

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

**Der Einfluss von maternalem Übergewicht mit und ohne  
Gestationsdiabetes mellitus auf die Homöostase und Funktionalität  
von Trophoblasten der plazentaren Transferzone**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Elena Konietzko  
aus Oberhausen

promoviert am 13. August 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
Druckjahr 2024

Dekan:                    Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter:        Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

2. Gutachterin:     Professorin Dr. med. G. Rahimi

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Dötsch  
Frau Dr. rer. nat. Sarah Appel  
Frau Dr. med. Eva-Maria Turnwald  
Dr. rer. nat. Tobias Kretschmer  
Dr. Jeremy Franklin  
Anne Adams  
Maria Wohlfahrt

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Das Studienformat wurde im Zusammenschluss mit Univ.-Prof. Dr. Jörg Dötsch, Dr. rer. nat. Sarah Appel und Dr. med. Eva Maria Turnwald erstellt. Dabei erfolgte mit Hilfe der Geburtshilfe der Frauenklinik der Universitätsklinik Köln unter der Leitung von Herrn Dr. Berthold Grüttner die Rekrutierung der Probandinnen sowie die Datenerhebung dieser. Im Rahmen der Studie erfolgten Aufklärungs- und Anamnesegespräche sowie Blutentnahmen von den Probandinnen, welche von mir oder weiteren Mitarbeitern der Cologne Placenta Cohort (CPC) (Judith Fischbach, Chiara Faridi, Lisa Marie Sgonina, Pavel Pavlov, Marie Wolte, Franziska Neu, Jana Thomas und Catharina Gündel) durchgeführt wurden. Die Entnahme von mütterlichen Nüchtern-Blutplasma erfolgte durch die Klinik für Anästhesiologie der Universitätsklinik Köln. Die laborchemischen Analysen der erworbenen Blutproben wurden durch das Labor des Institutes für Klinische Chemie der Uniklinik Köln ausgeführt. Des Weiteren fand die Präparation und Asservierung der erlangten Gewebeproben durch mich sowie durch oben genannte Mitarbeiter unter der Supervision von Dr. rer. nat. Sarah Appel, Dr. med. Eva-Maria Turnwald und Maria Wohlfahrt statt. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch die medizinisch-technische Assistentin Frau Maria Wohlfahrt von mir selbstständig und ausschließlich von mir ausgeführt worden. Das Prozedere der Zellzahlbestimmung im Rahmen eines Experiments wurde mit Hilfe von Dr. rer. nat. Tobias Kretschmer erlangt. Die statistische Auswertung, deren Interpretation und die graphische Darstellung der in den Experimenten erhobenen Daten erfolgte nach Beratung durch die Mitarbeiter Dr. Jeremy Franklin und Anne Adams des Instituts für Medizinische Statistik und Bioinformatik Köln ausschließlich durch meine Person.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 28.02.2024

Unterschrift:

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörg Dötsch für die Überlassung des Forschungsprojekts und dem damit verbundenen Zugang zum wissenschaftlichen Arbeiten sowie kritischen Denken.

Auch möchte ich Dr. Sarah Appel und Dr. Eva-Maria Turnwald meinen Dank für die hervorragende Betreuung sowie enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit aussprechen.

Außerdem möchte ich mich bei Maria Wohlfahrt, die mich im Rahmen meiner Arbeit stets mit viel Geduld und Rat begleitet hat, bedanken.

Des Weiteren muss ich zudem Dr. Tobias Kretschmer meinen Dank äußern, der meine Arbeit durch seine Unterstützung und Gedanken beeinflusst hat.

Zusätzlich gilt mein Dank den Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Statistik und Bioinformatik Köln, insbesondere Dr. Jeremy Franklin und Anne Adams, für die Unterstützung bei der Auswertung meiner Ergebnisse.

Meinen Eltern Mihaela und Michael Konietzko danke ich für ihre Ermutigungen während des Studiums und der Erstellung dieser Doktorarbeit.

Ebenso danke ich meinen Freunden und allen Personen, die mir nah stehen, für ihre Zusprüche und die gemeinsamen Erlebnisse während meines Studiums.

Für meine Eltern  
Mihaela und Michael Konietzko

Widmung

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>8</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>10</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
2.1. Übergewicht in der Gesellschaft	11
2.1.1. Übergewicht mit und ohne Gestationsdiabetes in der Schwangerschaft	11
2.2. Die humane Plazenta und ihre Entwicklung	14
2.2.1. Aufbau der reifen Plazenta	14
2.2.2. Die Plazentaschranke	15
2.2.3. Der (extravillöse) Trophoblast	16
2.3. Einfluss von Übergewicht mit und ohne GDM auf die Plazenta	17
2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	19
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
3.1. Materialien	20
3.1.1. Zellkulturprodukte	20
3.1.2. Gebrauchsmaterialien	20
3.1.3. Lösungen, Puffer und Chemikalien	21
3.1.4. Geräte und Softwares	22
3.2. Methoden der klinischen Arbeit	24
3.3. Methoden der experimentellen Arbeit	26
3.3.1. Grundlagen der Zellkulturversuche	27
3.3.2. Auftauen der Zellen	27
3.3.3. Passagieren der Zelle	27
3.3.4. Bestimmung der Zellzahl	28
3.3.5. Aussaat und Stimulation	28
3.3.6. Apoptoseassay	29
3.3.7. Proliferations-/Viabilitätsassay	29
3.3.8. Seneszenz-assoziierte Beta-Galactosidase Färbung	30
3.3.9. Invasionsassay	31

<b>3.4.</b>	<b>Statistische Analyse</b>	<b>32</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
4.1.	Apoptoseassay	36
4.2.	Proliferations-/Viabilitätsassay	38
4.3.	Seneszenz-assoziierte Beta-Galactosidase Färbung	40
4.4.	Invasionsassay	40
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>43</b>
5.1.	Der Einfluss von Übergewicht mit und ohne GDM auf die Homöostase von Trophoblasten	43
5.2.	Der Einfluss von Übergewicht mit und ohne GDM auf die Invasivität von humanen Trophoblasten	47
5.3.	Der Einfluss der chronischen Inflammation in übergewichtigen Schwangeren auf das Apoptose- und Invasionsverhalten von Trophoblasten	48
5.4.	Stärken und Schwächen der Studie	52
5.4.1.	Stärken und Schwächen der statistischen Auswertung	53
5.5.	Fazit und Ausblick	54
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>69</b>
7.1.	Abbildungsverzeichnis	69
7.2.	Tabellenverzeichnis	69

## Abkürzungsverzeichnis

AD	Adipositas
ANOVA	Varianzanalyse
BMI	Body-Mass-Index in kg/m <sup>2</sup>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C°	Grad Celsius
ca.	circa
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CPC	Cologne Placenta Cohort
CRP	C-Reaktives Protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dl	Deziliter
DMF	Dimethylformamid
DPBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung
DSMO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
EVT	Extravillöser Trophoblast
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Zentrifugalbeschleunigung
GDM	Gestationsdiabetes Mellitus
h	Stunde
IGF-1	Insulin Wachstumsfaktor 1
kg	Kilogramm
l	Liter
LDL	Low-Density-Lipoprotein
m	Meter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
Md	Median
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar

mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mU	Milliunits
MW	Mittelwert
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
NG	Normalgewicht
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
oGTT	Oraler Glukosetoleranztest
p	p-Wert
PBS	Phosphat Buffered Saline
pH	potentia hydrogenii
P/S	Penicillin/Streptomycin
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SS	Schwangerschaft
SSW	Schwangerschaftswoche
SV40	Simian-Virus 40
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
U	Units (Einheiten)
U/min	Umdrehungen pro Minuten
ÜG	Übergewicht
WHO	Weltgesundheitsorganisation
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
$\alpha$	Irrtumswahrscheinlichkeit
%	Prozent
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ M	Mikromolar
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ l	Mikroliter

## 1. Zusammenfassung

Maternales Übergewicht mit und ohne Gestationsdiabetes mellitus (GDM) während der Schwangerschaft ist mit negativen gesundheitlichen Folgen für die Nachkommen assoziiert. Dabei wird das Übergewicht durch einen Body-Mass-Index (BMI)  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$  definiert. Bei der Ausbildung von gesundheitlichen Komplikationen der Nachfahren wird die Plazenta als zentraler Punkt vermutet. Explizit die placentaren Trophoblastzellen, welche substanziiell für die Entwicklung einer funktionsfähigen Plazenta sind und durch den Kontakt zum mütterlichen Blut eine direkte Verbindung zur maternalen Umwelt haben. Das maternale Übergewicht (BMI  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) steht hierbei in der Diskussion, Veränderungen im laborchemischen Profil der Schwangeren zu induzieren und damit zu einer veränderten Homöostase und Funktion der placentaren Trophoblastzellen beizutragen. Um diese Annahme zu validieren, wurden die bereits eingeschlossenen Patientinnen der Cologne Placenta Cohorte (CPC) in die Gruppen Normalgewicht bei einem BMI 18,5-24,9  $\text{kg/m}^2$ , Übergewicht (BMI  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) ohne GDM und Übergewicht mit GDM (BMI  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$  mit GDM) unterteilt. Von diesen drei Gruppen wurden jeweils drei Patientinnen für Zellkulturversuche an humanen Trophoblastzellen (HTR-8/SVneo (ATCC CRL-3271)) selektiert. Die Zellen wurden mit dem Serum der ausgewählten Studienteilnehmerinnen stimuliert und anschließend auf ihr Apoptose-, Proliferations- und Seneszenz- sowie Invasionsverhalten untersucht. Hierbei zeigten die Zellen, die mit dem Serum der Mütter aus der Übergewicht-Gruppe stimuliert wurden, im Vergleich zu der Gruppe mit Patientinnen unter Normalgewicht eine signifikant erhöhte Apoptoserate, während die Invasionsrate im Verhältnis signifikant vermindert war. In der Übergewicht-Gruppe mit GDM waren im Vergleich zur Normalgewicht-Gruppe keine signifikanten Abweichungen in den Apoptose- oder Invasionsraten ersichtlich. Ebenso ergaben sich bei den Messungen zum Proliferations- und Seneszenzverhalten keine aussagekräftigen bzw. auswertbaren Ergebnisse zwischen den Studiengruppen. Die beschriebenen Resultate der Studie stehen der Hypothese, dass ein maternaler BMI  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$  zu einer veränderten Homöostase und Funktion von placentaren Trophoblasten führt, fördernd gegenüber. Mögliche Veränderungen im Laborprofil der übergewichtigen Schwangeren könnten erhöhte Apoptose- und verminderte Invasionsraten bedingen, welche zur Beeinträchtigung der placentaren Entwicklung und Funktion führen und damit die gesundheitliche Entwicklung der Nachkommen nachteilig beeinflussen könnten. Um auf langfristiger Ebene placentaren Störungen sowie negativen gesundheitlichen Folgen für die Nachfahren übergewichtiger Mütter mit und ohne GDM vorzubeugen, ist die Erforschung der Pathomechanismen in diesem Zusammenhang unabdingbar.

## 2. Einleitung

### 2.1. Übergewicht in der Gesellschaft

Ein in der Gesellschaft zunehmendes Krankheitsbild ist die Adipositas (AD) der Weltbevölkerung, deren Prävalenz der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge in den letzten Jahrzehnten gravierend zugenommen hat.<sup>1</sup> Die Expansion des weltweiten Anteils an Übergewichtigen oder Adipösen stellt somit Gesundheitssysteme des 21. Jahrhunderts auf internationaler Ebene vor eine enorme Herausforderung und Kosten.<sup>2,3</sup> Übergewicht (ÜG) wird als anormale Steigerung des Körperfettanteils definiert, wobei das Ausmaß der Fettleibigkeit mittels des Body-Mass-Index (BMI) kategorisiert werden kann. Zum Ermitteln des BMI muss der Quotient aus Körpergewicht und Körpergröße zum Quadrat berechnet werden. Im Rahmen dessen gilt ein Wert von 18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup> als Normalgewicht (NG), ein Wert von  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> als ÜG und ein BMI von  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> als AD. Letzteres kann zusätzlich noch in drei Schweregrade gegliedert werden. Grad I beschränkt sich dabei auf einen BMI von 30-34,9 kg/m<sup>2</sup>, Grad II auf Werte von 35-39,9 kg/m<sup>2</sup> und Grad III gilt ab einem BMI von  $\geq 40$  kg/m<sup>2</sup>.<sup>4</sup>

#### 2.1.1. Übergewicht mit und ohne Gestationsdiabetes in der Schwangerschaft

Auch in der Geburtshilfe machen sich die weltweit hohen Zahlen der an ÜG Erkrankten bemerkbar. So sind derzeit ca. ein Drittel aller sich im reproduktiven Alter befindenden Frauen übergewichtig oder adipös.<sup>5</sup> ÜG während der Schwangerschaft (SS) kann sowohl kurzfristige als auch langfristige Folgen mit sich bringen und führt unter anderem zu erhöhter Morbidität und Mortalität bei Mutter und Kind.<sup>6,7</sup> Außerdem sinkt mit steigendem Gewicht die Möglichkeit einer vaginalen Entbindung, während sich die Indikation zur Sectio caesarea erhöht.<sup>8</sup> Im Rahmen der Entbindung besteht zusätzlich für übergewichtige Schwangere ein vergrößertes Risiko für Wundinfektionen der Sectionaht<sup>9</sup> sowie thrombotische Ereignisse<sup>10</sup>. Schwangere mit erhöhtem Gewicht sind ebenfalls gefährdeter eine Präeklampsie zu entwickeln, welche mit hypertensiven Entgleisungen und einer Proteinurie einhergeht.<sup>11</sup> Des Weiteren konnte anhand einer Metaanalyse beobachtet werden, dass Schwangere mit einem BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> ein gesteigertes Risiko für Fehlgeburten aufweisen.<sup>12</sup> Auf fetaler Seite hingegen zeigte sich ein vergrößertes Risiko für ein makrosomes Geburtsgewicht von über 4000 g.<sup>13</sup> Zusätzlich beschreibt die Literatur eine Forcierung des postnatalen Wachstums sowie ein erhöhtes Ausmaß des Körperfettanteils in Nachfahren von übergewichtigen Ratten.<sup>14</sup> Hier korreliert vor allem ein gesteigerter maternaler BMI vor der SS sowie die Zunahme von Gewicht in dieser positiv mit dem Risiko der Nachkommen, ebenso im späteren Leben an ÜG zu erkranken.<sup>15</sup> Mit Blick auf Bevölkerungsstudien lässt sich des Weiteren vernehmen, dass Kinder von übergewichtigen Schwangeren postpartal anfälliger für Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind.<sup>16</sup>

So zeigten Kinder übergewichtiger Mütter nach der Geburt unter anderem ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Bluthochdrucks<sup>17</sup> und metabolischen Syndroms<sup>18</sup>. Außerdem beschreibt die Literatur ein vergrößertes Risiko für die Entwicklung einer Insulinresistenz<sup>19</sup> sowie gesteigerte Leptinspiegel im Nabelschnurblut von Nachkommen übergewichtiger Mütter im Vergleich zu normalgewichtigen Müttern.<sup>20</sup> Erhöhte Leptinspiegel konnten des Weiteren auch im Serum übergewichtiger Erwachsenen nachgewiesen werden.<sup>21</sup> Hier anlehnd wird ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Asthma bei Kindern von übergewichtigen Schwangeren und den mit maternalem ÜG einhergehenden gesteigerten Leptinkonzentrationen im Nabelschnurblut beschrieben.<sup>22</sup> Abgesehen von entzündlich bedingten pulmonalen Störungen kann maternales ÜG laut Literatur auch negativen Einfluss auf die Entwicklung und Funktion der fetalen Lunge nehmen.<sup>23-25</sup> Zusätzlich geben Studien Anhaltspunkte dafür, dass Nachkommen von übergewichtigen Schwangeren vermehrt neurologischen Entwicklungsstörungen ausgesetzt sind. So zeigten diese Kinder einen verminderten Intelligenzquotienten<sup>26,27</sup> sowie ein vermehrtes Auftreten von Zerebralpareesen<sup>28-30</sup> und affektiven Störungen<sup>31</sup>. Als weitere SS-Komplikation übergewichtiger Mütter ist der Gestationsdiabetes (GDM) zu nennen.<sup>32</sup> Hierbei handelt es sich um eine Glukosetoleranzstörung, die sich in der SS bemerkbar macht.<sup>33</sup> Gegenwärtig wurde der GDM im Rahmen einer Metanalyse von 2021 in Europa bei einer Prävalenz von 10,9 % geschätzt.<sup>34</sup> Nach den deutschen Mutterschaftsrichtlinien wird ein GDM primär mit Hilfe eines 50-g-GCT (Glucose-Challenge-Test) diagnostiziert. Hierfür wird der Schwangeren 50 g Glukose zum Trinken in Wasser gelöst. Eine Stunde nach oraler Aufnahme wird der Glukosewert im Blut bestimmt. Ein Blutglukosewert von > 200 mg/dl führt zur unmittelbaren Diagnose eines GDM, während ein Wert von  $\geq 135$  mg/dl weitere Diagnostik mittels eines 75 g oralen-Glukosetoleranztests bedingt. Hierbei wird zu drei verschiedenen Zeitpunkten der Blutglukosewert mit folgenden pathologischen Grenzwerten bestimmt: Nüchtern:  $\geq 92$  mg/dl, eine Stunde nach Einnahme der Glukoselösung  $\geq 180$  mg/dl, zwei Stunden nach Einnahme  $\geq 153$ mg/dl. Beim Überschreiten einer der genannten Grenzwerte kann die Diagnose eines GDM gestellt werden.<sup>35</sup> Langfristig sind sowohl die übergewichtigen Schwangeren mit der Diagnose eines GDM als auch ihr ungeborenes Kind anfälliger für Stoffwechselstörungen und Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems.<sup>36,37</sup> So demonstrierten Studien an Geschwisterkindern, dass jenes Kind, das sich intrauterin im Rahmen einer GDM-SS entwickelte, einen höheren BMI aufwies sowie anfälliger für die Entwicklung eines Diabetes Typ 2 war als jenes mit einer Mutter ohne GDM während der SS.<sup>38</sup> Daran anknüpfend konnten Studien zeigen, dass Föten, die intrauterin erhöhten Glukosespiegeln ausgesetzt waren, eine aberrante Insulinsensitivität sowie -sekretion im späteren Leben aufwiesen.<sup>39</sup> Gründe hierfür sind die im Rahmen der Hyperglykämie erhöhten Insulinspiegeln, die nachhaltig die Pankreaszellen des Fötus schädigen und damit eine Insulinresistenz des ungeborenen Kindes verursachen

können.<sup>40</sup> Abgesehen von erhöhten Insulinspiegeln wird eine Hyperglykämie während der SS auch mit vermehrt vorkommenden insulinähnlichem Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) im Fötusalter in Verbindung gebracht. Diese fördern die Überwucherung des Fötus intrauterin und können damit zum Zeitpunkt der Geburt eine Makrosomie bedingen.<sup>41</sup> Hier rückt die Pedersen Hypothese in den Fokus. Jene nimmt an, dass die aberrante Größenzunahme des ungeborenen Kindes, bedingt durch eine fetale Hyperinsulinämie, auf erhöhte Konzentrationen von zirkulierender Glukose und anderen Nährstoffen in der Schwangeren, welche die Plazenta passieren können, zurückzuführen ist. Die dadurch vermehrte Bereitstellung von Glukose sowie anderweitigen Nährstoffen gegenüber dem ungeborenen Kind induziert eine verstärkte fetale Produktion von Insulin.<sup>42</sup> Eine Makrosomie fördert das Risiko für eine Schulterdystokie, sodass Kinder von Müttern mit GDM meistens mittels Kaiserschnitts zur Welt gebracht werden.<sup>43,44</sup> Zusätzlich vermuten Studien eine Erhöhung des Risikos für Totgeburten in GDM-SS.<sup>45</sup> Postnatal hingegen wird ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Hypoglykämien und der intrauterinen Abhängigkeit des Fötus von der maternalen Hyperglykämie beschrieben.<sup>46</sup> Im Verlauf des Lebens steigt, wie bereits angedeutet, das Risiko von Kindern mit GDM-Müttern für Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie damit einhergehenden Stoffwechselerkrankungen. Dahingehend waren Kinder aus GDM-SS nahezu doppelt so anfällig für Fettleibigkeit und Glukosetoleranzstörungen als Kinder nichtdiabetischer Mütter.<sup>47-49</sup> Diese Kurz- und Langzeitfolgen vergrößern bei weiblichen Nachkommen, die in einer GDM-SS geboren wurden, das Risiko im späteren Leben ebenso an einem GDM zu erkranken, welcher in Rahmen einer Abwärtsspirale wieder einen GDM bei deren Kinder bedingen kann.<sup>50</sup> Die oben beschriebenen Aspekte bezüglich ÜG mit und ohne GDM in der SS lassen schlussfolgern, dass das intrauterine Umfeld eine Schlüsselrolle in der gesundheitlichen Entwicklung des ungeborenen Kindes einnimmt. Das heißt, der Fötus ist maßgeblich von den intrauterinen Einflüssen abhängig.<sup>51-53</sup> Hierauf beziehend rückt die Plazenta in den Fokus, welche als Versorgungsschnittstelle zwischen Mutter und Fötus fungiert.<sup>54</sup> Denn mütterliches ÜG während der SS wird mit Veränderungen in der plazentaren Entwicklung sowie der perinatalen Programmierung assoziiert, welche einen negativen Einfluss auf den kurz- und langfristigen gesundheitlichen Zustand des Kindes haben könnten.<sup>51-53</sup> Hierbei ist beziehend auf die oben genannten Aspekte vor allem der Einfluss von ÜG mit und ohne GDM auf die humane Plazentaschranke von Interesse, da diese, als eigentliche Barriere zwischen Mutter und Fötus, eine Schlüsselrolle bei der intrauterinen Versorgung des ungeborenen Kindes spielt.<sup>55,56</sup>

