

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 maternalen Übergewichts &  
Gestationsdiabetes auf proinflammatorische  
Faktoren in der Plazenta – eine klinisch-  
experimentelle Untersuchung an humanem  
Plazentagewebe sowie fetalem und maternalem Blut**

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

vorgelegt von  
Lisa Marie Sgonina  
aus Bremen

promoviert am 09. Juli 2025



Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. W. Dötsch  
2. Gutachter: Professor Dr. med. W. Neuhaus

## 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:

Frau Dr. rer. nat. Sarah Appel  
Frau Maria Wohlfarth

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 Studiendesign der humanen Plazentakohorte wurde durch Dr. Sarah Appel und Dr. Eva-Maria Turnwald erarbeitet. Die Aufklärungsgespräche und Blutentnahmen der werdenden Mütter, die Asservation der Daten aus den Mutterpässen, sowie die Präparation der Plazenten sind nach Anleitung durch Frau Dr. rer. nat. Sarah Appel und Frau Dr. med. Eva-Maria Turnwald von mir selbst, sowie folgenden weiteren DoktorandInnen der Arbeitsgruppe ausgeführt worden: Marie Woite, Franziska Neu, Jana Thomas, Catharina Gündel, Judith Fischbach, Chiara Faridi und Pavel Pavlov.

Die Entnahme der maternalen Blutproben unmittelbar vor geplanter Sectio im Kreißaal erfolgte durch die Klinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin der Uniklinik Köln.

Die Bereitstellung der Plazenten erfolgte durch das Kreissaalteam der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe unter der Leitung von Dr. med. Berthold Grüttner.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente (RNA-Isolation, Analyse der cDNA mittels qRT-PCR, sowie Immunhistochemie) sind von mir unter Anleitung von Frau Dr. rer. nat. Sarah Appel, Frau Dr. med. Eva-Maria Turnwald und der Biologielaborantin Frau Maria Wohlfarth durchgeführt worden.

Für die Methodenetablierung der quantitativen Analyse der Leukozyten mittels Immunhistochemie erhielt ich Unterstützung durch die Imaging Facility des CECAD (Cologne Excellence Cluster for Aging and Aging-Associated Diseases), insbesondere durch den Bioinformatiker Peter Zentis.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Blutuntersuchungen wurden in meinem Auftrag und meiner Vorbereitung, aber ohne meine Mitarbeit, vom Zentrallabor der Uniklinik Köln ermittelt.

Unterstützung für die statistische Auswertung mit SPSS erhielt ich durch das Institut für Medizinische Statistik und Bioinformatik der Universität zu Köln.

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 09.07.2025

Unterschrift: .....

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank an all diejenigen aussprechen, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Ich möchte mich hiermit bedanken bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jörg Dötsch, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Sarah Appel für die hervorragende und zuverlässige Betreuung bei der Erarbeitung meiner Forschungsfrage, ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft und mehrfaches, mühevollles Korrekturlesen meiner Arbeit. Vielen Dank auch an Frau Dr. med Eva-Maria Turnwald für die wertvolle Anleitung, Geduld und Unterstützung. Ihre Expertise und Ihr Engagement haben maßgeblich zu meinem wissenschaftlichen Interesse und Fortschritt beigetragen.

Ein herzliches Dankeschön geht an Maria Wohlfarth, die mir im Labor stets zur Seite stand und die Etablierung meiner Methoden möglich machte. Ebenso bedanke ich mich bei dem gesamten Team der Translationalen Neonatologie, die mir mit ihren Anregungen, Diskussionen und der gemeinsamen Arbeit stets zur Seite standen. Die Zusammenarbeit in unserem Team war nicht nur lehrreich, sondern hat auch viel Freude bereitet.

Ich möchte mich ebenfalls bei den Teilnehmerinnen unserer Plazentastudie bedanken, ohne deren Mitwirkung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ihr Vertrauen in meine Forschung schätze ich sehr.

Für die finanzielle Förderung meines Forschungsprojekts danke ich dem Köln Fortune Programm.

Ein großer Dank gebührt meinen Eltern, Geschwistern und FreundInnen für ihre unermüdliche Unterstützung und ihr Verständnis während der oft herausfordernden Phasen dieser Reise. Liebe Tamara und beide Rebeccas, eure offenen Ohren und Glaube an mich hat mir Kraft gegeben und mich motiviert, mein Ziel zu verfolgen. Lieber Fabian, ganz besonders zum Schluss hast du mich unermüdlich mit deinem Wissen über Statistik und, nicht zu unterschätzen, deinem Humor unterstützt.

