sie die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Stammzellen und die Ausbildung neuer Blutgefäße [69].

Der *Cluster of Differentiation 68* (CD68) wird auf der Oberfläche von Makrophagen exprimiert und dient so als immunologischer Marker [70]. Im gesunden Endometrium finden sich Makrophagen im luminalen Epithel und im subepithelialen Stroma,

angrenzend an das glanduläre Epithel [71]. Sie machen mit etwa 10% die zweitgrößte Leukozytenpopulation im Endometrium nach T-Lymphozyten aus [72].

Es gibt zahlreiche Studien, die Makrophagen bei Frauen mit Endometriose vor allem in Hinblick auf die Entstehung der Erkrankung selbst untersuchten. So konnte gezeigt werden, dass peritoneale Makrophagen bei Frauen mit Endometriose in vermehrter Anzahl und stärkerer Ausdifferenzierung im Vergleich zu Frauen ohne Endometriose vorkommen [73]. Außerdem haben erstgenannte Makrophagen ein höheres inflammatorisches Potential und schwächere zytolytische Eigenschaften [74, 75]. Zudem konnte ein Unterschied in der Aktivierung der peritonealen Makrophagen beobachtet werden, die bei Frauen mit Endometriose vorkommen [76]. Die Makrophagen scheinen die im Peritoneum vorkommenden Endometriumzellen nicht als solche zu erkennen und so die Inflammation, mit der eine Endometriose einhergeht, noch zu verstärken. Studien zeigen, dass die peritoneal vorkommenden Makrophagen zur Adhäsion, Implantation und zum Wachstum der ektopen Endometrioseherde beitragen [77, 78]. Betrachtet man hingegen das eutope Endometrium von Frauen mit Endometriose, so ist bisher wenig über das Vorkommen von Makrophagen und ihre Rolle bei der Endometriose-assoziierten Infertilität bekannt. In der Literatur finden sich widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich des Vorkommens von Makrophagen im eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose. Ob diese im Vergleich zu Frauen ohne Endometriose eine erhöhte Gewebeeinfiltration [63, 79] oder eine signifikant niedrigere [80] zeigen, bleibt bisher unklar. Unabhängig von dem Vorkommen von Endometriose konnte jedoch bereits ein Zusammenhang zwischen einer veränderten Funktion von uterinen Makrophagen und einer abnormalen Gestation beobachtet werden [72, 81].

1.3.3.2 Makrophagen und der Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A)

Neben der Regulation einer initialen inflammatorischen Antwort sind Makrophagen auch in die Ausbildung uteriner Blutgefäße involviert, in dem sie den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) produzieren - das wichtigste Signalmolekül der Angiogenese [82].

Für eine erfolgreiche Implantation, Plazentation und Gestation ist die koordinierte Aus- und Umbildung uteriner Gefäße essenziell. Zunächst ist eine adäquate Vaskularisation des Endometriums zum Zeitpunkt der Implantation notwendig, um die Rezeptivität sicherzustellen. Anschließend sorgen die Entwicklung und Ausdehnung der Zottengefäße der Plazenta für einen erfolgreichen Transport von Nährstoffen und

Sauerstoff zum Embryo. Der stetige Auf- und Umbau der endometrialen Blutgefäße muss den Anforderungen des schnell wachsenden Embryos gerecht werden. So ist es nicht verwunderlich, dass eine einmalige Inhibition der Angiogenese (z.B. mit AGM-1470) kurz vor oder nach der Implantation zum Abbruch der Schwangerschaft im Mausmodell führt [83]. Weiterhin beobachtet man im Tiermodell, dass VEGF die deziduale Angiogenese reguliert und die vaskuläre Permeabilität während der Implantation steigert [84]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Angiogenese eine kritische Komponente der normalen Implantation/Plazentation ist und unterstreicht die Bedeutung des Gefäßsystems in frühen Stadien der Schwangerschaft [85]. Dem entgegen steht die Beobachtung, dass Frauen mit Endometriose – die wie oben beschrieben häufig unter Infertilität leiden – ein vermehrtes Vorkommen von VEGF-A in ihrer Peritonealflüssigkeit aufweisen [86]. Die Autorinnen und Autoren deuten die erhöhten VEGF-A-Spiegel dahingehend, dass eine vermehrte Angiogenese zum Überleben der Endometrioseherde beitragen könnte. Ein möglicher Zusammenhang mit der Endometriose-assoziierten Infertilität wurde bisher jedoch nicht näher betrachtet. Studien, welche die eutope und ektope Expression von VEGF-A im Endometrium von Frauen mit Endometriose untersucht haben, fokussieren sich ebenfalls lediglich auf die Pathogenese der Erkrankung selbst [87]. Es bleibt also zu klären, welche Rolle die endometriale Expression von VEGF-A in Bezug auf die mit Endometriose-assoziierte Infertilität spielt.

1.3.3.3 Uterine natürliche Killerzellen (*uNK-Zellen*)

Uterine natürliche Killerzellen (*uNK-Zellen*) sind die vorherrschende Immunzellpopulation im Endometrium und machen ca. 70% der Leukozyten während der sekretorischen Phase und der Embryoimplantation aus [88, 89]. Während ihre genaue Funktion noch nicht geklärt ist, gibt es Hinweise darauf, dass *uNK-Zellen* eine entscheidende Rolle bei der Embryoimplantation spielen. Ob *uNK-Zellen* eine pro-invasive Umgebung für den Trophoblasten schaffen oder bei vermehrtem Vorkommen und/oder veränderter Funktion einer Einnistung eher im Weg stehen, ist bisher nicht hinreichend geklärt [90-92]. *uNK-Zellen* finden sich im eutopen Endometrium vor allem im luminalen Epithel und in der Nähe von Spiralarterien, wo sie durch Produktion von angiogenetischen Faktoren wie VEGF-A das uterine Gefäßwachstum stimulieren und den Umbau der Spiralarterien initiieren [90, 92]. Neben den förderlichen Einflüssen von *uNK-Zellen* auf die Schwangerschaftsentstehung, wurde ihr vermehrtes Vorkommen auch mit Infertilität assoziiert [91]. Zudem zeigt sich, dass auch ein verändertes Reifungsstadium der *uNK-Zellen* einer erfolgreichen Schwangerschaft im Wege stehen kann [93].

Einen neuartigen Therapieansatz zur Behandlung der Infertilität bei erhöhter uNK-Zellzahl stellt die intravenöse Gabe der Lipidlösung *Intralipid*[®] dar [94]. Es handelt sich um eine auf Sojabohnenöl basierende pflanzliche Emulsion, die eigentlich zur künstlichen (intravenösen) Ernährung entwickelt wurde und seit Jahren u.a. in der postchirurgischen Nachsorge routinemäßig eingesetzt wird [95]. *In vitro* Studien zeigen, dass die Applikation von *Intralipid*[®] die Toxizität von natürlichen Killerzellen (NK) in der Peripherie unterdrücken kann [96]. *In vivo* konnte die Rate der Schwangerschaften, die 21 Wochen nach Embryotransfer fortbestanden (*Ongoing Pregnancy Rate*, OPR), und die Lebendgeburtrate bei Frauen mit unerklärten habituellen Aborten und einer erhöhten Zahl an peripheren NK-Zellen durch die Gabe von *Intralipid*[®] verbessert werden [94, 97]. Da diese Studien bisher nur periphere NK-Zellen betrachten und die zellulären und molekularen Vorgänge im Endometrium nicht hinreichend geklärt sind, bleiben diese Ergebnisse Gegenstand aktueller Debatten [94, 98].

1.3.3.4 Plasmazellen und chronische Endometritis

Plasmazellen entsprechen dem letzten Differenzierungsstadium der B-Zellreihe. Sie sind Effektorzellen, die große Mengen Antikörper produzieren und eine Schlüsselrolle in der adaptiven Immunantwort spielen. Werden Plasmazellen histopathologisch im Endometrium nachgewiesen, liegt definitionsgemäß eine chronische Endometritis vor [99]. Die chronische Endometritis ist eine lokale, inflammatorische Erkrankung des Endometriums, die häufig asymptomatisch verläuft und insgesamt bei etwa 9% aller Frauen vorkommt [99]. Eine erhöhte Inzidenz von 28% zeigt sich bei Frauen mit ungeklärter Infertilität [100], Frauen mit wiederholten Spontanaborten haben in 27% eine chronische Endometritis [101] und die Inzidenz bei Frauen mit wiederkehrendem Implantationsversagen erreicht sogar 30% [102, 103]. Die Behandlung der chronischen Endometritis erfolgt mit einem Breitspektrumantibiotikum - wie z.B. *Doxycyclin* - das sich in 75% der Fälle als effektiv erweist [102]. In den anderen 25% persistiert die chronische Endometritis nach der ersten antibiotischen Behandlung [102]. Interessanterweise hat die Behandlung der chronischen Endometritis auch einen deutlichen Effekt auf die Fertilität: Schwangerschaftsraten bei Frauen mit habituellen Aborten konnten nach der Behandlung der chronischen Endometritis signifikant verbessert werden [102, 104]. Ein vermehrtes Vorkommen der Plasmazellen scheint also eine Entzündungsreaktion im Endometrium hervorzurufen, die sich gegenüber der Implantation und dem Weiterbestehen der Schwangerschaft als hinderlich erweist [105]. Zusätzlich zeigt sich in der Literatur eine Korrelation zwischen der chronischen Endometritis und dem Auftreten einer Endometriose [106, 107].

1.3.3.5 CXCL1, CXCR2 und SDC-1

Immunzellen kommunizieren über Signalmoleküle, darunter auch die chemotaktischen Zytokine. Diese pro-inflammatorischen Chemokine dienen der Chemotaxis, also dem Anlocken von Immunzellen zur Initiierung einer ersten Immunantwort. Darüber hinaus können Chemokine der Entstehung und dem Erhalt einer chronischen Inflammation dienen [108, 109]. Chemokine sind potente Mediatoren der Angiogenese [110] und spielen eine Schlüsselrolle im Embryo-maternalen Dialog [111, 112]. Der CXC-Motiv Ligand 1 (CXCL1) ist ein Chemokin, das Leukozyten aktiviert und von endometrialen Stromazellen produziert wird [113]. Es entfaltet seine Wirkung über den G-Proteingekoppelten Rezeptor CXC-Motiv Rezeptor 2 (CXCR2) und den Co-Rezeptor Syndecan-1 (SDC-1) [114, 115]. Während der frühen Implantation sezerniert der Embryo Interleukin-1 β , welches wiederum die CXCL1-Synthese induziert [116]. Unsere Arbeitsgruppe aus dem Forschungslabor des universitären Kinderwunschzentrums Düsseldorf (UniKiD) konnte zeigen, dass CXCL1 zu den am stärksten hochregulierten Genen in primär dezidualisierten Stromazellen gehört [117]. Somit scheint CXCL1 ein wichtiges Signalmolekül im Embryo-maternalen Dialog zu sein. Immunohistochemische Färbungen erbrachten den Nachweis, dass sein Rezeptor CXCR2 im eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose im Vergleich zu nicht erkrankten Frauen vermehrt vorkommt [118]. Der Co-Rezeptor SDC-1, auch bekannt als Cluster of Differentiation 138 (CD138), ist ein Heparansulfatproteoglykan, das auf Zelloberflächen vorkommt und der Familie der Syndecane angehört. Es ist in Zellproliferation, Zellmigration und Zell-Zell-Matrix-Interaktionen involviert. SDC-1 moduliert und bindet Marker der Inflammation, Infektion und Neoplasie [119]. Zusätzlich zu seiner Funktion auf der Zelloberfläche via Ektodomänen, kann SDC-1 auch zytoplasmatische Effekte anhand von löslichen, intrazellulären Domänen vermitteln [115, 120]. SDC-1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Sekretion von Zytokinen und angiogenetischen Faktoren [121] sowie von pro- und antiapoptischen Proteinen [122] und kann somit die plazentäre Angiogenese unterstützen [123]. Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen einer veränderten SDC-1-Expression und ungünstigen Schwangerschaftsausgängen [124, 125].

1.4 ZIELE DER ARBEIT

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Endometriose-assoziierte Infertilität in Hinblick auf immunologische und angiogenetische Veränderungen im eutopen Endometrium von Kinderwunschpatientinnen.

Hierfür wurde eine Gruppe von Frauen mit Endometriose-assoziiierter Infertilität einer Kontrollgruppe von infertilen Frauen ohne Endometriose gegenübergestellt. Um die Suche nach potenziellen Biomarkern für die Endometriose voranzutreiben, sollte zunächst ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von eutopen uNK- und Plasmazellen und dem Auftreten einer Endometriose geprüft werden. Weiterhin soll die bereits gängige klinische Praxis der *Intralipid*[®]-Gabe bei erhöhter uNK-Zellzahl und *Doxycyclin*-Gabe bei erhöhter Plasmazellzahl auf ihre Wirksamkeit zur Erhöhung der Schwangerschaftsraten untersucht werden. Der Zellstatus sowie das Auftreten einer Endometriose sollte zusätzlich mit *Lifestyle*-Faktoren wie dem *Body Mass Index* und dem Rauchverhalten korreliert werden.

In einem zweiten, experimentellen Versuchsansatz sollten eutope Endometriumproben der oben genannten Kohorte immunhistochemisch auf relevante Zellpopulationen und Signalmoleküle näher untersucht werden. Dabei wurde die Einteilung in verschiedene Gruppen anhand des uNK- und Plasmazellstatus sowie dem Vorhandensein einer Endometriose vorgenommen. Ziel war es, das Vorkommen von Makrophagen als wichtige Regulatoren der initialen Immunantwort und Angiogenese sowie das Vorhandensein von VEGF-A – dem wichtigsten Induktor der Angiogenese – näher zu beleuchten. Weiterhin lag ein Fokus auf dem Vorkommen des Chemokins CXCL1 sowie seinen Rezeptoren CXCR2 und Syndecan-1.

Insgesamt sollte durch die immunhistochemischen Färbungen ein Immunprofil des eutopen Endometriums erstellt werden, das einen möglichen Zusammenhang zwischen verschiedenen Immunzellpopulationen und ihren Sekretionsprodukten sowie dem Vorkommen einer Endometriose genauer beleuchtet. Dies sollte weiteren Aufschluss über potentielle Pathologien liefern, die zur Endometriose-assoziierten Infertilität beitragen können.

Ein positives Ethikvotum durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität liegt unter dem Aktenzeichen 2016065133 vor, die Erteilung des Ethikvotums erfolgte am 26.07.2016



Are uterine natural killer and plasma cells in infertility patients associated with endometriosis, repeated implantation failure, or recurrent pregnancy loss?

Nadine Freitag¹ · Sarah J. Pour¹ · Tanja N. Fehm² · Bettina Toth³ · Udo R. Markert⁴ · Maja Weber⁴ · Riku Togawa⁵ · Jan-Steffen Kruessel¹ · Dunja M. Baston-Buest¹ · Alexandra P. Bielfeld¹

Received: 21 April 2020 / Accepted: 3 July 2020 / Published online: 14 July 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

Purpose Infertility is a debilitating situation that millions of women around the world suffer from, but the causal relationship between infertility and endometriosis is still unclear. We hypothesize that the immune cell populations of uterine natural killer cells (uNK) and plasma cells (PC) which define chronic endometritis could differ in patients with or without endometriosis and therefore be the link to endometriosis-associated infertility.

Methods Our retrospective study includes 173 patients that underwent an endometrial scratching in the secretory phase of the menstrual cycle and subsequently immunohistochemical examination for uNK cells and PC. Sixty-seven patients were diagnosed with endometriosis, 106 served as the control cohort.

Results The risk for an elevated number of uNK cells in women with endometriosis is not increased as compared to the control group. Our findings suggest that patients with endometriosis are 1.3 times more likely to have chronic endometritis (CE) as compared to those without and that the treatment with doxycycline might increase pregnancy rates. Endometriosis and an increased number of uNK cells seem to be unrelated.

Conclusions In contrast to the lately published connection between endometriosis, infertility and increased uNK cells, we could not find any evidence that patients with endometriosis are more prone to elevated uterine uNK cells. Counting of PC in endometrial biopsies might be a new approach in the search of biomarkers for the nonsurgical diagnosis of endometriosis since our findings suggest a connection.

Keywords Chronic endometritis · Endometriosis · Endometrium · Immunotherapy · Soybean oil · Spontaneous abortion

Introduction

Involuntary childlessness is a disconsoling situation that around 12–15% of couples in the reproductive phase suffer from [1, 2]. The prevalence of infertility in women with endometriosis is 11.6% while women without endometriosis only have a prevalence of 3.4% [3]. The causal relationship between endometriosis and infertility is still unclear, and 4 theories are discussed. The most widespread theory suggests that pelvic inflammations caused by endometriosis leads to pelvic adhesions and engender functionally impaired fallopian tubes, that consequently compromise fertility [4]. Another theory suggests that endometriosis-associated infertility develops due to immunological dysfunctions. Endometriosis is a chronic pelvic inflammatory disease with an increased number of inflammatory cells and mediators in the peritoneal fluid [5]. Therefore, the microenvironment of the

✉ Dunja M. Baston-Buest
baston-buest@unikid.de

¹ Department of Obstetrics, Gynecology and REI (UniKiD), Medical Faculty, Medical Center University of Düsseldorf, University Hospital Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany

² Department of Obstetrics and Gynecology, Medical Center University of Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany

³ Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, Medical University Innsbruck, Innsbruck, Austria

⁴ Placenta Lab, Department of Obstetrics, Jena University Hospital, Am Klinikum 1, 07740 Jena, Germany

⁵ Department of Gynecological Endocrinology and Fertility Disorders, Karls-Ruprecht University, Heidelberg, Germany

eutopic endometrium might be altered too, and accordingly, the successful development of a pregnancy may be affected.

uNK cells are very important for a successful pregnancy, but could also be harmful if dysregulated in number and/or function. uNK cells represent 70% of the leukocytes in the endometrium during the secretory phase of the menstrual cycle and the time of embryo implantation [6, 7]. Once activated, uNK cells can produce angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and hence, promote spiral artery remodeling which supports the implantation of the trophoblast [8]. Through secreting cytokines, uNK cells may create a pro-invasive environment in the endometrium and promote the migration and invasion of the trophoblast [9]. However, a study with 61 patients revealed that patients with an increased number of uNK cells are at a greater risk for infertility disorders [10]. Furthermore, the developmental stage of uNK cells, and; therefore, their functions seem to impinge upon a normal pregnancy. Patients with endometriosis seem to have an abnormal maturation of uNK cells with lower levels of endometrial stem cell factor, that might lead to endometriosis-associated infertility. *In vitro*, stem cell factor can restore uNK cell maturation [11]. In conclusion, uNK cells seem to play an important role in the development of pregnancy. However, if they differ in their number and/or function, uNK cells may become a serious threat to implantation and pregnancy. We hypothesize that beside possible effects on the maturation process, endometriosis also influences the number and function of uNK cells.