## **2.2. Die humane Plazenta und ihre Entwicklung**

Die Plazenta ist während der Intrauterinzeit als fetomaternales Organ für den Stoff- und Gasaustausch zwischen Mutter und ungeborenem Kind verantwortlich.<sup>57</sup> Dabei umfasst die Entwicklung der reifen Plazenta und dem damit verbundenen fetoplazentaren Kreislauf mehrere intrauterine Vorgänge. Nach erfolgreicher Befruchtung der Eizelle entwickelt sich diese nach Zellteilung und Ausbildung von flüssigkeitsgefüllten Hohlräumen zur Blastozyste. Sechs bis sieben Tage nach der Befruchtung startet die Nidation der Blastozyste, bestehend aus dem inneren Embryoblast und dem umhüllenden Trophoblast, in die Gebärmutter-schleimhaut. Im Rahmen der Implantation unterteilt sich der Trophoblast in den im Inneren gelegenen Zytotrophoblasten und den äußeren Synzytiotrophoblasten.<sup>58</sup> (Lehrbuch) Der Synzytiotrophoblast wandert invasiv in die Uterusschleimhaut, nun Dezidua genannt, ein und bildet dabei Lakunen, welche, nach Arrodierung der dezidualen Spiralarterien, mit arteriellem Blut gespeist werden. Die blutgefüllten Lakunen weiten sich im Verlauf aus und werden von dem Synzytiotrophoblast balkenartig unterteilt, sodass sich zwischen den Lakunen Trabekel darlegen.<sup>58,59</sup> (58: Lehrbuch) Im weiteren Verlauf fusionieren die neu gebildeten Lakunen und erschaffen damit den sogenannten intervillösen Raum.<sup>59,60</sup> (60: Lehrbuch) Mit Eindringen des Zytotrophoblasten in die Trabekel entstehen säulenförmige, in den intervillösen Raum wachsende Strukturen, welche als Primärzotten bezeichnet werden.<sup>61</sup> Nach Einwachsen von extraembryonalem Mesoderm in die Primärzotten entwickeln sich diese zu Sekundärzotten. Im weiteren Verlauf der plazentaren Entwicklung bilden sich abschließend die Tertiärzotten. Hierfür wachsen innerhalb des mesodermalen Zottenkerns fetale Blutkapillaren heran.<sup>58,62</sup> (58: Lehrbuch) Das Fundament für den fetoplazentaren Kreislauf ist geschaffen.<sup>62</sup>

### **2.2.1. Aufbau der reifen Plazenta**

Die Plazenta gilt ab der 13. Schwangerschaftswoche (SSW) als voll entwickelt. In diesem Stadium ist sie etwa 2 bis 3 cm dick, 500 g schwer und weist einen ungefähren Durchmesser von 20 cm auf. Die reife Plazenta zeigt folgenden charakteristischen dreiteiligen Aufbau: Zum einen die Chorionplatte, welche in Richtung des Fötus gelegen ist. Zum anderen die Basalplatte, die der maternalen Seite zugehörig ist sowie die Zottenbäume, welche vom intervillösen Raum umgeben werden.<sup>58</sup> (Lehrbuch) Die Chorionplatte befindet sich zwischen der Amnionhöhle, in welcher sich das ungeborene Kind intrauterin in Fruchtwasser aufhält, und dem intervillösen Raum.<sup>58,63</sup> (Lehrbücher) Die Bindegewebsschicht in der Chorionplatte wird aus dem extraembryonalen Mesenchym gebildet.<sup>60</sup> (Lehrbuch) Hier integriert lassen sich Äste der Nabelschnurgefäße vorfinden.<sup>58</sup> (Lehrbuch) Zur Amnionhöhle hin wird das extraembryonale Mesoderm von dem Amnionepithel bedeckt. In Richtung des intervillösen Raums hingegen bildet der kontinuierlich auftretende Synzytiotrophoblast sowie der

diskontinuierlich vorkommende Zytotrophoblast die Grenze.<sup>63</sup> (Lehrbuch) Die Basalplatte besteht aus der Dezidua basalis, welche größtenteils der maternalen Seite der reifen Plazenta zuzuordnen ist und von extravillösen Trophoblastzellen durchzogen wird. Die Abgrenzung der Basalplatte zum intervillösen Raum erfolgt durch den Synzytiotrophoblast.<sup>60</sup> (Lehrbuch) Von der Basalplatte ragen des Weiteren verschieden große Plazentasepten in den intervillösen Raum und teilen die Plazenta hierdurch in sogenannte Kotyledone auf.<sup>58,60</sup> (Lehrbücher) Zwischen der Basal- und Chorionplatte befindet sich der intervillöse Raum mit den bereits erwähnten Zottenbäumen.<sup>60</sup> (Lehrbuch) Diese beginnen als ausladende Stammzotten ihr Wachstum von der Chorionplatte aus und gliedern sich in umfängliche Intermediär- und Terminalzotten.<sup>58</sup> (Lehrbuch) Dabei beinhalten die Terminalzotten die Kapillaren, welche für den Nährstoffaustausch zwischen maternalem und fetalem Blut verantwortlich sind.<sup>60</sup> (Lehrbuch) Im Gesamten entsteht somit eine Oberflächenvergrößerung der Plazenta auf 10 bis 14 m<sup>2</sup>.<sup>58</sup> (Lehrbuch) Eine Besonderheit bilden die sogenannten Haftzotten, welche die Plazenta stabilisieren, indem sie sich in der Dezidua verankern.<sup>60</sup> (Lehrbuch)

### **2.2.2. Die Plazentaschranke**

Um einen kontrollierten Stoffaustausch zwischen mütterlichem und fetalem Blut zu gewährleisten, fungiert die Plazentaschranke sowohl als Schnittstelle als auch Barriere für die beiden Blutkreisläufe. Hierfür gelangt sauerstoffarmes Blut über die beiden Umbilikalarterien in die Zottengefäße, während die Umbilikalvene das mit Sauerstoff angereicherte Blut zurück in den fetalen Kreislauf führt.<sup>60</sup> (Lehrbuch) Das mütterliche Blut befindet sich im intervillösen Raum, wo es die Zottenbäume umspült, während die fetalen Gefäße in den Zotten selbst eingebettet sind.<sup>64</sup> Durch diesen spezifischen Aufbau kann die Plazenta ihrer Hauptaufgabe des diaplazentaren Stoffaustauschs zwischen fetalem und maternalem Blut nachgehen, sodass mit Hilfe von Diffusion sowohl die Versorgung des fetalen Blutes mit Sauerstoff als auch der Abtransport von Kohlenstoffdioxid gewährleistet ist.<sup>58</sup> (Lehrbuch) Des Weiteren werden Mechanismen wie die erleichterte Diffusion oder Transporter abhängige Prozesse zum Transferieren von Nährstoffen wie z.B. Fettsäuren, Elektrolyten, Glukose und Aminosäuren genutzt.<sup>60,65,66</sup> (60: Lehrbuch) Unabhängig davon nimmt die Plazenta zusätzlich durch die Synthese von Hormonen endokrine Funktionen ein.<sup>60</sup> (Lehrbuch)

Die Plazentaschranke weist dabei in den ersten Monaten der SS einen typischen Aufbau mit folgenden Bestandteilen auf: Eine kontinuierliche Synzytiotrophoblastenschicht, diskontinuierlich vorkommende Zytotrophoblasten und die anliegende Basallamina der genannten Trophoblasten sowie das zum Zottensystem gehörende Bindegewebe. Zur fetalen Seite hin bilden die Endothelzellen der Zottenkapillaren sowie die dazugehörige Basallamina den restlichen Teil der Plazentaschranke.<sup>60,63</sup> (Lehrbücher) Durch diesen spezifischen Aufbau

wird die Plazenta als hämochorial bezeichnet.<sup>58</sup> (Lehrbuch) Im Verlauf der SS bilden sich einzelne Schichten zurück, sodass die Plazentaschranke langfristig verdünnt wird. Die Umbildung der Plazentaschranke beginnt ca. ab der zweiten SS-Hälfte. Im Synzytiotrophoblast selbst findet ab diesem Zeitpunkt keine Zellteilung mehr statt.<sup>60</sup> (Lehrbuch) Die Zytotrophoblastzellen bilden sich insoweit zurück, dass sie nur noch vereinzelt vorfindbar sind und damit keine gravierende Bedeutung mehr am Konstrukt der Plazentaschranke einnehmen. Die Basallamina des Endothels und der Trophoblastzellen überwinden zusätzlich das Bindegewebe der Zottenbaumstruktur und fusionieren somit zur einer übrigbleibenden Basallamina.<sup>60,63</sup> (Lehrbücher) Auf fetaler Seite expandieren die Kapillaren währenddessen in ihrer Lumenweite und kommen direkt unterhalb des dünnen Synzytiotrophoblasten zu liegen. Hierdurch kann der zunehmende Sauerstoff- und Nährstoffverbrauch des Fötus besser abgedeckt werden.<sup>58</sup> (Lehrbuch)

### **2.2.3. Der (extravillöse) Trophoblast**

Der plazentabildende Trophoblast entstammt dem embryonalen Trophoektoderm, welches für die Bildung der Blastozystenwand verantwortlich ist.<sup>67,68</sup> Im Rahmen der Blastozystenimplantation entstehen zwei Zelltypen: Der villöse und der extravillöse Trophoblast (EVT). Während der villöse Trophoblast sich zum Synzytiotrophoblast, welcher die Plazentazotten umrahmt, differenziert, invadiert der EVT von den Zotten ausgehend in die Dezidua.<sup>68</sup> Dabei unterteilt man den EVT in folgende zwei Unterformen: Den interstitiellen Trophoblasten und den endovaskulären Trophoblasten.<sup>69</sup> Der interstitielle Trophoblast dringt von den Haftzotten aus tiefer in das mütterliche Gewebe ein, während die endovaskulären Trophoblasten als Subpopulation fungierend in die mütterlichen Spiralarterien einwandern.<sup>70,71</sup> Im Rahmen der Einwanderung wird die Verankerung der Plazenta an die uterine Wand gewährleistet sowie ein Umbau der Spiralarterien ermöglicht.<sup>68,72,73</sup> Der Umbau beruht dabei auf einer durch den endovaskulären Trophoblasten induzierten Verringerung des interarteriellen Gefäßwiderstandes, indem unter anderem die Lumenweite vergrößert und der Platz des Endothels vom Trophoblasten übernommen wird. Dieser Prozess stellt den Transfer von Sauerstoff und Nährstoffen zum heranwachsenden Fötus sicher.<sup>60,74,75</sup> (60: Lehrbuch) In diesem Zusammenhang beschreibt die Literatur bei pathologischen SS eine reduzierte Invasion des Trophoblasten mit folglich mangelnder Konvertierung der Spiralarterien, was den Blutfluss im intervillösen Raum und damit die Versorgung des Fötus einschränkt.<sup>68,76</sup> Bezugnehmend auf die Veränderungen in der maternalen Umwelt nimmt die Literatur an, dass diese Einfluss auf die Plazentafunktion nehmen und damit negative Folgen in der gesundheitlichen Entwicklung des Fötus vermitteln.<sup>52</sup> Um auf fetaler Seite diesen Folgen zu entgehen, ist im Rahmen der plazentaren Entwicklung das fehlerfreie Zusammenwirken

verschiedener molekularer Prozesse unabdingbar.<sup>77</sup> Trotz der Tatsache, dass der regelrechten Invasion des Trophoblasten eine erhebliche Relevanz im Entwicklungsprozess des ungeborenen Kindes zukommt, sind die prozessregulierenden Faktoren bisher nicht vollständig bekannt.<sup>78</sup>

### **2.3. Einfluss von Übergewicht mit und ohne GDM auf die Plazenta**

Plazentare Störungen und Veränderungen in der perinatalen Programmierung, welche im Rahmen einer pathologischen intrauterinen Umgebung auftreten, sind Gegenstand der aktuellen Forschung.<sup>51-53</sup> Demnach können in utero stattgefundenen plazentaren Veränderungen die gesundheitliche Entwicklung des Kindes langfristig negativ beeinflussen,<sup>51,52</sup> wobei Störungen, die die Plazenta betreffen, auf unterschiedliche maternale und damit intrauterine Umstände zurückgeführt werden können.<sup>53</sup> In der Literatur diskutierte Gründe stellen dabei maternales ÜG während der SS<sup>79,80</sup> sowie ein GDM<sup>81</sup> dar. Um weitere Einblicke in die Pathomechanismen dieses Sachverhaltes zu erlangen, macht sich die aktuelle Forschung unter anderem Tier- und Zellkulturversuche sowie Studien mit humanen Plazentaprobe zu Nutze. In diesem Zusammenhang zeigten Plazenten von Schwangeren mit ÜG im Vergleich zu Frauen mit NG einen erhöhten Lipidgehalt sowie eine Anreicherung von Makrophagen und proinflammatorischen Mediatoren.<sup>82,83</sup> Dabei wird vermutet, dass die plazentare Immunantwort auf das maternale ÜG Einfluss auf die Funktion der Plazenta nimmt. Hier beschreibt die Literatur vor allem Veränderungen im Fett- und Aminosäuretransport, im Stoffwechsel sowie in der zellulären Antwort der Plazenta auf Insulin.<sup>52,84,85</sup> Des Weiteren konnte bei übergewichtigen Schwangeren eine toxische Komponente im Rahmen von erhöhten Lipidkonzentrationen festgestellt werden. Diese wirkten fördernd auf die Inflammation und beeinträchtigend auf die Plazentainvasion, was zudem mit einer aberranten Plazentafunktion assoziiert wird.<sup>86</sup> Darüber hinaus wurden negative Folgen des Gefäßsystems der humanen Plazenta im Zusammenhang mit maternalem ÜG beschrieben. Hierbei wird als Ursache die chronisch anhaltende Entzündungsaktivität in übergewichtigen Schwangeren diskutiert.<sup>87</sup> Daran anlehnend zeigten Versuche an Ratten eine aberrante Gefäßentwicklung sowie eine plazentare Gewebshypoxie in übergewichtigen Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren mit Standarddiät. Von diesen Ergebnissen ausgehend wurde konkludiert, dass die anormale Entwicklung der plazentaren Gefäße mit einer verringerten Sauerstoffzufuhr des fetalen Gewebes einhergeht und damit ein ungünstigeres Überleben der Nachfahren induziert.<sup>88</sup> Zusätzlich zeigten übergewichtige Schwangere ein vermehrtes Aufkommen an radikalen Sauerstoffspezies in ihrer Plazenta, welches für eine Dysfunktion der Mitochondrien spricht.<sup>89</sup> Bezugnehmend auf einen GDM in der SS konnten Studien nachweisen, dass Plazenten von Schwangeren mit GDM größer und schwerer im Vergleich zu Plazenten aus SS unter NG

waren.<sup>90,91</sup> Zusätzlich zeigten Plazenten von GDM-Müttern eine erhöhte Leptinproduktion, wobei als Grund eine plazentare Insulinresistenz angenommen wurde. Hier vermutet die aktuelle Forschung weiter, dass die veränderten Leptinkonzentrationen der Schwangeren mit GDM zu einer Erleichterung des Transports von Aminosäuren durch die Plazenta führen sowie eine Rolle bei der Ausbildung einer fetalen Makrosomie spielen.<sup>92</sup> Andere literarische Aufzeichnungen beschrieben hingegen ein reduziertes Geburtsgewicht der Nachkommen aus GDM-SS.<sup>93</sup> Zusätzlich zeichneten sich die Plazenten von GDM-Müttern durch ein vermehrtes Vorkommen von unreifen Zotten aus, wobei die Ausbildung einer unreifen Zotte den Sauerstofftransport vom maternalen zum fetalen Kreislauf reduzieren kann.<sup>90</sup> Außerdem haben werdende Mütter mit steigendem BMI, ohne und mit der Diagnose eines GDM, ein höheres Risiko eine Präeklampsie während der SS zu entwickeln.<sup>94-98</sup> Dabei führt eine Präeklampsie laut Literatur während der SS zur Beeinträchtigung der Invasionsfähigkeit von Trophoblasten.<sup>70</sup> Bei diesem Zelltyp handelt es sich um Zellen, die den Großteil des fetalen Anteils der Plazenta bilden.<sup>99</sup> (Lehrbuch) Außerdem ließen Versuchsreihen im Tiermodell beobachten, dass die Anzahl von Trophoblasten in Plazenten übergewichtiger Mäuse vermindert ist.<sup>100</sup> Weitergehend konnten Zellkulturversuche eine schädliche Wirkung von expandierten Insulinkonzentrationen auf Ersttrimester-Trophoblasten nachweisen.<sup>101</sup> Gesteigerte Levels an Seruminsulin können als Folge einer dauerhaften Aufnahme von fettreicher Nahrung auftreten.<sup>102</sup> Die mit erhöhtem Insulinspiegel stimulierten Trophoblastzellen wiesen dabei vermehrt Marker für DNA-Schäden, eine erhöhte Apoptoserate sowie ein reduziertes Überleben auf.<sup>101</sup> Ein weiterer die Plazenta beeinflussender Faktor stellt Glukose dar. Hier zeigten in vitro Studien, dass eine Hyperglykämie zur signifikanten Förderung der Proliferation von Trophoblastzellen führt.<sup>103</sup> Die beschriebenen Erkenntnisse stellen einen möglichen Zusammenhang zwischen der Homöostase und Funktionalität des Trophoblasten und den perinatalen Gegebenheiten der schwangeren Frau dar. Hier ist anzumerken, dass die plazentaren Trophoblasten permanent im Kontakt zum mütterlichen Blut stehen.<sup>56</sup> Studien konnten vermehrt proinflammatorische Faktoren wie bspw. C-Reaktives Protein (CRP) und Leptin im Serum von adipösen Schwangeren finden.<sup>104</sup> Dabei lässt sich eine Verbindung zwischen der in der Literatur beschriebenen chronischen Entzündungsaktivität in Übergewichtigen<sup>105</sup> und dem Trophoblastverhalten der plazentaren Transferzone vermuten. Demnach ist es von großem Interesse zu erfahren, welchen Einfluss das Serum einer übergewichtigen Schwangeren mit und ohne GDM auf die plazentaren Trophoblasten hat. Der Fokus liegt dabei auf dem Verdacht, dass Faktoren im Serum einer übergewichtigen Schwangeren mit und ohne GDM durch Veränderung des Homöostase- und Invasionsverhalten des Trophoblasten eine plazentare Dysfunktion bedingen, welche negativen Einfluss auf die gesundheitliche Entwicklung des Kindes nehmen könnte.

## 2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Dass die gesundheitlichen Umstände einer schwangeren Frau mit ÜG oder GDM maßgeblich Einfluss auf die gesundheitliche Entwicklung des ungeborenen Kindes haben, ist schon seit längerem bekannt.<sup>6,36,51</sup> Im Vordergrund steht dabei als Hauptträger der fetalen Versorgung die Plazenta, welche bei Störungen im Verdacht steht die perinatale Programmierung negativ zu beeinflussen und damit maßgeblich gesundheitliche Folgen für das Kind zu induzieren.<sup>52,53</sup> Ziel des Projektes ist ein umfassenderes Verständnis für die Pathomechanismen der plazentaren Störungen von Frauen, die während ihrer SS an ÜG mit oder ohne GDM litten, auf molekularer Ebene zu erlangen. Dabei stehen die Trophoblasten der plazentaren Transferzone, welche sich im ständigen Kontakt mit dem maternalen Blut befinden, im Fokus.<sup>56</sup> Explizit soll analysiert werden, ob das Serum von übergewichtigen Schwangeren mit und ohne GDM einen Einfluss auf den extravillösen Trophoblasten der humanen Plazenta hat. Diesbezüglich soll vor allem untersucht werden, ob es zu einer Störung in der Homöostase und Invasivität des Trophoblasten kommt. Im Rahmen dessen erfolgten

- 1) eine klinische Datenanalyse mit Rekrutierung einer Studienkohorte und die Erhebung der dazugehörigen Patientendaten sowie die Sammlung von Plazenta- und Blutproben.
- 2) in vitro Zellkulturversuche mit humanen Trophoblasten (HTR-8/SVneo (ATCC CRL-3271)) und humanem Serum von übergewichtigen Schwangeren mit und ohne GDM.

Ein Nachweis eines veränderten Zellverhaltens auf maternaler Seite der Plazentaschranke könnte dabei die Intaktheit der plazentaren Barriere beeinflussen, was wiederherum Störungen in der kindlichen Entwicklung erklären könnte.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

Das geplante Projekt gliedert sich in einen klinischen Abschnitt, in dem von Probandinnen relevante Daten erhoben und maternales Serum gesammelt wurde sowie einen experimentellen Teil, in dem das mütterliche Serum für etablierte Zellkulturversuche mit kommerziell erworbenen Trophoblasten (HTR-8/SVneo (ATCC CRL-3271)) verwendet wurde. Ein genehmigter Ethikantrag liegt vor (#14-244).