Danke, Flake und Ghost, die mir die Ruhe und Geduld verliehen haben, viele Stunden am Stück an meiner Dissertation zu schreiben.

Zuletzt danke ich allen, die auf irgendeine Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben. Jede/r einzelne von Ihnen und Euch hat einen Teil dazu beigetragen, dass ich dieses Kapitel meines Lebens erfolgreich abschließen konnte.

Vielen Dank!

Für Flake

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>9</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>12</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>13</b>
2.1 Die menschliche Plazenta	13
2.1.1 Entwicklung der menschlichen Plazenta	13
2.1.2 Aufbau der reifen Plazenta und die Plazentaschranke	14
2.1.3 Die Funktionen der reifen Plazenta	15
2.1.4 Die immunologische Rolle der Plazenta	16
2.2 Gestationsdiabetes	17
2.2.1 Definition und klinische Charakteristika	17
2.2.2 Ätiologie und Pathogenese/Risikofaktoren	17
2.2.3 Epidemiologie	18
2.2.4 Symptome und Klinik	18
2.2.5 Screening und Diagnostik	18
2.2.6 Auswirkungen und Komplikationen eines GDM	19
2.2.7 Therapie des GDM	19
2.2.8 Prognose des GDM	20
2.2.9 Der Zusammenhang zwischen metabolischem Syndrom, Adipositas und GDM	20
2.3 Die Rolle der Inflammation bei Übergewicht/Adipositas und GDM	22
2.3.1 Immunhistochemie: CD45 als Leukozytenmarker	23
2.3.2 C-reaktives Protein (CRP)	24
2.3.3 Interleukin 6	24
2.3.4 Interleukin 8	25
2.3.5 Interleukin-1-Rezeptor Typ 1	25
2.3.6 MCP-1	26
2.3.7 Interleukin 10	26
2.3.8 TGF- $\beta$	27
2.4 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	28
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>30</b>
3.1 Materialien	30
3.1.1 Geräte und Softwares	30
3.1.2 Chemikalien, Puffer und Stammlösungen	34

3.1.3	Biologisches Material	37
3.1.4	Antikörper	38
3.1.5	Primersequenzen	39
3.1.6	Verbrauchsmaterialien	40
3.2	Methoden der klinischen Arbeit	41
3.2.1	Patientinnenkollektiv	41
3.2.2	Asservierung des biologischen Materials	44
3.2.3	Gewebeentnahme und Asservieren der Proben am Tag des Kaiserschnitts	44
3.2.4	Datenerfassung und Fotodokumentation	44
3.2.5	Präparation des Gewebes	45
3.2.6	Klinische Chemie: Fetales und maternales Blut	46
3.3	Methoden der experimentellen Arbeit: Immunhistochemie	46
3.3.1	Vorbereitung der Gewebeproben	46
3.3.2	Immunhistochemie mit CD45	47
3.3.3	Digitalisierung der Gewebeproben und Analyse mit QuPath	49
3.3.4	Erkennung und Auswahl der untersuchten Gewebeproben	49
3.3.5	Automatisierung der Gewebeerkenennung	50
3.3.6	Automatisierung der Zellerkennung	51
3.4	Methoden der experimentellen Arbeit: Molekularbiologie	53
3.4.1	RNA-Isolation	53
3.4.2	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA	54
3.4.3	Herstellung der cDNA (Reverse Transkription)	54
3.4.4	Herstellung der Primer	55
3.4.5	Effizienztestung der Primer	56
3.4.6	Verdünnung von cDNA und Housekeeping-Gen	57
3.4.7	Real-Time Quantitative PCR (SYBR Green)	57
3.5	Statistische Analyse	59
4	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>61</b>
4.1	Stichprobe und Demografie	61
4.2	Klinische Daten	63
4.2.1	Geburtsgewicht	63
4.2.2	Systolischer Blutdruck vor Sectio	64
4.2.3	Diastolischer Blutdruck vor Sectio	65
4.2.4	Geburtslänge	65
4.2.5	pH-Wert im Blut der Nabelarterie	67
4.2.6	Plazentagewicht	68