A new therapeutic approach to treat an increased number of uNK cells is the administration of an intravenous lipid infusion [12]. This fat emulsion contains soybean oil, glycerin, and egg phospholipids, and is commonly used as part of an intravenous nutrition for patients who are unable to be nourished orally [13]. *In vitro* studies have revealed that intravenous lipid infusion can suppress the NK cells' cytotoxicity in the periphery [14]. *In vivo*, both ongoing pregnancy rate (OPR) and live birth rate (LBR) in women with unexplained recurrent pregnancy loss (RPL) and elevated peripheral NK activity may be improved by lipid infusion [12, 15]. Nevertheless, the discussion on potential molecular and cellular effects on the establishment of the pregnancy is still controversial [12, 16]. In our study, we analyzed the effect of the lipid infusion on elevated uNK cells and pregnancy rate in women with endometriosis, repeated implantation failure (RIF) or RPL.

Another cell population in the endometrium being associated with endometriosis and infertility are PC. A histopathological determination of PC in the endometrium verifies CE, which is often asymptotically, and; therefore, not detectable in the anamnesis in the clinical routine. CE usually progresses subclinically or with mild symptoms including abnormal uterine bleeding or menorrhagia [17].

CE is a persistent condition of local endometrial inflammation and its reported incidence is around 9% with an increase in infertile women [17–19]. The rate of CE has been found as 28% in patients with infertility of unknown etiology [20], 30% in patients with RIF [21, 22], and 27% in patients with RPL [23]. Additionally, a strong correlation between CE and endometriosis has been shown. In more than 50% of the biopsies of the endometriosis patients analyzed in this study a minimum number of 1 PC occurred [24, 25]. Unfortunately, a committed definition regarding the amount of PC in a defined area for the diagnosis of CE is still missing.

The treatment with a broad-spectrum antibiotic, such as doxycycline could effectively cure CE in 75% [22]. In about 25% of the cases, CE remains after the 1st antibiotic treatment [22]. Pregnancy rates subsequent to the treatment are significantly higher in women with a history of RPL who have been cured as compared to those with a persistent CE [22, 26].

Materials and methods

Participants of the study

The retrospective study was approved by the ethical committee of the medical faculty of the Heinrich-Heine University, Düsseldorf, Germany for the patients enrolled in Düsseldorf and for the diagnostics in Jena. All women gave their written informed consent. Female participants underwent an endometrial scratching in the secretory phase of the menstrual cycle and subsequently immunohistochemical examination for uNK cells and PC between January 2013 and February 2017. The examination was performed as part of diagnostic measures before assisted reproductive treatment (ART), including scheduled intercourse, insemination, and *in vitro* techniques or if requested by the patient. RIF was assumed in a patient if there was no occurrence of pregnancy after at least two high quality embryo transfers (or three, if the patient was older than 40 years). RPL was defined as two or more abortions after the 7th week of pregnancy.

In total, 173 infertility patients (> 90% Caucasian) who underwent the diagnostic procedure for uNK cells and PC between January 2013 and February 2017 were incorporated in the study. 67 of them were diagnosed with endometriosis (either anamnestic [dysmenorrhea, dyspareunia, dysuria] or laparoscopic) and 106 without endometriosis served as the control cohort. Patients were treated in either the fertility center UniKid Düsseldorf, Germany or the Kinderwunschzentrum Heidelberg, Germany. The patients' age ranged between 26 and 48 years.

IHC for uNK and plasma cells

The endometrial scratching was performed vaginally with a Pipelle Endometrial Suction Curette (Probet, Gynmed GmbH, Germany). The samples were fixed in 4% formaldehyde and sent to the Placenta Lab at the Jena University Hospital, Germany, where it was immunohistochemically stained for CD56-positive uNK cells and/or CD138-positive PC. A number of at least 300 uNK cells or at least 5 PC per mm² were defined as elevated according to the publications of Kuon et al. [16] and Bayer-Garner et al. [27, 28].

Therapeutic approach

Elevated uNK cells were treated with an intravenous infusion of *Intralipid* in the course of the ART treatment (8% Intralipid in 250 ml NaCl: 1st infusion on the day of ovum pickup or the day of the embryo transfer in frozen embryo transfer cycles, 2nd infusion after the positive pregnancy test, 3rd and following infusions every 2 weeks until 12th week of pregnancy), elevated PC were treated with a course of doxycycline (200 mg per day over 21 days) prior to treatment. In most cases, the reduction in PC after the doxycycline treatment was determined by a 2nd scratching and analysis at the University Hospital Jena. In addition, the following parameters were examined: patient age, day of the cycle biopsy was taken, body mass index (BMI), smoking status, obstetrical history, presence of RIF or RPL, presence and severity of endometriosis according to the classification of endometriosis by the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada [29]. Pregnancy was assumed when the blood level of human chorionic gonadotropin (β -hCG) was

higher than 20 international units (IU) per liter 14 days after fertilization.

Statistics analysis

The risk for elevated uNK cells or PC was compared using Odd's ratio (OR) calculations. Life style factors between different groups were contrasted using the two-tailed Student's *t* test. Levene's test assessed the equality of variances within the groups. Fisher exact test was used to compare the presence of endometriosis, elevated uNK cells and/or PC, and occurrence of RPL/RIF (analyses were performed using Microsoft Excel 2010). A level of $P \geq 0.05$ was considered as the limit for significance.

Theory

In this study, we aimed to analyze whether infertility patients with endometriosis have a higher prevalence for increased uNK or PC in the endometrium and if their modulation with an intravenous lipid infusion or doxycycline can increase pregnancy rates.

Results

171 patients underwent analysis for eutopic uNK cells. 43 (25.1%) patients had an elevated number of uNK cells with an average number of 385.8 uNK cells per mm² (± 117.8). 53.5% of the patients with an increased level of uNK cells reported an abortion prior to the examination. 16 of the

Table 1 Distribution of uNK cells in all patients

uNKs/mm ²	No. of patients	No. of patients with endometriosis	No. of patients with RIF	No. of patients with RPL
< 100	52	18	22	11
100–299	76	31	35	12
> 299	43	16	17	11
	No. of patients	> 299 uNKs/mm ²	No. of patients with an embryo transfer in the following cycle	All documented live births
Endometriosis	67	16	4	3
RIF	74	16	10	2
RPL	34	11	1	1
No endometriosis, RIF or RPL	53	11	5	1

Indicated is the no. of patients diagnosed for uNK cells and subdivided in patients suffering from endometriosis, RIF or RPL. Furthermore, the follow-up of patients treated with soybean oil infusion is shown

patients with elevated uNK cells suffered from endometriosis, 17 from RIF, and 16 from RPL (Table 1). Out of 16 patients with both endometriosis and elevated uNK cells, 9 (56.3%) had at least one abortion prior to the examination. OR calculations did not indicate an effect of endometriosis or increased levels of uNK on an abortion prior to the examination [OR = 1.0776/1.3952; 95% confidence interval (CI) 0.5782–2.0084/0.6924–2.8112; $P = 0.8140/0.8140$].

Sixty-seven patients with endometriosis were compared with 106 patients without endometriosis. In the endometriosis group, 23.9% had an elevated number of uNK cells in the endometrium. In the control group, 25.5% of the women had an increased number of uNK cells. Odd's ratio calculations showed that the frequency of having an elevated number of uNK cells does not differ for women with endometriosis as compared to those without (OR = 0.9179; 95% confidence interval 0.4506–1.8700; $P = 0.8135$) (Table 1).

Thirty-five patients (numbers in parentheses represent patients with endometriosis: 9) received an intravenous lipid infusion in order to treat elevated levels of uNK cells in the endometrium, of which 17 (3) received a transfer of at least one high quality embryo. The remaining 18 patients (6) did not receive an embryo transfer due to absence of a high-quality embryo, delayed transfer to a subsequent cycle or different treatment options such as insemination or scheduled intercourse. 5 (2) out of the 17 (3) patients with a transfer of a high-quality embryo following ART and one endometriosis-patient after scheduled intercourse had a live birth subsequent to the treatment (see Table 1). In the group of 5 (2) patients who had a live birth after intralipid therapy, 3 (1) underwent in vitro fertilization (IVF), 2 (0) underwent intracytoplasmic sperm injection (ICSI), and one had scheduled intercourse. Owing to the limited number of patients in

the individual subgroups, a statistical analysis did not seem to be appropriate here.

Of all patients, 43 showed elevated uNK cells. Five patients with elevated uNK cells suffered simultaneously from endometriosis and RIF, six patients with elevated uNK suffered simultaneously from endometriosis, and RPL. In 11 patients with elevated uNK neither endometriosis, nor RIF or RPL have been reported (Table 1).

112 patients underwent examination for eutopic PC. 13 patients (11.6%) showed an elevated number of PC with an average number of 15.7 PC per mm² (± 17.7). Four of those patients with an increased number of PC (three with endometriosis) reported an abortion prior to the examination. Eight of the patients with increased PC suffered from endometriosis, six patients from RIF and 2 from RPL (Table 2).

In the endometriosis group (62 patients), 12.9% of the patients had an increased number of PC vs. 10% in the control group (50 patients). The risk for an elevated level of PC and accordingly for the presence of CE was 1.3 times higher in women with endometriosis. However, the result was not significant (OR = 1.333; 95% confidence interval = 0.4075–4.3624; $P = 0.6343$). In order to cure CE, six patients (in parentheses the number of patients with endometriosis): (5) were treated with doxycycline [200 mg/day] for 3 weeks. 5 (4) patients reported previous pregnancies, 2 (2) of them had an abortion after the 12th week of pregnancy and 1 (1) live birth occurred before. The remaining 4 (3) patients with CE reported no previous pregnancies. Within 10 months after the treatment, 7 (4) patients received a transfer of at least one high quality embryo, and 2 (1) patients had a live birth. In total, the live birth rate could be improved from one out of nine before to two out of seven patients after the treatment with doxycycline (Table 2).

Table 2 Distribution of PC in all patients

PC/mm ²	No. of patients	No. of patients with endometriosis	No. patients with RIF	No. of patients with RPL
0	79	42	37	20
1–4	16	10	6	6
>4	13	8	6	2
	No. of patients	>4PC/mm ²	No. of patients with an embryo transfer in the following cycle	Documented live births
Endometriosis	67	8	3	1
RIF	74	6	5	1
RPL	34	2	0	0
No endometriosis, RIF or RPL	53	3	1	1

Indicated is the no. of patients diagnosed for PC and subdivided in patients suffering from endometriosis, RIF or RPL. Furthermore, the follow-up of patients treated with doxycycline is shown

Of all patients, 13 showed elevated PCs. Four patients with elevated PCs suffered simultaneously from endometriosis and RIF. Two patients with elevated PCs suffered simultaneously from endometriosis and RPL. Three patients with elevated PCs suffered from neither endometriosis nor RIF or RPL (Table 2).

In total, 74 patients were suffering from RIF, 16 of them had elevated uNK cells (with two subsequent live births), and 6 had elevated PC (with one subsequent live birth). Thirty-four patients suffered from RPL, 11 of them had elevated uNK cells (with one subsequent live birth), and two had elevated PCs. OR calculations did not indicate that elevated uNK or PC could be a risk factor for RIF/RPL (OR = 1.0336/0.6085; 95% CI 0.5065–2.1093/0.1829–2.0243; $P = 0.9277/P = 0.4179$).

The BMI of patients with elevated uNK cells ($22.4 \text{ kg/m}^2 \pm 3.44$) and PC ($21.6 \text{ kg/m}^2 \pm 7.2$) did not differ from those with normal uNK cells and PC ($22.9 \text{ kg/m}^2 \pm 4.9$) counts ($P \approx 0.33$).

Discussion

The intensive research on biomarkers for endometriosis has not yet been successful and laparoscopic surgery still remains the gold standard for diagnosis [30]. Endometriosis is considered an inflammatory disease and evidence for an altered distribution of immune cells in the uterine cavity has frequently been reported [31–36]. CE and endometriosis are both inflammatory diseases with an unexplained pathogenesis causing symptoms like pain and infertility. Takebayashi et al. showed a significant association between endometriosis and CE in a group of 71 patients [24]. Although in our group of mostly Caucasian patients with endometriosis, 12.9% were diagnosed with CE, the prevalence of CE in the Japanese endometriosis group of Takebayashi et al. reached 52.94%. The striking difference in the prevalence of CE might also be due to the method of acquisition of endometrial samples: Takebayashi et al. used the endometrial specimens from patients who underwent hysterectomy due to gynecological diseases. Our samples were generated from endometrial scrapings in women during ART treatment. Furthermore, different cutoff values for PC diagnosis were applied. Whereas our group defined > 4 PC cells per mm^2 as a marker for CE, Takebayashi et al. postulated CE as multiple PCs in ten nonoverlapping random fields of endometrial stroma [24]. Nonetheless, samples from both studies were immunostained with anti-CD138 antibody and PC were subsequently counted under a light microscope [24]. Another recent study including 156 patients found a statistically higher prevalence of CE in patients with endometriosis. They also compared two methods hysteroscopy vs. immunostaining—and found a significant connection of CE and

endometriosis in both procedures. Pictures photographed during hysteroscopy revealed 42.3% vs. 15.4% occurrence of CE for patients with endometriosis vs. without while immunostained samples for CD138 collected after hysterectomy of the same patients showed 38.5% vs. 14.1% prevalence of CE [25].

Analyzing uterine PCs might be a new approach in the search of biomarkers for endometriosis. The elevated number of PCs in endometriosis patients might result from a bacterial infection due to a dysregulated retrograde menstruation. However, large-scaled studies are necessary to confirm the correlation between endometriosis and CE and more research is required to understand the potential causal connection between both diseases.

In our study, the overall prevalence of CE was 11.6%. Other studies found higher prevalence rates of 30.3% [21], 33.7% [37] and 66% with more than 250 patients included [22]. In comparison with the other studies, our endometrial samples were generated from endometrial biopsies and not from hysterectomy due to a benign gynecological disease. The lower prevalence of CE might result from that difference. The number of patients treated with doxycycline ($n = 9$) in our study is limited, but supports our results. A large study, including 421 patients with RIF published in June 2017 compared the LBR in patients after successful treatment for CE with controls. They found significantly higher birth rates in the treated group, suggesting oral antibiotic treatment for women suffering from RIF as a new therapeutic option [37]. Another retrospective study investigated the outcome of embryo transfers in patients suffering from RIF and CE. They found an improvement of the LBR after antibiotic treatment in fresh embryo transfers [22]. Alongside with testing for and curing the occurrence of uterine PC, uNK cells have been associated with infertility and endometriosis [38], but the negative impact on the development of pregnancy is diverse [9–11, 39–42]. However, increased levels of uNK cells are more and more frequently treated with intravenous lipid infusions [12]. In vitro studies revealed that intravenous lipid infusions can suppress peripheral blood NK cytotoxicity [14]. In our study, we found that the treatment with intravenous lipid infusions tends to increase pregnancy rates in all groups investigated. This observation is due to a limited number of patients only descriptive though. Even though not associated with uNK cells yet, the idea of intravenous lipid infusion therapy for RPL already existed in 1994. Within a double-blinded randomized controlled trial in humans' intravenous lipid infusions versus trophoblast membrane vesicles was applied in patients with RPL. The prediction made from these data was tested in a mouse model of RPL and intravenous lipid infusions in small doses prevented abortions in mice [43].

In 2012, a study examined the coherence between immunotherapy and LBR in cases with elevated antiphospholipid

antibodies or increased peripheral blood NK cells. Intravenous lipid infusions seemed to be a successful therapeutic option for women with reproductive problems and increased peripheral blood NK cells [44]. Check et al. stated contradicting results when they compared two groups of patients at age 40–42 years with a history of RIF or RPL. The study was stopped after the first ten matched cycles because the group of treated patients did not show any pregnancies while the untreated group had 40% clinical PR and a 30% LBR. The authors suggested that the therapy with intravenous lipid infusions in this age group might rather be harmful than beneficial [45]. In line with those results, an Egyptian group compared 296 women with RPL and elevated peripheral blood NKs with a treatment of either intravenous lipid infusions (2 ml diluted at 20% in 250 ml saline) or saline (250 ml) infusion alone applied only once on the day of oocyte retrieval. The difference between both groups was not significant and; therefore, intravenous lipid infusions supplementation did not increase biochemical pregnancies [12]. Within a study, including 40 RPL patients with NK disorders treated with lipid infusions starting at positive pregnancy test, every 2 weeks until 12 +0 weeks of gestation prepregnancy immune diagnostics differed significantly with higher levels of peripheral NK (% and / μ l) in RPL patients who miscarried again as compared to controls [40].

Even though there is no large-scale study yet proving the positive effect of intravenous lipid infusion pregnancy outcomes, the publications reveal evidence of a positive effect. Contradicting the lately published connection between endometriosis, infertility, and increased uNK cells [38], we could not find any evidence for patients with endometriosis being of higher risk for elevated uNK cells. Endometriosis and increased uNK cells therefore seem to not be interdependent. In addition, we could not detect any statistical evidence that elevated levels of uNK cells or PC are a risk factor for RIF or RPL.

To summarize the data, analyzing uNK cells does not support a nonsurgical diagnosis of endometriosis whereas the analysis of uterine PC by endometrial scratching might be beneficial regarding the diagnosis of nonsurgically confirmed endometriosis and; therefore, improve the treatment of infertility patients with endometriosis in the clinical routine. The CE seems to be an above-average frequent concomitant of endometriosis.