##### 3.1.1. Zellkulturprodukte

Produkt	Hersteller, Hauptsitz, Land
Antibiotische Lösung - 10.000 Einheiten/ml Penicillin - 10.000 µg/ml Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HTR-8/SVneo (ATCC CRL-3271)	ATCC, Washington D.C., USA
Phenolrotfreies RPMI-1640 Medium	Gibco, Life Technologies Ltd. Paisley, UK
RPMI-1640 Medium	ATCC, Washington D.C., USA
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Lösung 0,05%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

**Tabelle 1: Zellkulturprodukte**

##### 3.1.2. Gebrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller, Hauptsitz, Land
0,1-10 µl epT.I.P.S LoRetention Dualfilter, Racks	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2-100 µl epT.I.P.S LoRetention Dualfilter, Racks	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2-200 µl epT.I.P.S LoRetention, Racks	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
50-1000 µl epT.I.P.S LoRetention Dualfilter, Racks	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Deckgläser 20 x 20 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckglaspinzette, gebogen	VWR, Radnor, USA
Einmal-Skalpell	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalpipette einzeln steril	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
EPTIPS STANDARD 20-300 µL Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 20 µl, 200 µl, 500 µl	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pipettierhilfen	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Röhre 15 ml, 120x17 mm, PP	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

S-Monovette EDTA	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
S-Monovette Lithium-Heparin-Gel	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
S-Monovette Serum	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Stabpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Superfrost Objektträger	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
TC-Flasche T75, Standard	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
TC-Platte 96 Well, Standard, F	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Transparente 24-Well Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Transparente 96-Well Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Transwell Inserts, 8µm pore size, PET membrane	BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA

**Tabelle 2: Gebrauchsmaterialien**

### 3.1.3. Lösungen, Puffer und Chemikalien

Lösungen	Bestandteile	Endkonzentration
Fixations Lösung	Formaldehyd	2 %
	Glutaraldehyd	0,2 %
	in PBS	variabel
Lysepuffer	HCl	4 mM
	Nonidet™ P 40	0,1 %
	in Isopropanol	variabel
MTT-Lösung	MTT in in Milli-Q® Wasser	5 mg/ml
NaCl Lösung	NaCl in Milli-Q® Wasser	0,9 %
β-Gal Färbelösung	X-Gal gelöst in Dimethylformamid (DMF) 20 mg/ml	1 mg/ml
	Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	2 mM
	Kaliumhexacyanidoferrat (III)	5 mM
	Kaliumhexacyanoferrat (II)-Trihydrat	5 mM
	PBS (pH6)	

**Tabelle 3: Angesetzte Lösungen**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
Caspase-Glo® 3/7 Kit	Promega™ Corporation, Madison, USA

**Tabelle 4: Kommerziell erworbene Kits**

<b>Puffer und Chemikalien</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -frei	Gibco, Life Technologies Ltd. Paisley, UK
Entellan	Merck Millipore, Billerica, USA
Ethanol 70% vergällt mit 1% Methylethylketon	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyde 37 %	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Glutaraldehyde 25 %	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Kaliumhexacyanoferrat (II)-Trihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumhexanoferrate (III)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) ≥98,5 %	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Matrigel, wachstumsfaktorreduziert	BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA
Methanol ≥ 99,9%	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Nonidet™ P 40	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phosphate-buffered saline (PBS)	Biochrom GmbH, Berlin, Germany
Salzsäure 1N	Merck Millipore, Billerica, USA
Staurosporin	Cell Signaling, Danvers, USA
Trypanblau 0,4%	Invitrogen, Waltham, USA
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-galactopyranosid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

**Tabelle 5: Puffer und Chemikalien**

### 3.1.4. Geräte und Softwares

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
Control- System CBM	Olympus, Hamburg, Deutschland
Easypet®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research® Plus Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
GloMax® Multi Detection System	Promega™ Corporation, Madison, USA
Hera Cell 150 CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Immunfluoreszenz – Lampe U-HGLGPS	Olympus, Hamburg, Deutschland
Infinite® M200 pro	Tecan, Männedorf, Schweiz

Invitrogen™ EVOS™ FL-Auto 2 Imaging	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Kalibrierungseinheit Tango	Märzhäuser Sensotech, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop BX43	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop HBO 50, invers	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Joystick	Märzhäuser Sensotech, Wetzlar, Deutschland
Milli-Q® Advantage A10	Merck, Darmstadt, Deutschland
Platteninkubator ELMI DTS-4	ELMI, Kalifornien, USA
Sicherheitswerkbank Golden Line	Kojair, Mänttä-Vilppula, Finnland
Ultra Low Freezer	SANYO, Moriguchi, Präfektur Osaka, Japan
UV Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, USA
Vortex V-1 plus	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, Deutschland
Wasserbad Typ1004	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 5804/5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge ROTINA 420R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

**Tabelle 6: Geräte**

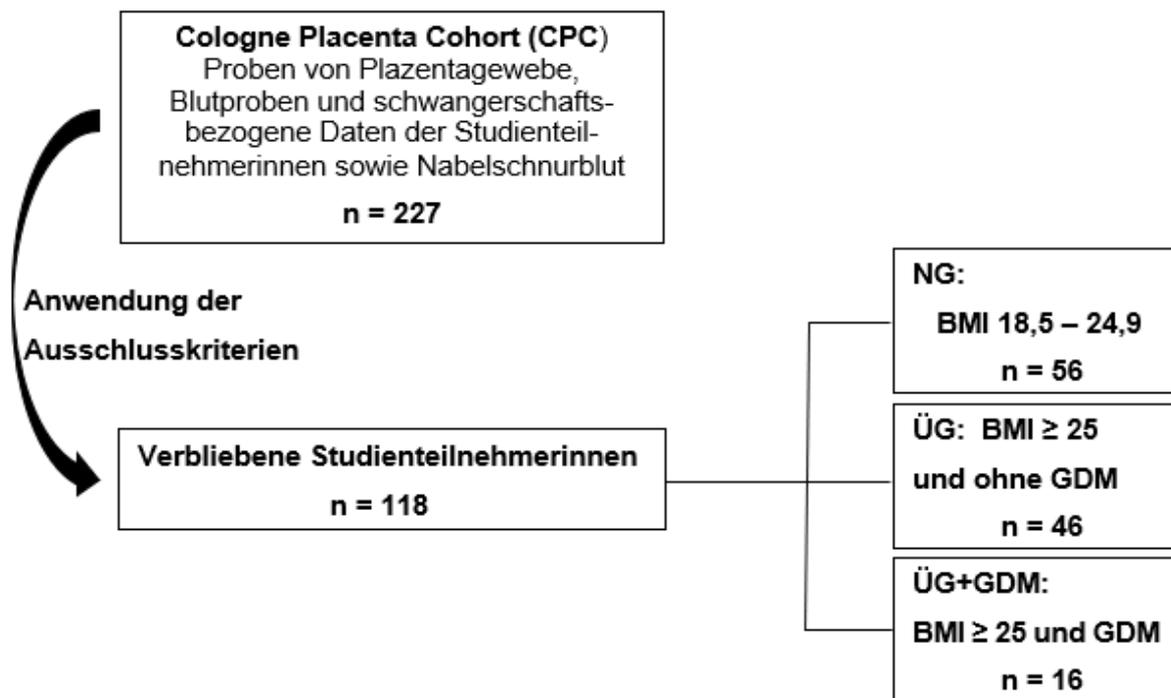
<b>Softwares</b>	<b>Hersteller, Land, Hauptsitz</b>
Cell-Sens Dimension 1.18.	Olympus, Hamburg, Deutschland
Endnote 20.2.1	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
EVOS™ Software	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA
Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
IBM SPSS® Statistics Version 27	IBM, New York, USA
ImageJ v1.53k	Wayne Rasband and contributors, National Institutes of Health, USA
Tecan i-control 2.0	Tecan, Männedorf, Schweiz
Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA

**Tabelle 7: Softwares**

### 3.2. Methoden der klinischen Arbeit

Der klinische Part der Arbeit beinhaltet mehrere Arbeitsschritte. Im Rahmen der Probandinnenrekrutierung für die geplanten Versuche erfolgte die Suche nach Patientinnen mit Indikation zur Sectio caesarea und einer SSW von 35+0 bis 41+6, welche in die Cologne Placenta Cohort der Arbeitsgruppe Appel (Kinderklinik der Universität zu Köln) aufgenommen wurden. Für die vorgesehene Studie wurden die Studienteilnehmerinnen der Kohorte in folgende drei Gruppen unterteilt, wobei die Aufteilung auch graphisch in Abbildung 1 ersichtlich ist:

1. SS unter NG (BMI 18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup>)
2. SS bei maternalem ÜG (BMI ≥ 25 kg/m<sup>2</sup>) und ohne GDM
3. SS mit ÜG und ohne Insulintherapie bzw. diätisch behandeltem GDM (BMI ≥ 25 kg/m<sup>2</sup> und diagnostizierter GDM in der 24.-28. SSW).



**Abbildung 1: Darstellung der Studienkohorte und Versuchsgruppen BMI in kg/m<sup>2</sup>. Die Ausschlusskriterien sind in Tabelle 8 ersichtlich.**

Weitere Einschluss- sowie Ausschlusskriterien für diese Dissertation sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
BMI $\geq$ 18,5 kg/m <sup>2</sup>	Behandlungsbedürftige arterielle Hypertonie
Gestationsalter bei Geburt $\geq$ 36. SSW	Infektion in der SS (z.B. Röteln, Toxoplasmose, Amnioninfektion)
Patientinnenalter $\geq$ 18 Jahre	Infektionskrankheiten (z.B. Hepatitis, HIV)
Sectio caesarea	Medikamenteneinnahme in der SS (z.B. Antibiotika, Antiepileptika, Antidepressiva, Antihypertonika)  Mehrlings-SS  Präeklampsie oder HELLP-Syndrom  Rauchen oder Alkoholabusus während der SS  Schwangere Frauen mit insulinbedürftigem GDM  Schwangere Frauen mit NG ohne nachweislich durchgeführte GDM-Diagnostik  Schwangere Frauen mit GDM unter NG  Vorerkrankungen (z.B. Herzinsuffizienz, maligne oder immunologische Erkrankung, Gerinnungsstörungen, rheumatologische-, neurologische-, gynäkologische-, genetische Erkrankungen)

**Tabelle 8: Ein- und Ausschlusskriterien der Studienkohorte der Dissertation**

Die Patientenrekrutierung erfolgte circa eine Woche vor der geplanten Sectio in der Hebammensprechstunde, in welcher die Patientinnen zur Geburtsplanung vorstellig wurden. Hier wurden potenzielle Probandinnen um die Spende ihrer Plazenta sowie Blutproben gebeten und im Rahmen dessen über die Hintergründe der Studie und die Wahrung der Anonymität aufgeklärt. Falls die Patientinnen der Spende schriftlich zustimmten, erfolgte eine kurze Anamnese, die dazu verhelfen sollte die gesundheitlichen Umstände der werdenden Mütter besser nachvollziehen zu können und sie so der passenden Studiengruppe zuzuordnen. Abschließend erfolgte im Rahmen der Routineblutentnahme die zusätzliche Entnahme eines Serum-Blutröhrchens. Die gewonnene Blutprobe wurden daraufhin im Labor für 10 min bei 3000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Am Tag der Sectio wurde von den Hebammen der Frauenklinik Uniklinik Köln vor Beginn des Eingriffes eine maternale Nüchtern-Plasmaprobe entnommen und diese, nach Geburt des Kindes, mit der Plazenta dem Präparator übergeben. Die an jenem Tag erlangten humanen Proben und Gewebe wurden jedoch im Rahmen des experimentellen Teils nicht weiter genutzt. Des Weiteren wurden SS-bezogene Daten aus der Patientenakte und dem Mutterpass der Patientinnen erhoben. Hierzu gehörten das Körpergewicht und die -größe, Vorerkrankungen und -operationen, die Einnahme von Medikamenten oder Infektionskrankheiten während der SS, die Gravidität und Parität, das Sport-, Ernährungs- und Nikotinverhalten der Probandinnen sowie Eckdaten zu den Neugeborenen. Dabei explizit die Größe, das Gewicht, der Kopfumfang, das Geschlecht und das Gestationsalter des Kindes.

### **3.3. Methoden der experimentellen Arbeit**

Für diesen Teil der Arbeit wurden Zellkulturversuche mit den kommerziell erwerblichen, immortalisierten HTR-8/SVneo (ATCC CRL-3271) Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden im Rahmen der geplanten Versuche mit 5 % Nicht-Nüchternserum (Probengewinnung ca. 1 Woche vor Sectio) der oben genannten Patientengruppen (NG, ÜG, ÜG mit GDM) stimuliert. In jeder Patientengruppe erfolgte die Stimulation der Zellen mit Serum von drei verschiedenen Patientinnen. Um off Target Effekte auszuschließen, wurde auf ein Zusammenführen der Seren der jeweiligen drei Patientinnen einer Gruppe verzichtet. Die durchgeführten Versuche sollen Auskunft darüber geben, ob sich Unterschiede im Homöostaseverhalten und in der Funktionalität der Zellen, nach Stimulation mit dem Serum der drei genannten Gruppen, ergeben.

### **3.3.1. Grundlagen der Zellkulturversuche**

Für die geplanten Versuche wurden HTR-8/SVneo (ATCC CRL-3271) Zellen genutzt. Dabei handelt es sich um eine mit Hilfe des große T-Antigen des Simian-Virus 40 (SV40) immortalisierte Trophoblastzelllinie, die von humanem Plazentagewebe im ersten Trimester abstammt. Des Weiteren zeigen sie Marker, welche konform mit den typischen Markern der extravillösen invasiven Trophoblasten sind, während sie für Makrophagen- und Endothelzellmarker negativ getestet wurden. Für die Zellen wurde nach Herstellerangaben das Medium RPMI-1640 (ATCC: 30-2001) unter Zusatz von 5 % fetalem bovinem Serum (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) zur Kultur genutzt.<sup>106</sup> Der Großteil der Zellkulturversuche wurde unter einer sterilen Werkbank bei möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt. Hierfür erfolgten Mykoplasmentests und regelmäßige Mikroskopkontrollen der Zellen.

### **3.3.2. Auftauen der Zellen**

Die folgenden Schritte wurden zügig durchgeführt, um während des Auftauens die Toxizität des Dimethylsulfoxid (DSMO) auf die Zellen möglichst gering zu halten. Ein Vial mit aliquotierten Zellen, die unter Zugabe von DMSO bei -150 °C kryokonserviert wurden, wurden bei 37 °C im Wasserbad soweit aufgetaut bis nur noch ein kleiner Eisklumpen im Vial sichtbar war. Der Inhalt des gesamten Vials wurde dann in ein mit Kulturmedium vorbereitetes 15 ml Falcon überführt und bei Raumtemperatur 5 min bei 180 x g zentrifugiert. Für das Kulturmedium wurde phenolrot-haltiges Medium RPMI-1640 unter Zusatz von 5 % FBS und 1 % P/S genutzt. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Mit Hilfe einer 1000 µl Pipette wurde die Zellsuspension in eine mit 15 ml Kulturmedium vorbefüllte T75-Flasche gegeben. Abschließend wurden die Zellen in einem 37 °C warmen Inkubator mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % kultiviert. 24 h später erfolgte je nach Konfluenz ein Mediumwechsel oder das Passagieren der Zellen.

### **3.3.3. Passagieren der Zelle**

Nachdem die Zellen eine Konfluenz von circa 90 % erreicht hatten, erfolgte eine Subkultivierung. Zuerst wurde das Medium aus der T75-Flasche abgesaugt und die verbliebenen Zellen mit 7 ml Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte das Ablösen der adhärennten Zellen vom Boden der T75-Flasche, indem die Zellen unter Zugabe von 3 ml des bereits vorgewärmten Trypsins und leichtem Schwenken der Flasche benetzt und anschließend für 5 min bei 37 °C in den Inkubator gestellt wurden. Nachdem das Lösen der Zellen optisch mit Hilfe eines Mikroskops festgestellt wurde, erfolgte mit der Zugabe von 7 ml FBS-haltigem Kulturmedium das Abstoppen der Trypsinreaktion sowie das Abspülen der restlichen Zellen vom Flaschenboden. Im Anschluss

wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur und 180 x g zentrifugiert. Das übrig gebliebene Zellpellet wurde nach Absaugen des Überstandes vorsichtig in 1 ml Kulturmedium resuspendiert, sodass anschließend 600 µl der Zellsuspension in eine mit 12 ml Kulturmedium vorgefüllte T75-Flasche gegeben wurde. Im letzten Schritt wurde die Flasche zum gleichmäßigen Verteilen der Zellen leicht kreuzförmig geschwenkt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt in den Inkubator gelegt.

#### **3.3.4. Bestimmung der Zellzahl**

Um die Vergleichbarkeit der Versuche zu gewährleisten, wurde für die geplanten Versuche eine definierte Zellzahl, welche im weiteren Kontext im Abschnitt des jeweiligen Versuchs genannt wird, festgelegt. Zum Auszählen der Zellen erfolgten die unter dem Abschnitt des Passagierens angegebenen Schritte bis zum Resuspendieren des verbliebenen Zellpellet in 1 ml Kulturmedium. Im weiteren Verlauf wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau (Verdünnungsfaktor 1:10), um zwischen vitalen und toten Zellen unterscheiden zu können, gemischt und anschließend 10 µl der Mischung luftblasenfrei in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Daraufhin erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops die Zählung aller vitalen Zellen, welche durch die fehlende tiefblaue Färbung des Trypanblau erkenntlich waren, für jeden der vier äußeren Großquadranten der Neubauer-Zählkammer einzeln. Aus den vier ermittelten Werten wurde im Anschluss der Mittelwert gebildet und die gewünschte Zellzahl in µl pro Well nach folgender Formel „zu pipettierende Zellzahl in µl = gewünschte Zellzahl / (Mittelwert der Zellzahlen der Großquadrate x 100)“ berechnet. Somit wurde das zu pipettierende Volumen für die gewünschte Zellzahl pro Well bestimmt. Hierfür wurde sich an vorab durchgeführte laboreigene Austestungen orientiert.

#### **3.3.5. Aussaat und Stimulation**

Nach erfolgreicher Bestimmung der anvisierten Zellzahl wurde mit der Zellaussaat für die Versuche begonnen. Dafür wurden in jedem Versuch für alle Probandinnen jeweils Triplets im Rahmen einer Mehrfachbestimmung ausgesät. Zusätzlich wurden für jeden zu messenden Parameter (Apoptose, Proliferation, Seneszenz und Invasion) mehrere Versuchsreihen vollzogen, sodass abgesehen von der Seneszenzmessung alle Versuche fünf Mal wiederholt wurden. Der Seneszenzassay wurde nur vier Mal durchgeführt. Des Weiteren wurden in den Versuchsreihen Negativkontrollen sowie für einige Versuche Positivkontrollen in Triplets angelegt. Die Aussaat der Zellen erfolgte dabei im Zellkulturmedium mit anschließender 12-stündiger Inkubation zum Anwachsen der Zellen. Im Anschluss wurde das Aussaatmedium abgesaugt und mit der Stimulation der Zellen begonnen. Für die Stimulation wurde für jede Probandin eine Stimulationslösung aus Kulturmedium und dem maternalen Serum mit einer

Konzentration von 5 % angesetzt. Für die Kontrolle hingegen wurde Medium mit 5 % FBS versetzt. Die Dauer der Stimulation erfolgte in Anlehnung an die jeweiligen Versuchsprotokolle.

### **3.3.6. Apoptoseassay**

Um das Apoptoseverhalten der HTR-8/SVneo Zellen nach Stimulation mit dem Serum der drei Versuchsgruppen zu analysieren, wurde der Caspase-Glo 3/7 Assay genutzt. Hierfür dient die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 als Marker für das Apoptoseausmaß.<sup>107</sup> Für den Versuch wurden die HTR-8/SVneo mit einer Zellzahl von 15.000 pro Well in einer weißwandigen 96-Well Platte mit transparentem Boden ausgesät und nach Anwachsen für 12 h mit dem maternalen Serum in einer Konzentration von 5 % bzw. dem Kontrollmedium mit 5 % FBS stimuliert. Die Stimulation mit 2 µM Staurosporin als Positivkontrolle erfolgte für 6 h. Zusätzlich wurde ein Triplet ohne Zellen, nur mit Kulturmedium, als Leerprobe angesetzt. Die Arbeitsschritte des Assays wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.<sup>107</sup> Nach Abkühlen der Platte für 10 min auf Raumtemperatur wurde zu jedem Well 100 µl des Caspase-Glo 3/7 Reagenz hinzugegeben. Im nächsten Schritt wurde die Platte für 30 sec in den Plattenschüttler gestellt, um anschließend bei Raumtemperatur und im Dunkeln für eine Stunde zu inkubieren. Im letzten Zug erfolgte für jedes Well die spektrometrische Messung der Lumineszenz mittels des GloMax® Multi Detection System. Die Ergebnisse der einzelnen Triplets wurden gemittelt und von diesen anschließend der gemittelte Wert der drei Leerproben subtrahiert.

### **3.3.7. Proliferations-/Viabilitätsassay**

Zum Bestimmen der Proliferationsrate der HTR-8/SVneo Zellen, unter Stimulation mit dem Serum der drei Versuchsgruppen, wurde vom MTT-Assay Gebrauch gemacht. Der MTT-Versuch wurde erstmals von Mosmann beschrieben und gibt Auskunft über die metabolische Aktivität von Zellen basierend auf der Reduktion vom gelben MTT-Farbstoff in ein blauviolett Formazan, mit welchem, nach anschließender Auflösung des Farbstoffes, die Absorptionsrate bestimmt werden kann.<sup>108</sup> Für den Versuch wurden die HTR-8/SVneo mit einer Zellzahl von 10.000 pro Well in einer transparenten 96-Well Platte ausgesät, für 12 h inkubiert und im Anschluss stimuliert. Die Stimulation erfolgte für 24 h mit 5 % maternalen Serum der neun ausgewählten Probandinnen sowie mit 5 % FBS als Kontrollmedium. Dabei wurden für alle Studienteilnehmerinnen sowie für die Kontrollmessungen Mehrfachbestimmungen im Rahmen von Triplets durchgeführt. Zusätzlich wurde als Leerprobe ein Triplet ohne Zellen angelegt. Alle folgenden Schritte erfolgten nach einem modifizierten Protokoll nach Abcam.<sup>109</sup> Im Rahmen dessen wurde das Stimulations- und Kontrollmedium nach 24 h vorsichtig von den Zellen abgesaugt, sodass diese mit 50 µl phenolrotfreiem RPMI-1640 Medium pro Well benetzt werden konnten. Im nächsten Schritt wurde zu jedem Well noch

50 µl der MTT-Lösung hinzugegeben und die Platte anschließend zum Inkubieren für vier Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen. Nach Ablauf der vier Stunden erfolgte die Zugabe von 150 µl Lysepuffer pro Well und das kräftige Resuspendieren der Wellinhalte, um das Lysieren der Zellen zu induzieren. Nachfolgend wurde die Platte, vor Messung der Absorption, für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Bestimmung der Absorption der einzelnen Wells bei einer Wellenlänge von 590 nm wurde die i-control 2.0 Software des Infinite M200 pro von Tecan genutzt. Zur Messung der Hintergrundabsorption wurde pro Versuchsreihe zusätzlich ein Tripletts ohne Zellen als Leerprobe befüllt. Abschließend wurden die gemessenen Ergebnisse der Tripletts gemittelt und die Werte der Leerproben von diesen subtrahiert.

### **3.3.8. Seneszenz-assoziierte Beta-Galactosidase Färbung**

Das Seneszenzverhalten der HTR-8/SVneo Zellen nach Stimulation mit dem Serum der drei Versuchsgruppen sollte mittels der Seneszenz-assoziierten Beta-Galactosidase Färbung abgebildet werden. Dabei wurde die Darstellung von seneszenten Zellen in Zellkultur mittels Beta-Galactosidase als Biomarker bei einem pH-Wert von 6 erstmalig von Dimri beschrieben.<sup>110</sup> Für den Versuch wurden die HTR-8/SVneo Zellen mit einer Zellzahl von 10.000 pro Well in einer weißwandigen 96-Well Platte mit transparentem Boden ausgesät. Für die Positivkontrolle wurden 30.000 Zellen pro Well ausplattiert, da diese bei hoher Zelldichte in die Seneszenz übergehen. Zusätzlich wurde als Leerprobe ein Tripletts ohne Zellen angelegt. Die Stimulation der Zellen erfolgte jeweils in Tripletts mit 5 % maternalen Serum der neun ausgewählten Probandinnen sowie mit 5 % FBS als Kontrollmedium. Die folgenden Arbeitsschritte wurden basierend auf Kretschmers<sup>111</sup> Modifizierung von Kipkeew<sup>112</sup> durchgeführt. 48 h nach Beginn der Stimulation, wobei hier innerhalb dieser Zeitspanne nach 24 h ein Wechsel der Stimulationslösung durchgeführt wurde, erfolgte das vorsichtige Absaugen dieser sowie das zweimalige Waschen der Zellen mit 60 µl DPBS pro Well für jeweils 30 sec. Anschließend wurden die Zellen mittels 60 µl pro Well Fixationslösung für 5 min bei Raumtemperatur fixiert, um im nächsten Schritt wieder zweimalig mit 60 µl DPBS pro Well für jeweils 30 sec gewaschen zu werden. Im nächsten Schritt erfolgte das Benetzen der Zellen mit 60 µl Färbelösung pro Well sowie im Anschluss das 12-stündige Inkubieren bei einer Temperatur von 37 °C im Inkubator. Nach dieser Zeitspanne wurden die Zellen erneut zweimal mit DPBS für jeweils 30 sec gewaschen. Abschließend wurden die Zellen einmalig mit 60 µl Methanol pro Well, welches auf -20 °C vorgekühlt war, gewaschen und zum Trocknen sicher bei Raumtemperatur verwahrt. Nach Trocknen der Platte wurden die Zellen und das Ausmaß ihrer Färbung mittels eines inversen Mikroskops begutachtet. Um den Färbegrad zu dokumentieren wurden die Wells mit dem 10x Objektiv innerhalb ihres Zentrums mit dem

Invitrogen™ EVOS™ FL-Auto 2 im automatischen Modus mit AutoFocus im Lock Z Offset im Hellfeld unter Nutzung der Farbkamera fotografiert.