<b>4.3</b>	<b>Inflammationsmarker im fetalen und maternalen Blut</b>	<b>68</b>
4.3.1	CRP maternal (mg/l)	69
4.3.2	Leukozytenzahl maternal ( $\times 10^9/l$ )	70
4.3.3	IL-6 maternal (pg/ml)	70
4.3.4	IL-8 maternal (pg/ml)	71
4.3.5	IL-6 fetal (pg/ml)	72
4.3.6	IL-8 fetal (pg/ml)	73
<b>4.4</b>	<b>Immunhistochemie</b>	<b>75</b>
4.4.1	CD45-Hauptanalyse	76
<b>4.5</b>	<b>Genexpressionen der Inflammationsmarker (RT-qPCR)</b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>101</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis	102
7.2	Tabellenverzeichnis	102

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AEC	AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol)
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
AP	Alkalische Phosphatase
APGAR	(Aussehen, Puls, Grundtonus, Atmung, Reflexe): Punktesystem zum Test der Vitalität von Neugeborenen
ASS	Acetylsalicylsäure
5'AUG	5' Adenin, Uracil, Guanin
B	Breite
BE	Base Excess (Basenüberschuss)
β-Actin	beta-Aktin
BGA	Blutgasanalyse
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
Ct	Cycle threshold
Cy3	Cyanine 3
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Df	degree of freedom = Anzahl der Freiheitsgrade
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOB	Date of birth (Geburtsdatum)
DOB OD	Detecting Objects Optical Density (Erkennen der optischen Dichte von Objekten)
dT	Desoxythymidin
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
etc.	etcetera
FFPE	Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet
for	forward (vorwärts)
G	Guanin
GDM	Gestationsdiabetes mellitus
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
H	Höhe
h	hour (Stunde)
HbA1c	glykosyliertes Hämoglobin A1
HDL	High-Density-Lipoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HOMA-Index	Homeostasis Model Assessment (Methode zur Abschätzung der endogenen Insulin-Resistenz)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase

HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Hz	Hertz (1/s): SI-Einheit für die Frequenz
H <sub>2</sub> O	Wasser
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IL1R1	Interleukin-1-Rezeptor Typ 1
INR	International Normalized Ratio (internationales normiertes Verhältnis, ein Gerinnungsparameter)
insb.	insbesondere
kg	Kilogramm
kg/m <sup>2</sup>	Kilogramm pro Quadratmeter
Krea	Kreatinin
Kryo	Kryokonservierung
L	Liter
LDL	Low-Density-Lipoprotein
m	Meter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mAb	monoclonal Antibody (monoklonaler Antikörper)
Max	Maximum
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Min	Minimum
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MW	Mittelwert
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information in Bethesda, Maryland, USA
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
OGTT	Oraler Glucosetoleranztest
OH	Hydroxygruppe
OMERO	Open Microscopy Environment Remote Objects
OP	Operation
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
p.c.	post conceptionem (=nach der Befruchtung)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii (negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration, Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung)
qRT PCR	quantitative real-time PCR (quantitative Echtzeit-PCR)
Quicki-Index	Quantitativer Insulin Sensitivitäts-Check Index
RDS	Respiratory Distress Syndrome (Atemnotsyndrom)
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
rev	reverse

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RR	Blutdruckmessung nach Riva Rocci
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
sog.	so genannt
SPSS	Statistical Package für Social Sciences
SS	Schwangerschaft
SSW	Schwangerschaftswoche
Stk.	Stück
STORCH	Akronym für Infektionskrankheiten: <b>S</b> yphilis, <b>T</b> oxoplasmose, <b>O</b> thersBakterielle Vaginose, Chlamydien, Gonorrhö, Listeriose, Streptokokken-B, Virushepatits, HIV, Masern/Mumps, Ringelröteln, Varizellen/Zoster, Kandidose bzw. Mykose), <b>R</b> öteln, <b>C</b> ytomegalie, <b>H</b> erpes simplex
s.u.	siehe unten
T	Tiefe
T	Thymin
TAMRA	Tetramethyl-6-Carboxyrhodamine
Taq	Thermus aquaticus
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
U	Unit (Einheit)
u.g.	unten genannt
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VE	Vorerkrankungen
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