Acknowledgements Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Author contributions NF: data collection, data analysis, manuscript writing. SJP: manuscript editing. TNF: manuscript editing. BT: project development, data collection, manuscript editing. URM: project development, data collection, manuscript editing. MW: data collection. RT: data collection. JSK: manuscript editing. DMB-B: project development, data collection, data analysis, data approval, manuscript writing

and editing. APB: project development, data collection, data analysis, data approval, manuscript writing, and editing.

Funding This work was funded by the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG) to A.P.B. (HE 3544/5–1).

Data availability The datasets and code that support the findings of this study are available from the corresponding author, DM Baston-Büst, upon reasonable request.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors report no conflict of interest or competing interests.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The retrospective study was approved by the ethical committee of the medical faculty of the Heinrich-Heine University, Düsseldorf, Germany, and the use of the data by the ethical committee of the University of Jena. Registration number Düsseldorf: 2016065133 (approved: July 28th, 2016). Registration number Jena: 2019-1305-Daten.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Thoma ME, McLain AC, Louis JF, King RB, Trumble AC, Sundaram R, Buck Louis GM (2013) Prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. *Fertil Steril* 99(5):1324–1331. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.037>
2. Louis JF, Thoma ME, Sorensen DN, McLain AC, King RB, Sundaram R, Keiding N, Buck Louis GM (2013) The prevalence of couple infertility in the United States from a male perspective: evidence from a nationally representative sample. *Andrology* 1(5):741–748. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00110.x>
3. Fuldeore MJ, Soliman AM (2016) 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*. <https://doi.org/10.1159/000452660>
4. Tanbo T, Fedorcsak P (2016) Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. *Acta Obstet Gynecol Scand*. <https://doi.org/10.1111/aogs.13082>

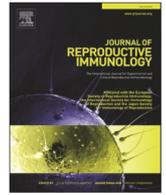
5. Gazvani R, Templeton A (2002) Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 123(2):217–226
6. Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D (1991) Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Hum Reprod* 6(6):791–798
7. Flynn L, Byrne B, Carton J, Kelehan P, O’Herlihy C, O’Farrelly C (2000) Menstrual cycle dependent fluctuations in NK and T-lymphocyte subsets from non-pregnant human endometrium. *Am J Reprod Immunol* 43(4):209–217
8. Robson A, Harris LK, Innes BA, Lash GE, Aljunaidy MM, Aplin JD, Baker PN, Robson SC, Bulmer JN (2012) Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *FASEB J* 26(12):4876–4885. <https://doi.org/10.1096/fj.12-210310>
9. Fraser R, Whitley GS, Johnstone AP, Host AJ, Sebire NJ, Thilaganathan B, Cartwright JE (2012) Impaired decidual natural killer cell regulation of vascular remodelling in early human pregnancies with high uterine artery resistance. *J Pathol* 228(3):322–332. <https://doi.org/10.1002/path.4057>
10. Giuliani E, Parkin KL, Lessey BA, Young SL, Fazleabas AT (2014) Characterization of uterine NK cells in women with infertility or recurrent pregnancy loss and associated endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 72(3):262–269. <https://doi.org/10.1111/aji.12259>
11. Thiruchelvam U, Wingfield M, O’Farrelly C (2016) Increased uNK progenitor cells in women with endometriosis and infertility are associated with low levels of endometrial stem cell factor. *Am J Reprod Immunol* 75(4):493–502. <https://doi.org/10.1111/aji.12486>
12. Dakhly DM, Bayoumi YA, Sharkawy M, Gad Allah SH, Hassan MA, Gouda HM, Hashem AT, Hatem DL, Ahmed MF, El-Khayat W (2016) Intralipid supplementation in women with recurrent spontaneous abortion and elevated levels of natural killer cells. *Int J Gynaecol Obstet* 135(3):324–327. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2016.06.026>
13. Koga Y, Ikeda K, Inokuchi K (1975) Effect of complete parenteral nutrition using fat emulsion on liver. *Ann Surg* 181(2):186–190
14. Roussev RG, Ng SC, Coulam CB (2007) Natural killer cell functional activity suppression by intravenous immunoglobulin, intralipid and soluble human leukocyte antigen-G. *Am J Reprod Immunol* 57(4):262–269. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00473.x>
15. Sax HC (1990) Practicalities of lipids: ICU patient, autoimmune disease, and vascular disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 14(5 Suppl):223S–225S. <https://doi.org/10.1177/014860719001400513>
16. Kuon RJ, Weber M, Heger J, Santillan I, Vomstein K, Bar C, Strowitzki T, Markert UR, Toth B (2017) Uterine natural killer cells in patients with idiopathic recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol*. <https://doi.org/10.1111/aji.12721>
17. Greenwood SM, Moran JJ (1981) Chronic endometritis: morphologic and clinical observations. *Obstet Gynecol* 58(2):176–184
18. Kitaya K, Yasuo T (2011) Immunohistochemical and clinicopathological characterization of chronic endometritis. *Am J Reprod Immunol* 66(5):410–415. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01051.x>
19. Kasius JC, Fatemi HM, Bourgain C, Sie-Go DM, Eijkemans RJ, Fauser BC, Devroey P, Broekmans FJ (2011) The impact of chronic endometritis on reproductive outcome. *Fertil Steril* 96(6):1451–1456. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.09.039>
20. Kitaya K, Yasuo T (2010) Aberrant expression of selectin E, CXCL1, and CXCL13 in chronic endometritis. *Mod Pathol* 23(8):1136–1146. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.98>
21. Johnston-MacAnanny EB, Hartnett J, Engmann LL, Nulsen JC, Sanders MM, Benadiva CA (2010) Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 93(2):437–441. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.131>
22. Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Lepera A, Alfonso R, Indraccolo U, Marrocchella S, Greco P, Resta L (2015) Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. *Hum Reprod* 30(2):323–330. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu292>
23. Bouet PE, El Hachem H, Monceau E, Garipey G, Kadoch IJ, Sylvestre C (2016) Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis. *Fertil Steril* 105(1):106–110. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.025>
24. Takebayashi A, Kimura F, Kishi Y, Ishida M, Takahashi A, Yamanaka A, Takahashi K, Suginami H, Murakami T (2014) The association between endometriosis and chronic endometritis. *PLoS ONE* 9(2):e88354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088354>
25. Cicinelli E, Trojano G, Mastromauro M, Vimercati A, Marinaccio M, Mitola PC, Resta L, de Ziegler D (2017) Higher prevalence of chronic endometritis in women with endometriosis: a possible etiopathogenetic link. *Fertil Steril*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.05.016>
26. Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Pinto V, Marinaccio M, Indraccolo U, De Ziegler D, Resta L (2014) Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment. *Reprod Sci* 21(5):640–647. <https://doi.org/10.1177/1933719113508817>
27. Bayer-Garner IB, Prieto VG, Smoller BR (2004) Detection of clonality with kappa and lambda immunohistochemical analysis in cutaneous plasmacytomas. *Arch Pathol Lab Med* 128(6):645–648. [https://doi.org/10.1043/1543-2165\(2004\)128<645:DOCWA I>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/1543-2165(2004)128<645:DOCWA I>2.0.CO;2)
28. Bayer-Garner IB, Nickell JA, Korourian S (2004) Routine syndecin-1 immunohistochemistry aids in the diagnosis of chronic endometritis. *Arch Pathol Lab Med* 128(9):1000–1003. [https://doi.org/10.1043/1543-2165\(2004\)128<1000:RSIAIT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/1543-2165(2004)128<1000:RSIAIT>2.0.CO;2)
29. Canada TSOOAGO (2010) Endometriosis: diagnosis and management. *J Obstet Gynecol Can* 32(7):S1–S3
30. Ahn SH, Singh V, Tayade C (2017) Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities. *Fertil Steril* 107(3):523–532. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.01.009>
31. Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Koninckx PR (1993) Immunohistochemical characterization of leucocyte subpopulations in endometriotic lesions. *Arch Gynecol Obstet* 253(4):197–206
32. Vinatier D, Dufour P, Oosterlynck D (1996) Immunological aspects of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2(5):371–384
33. Taylor RN, Ryan IP, Moore ES, Hornung D, Shifren JL, Tseng JF (1997) Angiogenesis and macrophage activation in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 828:194–207
34. Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD (2002) Angiogenic factors in endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 955:89–100
35. Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM, D’Hooghe TM (2003) Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 1:123. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-123>
36. Wu MY, Ho HN (2003) The role of cytokines in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 49(5):285–296
37. Kitaya K, Matsubayashi H, Takaya Y, Nishiyama R, Yamaguchi K, Takeuchi T, Ishikawa T (2017) Live birth rate following oral antibiotic treatment for chronic endometritis in infertile women with repeated implantation failure. *Am J Reprod Immunol*. <https://doi.org/10.1111/aji.12719>

38. Thiruchelvam U, Wingfield M, O'Farrelly C (2015) Natural killer cells: key players in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 74(4):291–301. <https://doi.org/10.1111/aji.12408>
39. Acar N, Ustunel I, Demir R (2011) Uterine natural killer (uNK) cells and their missions during pregnancy: a review. *Acta Histochem* 113(2):82–91. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.12.001>
40. Kuon RJ, Muller F, Vomstein K, Weber M, Hudalla H, Rosner S, Strowitzki T, Markert U, Daniel V, Toth B (2017) Pre-pregnancy levels of peripheral natural killer cells as markers for immunomodulatory treatment in patients with recurrent miscarriage. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. <https://doi.org/10.1007/s00005-017-0457-7>
41. Lash GE, Bulmer JN (2011) Do uterine natural killer (uNK) cells contribute to female reproductive disorders? *J Reprod Immunol* 88(2):156–164. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.01.003>
42. Moffett A, Shreeve N (2015) First do no harm: uterine natural killer (NK) cells in assisted reproduction. *Hum Reprod* 30(7):1519–1525. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev098>
43. Clark DA (1994) Intralipid as treatment for recurrent unexplained abortion? *Am J Reprod Immunol* 32(4):290–293
44. Coulam CB, Acacio B (2012) Does immunotherapy for treatment of reproductive failure enhance live births? *Am J Reprod Immunol* 67(4):296–304. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2012.01111.x>
45. Check JH, Check DL (2016) Intravenous intralipid therapy is not beneficial in having a live delivery in women aged 40–42 years with a previous history of miscarriage or failure to conceive despite embryo transfer undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Clin Exp Obstet Gynecol* 43(1):14–15

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Journal of Reproductive Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jri

Eutopic endometrial immune profile of infertility-patients with and without endometriosis

Nadine Freitag^a, Dunja M. Baston-Buest^{a,*}, Jan-Steffen Kruessel^a, Udo R. Markert^b,
Tanja N. Fehm^c, Alexandra P. Bielfeld^a^a Department of Obstetrics, Gynecology and REI (UniKid), Medical Faculty, Medical Center University of Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany^b Placenta Lab, Department of Obstetrics, Jena University Hospital, Am Klinikum 1, 07740 Jena, Germany^c Department of Obstetrics and Gynecology, Medical Faculty, Medical Center University of Düsseldorf, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Endometrium
Immune cells
Infertility
Endometriosis
Human

ABSTRACT

There is growing evidence that changes in the eutopic endometrial immune profile are a cause of endometriosis-associated infertility. Women affected by endometriosis experience a 2-fold increased risk of infertility compared to healthy controls. In our study we aimed to map out endometrial expressions of uterine natural killer cells, plasma cells, macrophages and the chemokine CXC-motif ligand 1 (CXCL1) as well as its main receptors CXC-motif receptor 2 (CXCR2) and Syndecan-1 in infertility-patients with endometriosis. 36 infertility patients were included of which 19 suffered from endometriosis and 17 served as a control cohort. All patients underwent endometrial scratching in the secretory phase and immunohistochemical staining which was evaluated by three independent observers. In endometriosis-patients, a higher concentration of macrophages coincided with an elevated number of uterine natural killer cells or plasma cells. Patients with endometriosis also showed a higher endothelial expression of VEGF-A. Furthermore, absence of stromal expression of SDC-1 was associated with an elevated level of uNK in general. Therefore, our study links endometriosis to an altered immune cell population in the eutopic endometrium, which might be a new approach to diagnosing endometriosis in infertility patients.

1. Introduction

Involuntary childlessness is a debilitating situation that approximately 13% of all women suffer from (Barbieri, 2019). Women affected by endometriosis, a chronic inflammatory and estrogen-dependent disease, are experiencing an age-adjusted 2-fold increased risk of infertility compared to women without a history of endometriosis (Prescott et al., 2016). While there is a clear association between endometriosis and infertility, the causal relationship is not fully understood.

Recent studies show an association between infertility and changes of immune cell populations and their secretion products in the eutopic endometrium (Palomino et al., 2018; Miller et al., 2017). It stands to reason that there is an association between the chronic inflammation in endometriosis and changes in immune cell populations of the endometrium that could lead to endometriosis-associated infertility. We aimed to identify immunological changes of macrophages, uterine natural killer (uNK) cells and plasma cells in the endometrium of women with endometriosis-associated infertility compared to infertility-patients without endometriosis.

Macrophages belong to the innate immune response, characterized by Cluster of Differentiation 68 (CD68), initiating the generation of blood vessels (Holness and Simmons, 1993; Varol et al., 2015). Previous studies have already shown that macrophages are increased in number and altered in function in the peritoneum of women with endometriosis (Dunselman et al., 1988). They are believed to exacerbate the inflammation and mediate the maintenance of endometriosis. Along with the activity status, there is an increase in the secretion of their products, such as cytokines or vascular endothelial growth factor (VEGF) (Lebovic et al., 2001). There are contradicting results on whether macrophages in the eutopic endometrium of women with endometriosis are increased or decreased compared to women without endometriosis (Khan et al., 2004; Braun et al., 2002; Berbic et al., 2009). Therefore, there is still a lot to discover about the role of macrophages in the eutopic endometrium of women with endometriosis-associated infertility.

VEGF is one of the main inducers of angiogenesis (Mclaren et al., 1996). Little is known about the influence of VEGF on the implanting embryo, especially in women with endometriosis. On the one hand, animal studies show that VEGF regulates decidual angiogenesis and increases vascular permeability during the embryo implantation

* Correspondence to: University Hospital Düsseldorf, Department of OB/GYN and REI, Moorenstr. 5, Düsseldorf, Germany.
E-mail address: baston-buest@unikid.de (D.M. Baston-Buest).

<https://doi.org/10.1016/j.jri.2022.103489>

Received 23 February 2021; Received in revised form 21 January 2022; Accepted 23 January 2022

Available online 29 January 2022

0165-0378/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

Nomenclature

CD68	Cluster of Differentiation 68
CXCL1	CXC-motif ligand 1
CXCR2	CXC-motif receptor 2
SDC-1	Syndecan-1
uNK	uterine natural killer cells
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A

(Sengupta et al., 2007). On the other hand, women suffering from endometriosis display higher levels of VEGF-A in their peritoneal fluid (Young et al., 2015). There are multiple studies approaching the eutopic and ectopic expression of VEGF-A in regards to the development of endometriosis (Yerlikaya et al., 2016). Yet, there is a scarcity of studies focusing on the role of VEGF-A in the eutopic endometrium in view of how endometriosis-associated infertility develops.

Another cell type associated with endometriosis and infertility are uterine natural killer (uNK) cells. They represent 70% of the leukocytes in the endometrium during the secretory phase of the menstrual cycle and the time of embryo implantation (Flynn et al., 2000). It is still discussed whether uNK cells create a pro-invasive environment for the trophoblast or – in case of increased occurrence – impair implantation (Robson et al., 2012; Giuliani et al., 2014).

Plasma cells are leukocytes that produce large amounts of antibodies. They originate from B lymphocytes and play a key role in the adaptive immune response (Alberts et al., 2002). A histopathological determination of plasma cells in the endometrium is a marker for chronic endometritis, an inflammatory disease of the endometrium. Chronic endometritis is often asymptomatic and is found more commonly in infertile women compared to healthy individuals (Mcqueen et al., 2015). There is also growing evidence on the correlation between endometriosis and chronic endometritis (Cicinelli et al., 2017).

Immune cells communicate through signaling molecules, such as chemotactic cytokines. Those chemokines are also believed to largely mediate the embryo-maternal cross-talk (Simon et al., 1999). The CXC chemokine subfamily not only influences inflammatory processes and angiogenesis but also coordinates and regulates those (Romagnani et al., 2004). CXC motif ligand 1 (CXCL1) is a chemokine that activates leukocytes and is produced by endometrial stroma cells (Nasu et al., 2001). It acts through its main receptor CXC motif receptor 2 (CXCR2) and the co-receptor Syndecan-1 (SDC-1) (Leonova and Galzitskaya, 2013). We have previously shown that CXCL1 is one of the most upregulated genes in human primary decidualized endometrial stromal cells (Hess et al., 2007). During early implantation, the embryo secretes Interleukin-1 β which induces the CXCL1 synthesis (Baston-Bust et al., 2013).

SDC-1, also known as Cluster of Differentiation 138 (CD138), is a cell surface heparan sulfate proteoglycan that modulates and binds mediators of inflammation (Teng et al., 2012). It is mainly expressed on plasma and epithelium cells and therefore acts as a marker for plasma cells (Bayer-Garner and Korourian, 2001). SDC-1 plays a pivotal role in the secretion of cytokines and angiogenic factors (Baston-Bust et al., 2010) as well as pro- and anti-apoptotic proteins (Boeddeker et al., 2014) and can therefore support placental angiogenesis (Boeddeker et al., 2015). It is known already, that alterations of SDC-1 expression are associated with adverse pregnancy outcomes (Greeley et al., 2020).

We hypothesize that immunological changes in the endometrium of patients with endometriosis are an explanatory approach to diagnose endometriosis-associated infertility. Therefore, the aim of this study was to compare the expression of CXCL1, CXCR2, SDC-1, CD68 and VEGF-A in the eutopic endometrium of women with endometriosis to those without. Furthermore, the aforementioned biomarkers were investigated in individuals with elevated uNK or plasma cells compared to individuals with normal cell counts to further identify the role of the

latter in endometriosis-associated infertility.