### **3.3.9. Invasionsassay**

Zur Analyse der Invasivität der HTR-8/SVneo Zellen wurde, nach Stimulation mit dem Serum der drei Versuchsgruppen, ein Invasionsassay durchgeführt. Dieser gibt an Hand der Anzahl von Zellen, welche in einem bestimmten Zeitraum durch eine Barriere in Form von Matrigel und einer porösen Membran gewandert sind, Auskunft über deren Invasivität. Zum Nachvollziehen der Invasionsfähigkeit von Zellen wurde dieser Versuchsaufbau erstmalig im Rahmen von Untersuchung an Tumorzellen von Repesh beschrieben.<sup>113</sup> Abgesehen vom Prozedere des Färbens der gewanderten Zellen erfolgten alle Arbeitsschritte auf Basis einer Modifizierung von Appel et al.<sup>114</sup> Zu Beginn des Versuches wurden 24-Well Platten mit Transwell-Inserts bestückt. Diese haben einen Boden, in den 8 µm große Poren eingelassen sind, durch die Zellen hindurchwandern können. Im Anschluss erfolgte die Beschichtung der Transwell-Insertsböden mit 100 µg des 4 °C kalten Matrigels, welches zuvor in 100 µl Coating-Buffer verdünnt wurde. Hierbei wurde stets darauf geachtet, dass alle benutzten Materialien vorgekühlt waren, um eine vorzeitige Polymerisation des Matrigels zu verhindern. Danach wurden die Platten zur Polymerisation des Matrigels für 2 h bei 37 °C im Inkubator belassen. Für den Versuch wurden die HRT-8/SVneo mit einer Zellzahl von 100.000 pro Transwell-Insert auf dem polymerisierten Matrigel ausgesät. Im Rahmen dieses Versuches wurde die gewünschte Zellzahl in 500 µl Medium verdünnt, wobei hier explizit darauf geachtet werden musste, dass das Medium kein Serum enthielt. In die Kammern der 24-Well Platten wurde hingegen 750 µl Medium, welches mit 5 % Serum der Patientinnen der 3 Versuchsgruppen bzw. für die Positivkontrollen 5 % FBS versetzt worden ist, gegeben. Die Negativkontrollen glichen, bis auf die Tatsache, dass keine Zellen in die Transwell-Inserts ausgesät wurden, im Aufbau den Positivkontrollen. Die Negativkontrollen fungierten dabei als Leerprobe bzw. Richtwert für Schmutzpartikel, die fälschlicherweise bei der Auszählung als Zellen identifiziert wurden und wurden von den finalen Ergebnissen der Auszählung subtrahiert. Anschließend wurden die Platten für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert. Mit Ablauf der 24 h erfolgte das Absaugen der Lösungen aus den Kammern und den Transwell-Inserts sowie das Überführen dieser in DPBS. Nachfolgend wurden die nicht gewanderten Zellen von der Membranoberfläche der Transwell-Inserts sorgfältig abgewischt und die Transwell-Inserts zum Fixieren der gewanderten Zellen mit ihrer Unterseite für zwei Minuten in -20 °C kaltem Methanol belassen. Im nächsten Schritt wurde das Methanol abgesaugt und die Membran der Transwell-Inserts mit MilliQ-Wasser gewaschen. Danach erfolgte das Färben der gewanderten Zellen auf der Membranunterseite der Transwell-Inserts mit Hilfe von 4',6-Diamidino-2-

phenylindol (DAPI), bei einem Verdünnungsfaktor von 1:1000 in DPBS, für 15 min im Dunkeln. Mittels der DAPI-Färbung wurden die Zellkerne der gewanderten Zellen angefärbt, sodass diese unter einem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar wurden und folglich ausgezählt werden konnten. Zum Zeitpunkt der Färbung musste darauf geachtet werden, dass die Membranen in allen Folgeschritten stets lichtgeschützt waren. Daraufhin wurden die Membranen nochmals einmalig mit DPBS sowie MilliQ gewaschen und im Anschluss zum Lufttrocknen im Dunkeln belassen. Nach dem Trocken erfolgte das Ausschneiden der Membranen aus den Transwellinserts mit Hilfe eines Skalpells und das abschließende Eindeckeln dieser mit Entellan auf Objektträgern unter einem Deckglas. Das Fotografieren der Membranen erfolgte am Mikroskop Olympus BX43 mittels der Software Cell-Sens Dimension 1.18. Hier wurde die gesamte Membran mit 10-facher Vergrößerung im DAPI-Filter gescannt. Nach Abfotografieren aller Membranen erfolgte das Auszählen der Zellen. Dafür wurde an Hand von zufällig gewählten Membranausschnitten eine Testzählung per Hand und mittels der Software ImageJ im Vergleich durchgeführt. Hierbei zeigten sich zwischen den beiden Methoden keine Unterschiede in der gezählten Zellzahl, sodass die Zellen schlussendlich nach folgendem Schema mit Hilfe der Software ImageJ gezählt wurden. Vor der Nutzung von ImageJ erfolgte eine Verblindung, indem die Zuordnungen der Membranen pseudonymisiert wurden. Nun wurde mit Hilfe der Software ImageJ der unebene Rand der Membranen möglichst fein abgeschnitten, sodass die verbliebene Fläche ausgemessen werden konnte. Im weiteren Verlauf wurde der Kontrast auf die maximale Stufe gesetzt, um die Zellen für das Programm zum Zählen besser sichtbar zu machen. Im nächsten Schritt wurden im Rahmen der Zählung der Threshold standardisiert für jede Membran auf 52 gesetzt und die Funktion Watershed genutzt, um Zellakkumulationen aufzutrennen. Anschließend wurden alle farbige hervorgehobenen Partikel gezählt, wobei der Software, um die Zellen zu erkennen, eine Rundung von 0,28 - 1,00 sowie eine Fläche von 37 - 480  $\mu\text{m}^2$  vorgegeben wurde. Zuletzt erfolgte, nach Abzug der Leerprobe, die Berechnung der gezählten Zellen pro 1  $\text{mm}^2$

### **3.4. Statistische Analyse**

Die statistische Auswertung erfolgte auf Empfehlung des Instituts für medizinische Statistik und Bioinformatik der Universität zu Köln. Hier fungierten als direkte Ansprechpartner Dr. Jeremy Franklin und Anne Adams.

Für die Auswertung der Datensätze wurde die Software SPSS 27® genutzt.

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden die erzielten Werte mittels Mittelwert und zugehöriger Standardabweichung abgebildet. Um die einzelnen Werte der Zellkulturversuche auf Normalverteilung zu überprüfen, wurde ein Streudiagramm erstellt, mit welchem ein Eindruck über das Ausmaß der Streuung der Werte innerhalb einer Gruppe sowie zwischen

deren Versuchswiederholungen erlangt werden konnte. Im Rahmen dessen wurden die Daten, nach Abzug der Leerprobenwerte, modifiziert, indem auf die Ergebnisse der einzelnen Patientinnen der natürliche Logarithmus angewandt wurde. Für die Hauptanalyse wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholungen durchgeführt. Im Rahmen der ANOVA wurden die Messwiederholungen der einzelnen Gruppen miteinander verglichen, wobei die modifizierten Messwerte verwendet wurden. Zusätzlich wurden die Ergebnisse im Rahmen einer Sensitivitätsanalyse mittels Friedman-Tests ausgewertet. Dieser erfolgte auf der Basis, dass eine Normalverteilung der Daten nicht vollends angenommen werden konnte. Er vergleicht verbundene, nicht normalverteilte Daten von mehr als zwei Gruppen, indem die Messwerte in Ränge eingeordnet werden. Für diese Analyse erfolgte keine Modifizierung der Versuchsergebnisse. Das Signifikanzniveau der Analysen wurde auf  $\alpha = 0,05$  gewählt.

## 4. Ergebnisse

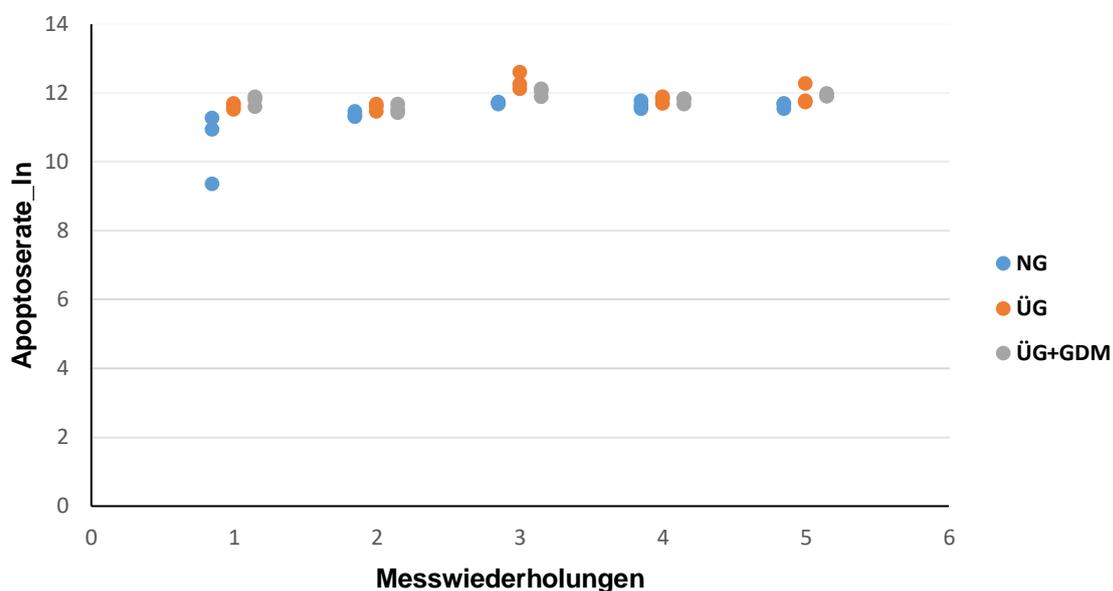
Da Fettleibigkeit und ein GDM bei werdenden Müttern ein gesundheitliches Risiko für den Fötus bergen und die Plazenta als wesentliche Schnittstelle zwischen diesen beiden Individuen fungiert,<sup>6,7,37,55,56</sup> wurde in der hier vorliegenden Arbeit im Rahmen von Zellkulturversuchen das Homöostaseverhalten sowie die Invasionsfähigkeit der immortalisierten Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo nach Stimulation mit dem Serum von drei verschiedenen Gruppen schwangerer Frauen analysiert. Die Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo stellt dabei ein in vitro Modell für den extravillösen Trophoblasten der humanen Plazenta dar.<sup>106</sup> Die Gruppen unterteilten sich in eine medizinisch unauffällige NG-Gruppe mit einem BMI von 18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup>, eine ÜG-Gruppe mit einem BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> und ohne GDM sowie einer Gruppe mit ÜG-Schwangeren (BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>) mit GDM. Dabei stellt Tabelle 9 die wichtigsten phänotypischen Daten der drei genannten Versuchsgruppen dar.

		Gruppe		
		BMI 18,5 – 24,9 (NG) n = 3	BMI ≥ 25 ohne GDM (ÜG) n = 3	BMI ≥ 25 mit GDM (ÜG+GDM) n = 3
<b>Alter (Jahre)</b>	MW ± SD	34,00 ± 4,32	33,33 ± 2,36	33,33 ± 2,36
<b>BMI zu Beginn der SS</b> (kg/m <sup>2</sup> )	MW ± SD	20,90 ± 1,00	36,50 ± 3,44	32,00 ± 30,00
<b>Geburtsgewicht des Kindes (g)</b>	MW ± SD	3100,00 ± 78,74	3663,30 ± 766,17	3755,00 ± 309,01
<b>Geschlecht des Kindes (m/w)</b>	absolute Häufigkeit	1/2	1/2	2/1
<b>Gestationsalter bei Entbindung (Wochen)</b>	MW ± SD	39,00 ± 0,07	39,00 ± 0,82	39,10 ± 0,20
<b>Gewichtszunahme in der SS (kg)</b>	MW ± SD	14,33 ± 1,51	11,50 ± 5,17	8,23 ± 1,37
<b>Plazentagewicht (g)</b>	MW ± SD	580,20 ± 80,14	700,53 ± 49,36	722,86 ± 18,66

**Tabelle 9: Phänotypische Daten der Versuchsgruppen** mit Angabe von Stichprobenumfang (n), absoluter oder relativer Häufigkeit sowie Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD).

#### 4.1. Apoptoseassay

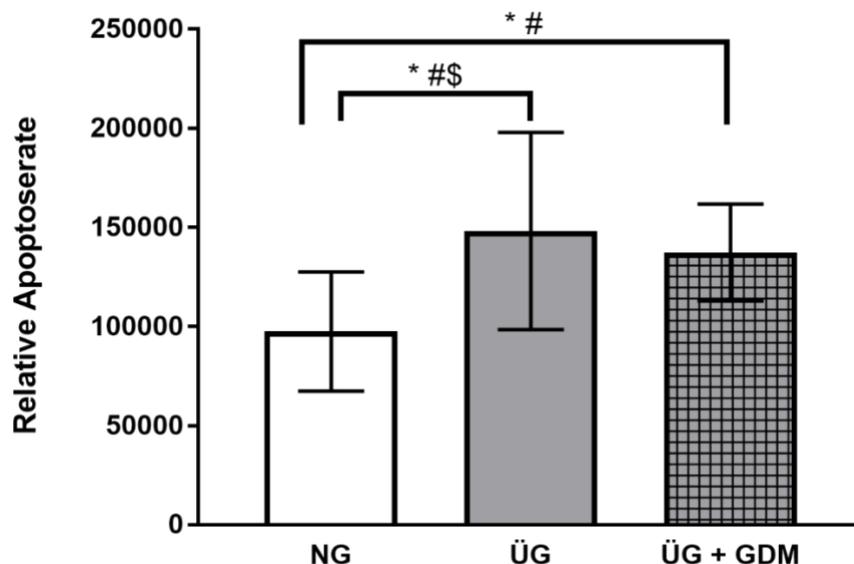
Nach Modifizierung der Daten mit dem natürlichen Logarithmus konnte mit Hilfe eines Streudiagramms (Abbildung 2) aufgezeigt werden, dass die Werte der neun Patientinnen der drei Gruppen sowohl innerhalb einer Gruppe als auch in den Messwiederholungen keiner starken Streuung unterlagen. Abgesehen von einem Ausreißer im ersten Versuchsdurchlauf bei einer Patientin der NG-Gruppe befanden sich die restlichen Werte in einer Spanne von 10,9 bis 12,6, wobei sich die meisten Werte um 11,6 einfügten. Der Ausreißer zeigte einen Wert von 9,37.



**Abbildung 2: Streudiagramm der logarithmierten Patientendaten des Apoptoseassays**  
Darstellung der logarithmierten (ln) relativen Apoptoseraten von humanen Trophoblasten (HTR-8/SVneo) nach Stimulation mit dem Serum von übergewichtigen Schwangeren mit (ÜG+GDM) und ohne Gestationsdiabetes (ÜG) sowie, als Kontrolle und Vergleichswert, von medizinisch unauffälligen und normalgewichtigen Schwangeren (NG) zur Beurteilung einer Normalverteilung der Daten. Alle drei Patientinnen pro Gruppe sind für jede Messwiederholung einzeln aufgeführt. Die Daten aller fünf Messwiederholungen sind unabhängig voneinander abgebildet.

Zur Testung, ob es zwischen den einzelnen Gruppen signifikante Unterschiede im Apoptoseverhalten gab, wurden die Daten mittels ANOVA mit Messwiederholungen mit Hilfe von SPSS analysiert. Im Rahmen dessen zeigte sich beim paarweisen Vergleich der Versuchsgruppen (Abbildung 3) mittels Post-Hoc-Test (Dunn-Bonferroni-Test) eine signifikante Erhöhung der Apoptoseraten der ÜG-Gruppe mit einem p-Wert von  $p = 0,018$  im Vergleich zur NG-Gruppe. Der Mittelwert der Apoptoseraten der NG-Gruppe lag hier bei 97539,52, während die ÜG-Gruppe bei einem Wert von 148116,67 lag. Ebenso ließ sich im

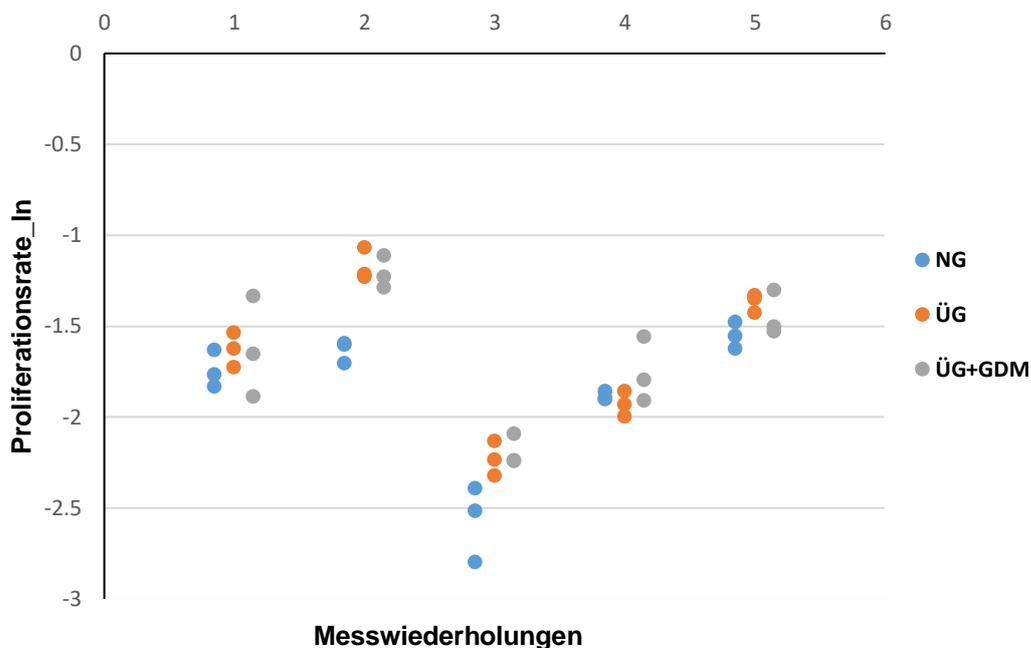
Apoptoseverhalten zwischen der NG- und ÜG-Gruppe mit GDM ein signifikanter Unterschied feststellen. Dabei zeigte sich das Apoptoseausmaß in der ÜG-Gruppe mit GDM bei einem Wert von  $p = 0,027$  erhöht. Der Mittelwert der ÜG-Gruppe mit GDM befand sich bei 137361,58. Zwischen den Gruppen der ÜG-Schwangeren mit und ohne GDM ließ sich hingegen kein relevanter Signifikanzgrad ausmachen, der  $p$ -Wert befand sich bei 1 und unterschritt damit nicht die Signifikanzgrenze von  $p < 0,05$ . Im Rahmen der Sensitivitätsanalyse wurden die Daten zusätzlich mittels des Friedman-Tests ausgewertet. Nach dessen Durchführung wurde die Nullhypothese, dass die Verteilung der NG- und ÜG-Gruppe sowie der ÜG-Gruppe mit GDM identisch sei, mit einem Signifikanzniveau von 0,015 abgelehnt. Im weiteren Verlauf wurde basierend auf der Ablehnung der Nullhypothese ein paarweiser Vergleich ebenso mittels Post-Hoc-Test (Dunn-Bonferroni-Test) durchgeführt, um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Gruppen im Vergleich für das signifikante Ergebnis ausschlaggebend waren. Die paarweisen Vergleiche zeigten eine signifikante Erhöhung der Apoptoseraten der ÜG-Gruppe mit einem  $p$ -Wert von 0,004 im Vergleich zur NG-Gruppe. Zwischen den Ergebnissen der NG- und der ÜG-Gruppe mit GDM ( $p = 0,058$ ) sowie zwischen den ÜG-Gruppen mit und ohne GDM ( $p = 0,343$ ) ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Apoptoserate der Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo nach Stimulation mit maternalem Serum** Darstellung der relativen Apoptoserate von humanen Trophoblasten (HTR-8/SVneo) nach Stimulation mit dem Serum von übergewichtigen Schwangeren mit (ÜG+GDM) und ohne (ÜG) Gestationsdiabetes sowie, als Kontrolle und Vergleichswert, von normalgewichtigen Schwangeren (NG). Die Säulen der einzelnen Studiengruppen präsentieren den *Mittelwert +/- SD*. \*  $p < 0,05$ . # Signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ausschließlich in der Hauptanalyse ANOVA mit Messwiederholungen plus post-hoc Test. \$ Signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen in der Sensitivitätsanalyse Friedmann plus post-hoc Test.

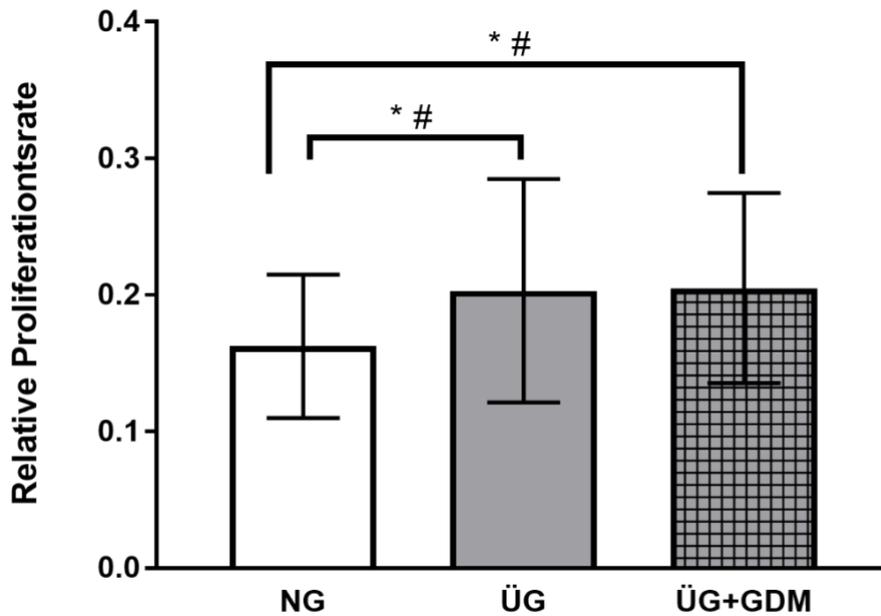
## 4.2. Proliferations-/Viabilitätsassay

Im Weiteren wird auf die Resultate des Proliferationsassays eingegangen. Das Streudiagramm (Abbildung 4) der mit dem natürlichen Logarithmus modifizierten Daten zeigte eine Verteilung der Werte der jeweils drei Patientinnen der drei Versuchsgruppen, abgesehen von der dritten Messwiederholung, zwischen einem Wertebereich von -2 und -1. In der dritten Messwiederholung zeigte sich bei allen neun Probandinnen der drei Versuchsgruppen eine Abweichung von den restlichen Daten. Hier befanden sich die Messwerte in einer Ergebnisspanne von -3 bis -2. Ersichtlich war, dass die Werte der dritten Messwiederholung, trotz ihrer leichten Abweichung, mit den Ergebnissen der anderen Messwiederholungen konform waren. Denn die Werte der ÜG-Gruppen mit und ohne GDM zeigten im Gesamten die Tendenz über den Werten der NG-Gruppe zu liegen.



**Abbildung 4: Streudiagramm der logarithmierten Patientendaten des Proliferationsassays** Darstellung der logarithmierten (ln) Proliferationsraten von humanen Trophoblasten (HTR-8/SVneo) nach Stimulation mit dem Serum von übergewichtigen Schwangeren mit (ÜG+GDM) und ohne Gestationsdiabetes (ÜG) sowie, als Kontrolle und Vergleichswert, von medizinisch unauffälligen und normalgewichtigen Schwangeren (NG) zur Beurteilung einer Normalverteilung der Daten. Alle drei Patientinnen pro Gruppe sind für jede Messwiederholung einzeln aufgeführt. Die Daten aller fünf Messwiederholungen sind unabhängig voneinander abgebildet.

Es wurde überprüft, ob im Proliferationsverhalten der einzelnen Gruppen signifikante Unterschiede bestanden. Hierfür wurde von der ANOVA mit Messwiederholungen Gebrauch gemacht. Im Kontext der paarweisen Vergleiche der drei Versuchsgruppen (Abbildung 5) mittels Post-Hoc-Test (Dunn-Bonferroni-Test) ließ sich zwischen der NG- und der ÜG-Gruppe ohne GDM eine signifikante Abweichung mit einem  $p$ -Wert von  $p = 0,033$  ausmachen. Dabei zeigte sich im Vergleich eine erhöhte Proliferationsrate der ÜG-Gruppe. Hier anlehnend wies die NG-Gruppe einen Mittelwert von 0,16 auf, während sich der Mittelwert der Proliferationsraten der ÜG-Gruppe bei 0,20 befand. Desgleichen zeigte sich beim paarweisen Vergleich der NG- und ÜG-Gruppe mit GDM ein signifikanter Unterschied mit  $p = 0,022$ . Auch hier lag die Proliferationsrate der ÜG-Gruppe mit GDM oberhalb der Werte der NG-Gruppe. Der Mittelwert der ÜG-Gruppe lag ebenso bei 0,20. Bei Betrachtung des  $p$ -Wertes zwischen den ÜG-Gruppen mit und ohne GDM ließ sich hingegen kein signifikanter Unterschied ausmachen. Der  $p$ -Wert befand sich hier bei 1 und somit oberhalb der Signifikanzgrenze von  $p < 0,05$ . Zusätzlich wurden die Daten mittels des Friedman-Tests einer Sensitivitätsanalyse unterzogen. Nach Durchführung des Friedman-Tests wurde die Nullhypothese, dass die Verteilung der NG- und ÜG-Gruppe sowie der ÜG-Gruppe mit GDM gleich sei, mit einem  $p$ -Wert von 0,074 angenommen. Da die Signifikanzgrenze von  $p < 0,05$  nicht unterschritten wurde, konnte der Friedman-Test die festgestellten signifikanten Unterschiede der ANOVA zwischen der NG-Gruppe und der ÜG-Gruppen mit und ohne GDM nicht bestätigen. Auf einen paarweisen Vergleich konnte demnach verzichtet werden.



**Abbildung 5: Proliferationsrate der Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo nach Stimulation mit maternalem Serum** Darstellung der relativen Proliferationsrate von humanen Trophoblasten (HTR-8/SVneo) nach Stimulation mit dem Serum von übergewichtigen Schwangeren mit (ÜG+GDM) und ohne Gestationsdiabetes (ÜG) sowie, als Kontrolle und Vergleichswert, von normalgewichtigen Schwangeren (NG). Die Säulen der einzelnen Studiengruppen präsentieren den *Mittelwert* +/- *SD*. \*  $p < 0,05$ . # Signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ausschließlich in der Hauptanalyse ANOVA mit Messwiederholungen plus post-hoc Test.

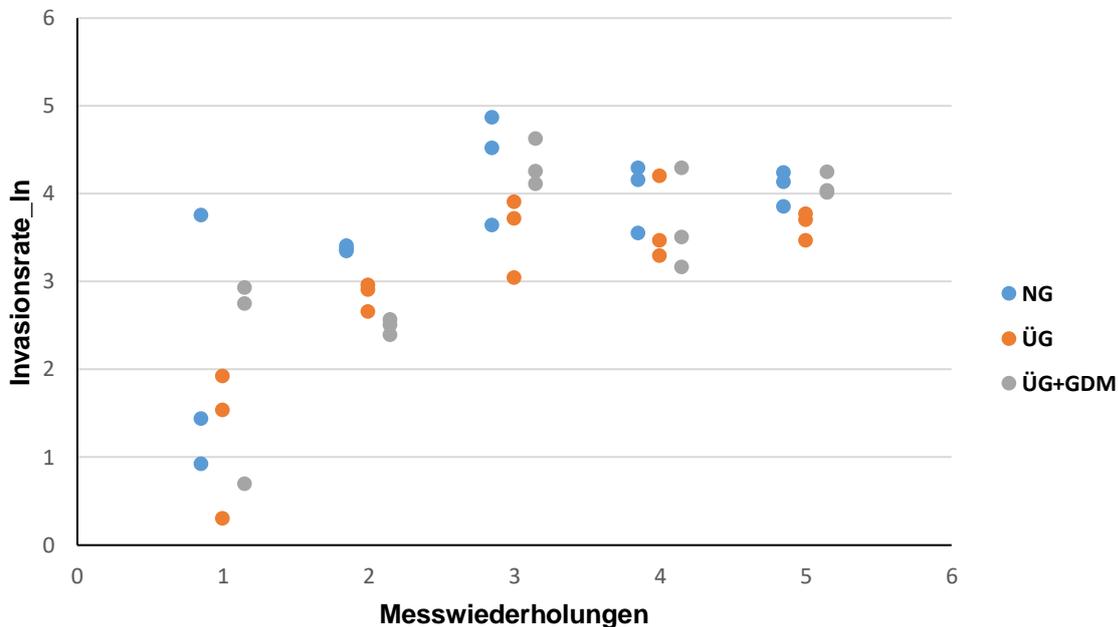
#### 4.3. Seneszenz-assoziierte Beta-Galactosidase Färbung

Im Rahmen des Versuches zeigten weder die Zellen, welche mit dem Serum der Studienteilnehmerinnen stimuliert wurden, noch die der Positivkontrollen eine bläuliche Färbung, weshalb auf das Zählen der Zellen sowie auf die anschließende statistische Auswertung verzichtet wurde.

#### 4.4. Invasionsassay

Der nachfolgende Abschnitt bezieht sich auf die Ergebnisse des Invasionsassays. Dieser soll Auskunft über die Invasivität der immortalisierten Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo nach Stimulation mit humanem Serum der drei Versuchsgruppen geben. Dafür wurde ein Streudiagramm (Abbildung 6) der modifizierten Ergebnisse des Invasionsassays angefertigt. Die Modifizierung erfolgte dabei mit dem natürlichen Logarithmus. Hier wurde ersichtlich, dass die Werte der neun Patientinnen der drei Gruppen sowohl innerhalb einer Gruppe als auch in den Messwiederholungen im Wertebereich von 0 bis circa 5 lagen. Der erweiterte Streubereich

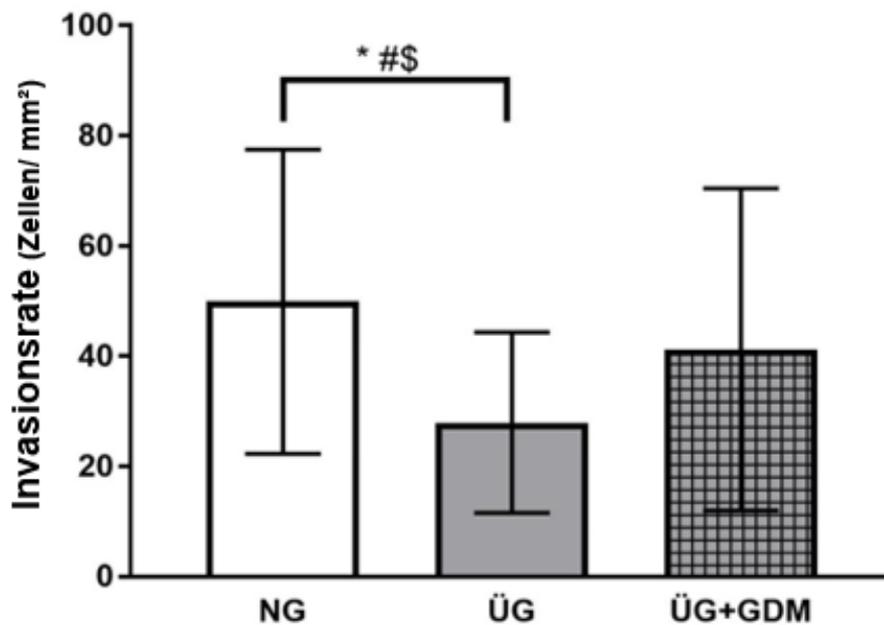
lässt sich durch die verstärkte Streuung in der ersten Messwiederholung im Vergleich zu den restlichen Wiederholungen erklären.



**Abbildung 6: Streudiagramm der logarithmierten Patientendaten des Invasionsassays**  
Darstellung der logarithmierten (ln) Invasionsraten von humanen Trophoblasten (HTR-8/SVneo) nach Stimulation mit dem Serum von übergewichtigen Schwangeren mit (ÜG+GDM) und ohne Gestationsdiabetes (ÜG) sowie, als Kontrolle und Vergleichswert, von medizinisch unauffälligen und normalgewichtigen Schwangeren (NG) zur Beurteilung einer Normalverteilung der Daten. Alle drei Patientinnen pro Gruppe sind für jede Messwiederholung einzeln aufgeführt. Die Daten aller fünf Messwiederholungen sind unabhängig voneinander abgebildet.

Zur Testung auf Signifikanzunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen in Bezug auf die Invasivität der Zellen wurden die Daten mittels ANOVA mit Messwiederholungen mit Hilfe von SPSS analysiert. Im Kontext des paarweisen Vergleichs der Versuchsgruppen (Abbildung 7), mit Hilfe eines Post-Hoc-Test (Dunn-Bonferroni-Test), zeigte sich in der ÜG-Gruppe ohne GDM eine signifikante Erhöhung der invadierten Zellzahl im Vergleich zur NG-Gruppe ( $p = 0,044$ ). Dabei lagen die Mittelwerte der Invasionsraten in der NG-Gruppe bei 49,90 Zellen/ mm<sup>2</sup> und in der ÜG-Gruppe bei 27,94 Zellen/ mm<sup>2</sup>. Im Invasionsverhalten zwischen der NG- und ÜG-Gruppe mit GDM ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Der  $p$ -Wert lag hier bei 0,686. Hier anlehnend befand sich der Mittelwert der ÜG-Gruppe mit GDM bei 41,21 Zellen/ mm<sup>2</sup>. Ebenso zeigte sich zwischen den ÜG-Gruppen mit und ohne GDM kein relevanter Unterschied, der  $p$ -Wert lag bei 0,26 und unterschritt damit nicht die Signifikanzgrenze von  $p < 0,05$ . Im Rahmen einer Sensitivitätsanalyse wurden die Daten zusätzlich mittels des

Friedman-Tests ausgewertet. Nach Durchführung der Sensitivitätsanalyse wurde die Nullhypothese, dass die Verteilung der NG- und ÜG-Gruppe sowie der ÜG-Gruppe mit GDM identisch sei, mit einem Signifikanzniveau von 0,041 abgelehnt. Um feststellen zu können, welche Gruppen im Vergleich für das signifikante Ergebnis ausschlaggebend waren, wurde ein paarweiser Vergleich mittels eines Post-Hoc-Tests (Dunn-Bonferroni-Test) durchgeführt. Der paarweise Vergleich zeigte eine signifikante Erhöhung in der Invasionsrate der ÜG-Gruppe ohne GDM im Verhältnis zur NG-Gruppe ( $p = 0,011$ ). Zwischen den Ergebnissen der NG- und der ÜG-Gruppe mit GDM ( $p = 0,206$ ) sowie zwischen den ÜG-Gruppen mit und ohne GDM ( $p = 0,206$ ) ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Invasionsrate der Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo nach Stimulation mit maternalem Serum** Darstellung der Invasionsrate (Zellen/ mm<sup>2</sup>) von humanen Trophoblasten (HTR-8/SVneo) nach Stimulation mit dem Serum von übergewichtigen Schwangeren mit (ÜG+GDM) und ohne Gestationsdiabetes (ÜG) sowie, als Kontrolle und Vergleichswert, von normalgewichtigen Schwangeren (NG). Die Säulen der einzelnen Studiengruppen präsentieren den *Mittelwert +/- SD*. \*  $p < 0,05$ . # Signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ausschließlich in der Hauptanalyse ANOVA mit Messwiederholungen plus post-hoc Test. \$ Signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen in der Sensitivitätsanalyse Friedman plus post-hoc Test.

## 5. Diskussion

Da das Krankheitsbild der Fettleibigkeit bei Frauen im gebärfähigen Alter sowie der während einer SS auftretende GDM eine hohe Prävalenz in unserer Bevölkerung aufweisen<sup>1,34</sup> und häufig mit einer kurz- und langfristigen pathologischen gesundheitlichen Entwicklung des Kindes einhergehen,<sup>37,51</sup> lag dem hier aufgeführten Versuch eine Untersuchung der extravillösen Trophoblasten der humanen Plazenta bei ÜG-Schwangeren mit und ohne GDM zu Grunde. Die Plazenta fungiert als Schnittstelle zwischen der werdenden Mutter und dem ungeborenen Kind. Hier findet maßgeblich die Versorgung des Kindes mit Nährstoffen statt sowie im Rahmen einer Barrierefunktion das Abhalten von Schadstoffen vom mütterlichen in den fetalen Kreislauf.<sup>55,56</sup> In den durchgeführten Versuchen wurde anhand von in vitro kultivierten humanen Trophoblasten Veränderungen dieser in ihrem Homöostaseverhalten sowie ihrer Invasivität nach Stimulation mit Serum von ÜG-Schwangeren mit und ohne GDM im Vergleich zu NG-Schwangeren ohne GDM analysiert. Hierfür wurden in Rahmen von Zellkulturversuchen ein Caspase-Glo 3/7 Assay zur Detektion der Apoptoserate, ein MTT-Assay zur Darstellung der Proliferationsrate sowie eine seneszenz-assoziierte Beta-Galactosidase Färbung zur Messung der Seneszenzrate durchgeführt. Um Rückschlüsse auf die Funktion der Trophoblasten nach Stimulation mit humanem Serum zu ziehen, wurde des Weiteren ein Invasionsassay ausgeführt.

### 5.1. Der Einfluss von Übergewicht mit und ohne GDM auf die Homöostase von Trophoblasten

Im Rahmen der Ergebnisauswertung zeigten die Zellen, die mit dem Serum der ÜG-Gruppe stimuliert wurden, in der ANOVA und Friedman-Analyse eine erhöhte Apoptoserate im Verhältnis zu den Zellen, die mit Serum der NG- bzw. Kontrollgruppe stimuliert wurden. Die Proliferationsraten der Zellen, die mit dem Serum der ÜG-Gruppe stimuliert wurden, waren einzig in der ANOVA im Vergleich zu den Zellen, die mit Serum der NG-Gruppe stimuliert wurden, gesteigert. Die Prozesse der Apoptose und Proliferation befinden sich in enger Beziehung zueinander und fungieren im Rahmen des Zellzyklus als Gegenspieler. Um die einwandfreie Aufrechterhaltung eines biologischen Systems zu gewährleisten, müssen sich die beiden Prozesse im stetigen Gleichgewicht befinden. Eine Störung des Gleichgewichts würde zur Beeinträchtigung der Homöostase führen und in Folge dessen zu einem Verlust oder im Rahmen einer überschießenden Proliferation zu einer unkontrollierten Vermehrung von Gewebe.<sup>115,116</sup> So konnten 1986 Versuche an adrenaletomisierten Ratten, welche mit in Thymozyten Apoptose induzierendem Dexamethason behandelt wurden, gezeigt werden, dass das Thymusgewicht bei erhöhtem Apoptoseausmaß der Thymozyten deutlich abnahm und die Zellmasse nicht durch verstärkte Mitose ausbalanciert wurde.<sup>117</sup> Zusätzlich konnten

Studien nachweisen, dass eine Überexpression von Apoptose hemmenden Genen, im Rahmen einer verminderten Apoptoserate und einer fehlenden Abnahme der Proliferationsrate zur Bereinigung des Ungleichgewichts, zu Neoplasien führt.<sup>115,118,119</sup> Demnach bedienen sich Zellen entweder der Proliferation oder Apoptose, sodass beide Mechanismen nicht gleichzeitig ausgeführt werden.<sup>115,117</sup> Bezugnehmend auf die Versuchsergebnisse der durchgeführten Studie müssen entweder die erhöhten Proliferations- oder Apoptoseraten der ÜG-Gruppen mit und ohne GDM im Vergleich zur NG-Gruppe angezweifelt werden. Denn ein gesteigertes Proliferations- als auch Apoptoseausmaß stehen wie oben beschrieben im Widerspruch zueinander. Im Rahmen dessen lässt sich mit Blick auf die statistische Auswertung der Studie eruieren, dass der signifikante Unterschied in der Apoptoserate zwischen der NG- und ÜG-Gruppe sowohl in der Hauptanalyse ANOVA als auch in der Sensitivitätsanalyse nachgewiesen wurde. Beim Proliferationsassay hingegen konnte ein signifikanter Anstieg zwischen diesen beiden Gruppen nur in der Hauptanalyse aufgezeigt werden. Die fehlende Bestätigung durch die sekundäre statistische Analyse bietet ein Indiz, dass den Werten der erhöhten Apoptoserate eher Glauben geschenkt werden kann, während die gesteigerte Proliferationsrate angezweifelt werden muss. Mit Anzweiflung der erhöhten Proliferationsraten der ÜG-Gruppen mit und ohne GDM im Vergleich zur NG-Gruppe muss die Aussagekraft der ANOVA somit kritisch hinterfragt werden. Dabei lässt sich vermuten, dass die Hauptanalyse mittels ANOVA übermäßig Signifikanzen aufzeigt, welche mit Blick auf die Studiendaten anfechtbar sind. Hier lässt sich ein Bezug zu den geringen Fallzahlen der Studie, welche zusätzlich den Nachweis einer Normalverteilung der Daten erschweren, annehmen. Aus diesem Grund sollten die Ergebnisse der Hauptanalyse nur mit der sekundären Sensitivitätsanalyse im Zusammenhang betrachtet werden.

Ein weiterer Anhaltspunkt für die Unglaubwürdigkeit der Ergebnisse des Proliferationsassays ergibt sich mit Blick auf die Werte der ÜG-Gruppen mit und ohne GDM, welche eine nahezu ähnliche Proliferationsrate aufzeigen. Die Ergebnisse der beiden Studiengruppen weichen somit nach statistischer Auswertung in ihren gemittelten Werten kaum voneinander ab. Diese Resultate müssen als fragwürdig angesehen werden, denn laut Literatur gilt ein GDM als Induktor der Zellproliferation.<sup>103</sup> Ein mögliches Argument, das eine fehlende Proliferationserhöhung in der ÜG-Gruppe mit GDM im Verhältnis zu der ÜG-Gruppe ohne GDM erklären würde, könnte zum einen die Tatsache sein, dass die Blutproben der werdenden Mutter nach erfolgreicher diätischer Therapie keine Faktoren mehr erhielten, welche im Rahmen eines GDM proliferationsfördernd auf Zellen wirken konnten. Oder zum anderen, dass der diagnostizierte GDM, welcher bei den Probandinnen ohne Insulin behandelt werden konnte, einen verminderten Krankheitswert darstellte als ein insulinbedürftiger GDM. Dadurch waren Faktoren im Blutserum, welche proliferationsanregend auf Zellen wirken, möglicherweise gar nicht oder nur in einem geringen Ausmaß vorhanden und konnten somit

keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der untersuchten Zellen nehmen. Hier anlehnend beschreibt die Literatur eine signifikante Erhöhung der Proliferationsraten in Trophoblasten nach hyperglykämischer Stimulation.<sup>103</sup> In den abgenommenen Nüchtern-Plasmaproben der Patientinnen, deren Serum für die in vitro Zellkultur-Stimulationsversuche genutzt wurde, ergaben sich bei der ÜG-Gruppe mit GDM im Durchschnitt Glukosewerte von 88,33 mg/dl, ohne GDM 81,33 mg/dl sowie in der NG-Gruppe einen Wert von 73,33 mg/dl. Hier muss erwähnt werden, dass die Ergebnisse der Glukosemessung, obwohl sie sich in allen Versuchsgruppen als normwertig darstellen, als sehr instabil zu bewerten sind, da diese nicht in frischen Proben bestimmt worden sind. Ein weiterer gemessener Parameter dieser Blutproben stellt Insulin dar. Hier zeigten sich erhöhte Insulinwerte bei der ÜG-Gruppe mit einem Wert von 18,27 mU/l im Vergleich zur ÜG-Gruppe mit GDM bei einem Wert von 12,40 mU/l und der NG-Gruppe mit 12,67 mU/l. Bezugnehmend auf die signifikant vergrößerten Apoptoseraten in der ÜG-Gruppe ohne GDM im Verhältnis zur NG-Gruppe erweisen sich die erhöhten Insulinwerte in der ÜG-Gruppe als möglicher Erklärungsgrund. Studien konnten zeigen, dass Trophoblasten unter Stimulation mit expandierten Insulinkonzentrationen vermehrt zur Apoptose neigten.<sup>101</sup> Hier ist jedoch hervorzuheben, dass sich die genannten Insulinwerte der Gruppen im Normbereich befinden und es sich bei dem Nüchtern-Plasma nicht um die verwendeten Serumproben der Zellkulturversuche handelt.