2. Material and methods

2.1. Population

Infertility patients included in the study were recruited between November 2014 and March 2017 from the UniKiD Department of Obstetrics, Gynecology and REI University Hospital Düsseldorf, Germany. The Ethics Committee of the Heinrich Heine University Düsseldorf approved of the study. Nineteen patients were diagnosed with endometriosis while 17 served as a control cohort. Patients were selected for the study based on the quality of the biopsy and the staining results as well as the completeness of staining for all antibodies. Table 1 compares the endometriosis-patients with their control cohort.

All 36 women underwent an investigation for uNK and plasma cells. A number of at least 300 uNK cells or at least 5 plasma cells per mm² was defined as elevated. These units were specified based on previous studies (Bayer-Garner et al., 2004; Kuon et al., 2017). Endometrial samples were generated by endometrial scratching during the secretory phase of the menstrual cycle and uNK and plasma cells were analyzed by the Placenta-Lab, Jena University Hospital, Germany.

2.2. Immunohistochemistry (IHC)

The paraffin embedded endometrial tissue was sent back from the Placenta Lab to our laboratory. Dako EnVision FLEX Mini Kit, High pH (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) was used for the staining process according to the manufacturer's protocol. Briefly, 4 μ m sections of endometrial tissue were dewaxed in Rotoclear (Rotoclear® ECO Plus, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany). Rehydration and epitope demasking was performed for 20 min in the EnVision Flex Target Retrieval Solution or Target Retrieval Solution, Citrate pH 6 at 97 °C dependent on the antibody. Slides were allowed to cool down to 65 °C and washed afterwards. In order to block the endogenous peroxidase activity, Peroxidase-Blocking Reagent was applied for 5 min. After washing, the slides were incubated with the first monoclonal unconjugated antibody [Syndecan (Abd Serotec, Oxford, United Kingdom, 1:2000, Mouse IgG1), CXCR2 (R&D Systems, 1:100, Mouse IgG2A), CXCL1 (R&D Systems, Minneapolis, United States, MAB275, 1:50, Mouse IgG2B), CXCL1 (Abcam, Cambridge, United Kingdom, ab86436, 1:400, Rabbit IgG), CD68 XP (Cell Signaling Technology, Danvers, United States, D4B9C, 1:400, Rabbit IgG), VEGF-A (Abcam ab1316, 1:200, Mouse IgG1)] or an appropriate mouse/ rabbit isotype control for 30 min. After washing, the second conjugated polymer-antibody EnVision/HRP (Dako Denmark A/S) was applied for another 30 min. Binding was visualized by incubation with DAB Chromogen for 10 min and slides were then washed in distilled water and counterstained with 20%

Table 1

Comparison of age, Body Mass Index (BMI) and history of infertility between patients with endometriosis and control cohort.

	Patients with endometriosis	Patients without endometriosis
No. of patients	19	17
Mean age (years)	35.3 \pm 3.1	38.3 \pm 4.7
Mean BMI (kg/m ²)	22.7 \pm 2.6	22.7 \pm 3.2
No. of primarily infertile patients	13 (68.4%)	14 (82.4%)
No. of secondarily infertile patients	6 (31.6%)	3 (17.6%)
No. of patients with history of infertility treatment	15 (78.9%)	15 (88.2%)
Mean no. of embryo transfers	4.5 \pm 2.5	4.9 \pm 2.4
No. of couples with male factor infertility	8 (42.1%)	14 (82.3%)
uNK cells (median)	198	225
Plasma cells (median)	3	2.5

haematoxylin for 6 min. Slides were dehydrated through the alcohols, cleared in Roticlear and mounted in Roti®-Mount (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany).

2.3. Image analysis

All specimens were evaluated using a Zeiss Standard microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Three different independent observers analyzed the specimen and the average of the results was calculated. The staining intensity of the luminal and glandular epithelium, as well as the stromal compartment and the vessel endothelium was evaluated on a scale of “0” (no staining), “+” (faintly positive staining reaction), “++” (moderately positive staining reaction) and “+++” (strong positive staining reaction). For CD68 the number of positive stained cells was counted in 10 random, non-overlapping microscope fields at a magnification of 100× and the mean number was calculated.

Sections were photographed using a Nikon SMZ25 microscope with a Nikon DS-Fi3 Camera and Nikon NIS Elements Imaging Software (Nikon

GmbH, Düsseldorf, Germany).

2.4. Statistical analysis

The mean number of CD68-positive cells was compared between patients with and without endometriosis using the Mann-Whitney-U test after performing a variance analysis. Z-score was computed for the sum of the ranks within the control group, the U-value is the sum of the ranks of the endometriosis-group and the p-value the corresponding probability of the U-score. Bivariate Pearson’s correlation analysis was applied to test the relation between number of uNK or PC and macrophages. The remaining data were grouped and analyzed using descriptive statistics due to small sample sizes. Results are presented as median, mean ± standard deviation or percentage. Statistical analysis was conducted using IBM SPSS Statistics (Version 26 for macOS) and Microsoft Excel (Version 16.35 for macOS).

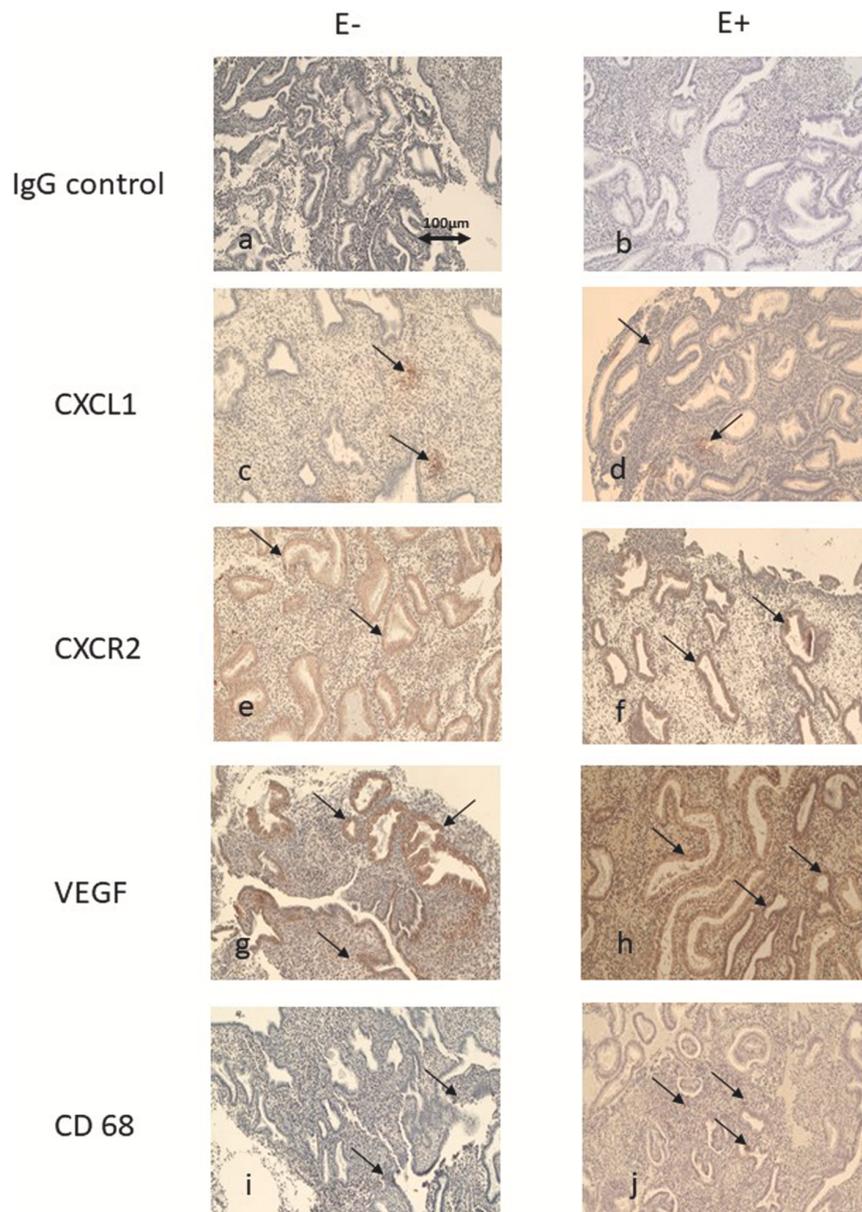


Fig. 1. Representative photographs of IHC staining for CXCL1 (C, D), CXCR2 (E, F), VEGF-A (G, H) and CD68 (I, J) in the eutopic endometrium of women with endometriosis (right column) and without endometriosis (left column) compared to an IgG control with endometriosis (B) and without endometriosis (A).

3. Results

A total of 36 endometrial samples were evaluated for CXCL1 (image c and d), CXCR2 (image e and f), SDC-1, VEGF-A (image g and h) and CD68 (image i and j). Representative photographs are displayed in Fig. 1. The patients were divided into subgroups regarding the cell count (elevated uNK, elevated plasma cells or normal cell count) and regarding the occurrence of endometriosis. In our cohort, 38.8% of the patients presented with elevated uNK and 30.6% with elevated plasma cells hence with chronic endometritis.

3.1. CD68-positive macrophages

The number of CD68-positive macrophages per microscopic field was counted. The endometriosis-group had a mean number of 12.39 (± 2.41) cells in the stroma, while the control group had a mean number of 5.1 (± 1.15) cells in the stroma. In patients with endometriosis, a significantly higher number of cells per microscopic field could be detected compared to controls (U=1.5, z = -5.002, p < 0.001). In the subgroups of patients with endometriosis plus elevated uNK cells (U=0, z = -3.105, p = 0.002), elevated plasma cells (U=0, z = -2.4, p = 0.016) or with normal cell count (U=1, z = -2.722, p = 0.006) the number of macrophages was significantly higher compared to the control group with the same elevated cell population. Mean number of cells according to each subgroup can be seen in Table 2.

The correlation between the number of macrophages per microscopic field and the number of uNK-cells per mm² can be seen in Fig. 2.

Even though not statistically significant, there is a tendency that the number of macrophages increases with a growing number of uNK cells in women without endometriosis (r = 0.245, p = 0.172) whereas the number of macrophages declines with increasing uNK cells in the endometriosis-group (r = -0.192, p = 0.238).

No such tendency could be observed when correlating the number of macrophages with the number of PC.

3.2. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)

The stroma, the glandular epithelium, the surface epithelium and the endothelium were stained positive in all samples as displayed in Table 3 and seen in images g and h of Fig. 1. Patients with endometriosis showed higher levels of VEGF-A in their endothelium than those without endometriosis though.

Also, the group of patients with elevated plasma cells showed a slightly higher immunoreactivity to VEGF-A in the stroma and the epithelium than patients with normal plasma cell levels.

Table 2

Mean number of CD68-positive macrophages per microscopic field broken down by subgroup, uNK uterine natural killer cells, ‡ One patient without endometriosis had elevated uNK and elevated plasma cells and was therefore assigned to both subgroups, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, values are mean ± standard error.

Subgroup	Mean number of cells per microscopic field		p-value
	With endometriosis	Without endometriosis	
Total	12.39 ± 2.41 (n = 19)	5.10 ± 1.15 (n = 17)	< 0.001 ***
Elevated uNK	11.92 ± 2.24 (n = 6)	5.23 ± 1.17 (n = 8 [‡])	0.002 **
Elevated plasma cells	13.67 ± 1.60 (n = 7)	5.03 ± 1.05 (n = 4 [‡])	0.016 *
Normal cell count	11.37 ± 2.70 (n = 6)	4.95 ± 1.08 (n = 6)	0.006 **

3.3. CXC-motif ligand 1 (CXCL1)

All 36 endometrial samples stained with a moderate intensity in stroma, surface epithelium, glandular epithelium and endothelium. No differences between patients with endometriosis compared to controls could be detected (compare image c and d of Fig. 1). Furthermore, no differences between individuals with elevated uNK or plasma cells compared to those with normal cell counts could be observed.

3.4. CXC-motif receptor 2 (CXCR2)

The surface epithelium as well as the glandular epithelium were evaluated in every sample with the commonest intensity faint positive as seen in image e and f of Fig. 1. The endometrial stroma was only stained positive in around 15% of all samples. Nonetheless, no correlation between the occurrence of positively stained stroma and affiliation to one of the subgroups (abnormalities in the cell count or occurrence of endometriosis) could be detected.

Every second sample showed positive staining of the endothelium, yet no assignment of the occurrence of staining to any of the subgroups could be identified.

In general, no difference between the subgroups could be detected as shown in Table 3.

3.5. Syndecan-1 (SDC-1)

In the specimens of all subgroups, glandular and surface epithelium were stained positive for SDC-1. None of the samples showed any staining of the endothelium.

The detection of SDC-1 in the stroma varied between the subgroups. Four patients with elevated uNK and without endometriosis showed no staining of the stroma while in 2 patients with elevated uNK and without endometriosis moderate staining of the stroma could be detected. In the group of patients with endometriosis and elevated uNK only 1 patient showed a positive stained stroma. In the rest of the samples, no staining could be detected. The stroma was most commonly evaluated with light to moderate staining of patients with normal cell count with endometriosis, while in patients with normal cell count and without endometriosis, there was none to light staining of the stroma. Table 3 gives an overview over the staining intensities of all subgroups.

4. Discussion

The embryo-maternal cross-talk is mediated by endocrine and paracrine hormones, cytokines and adhesion molecules (Lash, 2015). While acute inflammatory changes of the endometrium are a prerequisite for a successful embryo implantation (Critchley et al., 1999), chronic inflammation - as present in endometriosis - is impeding and a relevant cause of infertility (Lessey et al., 2013). The aim of our study was to investigate immune cell populations and signaling molecules related to embryo implantation in the eutopic endometrium of patients with endometriosis compared to patients without endometriosis during the secretory phase of their menstrual cycle.

Macrophages are key players of the innate immune response, and our results are consistent with the idea that endometriosis is an inflammatory disease: we found significantly higher numbers of macrophages in the eutopic endometrium of women with endometriosis compared to those without. This is in line with previous studies which demonstrated a higher tissue infiltration of macrophages in the eutopic endometrium of women with endometriosis across all cycle phases (Khan et al., 2004; Takebayashi et al., 2015). Other studies found contradicting results on the occurrence of endometrial macrophages during the proliferative phase: one describes significantly more macrophages in women with endometriosis while the other one finds them significantly reduced compared to women without endometriosis (Berbic et al., 2009; Braun et al., 2002). The discrepant observations are likely due to different

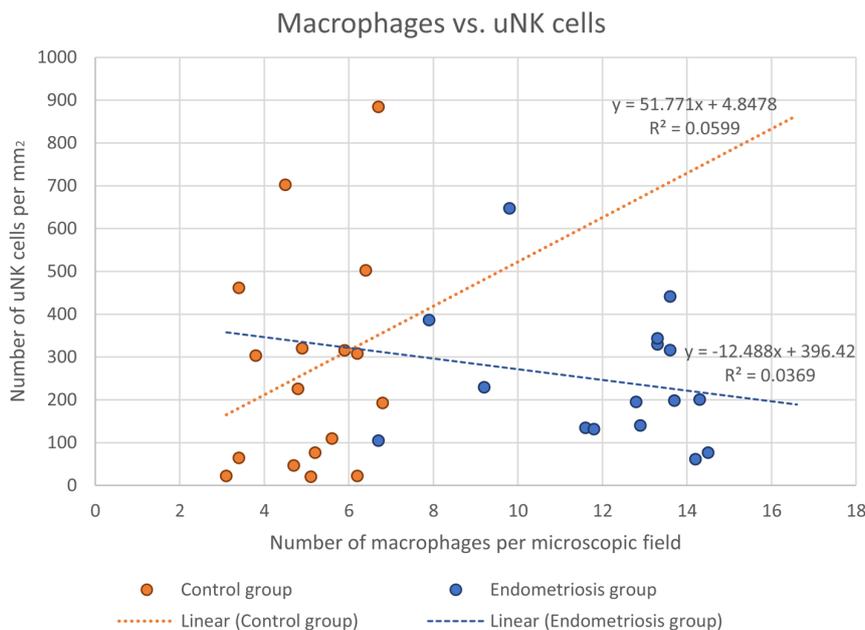


Fig. 2. Correlation between number of macrophages per microscopic field and number of uNK (uterine Natural Killer) cells per mm².

Table 3

Results of the VEGF-A, CXCR2 and SDC-1 antibody staining intensities of endometrial tissues, uNK uterine natural killer cells, E+ patients with endometriosis, E- patients without endometriosis, “0” no staining, “+” faintly positive staining reaction, “++” moderately positive staining reaction, “+++” strong positive staining reaction, * One patient without endometriosis had elevated uNK and elevated PC and was therefore assigned to both groups.

Number of patients (n=36) E+ (19) E- (17)*		VEGFA				CXCR2				SDC-1			
		Stroma	Glandular epithelium	Surface epithelium	Endothelium	Stroma	Glandular epithelium	Surface epithelium	Endothelium	Stroma	Glandular epithelium	Surface epithelium	Ednothelium
Elevated uNK	E+ (6)	+/ ++	++	++/ +++	++/ +++	0	+	+	0/ +	0/ +	++/ +++	++/ +++	0
	E- (8)	+/ ++	++	++/ +++	+/ ++	0	+	+	0/ +	0	++/ +++	++/ +++	0
Elevated plasma cells	E+ (7)	++	++/ +++	+++	++/ +++	0	+	+	0/ +	+	++/ +++	++/ +++	0
	E- (4)*	++	++/ +++	+++	++	0	+	+	0/ +	++	++/ +++	+++	0
Normal cell count	E+ (6)	+/ ++	++	++	+++	0	+	+	0/ +	+/ ++	++/ +++	+++	0
	E- (6)*	+/ ++	++	++	+/ ++	0	+	+	0/ +	0/ +	+++	++	0

CD68 antibody clones used (clone PG vs. PK1 and clone D4B9C in our study). In addition to previous findings, our study demonstrates that the presence or absence of uNK and plasma cells is not correlated with the presence of macrophages and their increased infiltration in women with endometriosis. Still, we observed the tendency that in endometriosis patients an increase in macrophages suppresses uNK cell numbers whilst the correlation is the other way around in the control cohort. A mutual influence of uNK cells and macrophages is already conceivable, since they fulfill similar functions in the eutopic endometrium: both cell types are involved in the remodeling of spiral arteries and the invasion of the trophoblast and therefore - provided they are present in adequate numbers and differentiation - ensure successful embryo implantation (Faas and De Vos, 2017). The pathways through which macrophages,

uNK and plasma cells alter endometrial receptivity in women with endometriosis are complex and more research is required to further understand the interactions between them (Vallve-Juanico et al., 2019). However, our results confirm that endometriosis is associated with an altered expression of macrophages in the eutopic endometrium of patients undergoing infertility treatment.