Trotz der Annahme, dass ein GDM fördernd auf die Proliferationsraten von Zellen wirkt,<sup>103</sup> müssten die Proliferationswerte in den durchgeführten Versuchen zum Erhalt der Konformität gegenüber des erhöhten Apoptoseausmaßes eine Verminderung aufzeigen. Diese Theorie stützend, konnten Zellkulturversuche an HTR-8/SVneo Zellen nach Stimulation mit hohen Glukosespiegeln eine Unterdrückung der Proliferation und Lebensfähigkeit bzw. Viabilität der Zellen<sup>120</sup> sowie die Induktion von Apoptose detektieren.<sup>121</sup> Weitere Zellkulturversuche zeigten eine erhöhte Apoptoserate in Trophoblast-Stammzellen nach Exposition gegenüber Palmitinsäure, wobei der Anstieg abhängig von der hinzugefügten Konzentration war. Palmitinsäure ist eine freie Fettsäure im humanen Serum.<sup>122</sup> Bezugnehmend zu der durchgeführten Studie ist anzumerken, dass Fettsäuren mit einem erhöhten auftreten im Rahmen von ÜG assoziiert sind.<sup>123</sup> Diese Annahme konnte in Nüchtern-Plasmaproben der Patientinnen, deren Serum für die in vitro Zellkultur-Stimulationsversuche ausgewählt wurde, jedoch nicht bestätigt werden. Hier zeigten sich laborchemisch im Durchschnitt Triglyceridwerte von 227,33 mg/dl in der ÜG-Gruppe und 238,67 mg/dl in der NG-Gruppe. Da es sich jedoch um eine sehr geringe Stichprobe handelt, sollten diese Werte in Folgeversuchen nochmals validiert werden. Zusätzlich war der Wert der ÜG-Gruppe mit GDM mit 321,83 mg/dl im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöht. Hingegen der erhöhten Apoptoserate zeigte sich die Proliferationsrate der Trophoblasten-Stammzellen nach Kultivierung mit Palmitinsäure im Vergleich zur NG-Gruppe verringert.<sup>122</sup> Mit Blick auf die

erhöhten Triglyceride in der ÜG-Gruppe mit GDM im Vergleich zu NG-Gruppe stellen sich die Ergebnisse des Proliferationsassays weiterhin als fragwürdig dar. Als Limitation muss angemerkt werden, dass die beschriebenen Laborwerte nicht aus dem verwendeten Serum, sondern aus zusätzlich abgenommenen Nüchtern-Plasmaproben stammen. Ausgehend von den erlangten Ergebnissen der beiden erwähnten Assays, welche Auskunft über mögliche Veränderungen in der Zellhomöostase geben sollten, müssen die Proliferationsraten kritisch hinterfragt werden, während die Apoptoseraten demnach als glaubwürdig erachtet werden können. Ein zu nennender möglicher Erklärungsgrund für die unglaublichen Ergebnisse des Proliferationsassays könnte, wie bei allen von Menschenhand durchgeführten Studien, auch die fehlerhafte Ausführung des Versuchs sein. Dieser Deutungsansatz sollte mit Blick auf guter wissenschaftlicher Praxis immer in Betracht gezogen werden. Da die beschriebenen Versuche jedoch im durchgeführten Forschungsumfeld etabliert und zum Standard gehören, wird von dieser Thesis Abstand genommen.

Um die erlangten Ergebnisse der Versuche zu überprüfen und zu validieren, hätten die Apoptose- und Proliferationsraten zusätzlich in anderweitigen Tests, unabhängig von den ausgeführten Versuchen, untersucht werden müssen. So hätte bspw. ein Bromdesoxyuridin-Proliferationstest durchgeführt werden können, welcher, im Gegensatz zum MTT-Assay, die Proliferationsrate direkt misst.<sup>124</sup> Der MTT-Assay hingegen dient primär als Viabilitätstest<sup>125</sup> und lässt damit auf das Proliferationsausmaß schließen. Dies kann als weitere Limitation der Studie angesehen werden. Zur Messung der Apoptose hingegen bestünde zusätzlich noch die Möglichkeit einer Apoptosedetektion im Rahmen einer Durchflusszytometrie mittels Annexin V Färbung auf der äußeren Zellmembran sowie eine Überprüfung einer Apoptose-induzierten DNA-Fragmentierung (DNA-laddering).

Ein weiterer Versuch zur Erlangung von Erkenntnissen über das Homöostaseverhalten von Trophoblasten nach Kontakt mit Blutserum von ÜG-Schwangeren mit und ohne GDM stellte in dieser Studie die Seneszenz-assoziierte Beta-Galactosidase Färbung dar, welche Auskunft über das Seneszenzverhalten der untersuchten Zellen gibt. Im Rahmen des Versuches ließ sich weder in den Zellen, welche mit dem Serum der Studienteilnehmerinnen stimuliert wurden, noch in den verschiedenen durchgeführten Positivkontrollen ein Übertreten in die Seneszenz eruieren. Hier ist die Annahme naheliegend, dass die genutzte Zelllinie HTR-8/SVneo nicht in der Lage ist in ein inaktives Stadium überzugehen. Erklärungsgrundlage für dieses Verhalten bietet die Tatsache, dass es sich bei dieser Zelllinie um immortalisierte Zellen handelt.<sup>106</sup> Eine Immortalisierung von Zellen bedeutet, dass diese ihre Fähigkeit der Zellteilung beibehalten.<sup>126</sup> Im Kontrast dazu stellt Seneszenz die Unfähigkeit der weiteren Zellteilung als Reaktion auf Stress dar.<sup>127-130</sup> Die beiden Verhaltensformen befinden sich demnach im Widerspruch zueinander, weshalb ein Messen der Seneszenz bei der auf unbegrenzte

Zellteilung programmierter HTR-8/SVneo Zelllinie<sup>106</sup> nicht möglich erscheint. Da sich auch in der Literatur keine Angaben zum Seneszenzverhalten der Zelllinie HTR-8/SVneo vorfinden ließen, wird von einer weiteren Diskussion der Ergebnisse, mit Annahme der nicht Durchführbarkeit der Seneszenz-assoziierten Beta-Galactosidase Färbung an HTR-8/SVneo Zellen, abgesehen.

## **5.2. Der Einfluss von Übergewicht mit und ohne GDM auf die Invasivität von humanen Trophoblasten**

Um auch auf funktionaler Ebene Veränderungen der Trophoblasten nach Stimulation mit dem Serum der beschriebenen Versuchsgruppen detektieren zu können, wurde zusätzlich ein Invasionsassay durchgeführt. Die Invasivität von Trophoblasten stellt im Rahmen der plazentaren Entwicklung eine Schlüsselrolle dar und ist somit essentiell für einen komplikationslosen SS-Verlauf.<sup>131,132</sup> Hier sollte als Schwäche der Studie angemerkt werden, dass die Stimulation der verwendeten Trophoblasten aus dem ersten Trimester mit maternalem Serum des dritten Trimesters erfolgte. Der Fokus lag nach Abschluss der statistischen Auswertung vor allem auf der ÜG-Gruppe ohne GDM, welche im Verhältnis zur NG-Gruppe ein signifikant vermindertes Invasionsverhalten aufzeigte. Der signifikante Unterschied wurde dabei sowohl in der Hauptanalyse nachgewiesen als auch von der Sensitivitätsanalyse bestätigt. Für dieses Zellverhalten lassen sich mit Blick auf die Gesamtstudie folgende Theorien hervorheben:

- 1) Die in den Homöostaseassay aufgezeigte erhöhte Apoptoserate in der ÜG-Gruppe, induziert durch unbekannte Faktoren im Serum, führt in Rahmen von Zellverlusten zur verminderten Zellinvasion.
- 2) Bei der verminderten Zahl an invadierten Zellen handelt es sich um einen durch unbekannte Faktoren im mütterlichen Serum induzierten realen Verlust der Invasivität der Zellen.

Hier erscheint vor allem die zweite Hypothese naheliegend, denn in der Literatur wird beschrieben, dass Komplikationen wie Präeklampsie, die mit ÜG während der SS konnektiert sind,<sup>94</sup> zu einem veränderten Invasionsverhalten von Trophoblasten führen. Dabei wird eine Verbindung zwischen späten Fehlgeburten, gleichartig wie bei der Präeklampsie, und einer mangelnden Trophoblasteninvasion sowie Spiralarterientransformation vermutet.<sup>133</sup> Um die Hypothesen jedoch validieren zu können, sollte von weiteren Versuchen Gebrauch gemacht werden. So könnte bspw. im Rahmen einer live Zellaufnahme ein Kratzassay durchgeführt werden, welcher Auskunft gibt, ob die untersuchten Zellen einer verringerten Motilität unterliegen oder aber vermehrt absterben. Zusätzlich bestünde im Verlauf noch die

Möglichkeit zu testen, ob das verminderte Invasionsverhalten auf veränderten Levels an Matrix-Metalloproteinase-Sekretion zurückzuführen ist. Denn hier wiesen Studien an Mäusen nach, dass das Vorhandensein der Proteinase zu einer Verbesserung der Trophoblasten-invasion führt.<sup>134</sup> Bezugnehmend auf die verminderte Invasionsfähigkeit der Zellen in der ÜG-Gruppe im Vergleich zur NG-Gruppe nach Kontakt mit mütterlichem Serum, lässt sich anmerken, dass hämatologische Veränderungen, die mit ÜG einhergehen und Einfluss auf die Plazentation nehmen könnten, mehr ins Forschungsblickfeld gelangen sollten. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre die in der Literatur beschriebene chronische Inflammation bei Übergewichtigen, die auch während der SS mit veränderten Blutzusammensetzungen einhergeht.<sup>104,135,136</sup>

### **5.3. Der Einfluss der chronischen Inflammation in übergewichtigen Schwangeren auf das Apoptose- und Invasionsverhalten von Trophoblasten**

Starkes ÜG wird mit dem Umstand einer chronischen, leichtgradigen Entzündung assoziiert, welcher auch unter dem Namen „Metainflammation“ bekannt ist.<sup>105</sup> Veränderte Entzündungsprofile zeigen sich auch im Rahmen einer SS, wobei dieser Zustand, um eine erfolgreiche Einnistung sowie Plazentation und damit einhergehend eine gesunde SS gewährleisten zu können durch die Balance von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen gesteuert wird.<sup>137-141</sup> Bei übergewichtigen Frauen orientiert sich dieses Äquilibrium, durch die Gegebenheit der chronischen Entzündung, jedoch in Richtung eines proinflammatorischen Befundes.<sup>142-146</sup> Bezugnehmend auf die Ergebnisse der durchgeführten Studie lässt sich vermuten, dass somit im Rahmen der übergewichtsbedingten chronischen, niedriggradigen Entzündung vermehrt proinflammatorische Zytokine im Serum der ÜG-Schwangeren vorkommen, welche die Apoptose in Trophoblasten induzieren. Weiterhin könnte der Entzündungszustand bei verminderter Zellzahl eine Reduktion der Zellinvasion bewirken oder aber neben der veränderten Homöostase direkt in die Biologie der Trophoblasten eingreifen, sodass es zu einer realen abgeschwächten Invasion der untersuchten Zellen kommt. Dabei muss als Limitation der Arbeit das unzureichende Blutprobenvolumen und die damit einhergehende fehlende Bestimmung von Zytokinen im genutzten Serum erwähnt werden. In diesem Zusammenhang wird davon ausgegangen, dass die durch das maternale ÜG herbeigeführte, expandierte Anzahl an zirkulierenden proinflammatorischen Zytokinen das intrauterine Milieu entzündlich verändern.<sup>135,147</sup> Hier anknüpfend ist bekannt, dass Zytokine in der Lage sind die plazentare Nährstoffversorgung des Kindes zu beeinflussen.<sup>148</sup> Zusätzlich konnte in Kultur nachgewiesen werden, dass Leptin, dessen Serumkonzentration sich bei ÜG erhöht zeigt,<sup>21</sup> imstande ist, Einfluss auf die Apoptose, Proliferation und Migration von

Trophoblasten zu nehmen.<sup>149</sup> Während darüber hinaus Low-Density-Lipoproteine (LDL) in Kulturversuchen zu einem erhöhtem Apoptoseausmaß und verminderter Invasion in primären EVT führten.<sup>150</sup> Mit Blick auf die Literatur könnte die festgestellte verminderte Invasionsfähigkeit der Trophoblasten bei verringerter Zellzahl oder im Rahmen eines Funktionsverlust vermutlich zu einem aberranten Spiralarterienumbau führen, welcher wiederherum negativen Einfluss auf die Blutversorgung des Fötus nimmt.<sup>151</sup> In diesem Zusammenhang wurde bei mit fettreicher Nahrung versorgten Tieren ein beeinträchtigter Umbau der uterinen Gefäße sowie Fehler bei der plazentaren Gefäßneubildung im ersten Trimester der SS festgestellt.<sup>152</sup> Des Weiteren wird in der Literatur vermutet, dass Zytokine eine hohe Relevanz bei der Umgestaltung der glatten Muskulatur, welche die Spiralarterien umgibt, einnehmen.<sup>153</sup> Zusätzlich konnten Studien am Menschen nachweisen, dass Adipokine an der Steuerung der plazentaren Angiogenese und Proteinsynthese beteiligt sind und damit die Plazentafunktion von ÜG-Schwangeren prägen.<sup>154,155</sup> Hierbei ist ebenso die fehlende Adipokine- und LDL-Messungen im Serum der Patientinnen als Schwäche der Studie aufzuführen.

Im Rahmen von Untersuchungen zur fetoplazentaren Adaption an das intrauterine Milieu von ÜG-Schwangeren konnte eine geschlechtsspezifische Komponente, welche im Rahmen dieser Studie nicht berücksichtigt wurden, nachgewiesen werden. Dabei wendeten männliche und weibliche Föten in Kontakt mit einer gleichartigen, ungünstigen Umweltsituation unterschiedliche Kompensationsmechanismen an.<sup>156-158</sup> So beschreibt die Literatur, dass bei SS mit ÜG nur die Plazenten der weiblichen Föten erhöhte Entzündungs- und Tumornekrosefaktor (TNF)-Spiegel aufwiesen, was auf eine geschlechtsspezifische Entgegnung der Föten auf mütterliches ÜG hinweist.<sup>159</sup> Männliche Föten hingegen zeigten ein stärkeres Ansprechen auf Veränderungen im intrauterinen Umfeld.<sup>160</sup> Des Weiteren legten Studien am Mausmodell dar, dass männliche Tiere empfänglicher für Stress waren.<sup>161</sup> Diese Befunde lassen vermuten, dass männliche Föten bei einer Veränderung des intrauterinen Milieus sowie einer gestörten Stoffwechsellage der übergewichtigen Mutter referenziell zur fetalen Programmierung vulnerabler sind.<sup>160</sup> An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass die fehlende Selektion zwischen männlichen und weiblichen Föten innerhalb der Versuchsgruppen bei mangelnder Patientenauswahl der Studienkohorte als Schwäche der Studie gewertet werden muss. In Folgeanalysen sollte demnach eine geschlechtsspezifische Trennung der Versuchsgruppen erfolgen, sodass eine gesonderte Betrachtung von männlichen und weiblichen Föten möglich ist.

Des Weiteren lässt sich festhalten, dass ÜG während der SS unter anderem auf Grund vermehrt zirkulierenden Zytokinen zu einem erhöhten proinflammatorischen intrauterinen Milieu führt.<sup>135,147</sup> Dabei wird vermuten, dass dies Einfluss auf die Homöostase und Funktion von Trophoblasten nehmen kann.<sup>150</sup> Hier rückt die erhöhte Apoptoserate sowie verminderte

Invasionsfähigkeit der Trophoblasten der durchgeführten Studie in den Fokus. Eine verringerte Invasion von EVT in Folge einer verminderten Zellzahl bei erhöhten Apoptoseraten oder durch einen realen Funktionsverlust induziert, ist mit einem aberranten Umbau der plazentaren Spiralarterien und dem zu Folge mit einer verschlechterten Nährstoffversorgung des heranwachsenden Fötus assoziiert.<sup>69,75,151</sup>

Im Rahmen der chronischen Inflammation bei ÜG soll, basierend auf der Hypothese, dass das Serum der ÜG-Schwangeren Faktoren enthält, welche zur erhöhten Apoptose und verminderten Invasivität von humanen Trophoblasten führen, auf entzündliche Mediatoren eingegangen werden. Wie bereits zuvor beschrieben, zeigen ÜG-Frauen während ihrer SS ein expandiertes Entzündungsprofil im Vergleich zur NG-Schwangeren.<sup>83,87</sup> Dieser Zustand drückt sich insbesondere durch eine verändertes Zytokinprofil im Blut aus.<sup>19,162</sup> Hier wird mit Bezug auf die erfolgten Versuche explizit Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) diskutiert. Dieser nimmt eine hohe Relevanz als Modulator der Implantation sowie Funktion von Trophoblasten ein und induziert laut Publikationen Apoptose in Trophoblastzellen.<sup>163-165</sup> Im Rahmen des Caspase-Glo 3/7 Assays wurde die Apoptoserate von humanen Trophoblasten anhand der Aktivität der Caspasen 3 und 7 gemessen. Bei den genannten Caspasen handelt es sich um proteolytische Enzyme, welche innerhalb der Apoptosekaskade von Zellen eine zentrale Rolle einnehmen.<sup>166</sup> Innerhalb der Kaskade kann man zwischen Initiator-Caspasen und Effektor-Caspasen unterscheiden. Während die Initiatoren im ersten Schritt die Einleitung der Apoptose induzieren, zerlegen die Effektor Caspasen im weiteren Verlauf an der Apoptosekaskade beteiligte zelluläre Proteine. Caspase 3 und 7 gehören der Familie der Effektor-Caspasen an.<sup>167</sup> In der Literatur wird ein kausaler Zusammenhang zwischen einer TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose und der Aktivität von Caspase 7 beschrieben. Demnach könnte ein erhöhtes Vorkommen von TNF- $\alpha$  zu einer gesteigerten Aktivität von Caspase 7 führen.<sup>168</sup> Das Ausmaß dieser Aktivität kann wiederherum im Rahmen ihrer fundamentalen Rolle in der Apoptosekaskade als Indikator für das Apoptoseverhalten einer Zellpopulation genutzt werden.<sup>166</sup> Hier ansetzend konnte im Rahmen von Tiermodellen festgestellt werden, dass vorhandenes Fettgewebe in Säugetieren TNF- $\alpha$  produziert. Wobei die Produktion von TNF- $\alpha$  in ihrem Ausmaß mit dem Anteil an Adipozyten korreliert.<sup>169</sup> Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen dem maternalem BMI und dem TNF- $\alpha$  Spiegel in Blutproben nachgewiesen werden.<sup>170</sup> Hier anknüpfend lassen sich die erhöhten Apoptoseraten und verminderte Invasionsfähigkeit der Trophoblasten in den durchgeführten Versuchen aufgreifen. So lässt sich spekulieren, dass die signifikanten Apoptoseunterschiede, welche sich sowohl mit der Hauptanalyse ANOVA als auch mit der Sensitivitätsanalyse Friedman vorfinden ließen, zwischen der NG- und ÜG-Gruppe auf einen erhöhten TNF- $\alpha$ -Spiegel im Serum zurückzuführen sind. Die erhöhten Spiegel ließen sich damit erklären, dass die

mehrzahlig vorhandenen Adipozyten im Körper der ÜG-Schwangeren im Verhältnis zur NG-Gruppe vermehrt TNF- $\alpha$  sezernieren, welches zur erhöhten Aktivität der Enzyme der Kaskade und damit zu einer erhöhten Apoptoserate der humanen Trophoblasten führt.<sup>168,169</sup> Dieser Verdacht lässt sich mit Blick auf Studien, die nachweisen konnten, dass der Serumspiegel von TNF- $\alpha$  mit dem BMI zusammenhängt, erhärten.<sup>171</sup> Es lässt sich spekulieren, dass die erhöhte Apoptoserate der humanen Trophoblasten in vivo die Kontinuität der Plazentaschranke drosselt und somit schädlichen Faktoren den Durchtritt in den fetalen Kreislauf ermöglicht. Dies könnte einen Erklärungsansatz bieten, warum Kinder von ÜG-Schwangeren häufig mit einer placentaren Dysfunktion sowie pathologischen gesundheitlichen Entwicklung konfrontiert sind.<sup>51-53</sup> Das vermehrt vorkommende TNF- $\alpha$  kann auch einen möglichen Erklärungsansatz für die in Kapitel 5.2. aufgeführte Arbeitshypothesen zur verringerten Invasionsrate von Trophoblasten in ÜG-Schwangeren bieten. Denn durch einen erhöhten TNF- $\alpha$  Spiegel im Serum könnten gesteigerte Apoptoseraten induziert werden, welche dazu führen, dass die Anzahl der Trophoblasten, die in der Lage wären zu invadieren, sinkt. Auf der anderen Seite bestünde die Möglichkeit, dass das in ÜG-Schwangeren vermehrt zirkulierende TNF- $\alpha$ <sup>170</sup> direkt in die Invasivität der Zellen eingreift. Letztere Theses lässt sich mit Blick auf die Literatur bekräftigen. Denn hier wird eine inhibierende Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die extravillöse Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo, welche ebenso in den durchgeführten Versuchen dieser Arbeit verwendet wurde, beschrieben.<sup>172</sup> Um jedoch einer Hypothese valide zustimmen zu können, müssten weitere Versuche durchgeführt werden sowie eine TNF- $\alpha$  Bestimmung in den genutzten Proben erfolgen.

Zusammenfassen lässt sich, dass im Rahmen der expandierten Inflammation in ÜG-Schwangeren verschiedene Zytokine und Faktoren einen Einfluss auf die Plazenta nehmen können.<sup>83,87,150,154,155</sup> Somit sollte TNF- $\alpha$ , auch auf Grund konträrer Aussagen der Literatur bezüglich eines gesteigerten Vorkommens in ÜG-Frauen,<sup>162,170,173</sup> im Rahmen dieser Studie lediglich als Anhaltspunkt für weitere Forschung innerhalb dieses Themenschwerpunktes betrachtet werden. Zusätzlich müssen weitere Studien basierend auf den oben genannten Lösungsansätzen erfolgen. So könnten die genutzten Seren bspw. auf ihre TNF- $\alpha$  Konzentration analysiert und verglichen werden. Darüber hinaus sollten Trophoblasten in Zellkulturversuchen isoliert mit TNF- $\alpha$  stimuliert und anschließend in ihrem Apoptose- und Invasionsausmaß begutachtet werden. Des Weiteren müsste untersucht werden, inwieweit ein gesteigertes Apoptoseverhalten der Zellen der Plazentaschranke am Anfang der SS tatsächlich Einfluss auf die Kontinuität der Barriere nimmt.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die durchgeführte Studie klare Anhaltspunkte für eine veränderte Homöostase und Invasivität in Trophoblasten von ÜG-Schwangeren gibt, welche jedoch durch weitere Forschung verifiziert werden müssen.