We also focused on the expression of VEGF-A as an important inducer of physiological and pathological angiogenesis in the human endometrium (Smith, 1996). We detected positive staining for VEGF-A in the endometrium of all specimen. Similar to the study of Takehara, we found VEGF-A expression mostly in the glandular and surface epithelium with milder staining intensity in the stroma (Takehara et al., 2004). Additionally, our results reveal that higher expression of VEGF-A

in patients with endometriosis is limited to the endothelium of the endometrial vessels. In other compartments of the endometrium, VEGF-A expression had the same intensity in women with and without endometriosis. Since blood vessels develop mainly during the secretory phase, it is no surprise to detect VEGF-A in the endothelium. We assume that the higher endothelial expression found in endometriosis patients might be due to an impaired angiogenesis and could therefore be linked to endometriosis-associated infertility. This observation is in contrast to the findings of Yerlikaya, who finds similarly high eutopic expression of VEGF-A mRNA in both, patients with and without endometriosis (Yerlikaya et al., 2016). The group used quantitative real-time PCR to determine VEGF-A mRNA expression while we relied on immunohistochemical detection of VEGF-A. Therefore, it is likely that the overall amount of VEGF-A in the endometrium is comparable in both women with and without endometriosis and that our results reflect a different distribution within the endometrium. In order to better understand the link between impaired angiogenesis and endometriosis-associated infertility, comprehensive studies focusing on the eutopic endometrium of women with endometriosis are needed.

Immune cells secrete and communicate through chemokines such as CXCL1 which acts via its receptors CXCR2 and SDC-1. Our previous study has shown how SDC-1 functions as an important regulator of CXCL1 expression in endometrial stroma cells (Baston-Buest et al., 2017). In the present study, which is composed of infertility patients, we found high immunoreactivity of CXCL1 in all compartments of the endometrium, with equally intense staining in all specimen. CXCR2 was only faintly detected in glandular and surface epithelium, its immunoreactivity was similarly to CXCL1 both not affected by the presence of endometriosis or elevated immune cells in the investigated subgroups. Both, the chemokine and its receptor, seem to be upregulated in human endometrium during the secretory phase regardless of the presence of endometriosis.

SDC-1, on the other hand, is involved in uterine angiogenesis and very low levels of SDC-1 have been linked to adverse pregnancy outcomes (Greeley et al., 2020). We detected high levels of SDC-1 mainly in the glandular and surface epithelium of all specimen, which is in accordance with previously published data (Lai et al., 2007). The stromal expression of SDC-1 was lower than in other compartments of the endometrium. Interestingly, this effect was even more significant in the group of patients who displayed elevated levels of uNK cells. After all, low stromal expression of SDC-1 in patients with elevated uNK is an observation that is in contrast to the findings of Chen et al. They demonstrated a correlation between high levels of SDC-1 and elevated uNK cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage (Chen et al., 2020). Unlike our study, where uNK cells were counted per 1 mm² specimen slide, Chen et al. measured elevated uNK cells in relation to stroma cells (uNK cell density). In total, they found elevated uNK cells only in 14% of the women while in our cohort and with our method of measurement, 38.8% displayed elevated levels of uNK. As demonstrated before, SDC-1 expression might also vary throughout the menstrual cycle (Lai et al., 2007), and therefore, differ between LH+ 7 (Chen et al.) and a variety of measuring points during the secretory phase (our study).

5. Conclusion

Infertility is a common symptom in women suffering from endometriosis, and while much research has been done to clarify the genesis of the disease itself, little is known about endometriosis-associated infertility. Our study focusses on the eutopic endometrium of infertile patients with and without endometriosis and links immunological and angiogenic changes to endometriosis-associated infertility. Future investigations should examine the complex correlation between immunological changes in the eutopic endometrium of patients with endometriosis-associated infertility and its potential impact on successful implantation and gestation.

Conflict of interest

All authors declare no conflict of interest.

References

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Al, E., 2002. The adaptive immune system. *Molecular Biology of the Cell*, fourth ed. Garland Science, New York.
- Barbieri, R.L., 2019. Female infertility. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology*, eighth ed. Elsevier, Philadelphia.
- Baston-Buest, D.M., Altergot-Ahmad, O., Pour, S.J., Krussel, J.S., Markert, U.R., Fehm, T. N., Bielfeld, A.P., 2017. Syndecan-1 acts as an important regulator of CXCL1 expression and cellular interaction of human endometrial stromal and trophoblast cells. *Mediat. Inflamm.* 2017, 8379256.
- Baston-Bust, D.M., Gotte, M., Janni, W., Krussel, J.S., Hess, A.P., 2010. Syndecan-1 knockdown in decidualized human endometrial stromal cells leads to significant changes in cytokine and angiogenic factor expression patterns. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8, 133.
- Baston-Bust, D.M., Schanz, A., Boeddeker, S.J., Altergot-Ahmad, O., Krussel, J.S., Rein, D., Hess, A.P., 2013. CXCL1 expression in human decidua in vitro is mediated via the MAPK signalling cascade. *Cytokine* 64, 79–85.
- Bayer-Garner, I.B., Korourian, S., 2001. Plasma cells in chronic endometritis are easily identified when stained with syndecan-1. *Mod. Pathol.* 14, 877–879.
- Bayer-Garner, I.B., Prieto, V.G., Smoller, B.R., 2004. Detection of clonality with kappa and lambda immunohistochemical analysis in cutaneous plasmacytomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 128, 645–648.
- Berbic, M., Schulke, L., Markham, R., Tokushige, N., Russell, P., Fraser, I.S., 2009. Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis. *Hum. Reprod.* 24, 325–332.
- Boeddeker, S.J., Baston-Buest, D.M., Altergot-Ahmad, O., Krussel, J.S., Hess, A.P., 2014. Syndecan-1 knockdown in endometrial epithelial cells alters their apoptotic protein profile and enhances the inducibility of apoptosis. *Mol. Hum. Reprod.* 20, 567–578.
- Boeddeker, S.J., Baston-Buest, D.M., Fehm, T., Krussel, J., Hess, A., 2015. Decidualization and syndecan-1 knock down sensitize endometrial stromal cells to apoptosis induced by embryonic stimuli. *PLoS One* 10, e0121103.
- Braun, D.P., Ding, J., Shen, J., Rana, N., Fernandez, B.B., Dmowski, W.P., 2002. Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. *Fertil. Steril.* 78, 830–835.
- Chen, X., Liu, Y., Zhao, Y., Cheung, W.C., Zhang, T., Qi, R., Chung, J.P.W., Wang, C.C., Li, T.C., 2020. Association between chronic endometritis and uterine natural killer cell density in women with recurrent miscarriage: clinical implications. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 46, 858–863.
- Cicinelli, E., Trojano, G., Mastromauro, M., Vimercati, A., Marinaccio, M., Mitola, P.C., Resta, L., De Ziegler, D., 2017. Higher prevalence of chronic endometritis in women with endometriosis: a possible etiopathogenetic link. *Fertil. Steril.*
- Critchley, H.O., Jones, R.L., Lea, R.G., Drudy, T.A., Kelly, R.W., Williams, A.R., Baird, D. T., 1999. Role of inflammatory mediators in human endometrium during progesterone withdrawal and early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 240–248.
- Dunselman, G.A., Hendrix, M.G., Bouckaert, P.X., Evers, J.L., 1988. Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women. *J. Reprod. Fertil.* 82, 707–710.
- Faas, M.M., De Vos, P., 2017. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta* 56, 44–52.
- Flynn, L., Byrne, B., Carton, J., Kelehan, P., O'herlihy, C., O'farrelly, C., 2000. Menstrual cycle dependent fluctuations in NK and T-lymphocyte subsets from non-pregnant human endometrium. *Am. J. Reprod. Immunol.* 43, 209–217.
- Giuliani, E., Parkin, K.L., Lessey, B.A., Young, S.L., Fazleabas, A.T., 2014. Characterization of uterine NK cells in women with infertility or recurrent pregnancy loss and associated endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 72, 262–269.
- Greeley, E.T., Rochelson, B., Krantz, D.A., Xue, X., Carmichael, J.B., Ashour, S., Woo, S., Augustine, S., Metz, C.N., 2020. Evaluation of syndecan-1 as a novel biomarker for adverse pregnancy outcomes. *Reprod. Sci.* 27, 355–363.
- Hess, A.P., Hamilton, A.E., Talbi, S., Dosiou, C., Nyegaard, M., Nayak, N., Genbecev-Krtolica, O., Mavrogianis, P., Ferrer, K., Krussel, J., Fazleabas, A.T., Fisher, S.J., Giudice, L.C., 2007. Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol. Reprod.* 76, 102–117.
- Holness, C.L., Simmons, D.L., 1993. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81, 1607–1613.
- Khan, K.N., Masuzaki, H., Fujishita, A., Kitajima, M., Sekine, I., Ishimaru, T., 2004. Differential macrophage infiltration in early and advanced endometriosis and adjacent peritoneum. *Fertil. Steril.* 81, 652–661.
- Kuon, R.J., Weber, M., Heger, J., Santillan, I., Vomstein, K., Bar, C., Strowitzki, T., Markert, U.R., Toth, B., 2017. Uterine natural killer cells in patients with idiopathic recurrent miscarriage. *Am. J. Reprod. Immunol.*
- Lai, T.H., King, J.A., Shih Ie, M., Vlahos, N.F., Zhao, Y., 2007. Immunological localization of syndecan-1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertil. Steril.* 87, 121–126.
- Lash, G.E., 2015. Molecular cross-talk at the feto-maternal interface. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5.
- Lebovic, D.I., Mueller, M.D., Taylor, R.N., 2001. Immunobiology of endometriosis. *Fertil. Steril.* 75, 1–10.

- Leonova, E.I., Galzitskaya, O.V., 2013. Structure and functions of syndecans in vertebrates. *Biochemistry* 78, 1071–1085.
- Lessey, B.A., Lebovic, D.I., Taylor, R.N., 2013. Eutopic endometrium in women with endometriosis: ground zero for the study of implantation defects. *Semin. Reprod. Med.* 31, 109–124.
- McLaren, J., Prentice, A., Charnock-Jones, D.S., Millican, S.A., Muller, K.H., Sharkey, A.M., Smith, S.K., 1996. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J. Clin. Invest.* 98, 482–489.
- McQueen, D.B., Perfetto, C.O., Hazard, F.K., Lathi, R.B., 2015. Pregnancy outcomes in women with chronic endometritis and recurrent pregnancy loss. *Fertil. Steril.* 104, 927–931.
- Miller, J.E., Ahn, S.H., Monsanto, S.P., Khalaj, K., Koti, M., Tayade, C., 2017. Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility. *Oncotarget* 8, 7138–7147.
- Nasu, K., Fujisawa, K., Arima, K., Kai, K., Sugano, T., Miyakawa, I., 2001. Expression and regulation of growth-regulated oncogene alpha in human endometrial stromal cells. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 741–746.
- Palomino, W.A., Tayade, C., Argandona, F., Devoto, L., Young, S.L., Lessey, B.A., 2018. The endometria of women with endometriosis exhibit dysfunctional expression of complement regulatory proteins during the mid secretory phase. *J. Reprod. Immunol.* 125, 1–7.
- Prescott, J., Farland, L.V., Tobias, D.K., Gaskins, A.J., Spiegelman, D., Chavarro, J.E., Rich-Edwards, J.W., Barbieri, R.L., Missmer, S.A., 2016. A prospective cohort study of endometriosis and subsequent risk of infertility. *Hum. Reprod.* 31, 1475–1482.
- Robson, A., Harris, L.K., Innes, B.A., Lash, G.E., Aljunaidy, M.M., Aplin, J.D., Baker, P.N., Robson, S.C., Bulmer, J.N., 2012. Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy. *FASEB J.* 26, 4876–4885.
- Romagnani, P., Lasagni, L., Annunziato, F., Serio, M., Romagnani, S., 2004. CXCL chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol.* 25, 201–209.
- Sengupta, J., Lalitkumar, P.G., Najwa, A.R., Charnock-Jones, D.S., Evans, A.L., Sharkey, A.M., Smith, S.K., Ghosh, D., 2007. Immunoneutralization of vascular endothelial growth factor inhibits pregnancy establishment in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Reproduction* 133, 1199–1211.
- Simon, C., Martin, J.C., Galan, A., Valbuena, D., Pellicer, A., 1999. Embryonic regulation in implantation. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 17, 267–274.
- Smith, S.K., 1996. Vascular endothelial growth factor and the endometrium. *Hum. Reprod.* 11 (Suppl. 2), S56–S61.
- Takebayashi, A., Kimura, F., Kishi, Y., Ishida, M., Takahashi, A., Yamanaka, A., Wu, D., Zheng, L., Takahashi, K., Suginami, H., Murakami, T., 2015. Subpopulations of macrophages within eutopic endometrium of endometriosis patients. *Am. J. Reprod. Immunol.* 73, 221–231.
- Takehara, M., Ueda, M., Yamashita, Y., Terai, Y., Hung, Y.C., Ueki, M., 2004. Vascular endothelial growth factor A and C gene expression in endometriosis. *Hum. Pathol.* 35, 1369–1375.
- Teng, Y.H., Aquino, R.S., Park, P.W., 2012. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol.* 31, 3–16.
- Vallve-Juanico, J., Houshdaran, S., Giudice, L.C., 2019. The endometrial immune environment of women with endometriosis. *Hum. Reprod. Update* 25, 564–591.
- Varol, C., Mildner, A., Jung, S., 2015. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 643–675.
- Yerlikaya, G., Balendran, S., Prostling, K., Reischer, T., Birner, P., Wenzl, R., Kuessel, L., Streubel, B., Husslein, H., 2016. Comprehensive study of angiogenic factors in women with endometriosis compared to women without endometriosis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 204, 88–98.
- Young, V.J., Ahmad, S.F., Brown, J.K., Duncan, W.C., Horne, A.W., 2015. Peritoneal VEGF-A expression is regulated by TGF-beta1 through an ID1 pathway in women with endometriosis. *Sci. Rep.* 5, 16859.

3 Diskussion

Die Endometriose ist eine schwerwiegende, chronisch-inflammatorische Erkrankung, die mit dem Leitsymptom der Infertilität einhergeht. Vom Einsetzen der ersten Symptome bis zur Diagnose vergehen im Schnitt zehn Jahre [126] und häufig tritt die Erkrankung erst durch einen unerfüllten Kinderwunsch erstmals in Erscheinung. Bis heute ist die Endometriose nur über eine Laparoskopie sicher zu diagnostizieren [19]. In der vorgelegten Arbeit haben wir das eutope Endometrium von Frauen mit Endometriose-assoziiierter Infertilität auf das Vorkommen von Zellen und Mediatoren der Inflammation und Angiogenese untersucht und diese mit einer infertilen Kohorte ohne Endometriose verglichen.

Auf der Suche nach nicht-invasiven Biomarkern rücken vermehrt uterine Plasmazellen in den Fokus. Das liegt daran, dass ein vermehrtes Vorkommen von uterinen Plasmazellen als diagnostischer Marker für die chronische Endometritis dienen, und Endometriose und chronische Endometritis häufig gemeinsam auftreten [106]. Beide Erkrankungen sind chronische, inflammatorische Prozesse, die sich in der Gebärmutter Schleimhaut abspielen. Das erhöhte Vorkommen von chronischer Endometritis bei Endometriose-Patientinnen könnte durch rezidivierende bakterielle Infektionen bedingt sein, die aufgrund der dysregulierten retrograden Menstruation entstehen. Es ist denkbar, dass die vermehrt vorkommenden Plasmazellen im eutopen Endometrium durch retrograde Menstruation in die freie Bauchhöhle geraten und dort die Entzündung der Endometriose unterhalten.

In unserer Kohorte von größtenteils kaukasischen Endometriose-Patientinnen lag die Inzidenz der chronischen Endometritis bei 12,9% [127]. Das Kontrollkollektiv zeigte in 10% der Fälle eine chronische Endometritis. Das Risiko für Endometriose-Patientinnen, ebenfalls an einer chronischen Endometritis zu leiden, war im Vergleich zum Kontrollkollektiv um das 1,3-fache erhöht. Aufgrund einer geringen Gruppengröße konnten wir jedoch keine statistische Signifikanz errechnen.

Die Forschungsgruppe um Takebayashi et al. fand in einer japanischen Kohorte von Endometriose-Patientinnen eine vergleichsweise hohe Inzidenz der chronischen Endometritis von 52,94%. Außerdem stellten sie einen signifikanten Unterschied zu dem Kontrollkollektiv heraus, die nur in 27,02% unter chronischer Endometritis litten [106]. Takebayashi et al. nutzte zwar ebenfalls CD-138 als immunologischen Marker zum histochemischen Nachweis von Plasmazellen, unklar bleibt jedoch, ab welcher

Plasmazellzahl im histopathologischen Biopsat die Diagnose chronische Endometritis gestellt wurde. In der vorgelegten Arbeit wurden mindestens 5 Plasmazellen pro mm² gefordert, bevor die Diagnose chronische Endometritis gestellt wurde und eine Indikation zur Behandlung vorlag. Es existiert jedoch keine einheitliche Definition hinsichtlich der Anzahl von Plasmazellen bei chronischer Endometritis, unser angenommene Zelldichte basiert auf der Publikation von Bayer-Garner et al. [128].

Hinzu kommt, dass unsere Proben durch endometriales Scratching bei Frauen gewonnen wurden, die sich zur Zeit der Probenentnahme in einer Kinderwunschbehandlung befanden. Takebayeshi et al. nutzten endometriales Gewebe, das durch eine Hysteroskopie bei einer gynäkologischen Grunderkrankung gewonnen wurde. Obwohl wir unser Ergebnis nicht mit einem Fehlerniveau von $\leq 0,05$ darstellen konnten, ist der immunhistochemische Nachweis von Plasmazellen im nicht-invasiv entnommenen, eutopen Endometrium unserer Meinung nach ein neuer Ansatz in der Suche nach Biomarkern für die Endometriose und sollte in größeren Kollektiven weiter untersucht werden.

Die chronische Endometritis ist mit einem erhöhten Risiko für Infertilität assoziiert [129]. In unserer infertilen Kohorte betrug die mittlere Inzidenz der chronischen Endometritis 11,6%. Andere Studien, welche die chronische Endometritis bei Frauen mit RIF untersuchten, fanden eine Inzidenz von 30-66% [102, 103, 130]. Ähnlich wie oben beschrieben unterscheiden sich die Entnahmemethode und die Grunderkrankung: die erwähnten Studien gewannen das Material bei Hysteroskopien, die aufgrund gynäkologischer Grunderkrankungen durchgeführt wurden. Unsere Patientinnen waren – abgesehen von ihrer (Endometriose-assoziierten) Infertilität - gesund.

Wir stellten uns die Frage, ob die Behandlung der chronischen Endometritis mit dem Breitspektrumantibiotikum *Doxycyclin* einen positiven Effekt auf die Schwangerschaftsrate von infertilen Frauen hat. In unserer Kohorte litten 13 Frauen an chronischer Endometritis, davon wurden 9 mit *Doxycyclin* behandelt. Von den vier unbehandelten Patientinnen wurde eine bereits im Diagnoseintervall schwanger und die verbleibenden drei Patientinnen wurden in unserem kooperierenden Zentrum in Heidelberg betreut, wo erst ab 10 Plasmazellen/mm² im eutopen Endometrium eine Indikation zur Behandlung gestellt wird. Die Lebendgeburt率 vor und nach Behandlung mit *Doxycyclin* stieg in unserer Kohorte von 11,1% auf 28,57%, wobei aufgrund der sehr geringen Gruppengröße keine Signifikanzen berechnet werden können. Eine große Studie mit 421 RIF-Patientinnen zeigte, dass die Lebendgeburt率

von Frauen mit RIF und erfolgreich behandelter chronischer Endometritis signifikant höher war als die derjenigen Frauen, die an RIF aber nicht an chronischer Endometritis litten [130]. Der Vergleich der Lebendgeburtsraten vor und nach Eradikation der chronischen Endometritis fehlt hingegen. Aus der Studie kann lediglich abgeleitet werden, dass die chronische Endometritis ein behandelbarer Auslöser von RIF sein könnte. Johnston-MacAnanny et al. konnten hingegen zeigen, dass RIF-Patientinnen mit chronischer Endometritis zwar niedrigere Implantationsraten als RIF-Patientinnen ohne chronische Endometritis aufweisen, dass eine antibiotische Behandlung jedoch nicht zu einer verbesserten Schwangerschaftsrate führt [103]. Cicinelli et al. haben 61 Patientinnen mit RIF und chronischer Endometritis mit *Doxycyclin* behandelt und im Anschluss 15 Patientinnen mit persistierender chronischer Endometritis identifiziert. Sowohl die Schwangerschafts- als auch die Geburtenrate war in der Gruppe mit erfolgreich behandelter chronischer Endometritis signifikant höher als in der Gruppe, in der die chronische Endometritis persistierte [102]. Aus den dargestellten Studien wird deutlich, dass es neben unserer Arbeit bisher keinen Vergleich von Schwangerschafts- und Lebendgeburtsraten bei Frauen mit chronischer Endometritis vor und nach der antibiotischen Behandlung gibt. In der vorgelegten Arbeit zeigte sich ein Trend zu einer Verbesserung der Lebendgeburtsrate nach Behandlung, wir konnten jedoch aufgrund unserer kleinen Kohorte keine Signifikanzen errechnen. Außerdem fehlt in der vorliegenden Arbeit die Überprüfung des Behandlungserfolges, da wir nach *Doxycyclin*-Gabe keine standardmäßige Re-evaluation des Endometriums auf das Vorkommen von Plasmazellen durchgeführt haben. Weiterführende Studien mit einem größeren Patientenkollektiv sollten die Effektivität der antibiotischen Behandlung bei RIF, Endometriose und/oder chronischer Endometritis durch Vergleiche der Lebendgeburtsrate vor und nach Behandlung weiter untersuchen und durch erneute Evaluation des eutopen Endometriums den Behandlungserfolg überprüfen.

Neben den Plasmazellen haben wir das eutope Endometrium hinsichtlich einer weiteren wichtigen Zellpopulation untersucht: den uNK-Zellen. Wir haben uns gefragt, ob uNK-Zellen bei Endometriose-Patientinnen vermehrt vorkommen und ob die Behandlung mit *Intralipid*[®] – welches *in vitro* die Toxizität von natürlichen Killerzellen unterdrücken kann - zu verbesserten Schwangerschaftsraten bei Frauen führt, die erhöhte uNK-Zellen aufweisen. Die Normwerte für uNK-Zellen wurden an fertilen Spenderinnen ermittelt; eine erniedrigte Zahl liegt bei <40 Zellen/mm² vor, der Normbereich umfasst 40-300 uNK-Zellen/mm² und von einer erhöhten Anzahl spricht

man ab 300 Zellen/mm². Insgesamt fanden wir über die gesamte Kohorte von 171 untersuchten Patientinnen hinweg eine durchschnittliche uNK-Zellzahl von 111,51(±142,66) Zellen/mm². Kuon et al. fanden bei Patientinnen mit PRL eine durchschnittliche uNK-Zellzahl von 256,5(±212) Zellen/mm², die gegenüber der gesunden Kontrollkohorte (148±73/mm²) signifikant erhöht war [98]. Die beiden Mittelwerte der Studien weichen zwar voneinander ab, die Daten zeigen jedoch auch eine sehr breite Streuung, sodass die Ergebnisse beider Studien in demselben Größenbereich liegen. In beiden Studien wurde das Endometrium mithilfe einer vaginalen Biopsie während der sekretorischen Zyklusphase entnommen. Die Forschungsgruppe um Kuon nutzte zum uNK-Zellennachweis einen CD56-Antikörper, wohingegen sich unsere Analyse auf den Nachweis durch CD138 stützt. Zusätzlich setzen sich die beiden Kohorten aus unterschiedlichen Patientinnen zusammen: in unserer Kohorte litten lediglich 19% der getesteten Patientinnen unter wiederholten Spontanaborten, 39% hatten Endometriose. Die Gruppe um Kuon betrachtete nur Patientinnen mit wiederholten Spontanaborten und verglich diese mit einer gesunden Kontrollgruppe. Aufgrund der genannten Unterschiede im Studiendesign und der breiten Streuung um den Mittelwert lassen sich der abweichende Durchschnitt der uNK-Zelldichte in der Gruppe um Kuon gut erklären. Tuckermann et al., eine Forschungsgruppe aus England, zeigte bei einer Kohorte von 87 Patientinnen mit wiederholten Spontanaborten ebenfalls eine erhöhte endometriale uNK-Zelldichte im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe [131]. Die absoluten Zahlen lassen sich jedoch nicht vergleichen, da die Gruppe CD56-positive Stromazellen in Relation zu allen Stromazellen betrachtete. Dem entgegen steht unser Ergebnis, welches besagt, dass erhöhte uNK-Zellen keinen Risikofaktor für das Auftreten von RIF oder RPL darstellen. Dies mag jedoch daran liegen, dass wir die Patientinnen mit RIF und RPL zwar mit einer Kohorte verglichen haben, die nicht an RIF oder RPL leidet, jedoch ebenso infertil ist. Möglicherweise zeigt sich die erhöhte uNK-Zellzahl bei RPL Patientinnen erst dann, wenn man sie mit vollkommen gesunden Patientinnen vergleicht.

Betrachtet man nun die uNK-Zelldichte bei Patientinnen mit Endometriose, so konnten wir in unserer Kohorte keinen Unterschied zwischen Patientinnen mit und ohne Endometriose ausmachen. Wir kamen zu dem Schluss, dass Patientinnen mit Endometriose kein erhöhtes Risiko für vermehrte uNK-Zellen haben und sich uNK-Zellen dementsprechend auch nicht als Biomarker zur Diagnose von Endometriose

eignen. Zu unserem Wissen liegen bisher keine vergleichbaren Studien vor, die sich mit dem Zusammenhang von Endometriose und erhöhter uNK-Zelldichte befassen haben. Bekannt ist allerdings, dass Frauen, die einen erhöhten Anteil an zytotoxischen CD16+ uNK-Zellen aufweisen – mit oder ohne Endometriose – ein erhöhtes Risiko für RPL oder Infertilität haben [91]. Womöglich spielt weniger die Anzahl aller uNK-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der (Endometriose-assoziierten) Infertilität als vielmehr ihre Toxizität. Dies würde erklären, weshalb in der vorgelegten Arbeit eine erhöhte uNK-Zellzahl zwar kein Risikofaktor für RIF oder RPL ist, die Therapie mit intravenösem *Intralipid*[®] jedoch zu besseren Schwangerschaftsraten führt. Die Beobachtung des Therapieerfolgs bleibt beschreibend und kann nur als Trend angesehen werden, da das Patientenkollektiv zu klein war. Der Effekt zeigt sich jedoch in allen Untergruppen (Endometriose vs. keine Endometriose und RIF/RPL vs. kein RIF/RPL). Wir schließen uns demnach vorherigen Studien in der Empfehlung an, bei unerklärter Infertilität und erhöhten uNK-Zellen mit *Intralipid*[®] zu behandeln [132, 133]. Es besteht jedoch weiterhin die Notwendigkeit größerer Studien, die Schwangerschaftsraten von Frauen mit erhöhten uNK-Zellen vor und nach der Behandlung mit *Intralipid*[®] vergleichen und den genauen Effekt auf die uNK-Zelltoxizität darstellen [134].

Als Teil der initialen Immunantwort spielen auch ortsständige Makrophagen des eutopen Endometriums bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle. In der vorgelegten Arbeit konnte während der sekretorischen Zyklusphase eine signifikant höhere Anzahl von Makrophagen im eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose im Vergleich zu Frauen ohne Endometriose gezeigt werden [135]. Dies bestätigt die Annahme, dass Endometriose eine inflammatorische Erkrankung ist und immunologische Veränderungen auch im eutopen Endometrium stattfinden. Unser Ergebnis stimmt mit dem vorheriger Studien überein, die über alle Zyklusphasen hinweg eine erhöhte Anzahl von Makrophagen bei Frauen mit Endometriose fanden [63, 79], wengleich die Anzahl der endometrialen Makrophagen erheblichen, zyklusabhängigen Schwankungen unterworfen ist [136].

Bezüglich der proliferativen Zyklusphase gibt es widersprüchliche Studien: eine Forschungsgruppe aus Chicago verglich das eutope Vorkommen von CD68-positiven Makrophagen bei 51 Endometriose-Patientinnen und stellte es 24 gesunden Kontrollen gegenüber [80]. Dabei fanden sie eine signifikant reduzierte Infiltration von Makrophagen bei Endometriose-Patientinnen und zudem eine signifikant reduzierte

Anzahl von apoptotischen Zellen. Die Gruppe interpretiert das Ergebnis dahingehend, dass die Makrophagen möglicherweise vermehrt in ektoper Endometrioseherde einwandern, dadurch im eutopen Endometrium fehlen, was wiederum zu einer verminderten Apoptoserate führt und letztendlich ein verbessertes Überleben der Endometriumzellen und damit das Fortbestehen der Endometriose begünstigt [80]. Dem gegenüber steht das Ergebnis von Berbic et al., die ebenfalls immunhistochemisch die Makrophagen-Infiltration im eutopen Endometrium während der proliferativen Zyklusphase bei 21 Frauen mit und 20 Frauen ohne Endometriose verglichen [137]. Die Gruppe fand eine signifikant höhere Anzahl an CD68-positiven Makrophagen im eutopen Endometrium von Frauen mit Endometriose. Es fällt auf, dass die unterschiedlichen Forschungsgruppen auf verschiedene CD68-Antikörperklone zurückgriffen: während Braun, Berbic und Takebayashi et al. den PGMI-Klon [63, 80, 137] verwendeten, nutzte Khan et al. den KPI-Klon [79] und wir den D4B9C-Klon. Weiterhin unterscheiden sich die Studien durch die Auswahl der Population: während Berbic et al. die Endometriumbiopsien von Endometriose-Patientinnen gewannen, die aufgrund einer Schmerzsymptomatik eine laparoskopische Abklärung erhielten, sind unsere Studienteilnehmerinnen – ebenso wie bei Braun und Khan et al. [79, 80] – Kinderwunschpatientinnen. Die Population von Takebayashi et al. setzt sich wie oben beschrieben aus Frauen mit gynäkologischen Grunderkrankungen zusammen [63].

Insgesamt herrscht bezogen auf die Anzahl von Makrophagen im eutopen Endometrium von Endometriose-Patientinnen und die Zyklus-bedingten Schwankungen eine eher heterogene Studienlage. Unser Ergebnis reiht sich in den überwiegenden Teil der Studien ein, die eine vermehrte Infiltration der Makrophagen bei Patientinnen mit Endometriose-assoziiierter Infertilität beobachten. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die erhöhte endometriale Infiltration auch dann signifikant höher in der Endometriose-Gruppe war, wenn man nur Patientinnen miteinander vergleicht, die entweder erhöhte uNK-Zellen, erhöhte Plasmazellen oder normale Zellzahlen hatten. Es zeigte sich eine leichte Tendenz, dass Frauen mit Endometriose bei steigender Makrophagenzahl eine geringere uNK-Zelldichte haben, wogegen der Zusammenhang bei Frauen ohne Endometriose genau andersrum ausfällt: je mehr Makrophagen, desto mehr uNK-Zellen. Diese Beobachtungen lassen sich bei geringer Gruppengröße allerdings nicht statistisch signifikant darstellen. Eine wechselseitige Beeinflussung von uNK-Zellen und Makrophagen ist jedoch schon deshalb denkbar, da sie im eutopen Endometrium ähnliche Funktionen erfüllen: beide Zellarten sind am Umbau der Spiralarterien und der

Invasion des Trophoblasten beteiligt und sorgen daher – sofern sie in angemessener Zahl und Differenzierung vorliegen – für die erfolgreiche Embryoimplantation [138]. Da in der vorgelegten Arbeit CD68 als Pan-Makrophagen-Marker genutzt wurde, kann keine Aussage über die Art der Differenzierung – in M1 oder M2 Makrophagen – getroffen werden. Die aktuelle Literatur zeigt, dass jene Makrophagen, die das eutrope Endometrium von Frauen mit Endometriose infiltrieren, häufiger zu M1 als zu M2 Makrophagen differenziert sind als bei Frauen ohne Endometriose [63]. Die M1 Zelllinie neigt eher zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und zur Phagozytose von Erregern, während die M2 Makrophagen die inflammatorische Antwort reduzieren und die Angiogenese sowie den Gewebeneu- und umbau initiieren [139]. Die wechselseitige Beeinflussung von uNK-Zellen und Makrophagen könnte sich im Endometrium von Frauen mit Endometriose also deshalb wie oben beschrieben verändern, weil die Makrophagen anders differenziert sind und eine andere Funktion ausüben als bei Frauen ohne Endometriose. Die gegenseitige Beeinflussung dieser beider Zelllinien ist in unserer Arbeit erstmals beschrieben, bedarf allerdings weiterführender Studien, die sich ausführlich mit den Eigenschaften von uterinen Makrophagen, ihrer Differenzierung und ihrer Interaktion mit anderen Immunzellpopulationen auseinandersetzen und die Ergebnisse in Zusammenhang mit dem Auftreten einer Endometriose-assoziierten Infertilität bringen.

Sowohl Makrophagen als auch uNK-Zellen sind in der Lage, VEGF-A, den wichtigsten Induktor der Angiogenese, zu sezernieren [92]. VEGF-A vermag im Endometrium sowohl physiologische als auch pathologische Gefäßneubildung zu vermitteln [140], weshalb wir uns in der vorgelegten Arbeit genauer mit der endometrialen Expression bei Frauen mit und ohne Endometriose befasst haben. Wir konnten zeigen, dass sich VEGF-A in allen Endometriumproben anfärben lässt.