#### **5.4. Stärken und Schwächen der Studie**

Anlehnend an die Durchführung der Versuche lässt sich positiv hervorheben, dass es sich bei dem Caspase-Glo 3/7- und Invasionsassay um ein etabliertes Verfahren der Zellkultur zur Messung des Apoptose- und Invasionsverhalten handelt. Die Ergebnisse der Assays geben somit valide Auskunft über die Apoptose- und Invasionsraten der untersuchten Zellen. Der MTT- Assay hingegen bildet nicht direkt die Proliferationsrate ab, sondern lässt nur im Rahmen einer Viabilitätsmessung auf diese schließen. Zusätzlich beinhaltete das Studiendesign nur zwei Komponenten: Zum einen die humanen Trophoblasten und zum anderen das zur Stimulation der Zellen genutzte Serum der werdenden Mütter. Demnach zeigt sich die Komplexität des dargestellten Modells, im Gegensatz zu einem Tiermodell, stark reduziert. Weitere Faktoren, die Einfluss auf die Ergebnisse nehmen könnten, lassen sich somit weitestgehend ausschließen. Darüber hinaus wurde das verwendete Serum von humanen Spendern entnommen, wodurch die Möglichkeit einer Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen gewährleistet wird. Hier anknüpfend hätte die Zellkulturstudie, um ein ausgedehnteres Spektrum an Ergebnissen zur Studieninterpretation zu erzielen, mit Versuchen an Tiermodellen erweitert werden können. Ebenso hätte der MTT-Assay zur direkten Messung der Proliferationsraten durch einen Bromdesoxyuridin-Proliferationstest Ergänzung finden können. Während die Ergebnisse des Caspase-Glo 3/7 Assay zusätzlich durch die Apoptosedetektion im Rahmen einer Durchflusszytometrie mittels Annexin V Färbung auf der äußeren Zellmembran oder Überprüfung einer Apoptose-induzierten DNA-Fragmentierung (DNA-laddering) validierbar gewesen wären. Auch in Bezug auf den Invasionsassay sind mangelnde Folgeversuche zur Validierung der Ergebnisse als Schwäche der Studie zu nennen. So hätte hier zusätzlich ein Kratzassay durchgeführt sowie die Levels an Matrix-Metalloproteinasen untersucht werden können.

Weitere Schwächen der Versuchsdurchführung sind, dass die Stichzahl der Patientinnen pro Gruppe sowie deren Messwiederholungen in ihrer Gesamtheit nicht ausreichend sind, um die Ergebnisse eindeutig als valide einzustufen. Diese müssten in Rahmen einer deutlich größer aufgezogenen Kohorte erneut bestätigt werden. In diesem Kontext sollte zusätzlich das Serum von männlichen und weiblichen Föten selektiert werden, sodass geschlechtsspezifische Faktoren, die Einfluss auf die Versuchsergebnisse nehmen könnten, eliminiert werden. Vor allem das Serum kann eine Verfälschung der Ergebnisse bedingen, denn im Rahmen der Gruppenzuordnung wurden die Patientinnen nur nach ihrem aktuellen gesundheitlichen Status bewertet. Hier kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass der gesundheitliche Zustand der schwangeren Probandinnen der Realität entspricht. So wurden bisher latente bzw. noch nicht diagnostizierte mögliche Erkrankungen nicht erfasst. Als zusätzliche Limitation muss erwähnt werden, dass es sich bei den verwendeten Blutproben um nicht-Nüchternserum handelt. Im Rahmen dessen kann nicht ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche

Nährstoffzusammensetzungen in den Proben die Ergebnisse der Studie beeinflusst haben. Aus diesem Grund erfolgte die Diskussion von bestimmten Laborparametern aus dem nicht genutzten Nüchtern-Plasma der Patientinnen. Bei einer Wiederholung der Versuche sollten die Serumproben der Probandinnen im nüchternen Zustand entnommen werden, um einen ernährungsbedingten Einfluss ausschließen und die genutzten Blutproben direkt auf ihre laborchemischen Parameter vergleichen zu können. Mit Blick auf die verwendeten Zellen lässt sich anmerken, dass diese von humanen Plazenten im ersten Trimester stammen.<sup>106</sup> Konform hierzu sollte in Folgestudien die Stimulation mit Serum von Schwangeren im ersten Trimester erfolgen. Als abschließende Schwäche der Studie müssen die, bei nicht ausreichenden Blutprobenmengen, fehlenden Messungen von Laborwerten wie bspw. TNF- $\alpha$  in den verwendeten Seren erwähnt werden. Hier sollte in zukünftigen Studien auf die Sammlung von ausreichenden Nüchternproben geachtet werden, um im Rahmen von möglichen Laborwertbestimmungen validere Aussagen zu den Gründen des veränderten Trophoblastverhaltens treffen zu können.

#### **5.4.1. Stärken und Schwächen der statistischen Auswertung**

Im Rahmen der statistischen Auswertung hebt sich als Stärke der Studie hervor, dass die Ergebnisse der Versuche zwei Tests zur Signifikanzprüfung unterlaufen mussten. Die ANOVA mit Messwiederholungen als Hauptanalyse sowie den Friedman-Test als Sensitivitätsanalyse. Somit wurden die Ergebnisse durch zwei unterschiedliche Verfahren untersucht und sind dadurch in ihrer Aussagekraft verlässlicher. Für die ANOVA als Hauptanalyse spricht, dass dieser Test die Datensätze der verschiedenen Gruppen und ihren einzelnen Patientinnen mit den einzelnen Messwiederholungen am besten darstellt. So werden keine Daten gemittelt, sondern jede Patientin wird in ihrer Individualität einzeln abgebildet. Bei jeder Patientin wird außerdem zwischen den einzelnen Messwiederholungen unterschieden, sodass diese in jedem neu angesetzten Versuch für sich alleine stehen. Eine Schwäche der ANOVA hingegen ist, dass dieser Test für normalverteilte Daten erstellt wurde und es im Rahmen des oben beschriebenen Versuchsaufbaus unmöglich ist mittels eines statistischen Tests festzustellen, ob die Daten tatsächlich normalverteilt sind. Der Grund hierfür ist, dass sich die Stichprobengröße von neun Patientinnen mit jeweils fünf Wiederholungen als zu gering erweist. Um diesem entgegenzuwirken, wurden die Ergebnisse vor Testdurchführung mit ihrem natürlichen Logarithmus modifiziert, sodass die Daten angeglichen werden konnten und die Möglichkeit einer Normalverteilung gegeben war. Dies ließ sich anhand des erstellten Streudiagramms bestätigen.

Positiv für den Friedman-Test lässt sich auflisten, dass dieser für nicht-normalverteilte Daten konzipiert wurde und somit keiner Modifizierung der Ergebnisse bedarf. Zusätzlich wurden die

Datensätze für jede Studiengruppe gemittelt, sodass die Komplexität des Versuchsaufbaus gemindert wurde und Analyseergebnisse leichter gedeutet werden konnten. Auf der anderen Seite wird, hingegen zur ANOVA, die Individualität der einzelnen Patientinnen nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund sollte die ANOVA mit Messwiederholungen als Hauptanalyse gelten. Hier ist jedoch anzumerken, dass nach Beurteilung der Versuchsergebnisse nur jenen Signifikanzen getraut werden kann, welche durch beide Analysen bestätigt wurden. Somit ist ein Unterscheiden zwischen Haupt- und Nebenanalyse final nicht von Nöten.

## 5.5. Fazit und Ausblick

Die durchgeführte Promotionsarbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit ein BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> mit und ohne GDM während der SS Einfluss auf die Homöostase und Funktion von plazentaren Trophoblasten nimmt. Dabei ergaben sich Anhaltspunkte, dass mütterliches ÜG ohne GDM zu einem aberranten Apoptose- und Invasionsverhalten führt. Im Hinblick auf die Plazentabildung während der SS beschreibt die Literatur einen Zusammenhang zwischen einer beeinträchtigten Invasionsfähigkeit von Trophoblasten und einer dysfunktionalen Plazentation.<sup>71</sup> Hier rücken die EVT, welche in vitro durch die verwendete HTR-8/SVneo Zelllinie abgebildet werden können, in den Fokus.<sup>106</sup> EVT bilden mit der Einwanderung in die mütterlichen Spiralarterien einen maßgeblichen Aspekt beim Ablauf der erfolgreichen Plazentation.<sup>71</sup> Zur Untersuchung des Prozesses wurde in verschiedenen Studien auf das Modell der Ratte zurückgegriffen.<sup>174-176</sup> Dieses Tiermodell soll laut Literatur geeignet sein, denn der Umfang der Invasion in den maternalen Bereich der Plazenta zeigt Ähnlichkeiten zur Einwanderung der Zellen in die menschliche Dezidua.<sup>177</sup> Auf Grund der Komplexität, die ein Tiermodell jedoch mit sich bringt und die daraus folgende erhöhte Anzahl an Variablen, die Einfluss auf die Ergebnisse nehmen können, wurde sich in dieser Arbeit für das Zellkulturmodell entschieden. Hier lässt sich bei Veränderung in Funktion oder Homöostase der verwendeten Zellen ein klarer Zusammenhang zu den Blutseren der Studiengruppen herstellen. Denn in der durchgeführten Studie stellten diese den einzigen Parameter, welcher auf die Zellen einwirken konnte, dar.

Nach Invasion der mütterlichen Arterien durch EVT erfolgt der Umbau dieser zu widerstandsärmeren Gefäßen, sodass die Versorgung des heranwachsenden Fötus gewährleistet werden kann.<sup>69,75</sup> Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass ein mangelhafter Umbau der Spiralarterien auf Basis verminderter Invasivität von EVT zu einem erhöhten Gefäßwiderstand führt und damit die Blutversorgung zum Fötus beeinträchtigt.<sup>151</sup> Bezugnehmend auf die durchgeführten Versuche ergaben sich die Hypothesen, dass im Serum der ÜG-Schwangeren Faktoren vorzufinden sind, welche als Apoptoseinduktor

fungieren und somit über eine verminderte Zellzahl zur Stagnation der Invasion von humanen Trophoblasten führen. Oder aber, dass die besagten Faktoren direkt in die Biologie und damit in die Invasivität der Zellen eingreifen. Die laut Literatur damit einhergehende fehlerhafte Spiralarterienkonversion sowie die folgende mangelnde Nährstoffversorgung des Fötus könnten somit als möglicher Erklärungsansatz für die gesundheitlichen Langzeitfolgen des Ungeborenen einer ÜG-Schwangere dienen.<sup>69,75</sup> In diesem Kontext wird beschrieben, dass eine aberrante Trophoblasteninvasion, die mit einem gestörten Gleichgewicht des plazentaren Gefäßsystems assoziiert wird, zu Schwierigkeiten wie Präeklampsie, eine Erkrankung deren Entstehungsrisiko bei ÜG erhöht ist, in der SS führen kann.<sup>94,178</sup> Zusätzlich ergaben Studien, dass Plazenten von Totgeburten in der 20. oder einer älteren SSW, die mit einer erhöhten Inzidenz von maternalem ÜG vor der SS in Verbindung gebracht wurden, regelwidrige Veränderungen der Spiralarterien aufzeigten.<sup>179</sup> Hier rückt die Baker-Hypothese in den Vordergrund, welche auf der Annahme beruht, dass Parameter, die ein Risiko für Krankheiten im Erwachsenenalter darstellen, intrauterin auf Grund verschiedener Ursachen erlangt werden können. Kurz- und langfristige Folgen in der gesundheitlichen Entwicklung des Kindes wären somit auf in utero abgelaufene Prozesse zurückzuführen. Einer dieser Ursachen stellt dabei die mangelhafte Plazentation während der SS dar.<sup>180</sup> Hier beschreibt die Literatur eine geringerwertige Plazentation im Rahmen einer verminderten Invasion von EVT.<sup>71</sup> Um eine erfolgreiche EVT-Invasion zu erlangen, ist auf molekularer Ebene das Zusammenspiel vielschichtiger Mechanismen von Nöten.<sup>75,181</sup> Trotz der Unabdingbarkeit einer einwandfreien Trophoblasteninvasion in der SS sind die prozessregulierenden Elemente in vivo kaum verstanden. Bisher nimmt die Literatur an, dass in diesem Zusammenhang möglicherweise deziduale Bestandteile eine gravierende Stellung einnehmen.<sup>182</sup>

Abschließen lässt sich, dass die erhöhte Apoptoserate und verminderte Invasionsfähigkeit der Trophoblasten von ÜG-Schwangeren in den durchgeführten Versuchen Anhaltspunkte für molekulare Mechanismen einer veränderten intrauterinen Umgebung, die mit einer fehlerhaften fetalen Programmierung assoziiert wird, bieten kann.<sup>51,52</sup> Um eine definitive Bestätigung dieser Annahme zu erlangen, müssen weitere Studien in diesem Themengebiet erfolgen. Explizit sollte hier jedoch auf die Verwendung einer größeren Stichprobe innerhalb der Versuchsgruppen geachtet sowie die maternalen Seren auf entzündungsfördernde Parameter untersucht werden. Ein fundierteres Verständnis für die beschriebenen Prozesse könnte, wenn auch in ferner Zukunft, dabei helfen die Entwicklung gesundheitlicher Langzeitfolgen im Leben des ungeborenen Kindes einer ÜG-Mutter zu vermeiden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. WHO European Regional Obesity Report 2022. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/353747/9789289057738-eng.pdf?sequence=1> (Zuletzt abgerufen am 18.11.2023)
2. Trasande L, Lee M, Liu Y, Weitzman M, Savitz D. Incremental charges, costs, and length of stay associated with obesity as a secondary diagnosis among pregnant women. *Med Care* 2009; **47**(10): 1046-52.
3. Cawley J, Biener A, Meyerhoefer C, Ding Y, Zvenyach T, Smolarz BG, Ramasamy A. Direct medical costs of obesity in the United States and the most populous states. *J Manag Care Spec Pharm.* 2021; **27**(3): 354-366.
4. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000; **894**: i-xii, 1-253. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11234459/> (Zuletzt abgerufen am 12.05.2023)
5. Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *Jama* 2012; **307**(5): 491-7.
6. Catalano PM. Management of obesity in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2007; **109**(2 Pt 1): 419-33.
7. Johansson S, Villamor E, Altman M, Bonamy AK, Granath F, Cnattingius S. Maternal overweight and obesity in early pregnancy and risk of infant mortality: a population based cohort study in Sweden. *Bmj* 2014; **349**: g6572.
8. Hibbard JU, Gilbert S, Landon MB, et al. Trial of labor or repeat cesarean delivery in women with morbid obesity and previous cesarean delivery. *Obstet Gynecol* 2006; **108**(1): 125-33.
9. Wloch C, Wilson J, Lamagni T, Harrington P, Charlett A, Sheridan E. Risk factors for surgical site infection following caesarean section in England: results from a multicentre cohort study. *Bjog* 2012; **119**(11): 1324-33.
10. Duhl AJ, Paidas MJ, Ural SH, et al. Antithrombotic therapy and pregnancy: consensus report and recommendations for prevention and treatment of venous thromboembolism and adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 2007; **197**(5): 457.e1-21.
11. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; **183**(1): S1-s22.
12. Metwally M, Ong KJ, Ledger WL, Li TC. Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence. *Fertil Steril* 2008; **90**(3): 714-26.

13. Catalano PM, Shankar K. Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *Bmj* 2017; **356**: j1.
14. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol* 2009; **587**(Pt 4): 905-15.
15. Voerman E, Santos S, Patro Golab B, et al. Maternal body mass index, gestational weight gain, and the risk of overweight and obesity across childhood: An individual participant data meta-analysis. *PLoS Med* 2019; **16**(2): e1002744.
16. Razaz N, Villamor E, Muraca GM, Bonamy AE, Cnattingius S. Maternal obesity and risk of cardiovascular diseases in offspring: a population-based cohort and sibling-controlled study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020; **8**(7): 572-81.
17. Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 2008; **51**(2): 383-92.
18. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 2005; **115**(3): e290-6.
19. Catalano PM, Presley L, Minium J, Hauguel-de Mouzon S. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes Care* 2009; **32**(6): 1076-80.
20. Guzmán-Bárceñas J, Hernández JA, Arias-Martínez J, Baptista-González H, Ceballos-Reyes G, Irlés C. Estimation of umbilical cord blood leptin and insulin based on anthropometric data by means of artificial neural network approach: identifying key maternal and neonatal factors. *BMC Pregnancy Childbirth* 2016; **16**(1): 179.
21. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; **334**(5): 292-5.
22. Castro-Rodriguez JA, Forno E, Casanello P, Padilla O, Krause BJ, Uauy R. Leptin in Cord Blood Associates with Asthma Risk at Age 3 in the Offspring of Women with Gestational Obesity. *Ann Am Thorac Soc* 2020; **17**(12): 1583-9.
23. Heyob KM, Mieth S, Sugar SS, et al. Maternal high-fat diet alters lung development and function in the offspring. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2019; **317**(2): L167-174.
24. Mayor RS, Finch KE, Zehr J, et al. Maternal high-fat diet is associated with impaired fetal lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015; **309**(4): L360-8.
25. Smoothy J, Larcombe AN, Chivers EK, Matthews VB, Gorman S. Maternal high fat diet compromises survival and modulates lung development of offspring, and impairs lung function of dams (female mice). *Respir Res* 2019; **20**(1): 21.
26. Pugh SJ, Richardson GA, Hutcheon JA, et al. Maternal Obesity and Excessive Gestational Weight Gain Are Associated with Components of Child Cognition. *J Nutr* 2015; **145**(11): 2562-9.

27. Tanda R, Salsberry PJ, Reagan PB, Fang MZ. The impact of prepregnancy obesity on children's cognitive test scores. *Matern Child Health J* 2013; **17**(2): 222-9.
28. Crisham Janik MD, Newman TB, Cheng YW, Xing G, Gilbert WM, Wu YW. Maternal diagnosis of obesity and risk of cerebral palsy in the child. *J Pediatr* 2013; **163**(5): 1307-12.
29. Villamor E, Tedroff K, Peterson M, et al. Association Between Maternal Body Mass Index in Early Pregnancy and Incidence of Cerebral Palsy. *Jama* 2017; **317**(9): 925-36.
30. Xiao D, Qu Y, Huang L, Wang Y, Li X, Mu D. Association between maternal overweight or obesity and cerebral palsy in children: A meta-analysis. *PLoS One* 2018; **13**(10): e0205733.
31. Robinson M, Zubrick SR, Pennell CE, et al. Pre-pregnancy maternal overweight and obesity increase the risk for affective disorders in offspring. *J Dev Orig Health Dis* 2013; **4**(1): 42-8.
32. Kim SY, England L, Wilson HG, Bish C, Satten GA, Dietz P. Percentage of gestational diabetes mellitus attributable to overweight and obesity. *Am J Public Health* 2010; **100**(6): 1047-52.
33. O'Sullivan JB. Gestational diabetes. Unsuspected, asymptomatic diabetes in pregnancy. *N Engl J Med*. 1961; **264**: 1082-5.
34. Paulo MS, Abdo NM, Bettencourt-Silva R, Al-Rifai RH. Gestational Diabetes Mellitus in Europe: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prevalence Studies. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021; **12**: 691033.
35. Deutsche Diabetes Gesellschaft, Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe. S3-Leitlinie Gestationsdiabetes mellitus (GDM), Diagnostik, Therapie und Nachsorge. AWMF-Registernummer: 057-008 2018: 9, 11, 19–45,.  
[https://register.awmf.org/assets/guidelines/057-008l\\_S3\\_Gestationsdiabetes-mellitus-GDM-Diagnostik-Therapie-Nachsorge\\_2019-06.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/057-008l_S3_Gestationsdiabetes-mellitus-GDM-Diagnostik-Therapie-Nachsorge_2019-06.pdf) (Zuletzt abgerufen am 01.06.2023).
36. Stang J, Huffman LG. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Obesity, Reproduction, and Pregnancy Outcomes. *J Acad Nutr Diet* 2016; **116**(4): 677-91.
37. Zhao P, Liu E, Qiao Y, et al. Maternal gestational diabetes and childhood obesity at age 9-11: results of a multinational study. *Diabetologia* 2016; **59**(11): 2339-48.
38. Dabelea D, Hanson RL, Lindsay RS, et al. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. *Diabetes* 2000; **49**(12): 2208-11.
39. Fetita LS, Sobngwi E, Serradas P, Calvo F, Gautier JF. Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**(10): 3718-24.
40. Kelstrup L, Damm P, Mathiesen ER, et al. Insulin resistance and impaired pancreatic  $\beta$ -cell function in adult offspring of women with diabetes in pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; **98**(9): 3793-801.

41. Schwartz R, Gruppuso PA, Petzold K, Brambilla D, Hiilesmaa V, Teramo KA. Hyperinsulinemia and macrosomia in the fetus of the diabetic mother. *Diabetes Care* 1994; **17**(7): 640-8.
42. Pedersen J. Diabetes and pregnancy; blood sugar of newborn infants during fasting and glucose administration. *Ugeskr Laeger* 1952; **114**(21): 685.
43. Gascho CL, Leandro DM, Ribeiro EST, Silva JC. Predictors of cesarean delivery in pregnant women with gestational diabetes mellitus. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2017; **39**(2): 60-5.
44. Scifres CM, Feghali M, Dumont T, et al. Large-for-Gestational-Age Ultrasound Diagnosis and Risk for Cesarean Delivery in Women With Gestational Diabetes Mellitus. *Obstet Gynecol* 2015; **126**(5): 978-86.
45. Langer O, Yogev Y, Most O, Xenakis EM. Gestational diabetes: the consequences of not treating. *Am J Obstet Gynecol* 2005; **192**(4): 989-97.
46. Esakoff TF, Cheng YW, Sparks TN, Caughey AB. The association between birthweight 4000 g or greater and perinatal outcomes in patients with and without gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 2009; **200**(6): 672.e1-4.
47. Petitt DJ, Bennett PH, Knowler WC, Baird HR, Aleck KA. Gestational diabetes mellitus and impaired glucose tolerance during pregnancy. Long-term effects on obesity and glucose tolerance in the offspring. *Diabetes* 1985; **34** Suppl 2: 119-22.
48. Tam WH, Ma RCW, Ozaki R, et al. In Utero Exposure to Maternal Hyperglycemia Increases Childhood Cardiometabolic Risk in Offspring. *Diabetes Care* 2017; **40**(5): 679-86.
49. Vohr BR, Boney CM. Gestational diabetes: the forerunner for the development of maternal and childhood obesity and metabolic syndrome? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; **21**(3): 149-57.
50. Lee SC, Pu YB, Chow CC, et al. Diabetes in Hong Kong Chinese: evidence for familial clustering and parental effects. *Diabetes Care* 2000; **23**(9): 1365-8.
51. Chandrasekaran S, Neal-Perry G. Long-term consequences of obesity on female fertility and the health of the offspring. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2017; **29**(3): 180-7.
52. Myatt L, Maloyan A. Obesity and Placental Function. *Semin Reprod Med* 2016; **34**(1): 42-9.
53. Reijnders IF, Mulders A, van der Windt M, Steegers EAP, Steegers-Theunissen RPM. The impact of periconceptional maternal lifestyle on clinical features and biomarkers of placental development and function: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2019; **25**(1): 72-94.
54. Sibley CP. Understanding placental nutrient transfer--why bother? New biomarkers of fetal growth. *J Physiol* 2009; **587**(Pt 14): 3431-40.

55. Cindrova-Davies T, Sferruzzi-Perri AN. Human placental development and function. *Semin Cell Dev Biol* 2022; **131**: 66-77.
56. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015; **370**(1663): 20140066.
57. Mossman HW. Classics revisited: Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Placenta* 1991; **12**(1): 1-5.
58. Welsch S, Kummer W., & Deller T. (2014). Lehrbuch Histologie. 4rd ed. Amsterdam: Elsevier.
59. Schlafke S, Enders AC. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol Reprod* 1975; **12**(1): 41-65.
60. Lüllmann-Rauch. (2019). Taschenlehrbuch Histologie. 6rd ed. New York: Thieme.
61. Shahbazi MN, Jedrusik A, Vuoristo S, et al. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nat Cell Biol* 2016; **18**(6): 700-8.
62. Aplin JD, Whittaker H, Jana Lim YT, Swietlik S, Charnock J, Jones CJ. Hemangioblastic foci in human first trimester placenta: Distribution and gestational profile. *Placenta* 2015; **36**(10): 1069-77.
63. Ulfing. (2019). Kurzlehrbuch Histologie. 5rd ed. New York: Thieme.
64. Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 2004; **114**(5-6): 397-407.
65. Jansson T. Amino acid transporters in the human placenta. *Pediatr Res* 2001; **49**(2): 141-7.
66. Strid H, Powell TL. ATP-dependent Ca<sup>2+</sup> transport is up-regulated during third trimester in human syncytiotrophoblast basal membranes. *Pediatr Res* 2000; **48**(1): 58-63.
67. Malassiné A, Frenzo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update* 2003; **9**(6): 531-9.
68. Pijnenborg R, Vercruyse L, Carter AM. Deep trophoblast invasion and spiral artery remodelling in the placental bed of the lowland gorilla. *Placenta* 2011; **32**(8): 586-91.
69. Moser G, Windsperger K, Pollheimer J, de Sousa Lopes SC, Huppertz B. Human trophoblast invasion: new and unexpected routes and functions. *Histochem Cell Biol* 2018; **150**(4): 361-70.
70. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003; **69**(1): 1-7.
71. Knöfler M, Haider S, Saleh L, Pollheimer J, Gamage T, James J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cell Mol Life Sci* 2019; **76**(18): 3479-96.

72. Knöfler M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol* 2010; **54**(2-3): 269-80.
73. Moser G, Weiss G, Sundl M, et al. Extravillous trophoblasts invade more than uterine arteries: evidence for the invasion of uterine veins. *Histochem Cell Biol* 2017; **147**(3): 353-66.
74. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 2004; **114**(6): 744-54.
75. Silva JF, Serakides R. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. *Cell Adh Migr* 2016; **10**(1-2): 88-110.
76. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta* 2009; **30**(6): 473-82.
77. Velicky P, Meinhardt G, Plessl K, et al. Genome amplification and cellular senescence are hallmarks of human placenta development. *PLoS Genet* 2018; **14**(10): e1007698.
78. Abbas Y, Turco MY, Burton GJ, Moffett A. Investigation of human trophoblast invasion in vitro. *Hum Reprod Update* 2020; **26**(4): 501-13.
79. Huang L, Liu J, Feng L, Chen Y, Zhang J, Wang W. Maternal prepregnancy obesity is associated with higher risk of placental pathological lesions. *Placenta* 2014; **35**(8): 563-9.
80. Howell KR, Powell TL. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reproduction* 2017; **153**(3): R97-r108.
81. Musa E, Salazar-Petres E, Arowolo A, Levitt N, Matjila M, Sferruzzi-Perri AN. Obesity and gestational diabetes independently and collectively induce specific effects on placental structure, inflammation and endocrine function in a cohort of South African women. *J Physiol* 2023; **601**(7): 1287-306.
82. Calabuig-Navarro V, Puchowicz M, Glazebrook P, et al. Effect of  $\omega$ -3 supplementation on placental lipid metabolism in overweight and obese women. *Am J Clin Nutr* 2016; **103**(4): 1064-72.
83. Challier JC, Basu S, Bintein T, et al. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta* 2008; **29**(3): 274-81.
84. Aye IL, Jansson T, Powell TL. TNF- $\alpha$  stimulates System A amino acid transport in primary human trophoblast cells mediated by p38 MAPK signaling. *Physiol Rep* 2015; **3**(10).
85. Jansson N, Rosario FJ, Gaccioli F, et al. Activation of placental mTOR signaling and amino acid transporters in obese women giving birth to large babies. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; **98**(1): 105-13.
86. Jarvie E, Hauguel-de-Mouzon S, Nelson SM, Sattar N, Catalano PM, Freeman DJ. Lipotoxicity in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome and obesity in the offspring. *Clin Sci (Lond)* 2010; **119**(3): 123-9.

87. Denison FC, Roberts KA, Barr SM, Norman JE. Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function. *Reproduction* 2010; **140**(3): 373-85.
88. Hayes EK, Lechowicz A, Petrik JJ, et al. Adverse fetal and neonatal outcomes associated with a life-long high fat diet: role of altered development of the placental vasculature. *PLoS One* 2012; **7**(3): e33370.
89. Hastie R, Lappas M. The effect of pre-existing maternal obesity and diabetes on placental mitochondrial content and electron transport chain activity. *Placenta* 2014; **35**(9): 673-83.
90. Daskalakis G, Marinopoulos S, Krielesi V, et al. Placental pathology in women with gestational diabetes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; **87**(4): 403-7.
91. Taricco E, Radaelli T, Nobile de Santis MS, Cetin I. Foetal and placental weights in relation to maternal characteristics in gestational diabetes. *Placenta* 2003; **24**(4): 343-7.
92. Pérez-Pérez A, Maymó JL, Gambino YP, et al. Activated translation signaling in placenta from pregnant women with gestational diabetes mellitus: possible role of leptin. *Horm Metab Res* 2013; **45**(6): 436-42.
93. Esakoff TF, Guillet A, Caughey AB. Does small for gestational age worsen outcomes in gestational diabetics?(). *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017; **30**(8): 890-3.
94. Durst JK, Tuuli MG, Stout MJ, Macones GA, Cahill AG. Degree of obesity at delivery and risk of preeclampsia with severe features. *Am J Obstet Gynecol* 2016; **214**(5): 651.e1-5.
95. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005; **308**(5728): 1592-4.
96. Nerenberg KA, Johnson JA, Leung B, et al. Risks of gestational diabetes and preeclampsia over the last decade in a cohort of Alberta women. *J Obstet Gynaecol Can* 2013; **35**(11): 986-94.
97. Schneider S, Freerksen N, Röhrig S, Hoefl B, Maul H. Gestational diabetes and preeclampsia--similar risk factor profiles? *Early Hum Dev* 2012; **88**(3): 179-84.
98. Ostlund I, Haglund B, Hanson U. Gestational diabetes and preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; **113**(1): 12-6.
99. Boyd J HW. (1970). The human placenta. Cambridge: W.Heffer & Sons Ltd.
100. Liang C, DeCourcy K, Prater MR. High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice. *Metabolism* 2010; **59**(7): 943-50.
101. Vega M, Mauro M, Williams Z. Direct toxicity of insulin on the human placenta and protection by metformin. *Fertil Steril* 2019; **111**(3): 489-96.e5.
102. Boden G, Homko C, Barrero CA, et al. Excessive caloric intake acutely causes oxidative stress, GLUT4 carbonylation, and insulin resistance in healthy men. *Sci Transl Med* 2015; **7**(304): 304re7.

103. Zheng Y, Huang M, Lu X, et al. Association of hyperglycaemia with the placenta of GDM-induced macrosomia with normal pre-pregnancy BMI and the proliferation of trophoblast cells. *J Obstet Gynaecol* 2022; **42**(6): 1759-68.
104. Madan JC, Davis JM, Craig WY, et al. Maternal obesity and markers of inflammation in pregnancy. *Cytokine* 2009; **47**(1): 61-4.
105. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 2011; **29**: 415-45.
106. ATCC. HTR-8/SVneo (CRL-3271™) Product Sheet. <https://www.atcc.org/api/pdf/product-sheet?id=CRL-3271> (Zuletzt abgerufen am 14.04.2023)
107. Promega Corporation. Caspase-Glo® 3/7 Assay. Technical Bulletin TB323. <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf?la=en> (Zuletzt abgerufen am 02.03.2021)
108. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**(1-2): 55-63.
109. Abcam. Ab211091- MTT Cell Proliferation Assay Kit. [https://www.abcam.com/ps/products/211/ab211091/documents/MTT-Assay-protocol-book-v2-ab211091%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/211/ab211091/documents/MTT-Assay-protocol-book-v2-ab211091%20(website).pdf) (Zuletzt abgerufen 18.02.2021)
110. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(20): 9363-7.
111. Kretschmer T, Schulze-Edinghausen M, Turnwald EM, et al. Effect of Maternal Obesity in Mice on IL-6 Levels and Placental Endothelial Cell Homeostasis. *Nutrients* 2020; **12**(2).
112. Kipkeew F, Kirsch M, Klein D, Wuelling M, Winterhager E, Gellhaus A. CCN1 (CYR61) and CCN3 (NOV) signaling drives human trophoblast cells into senescence and stimulates migration properties. *Cell Adh Migr* 2016; **10**(1-2): 163-78.
113. Repesh LA. A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion. *Invasion Metastasis* 1989; **9**(3): 192-208.
114. Appel S, Ankerne J, Appel J, Oberthuer A, Mallmann P, Dötsch J. CNN3 regulates trophoblast invasion and is upregulated by hypoxia in BeWo cells. *PLoS One* 2014; **9**(7): e103216.
115. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, et al. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989; **57**(1): 79-88.
116. Meikrantz W, Schlegel R. Apoptosis and the cell cycle. *J Cell Biochem* 1995; **58**(2): 160-74.
117. Compton MM, Cidlowski JA. Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 1986; **118**(1): 38-45.

118. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 1991; **349**(6306): 254-6.
119. Strasser A, Harris AW, Cory S. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 1991; **67**(5): 889-99.
120. Peng HY, Li MQ, Li HP. High glucose suppresses the viability and proliferation of HTR-8/SVneo cells through regulation of the miR-137/PRKAA1/IL-6 axis. *Int J Mol Med* 2018; **42**(2): 799-810.
121. Zhang C, Zhao D. MicroRNA-362-5p promotes the proliferation and inhibits apoptosis of trophoblast cells via targeting glutathione-disulfide reductase. *Bioengineered* 2021; **12**(1): 2410-9.
122. Jungheim ES, Loudon ED, Chi MM, Frolova AI, Riley JK, Moley KH. Preimplantation exposure of mouse embryos to palmitic acid results in fetal growth restriction followed by catch-up growth in the offspring. *Biol Reprod* 2011; **85**(4): 678-83.
123. Opie LH, Walfish PG. Plasma free fatty acid concentrations in obesity. *N Engl J Med* 1963; **268**: 757-60.
124. Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982; **218**(4571): 474-5.
125. Levitz SM, Diamond RD. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J Infect Dis* 1985; **152**(5): 938-45.
126. Shay JW, Wright WE, Werbin H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1072**(1): 1-7.
127. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**(9): 729-40.
128. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007; **130**(2): 223-33.
129. Hayflick L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res* 1965; **37**: 614-36.
130. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev* 2010; **24**(22): 2463-79.
131. Hammer A. Immunological regulation of trophoblast invasion. *J Reprod Immunol* 2011; **90**(1): 21-8.
132. Soares MJ, Chakraborty D, Kubota K, Renaud SJ, Rumi MA. Adaptive mechanisms controlling uterine spiral artery remodeling during the establishment of pregnancy. *Int J Dev Biol* 2014; **58**(2-4): 247-59.
133. Ball E, Bulmer JN, Ayis S, Lyall F, Robson SC. Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. *J Pathol* 2006; **208**(4): 535-42.

134. Zhang S, Mesalam A, Joo MD, et al. Matrix metalloproteinases improves trophoblast invasion and pregnancy potential in mice. *Theriogenology* 2020; **151**: 144-50.
135. Basu S, Haghiac M, Surace P, et al. Pregravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation. *Obesity (Silver Spring)* 2011; **19**(3): 476-82.
136. Christian LM, Porter K. Longitudinal changes in serum proinflammatory markers across pregnancy and postpartum: effects of maternal body mass index. *Cytokine* 2014; **70**(2): 134-40.
137. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 2004; **5**(3): 266-71.
138. Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med* 2000; **192**(2): 259-70.
139. Care AS, Diener KR, Jasper MJ, Brown HM, Ingman WV, Robertson SA. Macrophages regulate corpus luteum development during embryo implantation in mice. *J Clin Invest* 2013; **123**(8): 3472-87.
140. Fest S, Aldo PB, Abrahams VM, et al. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2007; **57**(1): 55-66.
141. Griffith OW, Chavan AR, Protopapas S, Maziarz J, Romero R, Wagner GP. Embryo implantation evolved from an ancestral inflammatory attachment reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; **114**(32): E6566-e75.
142. Castellana B, Perdu S, Kim Y, et al. Maternal obesity alters uterine NK activity through a functional KIR2DL1/S1 imbalance. *Immunol Cell Biol* 2018; **96**(8): 805-19.
143. Nakajima S, Koh V, Kua LF, et al. Accumulation of CD11c+CD163+ Adipose Tissue Macrophages through Upregulation of Intracellular 11 $\beta$ -HSD1 in Human Obesity. *J Immunol* 2016; **197**(9): 3735-45.
144. Saben J, Lindsey F, Zhong Y, et al. Maternal obesity is associated with a lipotoxic placental environment. *Placenta* 2014; **35**(3): 171-7.
145. Sisino G, Bouckennooghe T, Aurientis S, Fontaine P, Storme L, Vambergue A. Diabetes during pregnancy influences Hofbauer cells, a subtype of placental macrophages, to acquire a pro-inflammatory phenotype. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1832**(12): 1959-68.
146. Thakali KM, Saben J, Faske JB, et al. Maternal pregravid obesity changes gene expression profiles toward greater inflammation and reduced insulin sensitivity in umbilical cord. *Pediatr Res* 2014; **76**(2): 202-10.
147. Segovia SA, Vickers MH, Reynolds CM. The impact of maternal obesity on inflammatory processes and consequences for later offspring health outcomes. *J Dev Orig Health Dis* 2017; **8**(5): 529-40.

148. Ingvorsen C, Brix S, Ozanne SE, Hellgren LI. The effect of maternal Inflammation on foetal programming of metabolic disease. *Acta Physiol (Oxf)* 2015; **214**(4): 440-9.
149. St-Germain LE, Castellana B, Baltayeva J, Beristain AG. Maternal Obesity and the Uterine Immune Cell Landscape: The Shaping Role of Inflammation. *Int J Mol Sci* 2020; **21**(11).
150. Pavan L, Tsatsaris V, Hermouet A, Therond P, Evain-Brion D, Fournier T. Oxidized low-density lipoproteins inhibit trophoblastic cell invasion. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**(4): 1969-72.
151. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu* 1972; **1**: 177-91.
152. Stuart TJ, O'Neill K, Condon D, et al. Diet-induced obesity alters the maternal metabolome and early placenta transcriptome and decreases placenta vascularity in the mouse. *Biol Reprod* 2018; **98**(6): 795-809.
153. Whitley GS, Cartwright JE. Trophoblast-mediated spiral artery remodelling: a role for apoptosis. *J Anat* 2009; **215**(1): 21-6.
154. Islami D, Bischof P, Chardonnens D. Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol Hum Reprod* 2003; **9**(7): 395-8.
155. Pérez-Pérez A, Maymó J, Gambino Y, et al. Leptin stimulates protein synthesis-activating translation machinery in human trophoblastic cells. *Biol Reprod* 2009; **81**(5): 826-32.
156. Barke TL, Money KM, Du L, et al. Sex modifies placental gene expression in response to metabolic and inflammatory stress. *Placenta* 2019; **78**: 1-9.
157. Leon-Garcia SM, Roeder HA, Nelson KK, et al. Maternal obesity and sex-specific differences in placental pathology. *Placenta* 2016; **38**: 33-40.
158. Mandò C, Calabrese S, Mazzocco MI, et al. Sex specific adaptations in placental biometry of overweight and obese women. *Placenta* 2016; **38**: 1-7.
159. Muralimanoharan S, Guo C, Myatt L, Maloyan A. Sexual dimorphism in miR-210 expression and mitochondrial dysfunction in the placenta with maternal obesity. *Int J Obes (Lond)* 2015; **39**(8): 1274-81.
160. Eriksson JG, Kajantie E, Osmond C, Thornburg K, Barker DJ. Boys live dangerously in the womb. *Am J Hum Biol* 2010; **22**(3): 330-5.
161. Mueller BR, Bale TL. Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *J Neurosci* 2008; **28**(36): 9055-65.
162. Stewart FM, Freeman DJ, Ramsay JE, Greer IA, Caslake M, Ferrell WR. Longitudinal assessment of maternal endothelial function and markers of inflammation and placental function throughout pregnancy in lean and obese mothers. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**(3): 969-75.

163. Knöfler M, Mösl B, Bauer S, Griesinger G, Husslein P. TNF-alpha/TNFR1 in primary and immortalized first trimester cytotrophoblasts. *Placenta* 2000; **21**(5-6): 525-35.
164. Pavlov OV, Niauri DA, Selutin AV, Selkov SA. Coordinated expression of TNF $\alpha$ - and VEGF-mediated signaling components by placental macrophages in early and late pregnancy. *Placenta* 2016; **42**: 28-36.
165. Siwetz M, Blaschitz A, El-Heliebi A, et al. TNF- $\alpha$  alters the inflammatory secretion profile of human first trimester placenta. *Lab Invest* 2016; **96**(4): 428-38.
166. Miller DK. The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin Immunol* 1997; **9**(1): 35-49.
167. Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 2005; **24**(33): 5137-48.
168. Duan H, Chinnaiyan AM, Hudson PL, Wing JP, He WW, Dixit VM. ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 is activated during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996; **271**(3): 1621-5.
169. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; **259**(5091): 87-91.
170. Aye IL, Lager S, Ramirez VI, et al. Increasing maternal body mass index is associated with systemic inflammation in the mother and the activation of distinct placental inflammatory pathways. *Biol Reprod* 2014; **90**(6): 129.
171. Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; **69**(1): 29-35.
172. Wen Z, Chen Y, Long Y, Yu J, Li M. Tumor necrosis factor-alpha suppresses the invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells through microRNA-145-5p-mediated downregulation of Cyr61. *Life Sci* 2018; **209**: 132-9.
173. Friis CM, Paasche Roland MC, Godang K, et al. Adiposity-related inflammation: effects of pregnancy. *Obesity (Silver Spring)* 2013; **21**(1): E124-30.
174. Ain R, Canham LN, Soares MJ. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Dev Biol* 2003; **260**(1): 176-90.
175. Konno T, Rempel LA, Rumi MA, et al. Chromosome-substituted rat strains provide insights into the genetics of placentation. *Physiol Genomics* 2011; **43**(15): 930-41.
176. Rosario GX, Ain R, Konno T, Soares MJ. Intrauterine fate of invasive trophoblast cells. *Placenta* 2009; **30**(5): 457-63.
177. Soares MJ, Chakraborty D, Renaud SJ, et al. Regulatory pathways controlling the endovascular invasive trophoblast cell lineage. *J Reprod Dev* 2012; **58**(3): 283-7.
178. Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, et al. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1991; **98**(7): 648-55.

179. Avagliano L, Marconi AM, Romagnoli S, Bulfamante GP. Abnormal spiral arteries modification in stillbirths: the role of maternal prepregnancy body mass index. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; **25**(12): 2789-92.
180. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *Bmj* 1995; **311**(6998): 171-4.
181. Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; **5**: 6.
182. Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum Reprod Update* 2008; **14**(4): 335-44.

## **7. Anhang**

### **7.1. Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b> Darstellung der Studienkohorte und Versuchsgruppen	<b>24</b>
<b>Abbildung 2:</b> Streudiagramm der logarithmierten Patientendaten des Apoptoseassays	<b>36</b>
<b>Abbildung 3:</b> Apoptoserate der Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo nach Stimulation mit maternalem Serum	<b>37</b>
<b>Abbildung 4:</b> Streudiagramm der logarithmierten Patientendaten des Proliferationsassays	<b>38</b>
<b>Abbildung 5:</b> Proliferationsrate der Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo nach Stimulation mit maternalem Serum	<b>40</b>
<b>Abbildung 6:</b> Streudiagramm der logarithmierten Patientendaten des Invasionsassays	<b>41</b>
<b>Abbildung 7:</b> Invasionsrate der Trophoblastzelllinie HTR-8/SVneo nach Stimulation mit maternalem Serum	<b>42</b>

### **7.2. Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Zellkulturprodukte	<b>20</b>
<b>Tabelle 2:</b> Gebrauchsmaterialien	<b>20</b>
<b>Tabelle 3:</b> Angesetzte Lösungen	<b>21</b>
<b>Tabelle 4:</b> Kommerziell erworbene Kits	<b>22</b>
<b>Tabelle 5:</b> Puffer und Chemikalien	<b>22</b>
<b>Tabelle 6:</b> Geräte	<b>22</b>
<b>Tabelle 7:</b> Softwares	<b>23</b>
<b>Tabelle 8:</b> Ein- und Ausschlusskriterien der Studienkohorte der Dissertation	<b>25</b>
<b>Tabelle 9:</b> Phänotypische Daten der Versuchsgruppen	<b>35</b>