Ähnlich zu den Ergebnissen von Takehara et al., die ebenfalls eine Gruppe von Endometriose-Patientinnen mit einem gesunden Kontrollkollektiv verglichen, war VEGF-A vor allem im glandulären und im Oberflächenepithel des Endometriums sowie mit schwächerer Färbung im Stroma zu finden [141]. Wir stellten außerdem heraus, dass die Gruppe der Endometriose-Patientinnen eine stärkere VEGF-A-Expression im Gefäßendothel als die Gruppe ohne Endometriose zeigte. In allen anderen Schichten des Endometriums (Stroma, glanduläres und Oberflächenepithel) zeigte sich kein Unterschied zwischen Patientinnen mit und ohne Endometriose. Takehara et al. beschreibt ein insgesamt Überwiegen der VEGF-A-Expression bei Frauen mit

Endometriose, welches zwar durch eine zusätzliche Bestimmung der mRNA (*messenger ribonucleic acid*) Expression von VEGF-A quantifiziert wurde, jedoch keine Feinanalyse der einzelnen Schichten zulässt [141]. Die beiden Studien unterscheiden sich insofern, als dass unser Patientinnenkollektiv aufgrund eines unerfüllten Kinderwunsches in Behandlung war, während die von Takehara et al. untersuchten Probandinnen bei Verdacht auf eine Endometriose laparoskopiert wurden [141]. Zusätzlich beinhaltete die Messung der Gruppe von Takehara et al. Gewebeproben sowohl von der proliferativen als auch der sekretorischen Zyklusphase, während in der vorgelegten Arbeit lediglich die sekretorische Zyklusphase betrachtet wurde [141]. Im Gegensatz zu den eben genannten Ergebnissen, die beide ein Überwiegen der endometrialen VEGF-A Expression bei Frauen mit Endometriose beschreiben, kommen Yerlikaya et al. zu einem anderen Schluss: sie fanden keinen signifikanten Unterschied in der VEGF-A mRNA Expression im eutopen Endometrium von Frauen mit und ohne Endometriose. Die Gruppe konnte jedoch eine signifikant erhöhte Expression des VEGF-A Rezeptors VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Receptor*) bei Frauen mit Endometriose nachweisen. Das Patientinnenkollektiv setzte sich aus Frauen mit Endometriose zusammen, von denen einige ebenfalls unter Infertilität litten, und wurde mit einer Gruppe von Frauen ohne Endometriose verglichen. Die Entnahme des Endometrium erfolgte in den überwiegenden Fällen während der proliferativen oder der sekretorischen Zyklusphase [87]. In der vorgelegten Arbeit erfolgte keine quantitative Messung der VEGF-A Expression, sondern lediglich ein Vergleich der immunhistochemischen Expression in den einzelnen Schichten des Endometriums zwischen infertilen Frauen mit und ohne Endometriose. Daher ist der Aussagewert unserer Studie hinsichtlich der gesamten Menge an VEGF-A bei Frauen mit oder ohne Endometriose begrenzt, wir konnten jedoch erstmals eine andere VEGF-A-Verteilung innerhalb des Endometriums mit verstärkter endothelialer Expression bei Frauen mit Endometriose beobachten. Die Ausbildung uteriner Gefäße findet vor allem während der sekretorischen Phase in Vorbereitung auf die Embryoimplantation statt. In der Literatur häufen sich die Hinweise darauf, dass eine gestörte Angiogenese in der embryo-maternalen Schnittstelle die erfolgreiche Implantation beeinträchtigen kann [85]. Chen et al. fanden bei einer Gruppe von Patientinnen mit RSA eine vermehrte Anzahl von kleinen Gefäßen im Endometrium genau sieben Tage nach dem Eisprung im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv. Sie stellten die Hypothese auf, dass ein zu schnelles Reifen des Gefäßnetzwerks mit dem Auftreten von Aborten assoziiert sei [142]. Zusätzlich konnte die Gruppe zeigen, dass die VEGF-A Expression bei

Frauen mit RSA im Vergleich zum Kontrollkollektiv erhöht ist und somit das Auftreten von RSA mit einer erhöhten Angiogenese einherzugehen scheint [143]. Ein vermehrtes Vorkommen von VEGF-A im Endothel endometrialer Gefäße bei Frauen mit Endometriose könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch der Endometriose-assoziierten Infertilität eine pathologische Angiogenese zugrunde liegt. Basierend auf unserer Recherche ist die vorliegende Arbeit die erste, die eine eutope VEGF-A Expression bei Frauen mit Endometriose in Zusammenhang mit einem unerfüllten Kinderwunsch bringt. Zukünftig sollte die Neubildung von Gefäßen während der Embryoimplantation bei Frauen mit Endometriose-assoziiierter Infertilität näher untersucht und sie mit fertilen Kontrollen verglichen werden.

Ein weiteres Signalmolekül im embryo-maternalen Dialog ist das Chemokin CXCL1, welches seine Wirkung über den Rezeptor CXCR2 und den Co-Rezeptor SDC-1 entfaltet [111, 115]. Vorherige Studien unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass SDC-1 ein wichtiger Regulator der CXCL1-Expression in endometrialen Stromazellen ist [121]. Die vorliegende Arbeit demonstriert eine hohe Expression von CXCL1 in allen Abschnitten des Endometriums bei der gesamten Kohorte von Kinderwunschpatientinnen, wobei keinerlei Unterschiede zwischen Patientinnen mit und ohne Endometriose sowie zwischen Patientinnen mit normalen oder veränderten uNK- bzw. Plasmazellzahlen ausgemacht werden konnte. Nasu et al. konnten bereits 2001 eine CXCL1-Expression in endometrialen Stromazellen nachweisen, die während der sekretorischen Zyklusphase im Vergleich zur proliferativen Zyklusphase signifikant erhöht war [144]. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen fanden Kitaya et al. eine geringe epitheliale und endotheliale CXCL1-Expression bei infertilen Frauen mit chronischer Endometritis, wogegen Kinderwunschpatientinnen ohne chronische Endometritis keine Färbung des Epi- und Endothels aufwiesen [100]. Die Gruppe nutzte denselben CXCL1-Antikörper in derselben Verdünnung wie in der vorliegenden Arbeit. Dennoch muss bedacht werden, dass in beiden Studien kleine Gruppen von Patientinnen untersucht wurden (21 Patientinnen bei Kitaya et al. und 36 Patientinnen in unserer Kohorte) [100]. Das endometriale Vorkommen von CXCL1 in den verschiedenen Schichten sollte an größeren Populationen weiter untersucht werden, um eine valide Aussage treffen zu können. Für CXCR2 ergab sich in der vorliegenden Arbeit ebenfalls kein Unterschied zwischen Endometriose-Patientinnen und Kontrollen bzw. zwischen Patientinnen mit erhöhten oder normalen Immunzellpopulationen. Wir fanden eine leichte Expression von CXCR2 im Drüsen- und Oberflächenepithel aller

Patientinnen, sowie eine leichte Färbung des vaskulären Endothels. Insgesamt scheinen sowohl CXCL1 als auch CXCR2 im Endometrium während der sekretorischen Zyklusphase hochreguliert zu sein, wobei ihre Expression nicht von dem Vorhandensein einer Endometriose oder erhöhten uNK- bzw. Plasmazellen abhängig ist. Betrachtet man den Co-Rezeptor SDC-1, so konnten wir seine Expression vor allem im Drüsen- und Oberflächenepithel aller Proben zeigen. Dies stimmt mit der vorherigen Literatur überein: Lai et al. fanden während der sekretorischen Zyklusphase eine hochregulierte SDC-1 Expression im Drüsenepithel und eine erniedrigte Expression im Stroma im Vergleich zur proliferativen Zyklusphase [145]. Wir fanden ebenfalls eine niedrigere stromale SDC-1 Expression im Vergleich zu anderen Schichten des Endometriums. Interessanterweise tritt der Unterschied dann noch deutlicher in Erscheinung, wenn zusätzlich erhöhte uNK-Zellen vorlagen. Eine erniedrigte stromale SDC-1 Expression scheint also mit dem Auftreten von erhöhten uNK-Zellen assoziiert zu sein, was den Ergebnissen der Forschungsgruppe um Chen et al. widerspricht. Sie fanden einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten SDC-1 Expression und dem vermehrten Vorkommen von uNK-Zellen. Chen et al. untersuchten nur Patientinnen mit RSA und fanden über die gesamte Kohorte hinweg lediglich bei 14% der Patientinnen erhöhte uNK-Zellen [146], während wir bei 38,8% der Kinderwunschpatientinnen erhöhte uNK-Zellen detektierten. Möglicherweise lassen sich die gefundenen Unterschiede damit erklären, dass unsere Population auch Patientinnen einschloss, die an RIF, Endometriose-assoziiertes oder idiopathischer Infertilität litten.

3.1 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die vorliegende Arbeit gibt eine Übersicht über relevante Zellen und Mediatoren der Inflammation und Angiogenese im eutopen Endometrium von Frauen mit (Endometriose-assoziiertes) Infertilität. Wir konnten zeigen, dass Frauen mit Endometriose tendenziell häufiger unter chronischer Endometritis leiden als Frauen ohne Endometriose, weshalb wir eine Untersuchung des eutopen Endometriums bei Frauen mit Verdacht auf Endometriose-assoziiertes Infertilität empfehlen. An unsere Arbeit anknüpfend erscheint es sinnvoll, das Vorkommen von uterinen Plasmazellen als möglichen Biomarker für die Endometriose weiter zu untersuchen.

In unserer Arbeit scheinen sich die Schwangerschaftsraten von Frauen mit chronischer Endometritis durch die Behandlung mit *Doxycyclin* zu verbessern, allerdings sollte dieses Ergebnis durch eine größere Kohorte von Frauen überprüft und der

Behandlungserfolg durch eine Nachkontrolle des Endometriums bewertet werden. Frauen mit und ohne Endometriose litten in unserer Kohorte gleich häufig an erhöhten uNK-Zellen; außerdem sind die erhöhten Zellen kein Risikofaktor für RPL oder RIF. Dennoch beobachteten wir, dass eine Behandlung mit *Intralipid*[®] – unabhängig von der Ursache der Infertilität – zu einer verbesserten Lebendgeburtrate führte. Wir empfehlen daher weiterhin die Gabe von *Intralipid*[®] bei Kinderwunschpatientinnen mit erhöhten uNK-Zellen. Zukünftige Studien sollten die Subtypen der uNK-Zellen (wie z.B. die cytotoxischen CD16+ uNK-Zellen) genauer differenzieren, um ihre Funktion im Endometrium von Frauen mit und ohne Endometriose bei der erfolgreichen Embryoimplantation besser darzustellen.

Wir konnten weiterhin beobachten, dass ein erhöhtes Vorkommen von uterinen Makrophagen bei Frauen mit Endometriose auch dann besteht, wenn andere Immunzellpopulationen verändert sind. Es ergab sich der Hinweis, dass die Interaktion zwischen Makrophagen und uNK-Zellen – die beide wichtige Funktionen in der Angiogenese und der Embryoimplantation übernehmen – durch das Auftreten einer Endometriose verändert wird. Um dies weiter abzuklären, sollte die Differenzierung der Makrophagen in M1 und M2 Zelllinien näher betrachtet und der Zusammenhang zum Auftreten von uNK-Zellen und Infertilität evaluiert werden. Als wichtigen Induktor der Angiogenese haben wir eine vermehrte VEGF-A Expression im Gefäßendothel von Frauen mit Endometriose gefunden, in anderen Schichten des Endometriums fanden sich keine Unterschiede zwischen Frauen mit und ohne Endometriose. Wir vermuten, dass ein pathologisches oder zu schnelles Wachstum der Mikrogefäße im Endometrium der erfolgreichen Embryoimplantation im Wege steht. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen einer gestörten Angiogenese und dem Auftreten von Endometriose-assoziiierter Infertilität. Wir erachten es als notwendig, die Mikrogefäßbildung bei Frauen mit Endometriose genauer zu untersuchen und mit einer fertilen Kohorte zu vergleichen.

Wir fanden eine hohe endometriale Expression von CXCL1 und CXCR2 während der sekretorischen Zyklusphase, was unsere Annahme bestätigt, dass eine kontrollierte Entzündungsreaktion im Endometrium zum Zeitpunkt der Embryoimplantation erforderlich ist. Wir konnten beobachten, dass die stromale Expression von SDC-1 dann besonders niedrig ist, wenn erhöhte uNK-Zellen vorlagen. In nachfolgenden Studien sollte die stromale SDC-1 Expression im Verlauf des Zyklus in Zusammenhang mit dem Auftreten von uNK-Zellen weiter untersucht werden.

Die vorgelegte Arbeit trägt damit zum Verständnis endometrialer Veränderungen bei, die womöglich eine Rolle bei der Endometriose-assoziierten Infertilität spielen. Die genaue Untersuchung des eutopen Endometriums – dem Ort der Embryoimplantation und -reifung – könnte entscheidenden Aufschluss über immunologischen und angiogenetische Veränderungen liefern und neue Ansätze zur Therapie der Endometriose-assoziierten Infertilität hervorbringen. Die Behandlung mit *Doxycyclin* und *Intralipid*[®] findet bereits klinische Anwendung, sie scheint auf der Basis unserer Ergebnisse jedoch erst der Anfang in einer Reihe weiterer Möglichkeiten zu sein, Patientinnen mit Endometriose-assoziiierter Infertilität zu therapieren. Die Entnahme des eutopen Endometriums ist ein risikoarmer, nicht-invasiver Eingriff, der in der Abklärung von Entzündungsprozessen, veränderter Mikroumgebung und pathologischer Angiogenese entscheidend zum Verständnis einer (Endometriose-assoziierten) Infertilität beitragen kann. Unsere Arbeit unterstreicht die klinische Relevanz dieser Untersuchung und zeigt, dass die Klärung der offenen Fragestellungen das Potential hat, die Endometriose-assoziierte Infertilität besser zu verstehen und zu behandeln.

4 Quellenverzeichnis

1. Crause RW, S.D., *Disputatio Inauguralis Medica de Ulceribus Uteri*. 1690, University of Jena: Jena, Germany.
2. Olive, D., *Endometriosis in Clinical Practice*. 2005. London and New York: Taylor and Francis. **11**.
3. Burney, R.O. and L.C. Giudice, *Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis*. *Fertil Steril*, 2012. **98**(3): p. 511-9.
4. Adamson, G.D., Kennedy, S., & Hummelshoj, L., *Creating Solutions in Endometriosis: Global Collaboration through the World Endometriosis Research Foundation*. *Journal of Endometriosis*, 2010. **2**(1): p. 3-6.
5. Goodman, L.R. and J.M. Franasiak, *Efforts to redefine endometriosis prevalence in low-risk patients*. *BJOG*, 2018. **125**(1): p. 63.
6. D'Hooghe, T.M., et al., *Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved?* *Semin Reprod Med*, 2003. **21**(2): p. 243-54.
7. Alkatout, I., et al., *Endometriosis: A concise practical guide to current diagnosis and treatment*. *J Turk Ger Gynecol Assoc*, 2018. **19**(3): p. 173-175.
8. JA, S., *Heterotopic or misplaced endometrial tissue*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 1925. **10**(5): p. 649-664.
9. Halme, J., et al., *Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis*. *Obstet Gynecol*, 1984. **64**(2): p. 151-4.
10. Matalliotakis, I.M., et al., *Epidemiological characteristics in women with and without endometriosis in the Yale series*. *Arch Gynecol Obstet*, 2008. **277**(5): p. 389-93.
11. Vercellini, P., et al., *Menstrual characteristics in women with and without endometriosis*. *Obstet Gynecol*, 1997. **90**(2): p. 264-8.
12. Bulletti, C., et al., *Characteristics of uterine contractility during menses in women with mild to moderate endometriosis*. *Fertil Steril*, 2002. **77**(6): p. 1156-61.
13. P, G., *Origin of endometriosis from mesenchym of the celomic walls*. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 1942. **44**(3): p. 470-4.
14. Aghajanova, L., et al., *Unique transcriptome, pathways, and networks in the human endometrial fibroblast response to progesterone in endometriosis*. *Biol Reprod*, 2011. **84**(4): p. 801-15.
15. Kim, J.J., T. Kurita, and S.E. Bulun, *Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer*. *Endocr Rev*, 2013. **34**(1): p. 130-62.
16. Matarese, G., et al., *Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease?* *Trends Mol Med*, 2003. **9**(5): p. 223-8.
17. Christodoulakos, G., et al., *Pathogenesis of endometriosis: the role of defective 'immunosurveillance'*. *Eur J Contracept Reprod Health Care*, 2007. **12**(3): p. 194-202.
18. Cramer, D.W. and S.A. Missmer, *The epidemiology of endometriosis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **955**: p. 11-22; discussion 34-6, 396-406.
19. Beckmann, M., et al., *AWMF Leitlinie (S2k): Diagnostik und Therapie der Endometriose, Langfassung, AWMF Register Nummer 015/045*. 2020.
20. Fassbender, A., et al., *Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 130854.
21. Ahn, S.H., V. Singh, and C. Tayade, *Biomarkers in endometriosis: challenges and opportunities*. *Fertil Steril*, 2017. **107**(3): p. 523-532.
22. Demirkiran, F., et al., *Which is the best technique for endometrial sampling? Aspiration (pipelle) versus dilatation and curettage (D&C)*. *Arch Gynecol Obstet*, 2012. **286**(5): p. 1277-82.

23. Ferrero, S., F. Barra, and U. Leone Roberti Maggiore, *Current and Emerging Therapeutics for the Management of Endometriosis*. *Drugs*, 2018. **78**(10): p. 995-1012.
24. Practice Committee of the American Society for Reproductive, M., *Endometriosis and infertility: a committee opinion*. *Fertil Steril*, 2012. **98**(3): p. 591-8.
25. Selcuk, I. and G. Bozdog, *Recurrence of endometriosis; risk factors, mechanisms and biomarkers; review of the literature*. *J Turk Ger Gynecol Assoc*, 2013. **14**(2): p. 98-103.
26. (WHO), W.H.O. *International Classification of Diseases, 11th Revision (ICD-11)*. 2018; Available from: icd.who.int/browse11/l-m/en.
27. Mascarenhas, M.N., et al., *National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys*. *PLoS Med*, 2012. **9**(12): p. e1001356.
28. Polanski, L.T., et al., *What exactly do we mean by 'recurrent implantation failure'? A systematic review and opinion*. *Reprod Biomed Online*, 2014. **28**(4): p. 409-23.
29. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address, a.a.o., *Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion*. *Fertil Steril*, 2020. **113**(3): p. 533-535.
30. Boivin, J., et al., *International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care*. *Hum Reprod*, 2007. **22**(6): p. 1506-12.
31. Leridon, H., *Studies of fertility and fecundity: comparative approaches from demography and epidemiology*. *C R Biol*, 2007. **330**(4): p. 339-46.
32. Deroux, A., et al., *Female Infertility and Serum Auto-antibodies: a Systematic Review*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2017. **53**(1): p. 78-86.
33. Sharma, R., et al., *Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2013. **11**: p. 66.
34. Missmer, S.A., et al., *Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors*. *Am J Epidemiol*, 2004. **160**(8): p. 784-96.
35. Schwartz, D. and M.J. Mayaux, *Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands*. *Federation CECOS. N Engl J Med*, 1982. **306**(7): p. 404-6.
36. Saraswat, L., et al., *Pregnancy outcomes in women with endometriosis: a national record linkage study*. *BJOG*, 2017. **124**(3): p. 444-452.
37. Harb, H.M., et al., *The effect of endometriosis on in vitro fertilisation outcome: a systematic review and meta-analysis*. *BJOG*, 2013. **120**(11): p. 1308-20.
38. Parente Barbosa, C., et al., *The effect of hormones on endometriosis development*. *Minerva Ginecol*, 2011. **63**(4): p. 375-86.
39. Santulli, P., et al., *MAP kinases and the inflammatory signaling cascade as targets for the treatment of endometriosis?* *Expert Opin Ther Targets*, 2015. **19**(11): p. 1465-83.
40. Oosterlynck, D.J., et al., *Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium*. *Fertil Steril*, 1991. **56**(1): p. 45-51.
41. Zeitoun, K., et al., *Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(12): p. 4474-80.
42. Attia, G.R., et al., *Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(8): p. 2897-902.
43. Bulun, S.E., et al., *Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol*. *Mol Cell Endocrinol*, 2006. **248**(1-2): p. 94-103.
44. Giudice, L.C. and L.C. Kao, *Endometriosis*. *Lancet*, 2004. **364**(9447): p. 1789-99.

45. Al-Sabbagh, M., E.W. Lam, and J.J. Brosens, *Mechanisms of endometrial progesterone resistance*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **358**(2): p. 208-15.
46. Patel, B., et al., *Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology*. Hum Reprod Update, 2015. **21**(2): p. 155-73.
47. Braun, D.P. and W.P. Dmowski, *Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response*. Curr Opin Obstet Gynecol, 1998. **10**(5): p. 365-9.
48. Sharpe-Timms, K.L., *Endometrial anomalies in women with endometriosis*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **943**: p. 131-47.
49. Jones, R.K., J.N. Bulmer, and R.F. Searle, *Phenotypic and functional studies of leukocytes in human endometrium and endometriosis*. Hum Reprod Update, 1998. **4**(5): p. 702-9.
50. Agic, A., et al., *Is endometriosis associated with systemic subclinical inflammation?* Gynecol Obstet Invest, 2006. **62**(3): p. 139-47.
51. Patel, B.G., et al., *Pathogenesis of endometriosis: Interaction between Endocrine and inflammatory pathways*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2018. **50**: p. 50-60.
52. Lebovic, D.I., M.D. Mueller, and R.N. Taylor, *Immunobiology of endometriosis*. Fertil Steril, 2001. **75**(1): p. 1-10.
53. Miller, J.E., et al., *Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility*. Oncotarget, 2017. **8**(4): p. 7138-7147.
54. Opoien, H.K., et al., *Do endometriomas induce an inflammatory reaction in nearby follicles?* Hum Reprod, 2013. **28**(7): p. 1837-45.
55. Punnonen, J., et al., *Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis*. Am J Obstet Gynecol, 1996. **174**(5): p. 1522-6.
56. Yoshida, S., et al., *A combination of interleukin-6 and its soluble receptor impairs sperm motility: implications in infertility associated with endometriosis*. Hum Reprod, 2004. **19**(8): p. 1821-5.
57. Mansour, G., et al., *The impact of peritoneal fluid from healthy women and from women with endometriosis on sperm DNA and its relationship to the sperm deformity index*. Fertil Steril, 2009. **92**(1): p. 61-7.
58. Muscato, J.J., A.F. Haney, and J.B. Weinberg, *Sperm phagocytosis by human peritoneal macrophages: a possible cause of infertility in endometriosis*. Am J Obstet Gynecol, 1982. **144**(5): p. 503-10.
59. Hunter, R.H., E. Cicinelli, and N. Einer-Jensen, *Peritoneal fluid as an unrecognized vector between female reproductive tissues*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2007. **86**(3): p. 260-5.
60. de Ziegler, D., B. Borghese, and C. Chapron, *Endometriosis and infertility: pathophysiology and management*. Lancet, 2010. **376**(9742): p. 730-8.
61. Jeung, I., K. Cheon, and M.R. Kim, *Decreased Cytotoxicity of Peripheral and Peritoneal Natural Killer Cell in Endometriosis*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 2916070.
62. Hever, A., et al., *Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(30): p. 12451-6.
63. Takebayashi, A., et al., *Subpopulations of macrophages within eutopic endometrium of endometriosis patients*. Am J Reprod Immunol, 2015. **73**(3): p. 221-31.
64. Herrler, A., U. von Rango, and H.M. Beier, *Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation*. Reprod Biomed Online, 2003. **6**(2): p. 244-56.
65. Lessey, B.A., D.I. Lebovic, and R.N. Taylor, *Eutopic endometrium in women with endometriosis: ground zero for the study of implantation defects*. Semin Reprod Med, 2013. **31**(2): p. 109-24.

66. Critchley, H.O., et al., *Role of inflammatory mediators in human endometrium during progesterone withdrawal and early pregnancy*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(1): p. 240-8.
67. Mor, G., et al., *Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1221**: p. 80-7.
68. Karizbodagh, M.P., et al., *Implantation Window and Angiogenesis*. J Cell Biochem, 2017. **118**(12): p. 4141-4151.
69. Varol, C., A. Mildner, and S. Jung, *Macrophages: development and tissue specialization*. Annu Rev Immunol, 2015. **33**: p. 643-75.
70. Holness, C.L. and D.L. Simmons, *Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins*. Blood, 1993. **81**(6): p. 1607-13.
71. Kaldensjo, T., et al., *Detection of intraepithelial and stromal Langerin and CCR5 positive cells in the human endometrium: potential targets for HIV infection*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e21344.
72. Ning, F., H. Liu, and G.E. Lash, *The Role of Decidual Macrophages During Normal and Pathological Pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2016. **75**(3): p. 298-309.
73. Dunselman, G.A., et al., *Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women*. J Reprod Fertil, 1988. **82**(2): p. 707-10.
74. Steele, R.W., W.P. Dmowski, and D.J. Marmer, *Immunologic aspects of human endometriosis*. Am J Reprod Immunol, 1984. **6**(1): p. 33-6.
75. Dmowski, W.P., H. Gebel, and D.P. Braun, *Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytolysis of endometrial cells in endometriosis*. Hum Reprod Update, 1998. **4**(5): p. 696-701.
76. Wang, Y., et al., *The M2 polarization of macrophage induced by fractalkine in the endometriotic milieu enhances invasiveness of endometrial stromal cells*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(1): p. 194-203.
77. Shi, Y.L., et al., *Combination of 17beta-estradiol with the environmental pollutant TCDD is involved in pathogenesis of endometriosis via up-regulating the chemokine I-309-CCR8*. Fertil Steril, 2007. **88**(2): p. 317-25.
78. Yu, J., et al., *Combination of estrogen and dioxin is involved in the pathogenesis of endometriosis by promoting chemokine secretion and invasion of endometrial stromal cells*. Hum Reprod, 2008. **23**(7): p. 1614-26.
79. Khan, K.N., et al., *Differential macrophage infiltration in early and advanced endometriosis and adjacent peritoneum*. Fertil Steril, 2004. **81**(3): p. 652-61.
80. Braun, D.P., et al., *Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis*. Fertil Steril, 2002. **78**(4): p. 830-5.
81. Nagamatsu, T. and D.J. Schust, *The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 460-71.
82. McLaren, J., et al., *Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids*. J Clin Invest, 1996. **98**(2): p. 482-9.
83. Klauber, N., et al., *Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470*. Nat Med, 1997. **3**(4): p. 443-6.
84. Sengupta, J., et al., *Immunoneutralization of vascular endothelial growth factor inhibits pregnancy establishment in the rhesus monkey (Macaca mulatta)*. Reproduction, 2007. **133**(6): p. 1199-211.
85. Torry, D.S., et al., *Angiogenesis in implantation*. J Assist Reprod Genet, 2007. **24**(7): p. 303-15.
86. Young, V.J., et al., *Peritoneal VEGF-A expression is regulated by TGF-beta1 through an ID1 pathway in women with endometriosis*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16859.

87. Yerlikaya, G., et al., *Comprehensive study of angiogenic factors in women with endometriosis compared to women without endometriosis*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2016. **204**: p. 88-98.
88. Bulmer, J.N., et al., *Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies*. Hum Reprod, 1991. **6**(6): p. 791-8.
89. Flynn, L., et al., *Menstrual cycle dependent fluctuations in NK and T-lymphocyte subsets from non-pregnant human endometrium*. Am J Reprod Immunol, 2000. **43**(4): p. 209-17.
90. Fraser, R., et al., *Impaired decidual natural killer cell regulation of vascular remodelling in early human pregnancies with high uterine artery resistance*. J Pathol, 2012. **228**(3): p. 322-32.
91. Giuliani, E., et al., *Characterization of uterine NK cells in women with infertility or recurrent pregnancy loss and associated endometriosis*. Am J Reprod Immunol, 2014. **72**(3): p. 262-9.
92. Robson, A., et al., *Uterine natural killer cells initiate spiral artery remodeling in human pregnancy*. FASEB J, 2012. **26**(12): p. 4876-85.
93. Thiruchelvam, U., M. Wingfield, and C. O'Farrelly, *Increased uNK Progenitor Cells in Women With Endometriosis and Infertility are Associated With Low Levels of Endometrial Stem Cell Factor*. Am J Reprod Immunol, 2016. **75**(4): p. 493-502.
94. Dakhly, D.M., et al., *Intralipid supplementation in women with recurrent spontaneous abortion and elevated levels of natural killer cells*. Int J Gynaecol Obstet, 2016. **135**(3): p. 324-327.
95. Koga, Y., K. Ikeda, and K. Inokuchi, *Effect of complete parenteral nutrition using fat emulsion on liver*. Ann Surg, 1975. **181**(2): p. 186-90.
96. Roussev, R.G., S.C. Ng, and C.B. Coulam, *Natural killer cell functional activity suppression by intravenous immunoglobulin, intralipid and soluble human leukocyte antigen-G*. Am J Reprod Immunol, 2007. **57**(4): p. 262-9.
97. Sax, H.C., *Practicalities of lipids: ICU patient, autoimmune disease, and vascular disease*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1990. **14**(5 Suppl): p. 223S-225S.
98. Kuon, R.J., et al., *Uterine natural killer cells in patients with idiopathic recurrent miscarriage*. Am J Reprod Immunol, 2017.
99. Kitaya, K. and T. Yasuo, *Immunohistochemical and clinicopathological characterization of chronic endometritis*. Am J Reprod Immunol, 2011. **66**(5): p. 410-5.
100. Kitaya, K. and T. Yasuo, *Aberrant expression of selectin E, CXCL1, and CXCL13 in chronic endometritis*. Mod Pathol, 2010. **23**(8): p. 1136-46.
101. Bouet, P.E., et al., *Chronic endometritis in women with recurrent pregnancy loss and recurrent implantation failure: prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis*. Fertil Steril, 2016. **105**(1): p. 106-10.
102. Cicinelli, E., et al., *Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy*. Hum Reprod, 2015. **30**(2): p. 323-30.
103. Johnston-MacAnanny, E.B., et al., *Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization*. Fertil Steril, 2010. **93**(2): p. 437-41.
104. Cicinelli, E., et al., *Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment*. Reprod Sci, 2014. **21**(5): p. 640-7.
105. Li, Y., et al., *Evaluation of peripheral and uterine immune status of chronic endometritis in patients with recurrent reproductive failure*. Fertil Steril, 2020. **113**(1): p. 187-196 e1.
106. Takebayashi, A., et al., *The association between endometriosis and chronic endometritis*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88354.

107. Cicinelli, E., et al., *Higher prevalence of chronic endometritis in women with endometriosis: a possible etiopathogenetic link*. Fertil Steril, 2017.
108. Liu, C., et al., *Neuroinflammation in Alzheimer's disease: chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(12): p. 8342-55.
109. Hedin, K.E., *Chemokines: new, key players in the pathobiology of pancreatic cancer*. Int J Gastrointest Cancer, 2002. **31**(1-3): p. 23-9.
110. Romagnani, P., et al., *CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis*. Trends Immunol, 2004. **25**(4): p. 201-9.
111. Red-Horse, K., et al., *Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface*. J Clin Invest, 2004. **114**(6): p. 744-54.
112. Makrigiannakis, A., et al., *Hormonal and cytokine regulation of early implantation*. Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(5): p. 178-85.
113. Fukuda, J., et al., *Expression of growth-regulated oncogene beta in an endometrial epithelial cell line, HHUA, and cultured human endometrial cells*. J Reprod Immunol, 2003. **59**(1): p. 61-70.
114. Carey, D.J., *Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors*. Biochem J, 1997. **327** (Pt 1): p. 1-16.
115. Leonova, E.I. and O.V. Galzitskaya, *Structure and functions of syndecans in vertebrates*. Biochemistry (Mosc), 2013. **78**(10): p. 1071-85.
116. Hess, A.P., et al., *Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators*. Biol Reprod, 2007. **76**(1): p. 102-17.
117. Geiser, T., et al., *The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO alpha, GRO beta, and GRO gamma activate human neutrophil and basophil leukocytes*. J Biol Chem, 1993. **268**(21): p. 15419-24.
118. Ulukus, M., et al., *Expression of interleukin-8 receptors in endometriosis*. Hum Reprod, 2005. **20**(3): p. 794-801.
119. Teng, Y.H., R.S. Aquino, and P.W. Park, *Molecular functions of syndecan-1 in disease*. Matrix Biol, 2012. **31**(1): p. 3-16.
120. Hayashida, K., et al., *Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding*. Anat Rec (Hoboken), 2010. **293**(6): p. 925-37.
121. Baston-Bust, D.M., et al., *Syndecan-1 knock-down in decidualized human endometrial stromal cells leads to significant changes in cytokine and angiogenic factor expression patterns*. Reprod Biol Endocrinol, 2010. **8**: p. 133.
122. Boeddeker, S.J., et al., *Syndecan-1 knockdown in endometrial epithelial cells alters their apoptotic protein profile and enhances the inducibility of apoptosis*. Mol Hum Reprod, 2014. **20**(6): p. 567-78.
123. Boeddeker, S.J., et al., *Decidualization and syndecan-1 knock down sensitize endometrial stromal cells to apoptosis induced by embryonic stimuli*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0121103.
124. Greeley, E.T., et al., *Evaluation of Syndecan-1 as a Novel Biomarker for Adverse Pregnancy Outcomes*. Reprod Sci, 2020. **27**(1): p. 355-363.
125. Schmedt, A., et al., *Evaluation of placental syndecan-1 expression in early pregnancy as a predictive fetal factor for pregnancy outcome*. Prenat Diagn, 2012. **32**(2): p. 131-7.
126. Hudelist, G., et al., *Diagnostic delay for endometriosis in Austria and Germany: causes and possible consequences*. Hum Reprod, 2012. **27**(12): p. 3412-6.
127. Freitag, N., et al., *Are uterine natural killer and plasma cells in infertility patients associated with endometriosis, repeated implantation failure, or recurrent pregnancy loss?* Arch Gynecol Obstet, 2020. **302**(6): p. 1487-1494.
128. Bayer-Garner, I.B., J.A. Nickell, and S. Korourian, *Routine syndecan-1 immunohistochemistry aids in the diagnosis of chronic endometritis*. Arch Pathol Lab Med, 2004. **128**(9): p. 1000-3.

129. Kitaya, K., et al., *Chronic Endometritis: Potential Cause of Infertility and Obstetric and Neonatal Complications*. Am J Reprod Immunol, 2016. **75**(1): p. 13-22.
130. Kitaya, K., et al., *Live birth rate following oral antibiotic treatment for chronic endometritis in infertile women with repeated implantation failure*. Am J Reprod Immunol, 2017.
131. Tuckerman, E., et al., *Prognostic value of the measurement of uterine natural killer cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage*. Hum Reprod, 2007. **22**(8): p. 2208-13.
132. Meng, L., et al., *Effectiveness and potential mechanisms of intralipid in treating unexplained recurrent spontaneous abortion*. Arch Gynecol Obstet, 2016. **294**(1): p. 29-39.
133. Ledee, N., et al., *Intralipid(R) may represent a new hope for patients with reproductive failures and simultaneously an over-immune endometrial activation*. J Reprod Immunol, 2018. **130**: p. 18-22.
134. Shreeve, N. and K. Sadek, *Intralipid therapy for recurrent implantation failure: new hope or false dawn?* J Reprod Immunol, 2012. **93**(1): p. 38-40.
135. Freitag, N., et al., *Eutopic endometrial immune profile of infertility-patients with and without endometriosis*. Journal of Reproductive Immunology, 2022. **150**: p. 103489.
136. Thiruchelvam, U., et al., *The importance of the macrophage within the human endometrium*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(2): p. 217-25.
137. Berbic, M., et al., *Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis*. Hum Reprod, 2009. **24**(2): p. 325-32.
138. Faas, M.M. and P. de Vos, *Uterine NK cells and macrophages in pregnancy*. Placenta, 2017. **56**: p. 44-52.
139. Auffray, C., et al., *Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior*. Science, 2007. **317**(5838): p. 666-70.
140. Smith, S.K., *Vascular endothelial growth factor and the endometrium*. Hum Reprod, 1996. **11 Suppl 2**: p. 56-61.
141. Takehara, M., et al., *Vascular endothelial growth factor A and C gene expression in endometriosis*. Hum Pathol, 2004. **35**(11): p. 1369-75.
142. Chen, X., et al., *Hypoxia inducible factor and microvessels in peri-implantation endometrium of women with recurrent miscarriage*. Fertil Steril, 2016. **105**(6): p. 1496-1502 e4.
143. Chen, X., et al., *Physiological and pathological angiogenesis in endometrium at the time of embryo implantation*. Am J Reprod Immunol, 2017. **78**(2).
144. Nasu, K., et al., *Expression and regulation of growth-regulated oncogene alpha in human endometrial stromal cells*. Mol Hum Reprod, 2001. **7**(8): p. 741-6.
145. Lai, T.H., et al., *Immunological localization of syndecan-1 in human endometrium throughout the menstrual cycle*. Fertil Steril, 2007. **87**(1): p. 121-6.
146. Chen, X., et al., *Association between chronic endometritis and uterine natural killer cell density in women with recurrent miscarriage: clinical implications*. J Obstet Gynaecol Res, 2020. **46**(6): p. 858-863.

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben.

Ich danke Frau Prof. Dr. Bielfeld und Frau Dr. Baston-Büst für das in mich gesetzte Vertrauen und für die Bereitstellung der Rahmenbedingungen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt dem Laborteam des UniKiD Kinderwunschzentrums Düsseldorf für die herzliche Aufnahme, Einarbeitung und Förderung. Dabei möchte ich besonders Frau Dr. Sarah Pour, Frau Alexandra Knebel und Frau Djamila Haramustek für die Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Dirk Schramm, der in mir die Begeisterung für die Wissenschaft geweckt hat und mir stets unterstützend zur Seite stand.

Ich möchte weiterhin meiner Familie und meinen Freunden für ihre Geduld, Ermutigungen und Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation danken. Ohne den Rückhalt und die Unterstützung, die ich jeden Tag durch euch erfahre, wäre ich nicht da, wo ich heute bin.