## 1. Zusammenfassung

Der Anteil der übergewichtigen und adipösen Bevölkerung steigt weltweit stetig an. Adipositas ist als häufigste Erkrankung unter Frauen im gebärfähigen Alter mit dem Auftreten eines konsekutiven Gestationsdiabetes assoziiert. Die dadurch entstehenden akuten sowie Langzeitfolgen während und nach der Schwangerschaft betreffen sowohl die Mutter als auch ihr Kind. Studien konnten bereits belegen, dass inflammatorische Prozesse die Pathogenese eines Diabetes mellitus beeinflussen. Ein Ziel dieser klinisch-experimentellen Studie war es, die Rolle der Inflammation bei Gestationsdiabetes zu analysieren: Wir untersuchten den Einfluss von maternalem Übergewicht/Adipositas mit/ohne Gestationsdiabetes auf die Veränderung proinflammatorischer Faktoren in der Plazenta anhand von humanem Plazentagewebe sowie fetalem und maternalem Blut. Eine Kooperation zwischen der Kinderklinik und der Frauenklinik der Uniklinik Köln ermöglichte die Durchführung der Studie. Im maternalen und fetalen Blut analysierten wir die Interleukine 6 und 8. Im maternalen Blut erfolgte die zusätzliche Untersuchung der Leukozytenzahl sowie des C-Reaktiven Proteins (CRP). In 76 Plazentagewebeproben erfolgte der Nachweis der relativen mRNA-Genexpression von Inflammediatoren mittels real-time qPCR. Untersucht wurden mit dieser Methode die Inflammediatoren Interleukin 6, Interleukin 10, Interleukin 1 - Rezeptor Typ 1, TGF- $\beta$  und MCP-1. Zusätzlich führten wir eine quantitative immunhistochemische Analyse von Immunzellen an 59 humanen Plazenten durch. Dazu markierten wir sämtliche Leukozyten mithilfe eines CD45-Antikörpers (Pan-Leukozytenmarker) und bestimmten die Anzahl der durchschnittlichen Zellzahl in Relation zur analysierten Gewebefläche der jeweiligen Plazentaprobe.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass das Geburtsgewicht in der Gruppe übergewichtiger/adipöser Mütter mit Gestationsdiabetes (UGAD+GDM-Gruppe) signifikant höher war als in der Kontrollgruppe (KG), was auf ein erhöhtes Risiko für Geburtskomplikationen und spätere Fettleibigkeit hindeutet. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede bei den Inflammediatormarkern CRP, CD45+, und den untersuchten Genexpressions-Leveln festgestellt werden. Auch die Analyse der Interleukine IL-6 und IL-8 im maternalen und fetalen Blut zeigte keine signifikanten Gruppenunterschiede, wobei die hohe Variabilität der Werte und die relativ kleine Stichprobengröße mögliche Erklärungen dafür sein könnten. Die immunhistochemischen Ergebnisse wiesen zudem auf eine Variabilität in der Färbungsintensität hin, was die Notwendigkeit für standardisierte Protokolle und verbesserte Techniken unterstreicht. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Gestationsdiabetes und Übergewicht/Adipositas das Geburtsgewicht signifikant beeinflussen, ohne jedoch deutliche Effekte auf die untersuchten Entzündungsmarker im maternalen und fetalen Blut oder die Genexpression sowie Leukozytenzahl in der Plazenta nachweisen zu können. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Rolle von Inflammation bei Gestationsdiabetes

komplex ist und möglicherweise durch andere Faktoren moduliert wird, was in zukünftigen Studien weiter untersucht werden sollte.

## 2. Einleitung

### 2.1 Die menschliche Plazenta

Die Plazenta ist ein temporär angelegtes Organ, welches im Uterus während der Schwangerschaft entsteht. Sie besteht aus fetalen und maternalen Anteilen und ermöglicht in erster Linie den Stoff- und Gasaustausch zwischen Mutter und Fetus. Durch die sog. „Plazentaschranke“ fungiert sie als selektiver Filter, wodurch nur bestimmte Substanzen auf den fetalen Kreislauf übergehen. Neben der Produktion verschiedener Hormone nimmt die Plazenta einen wichtigen immunologischen Stellenwert ein. <sup>1</sup>

#### 2.1.1 Entwicklung der menschlichen Plazenta

Die Ausbildung des uteroplazentaren Kreislaufs besteht aus mehreren Schritten: Das Endometrium wird umgebaut und fetal gebildete Plazentaanteile dringen in die mütterliche Gebärmutterschleimhaut ein (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Die Plazenta entwickelt sich während der Schwangerschaft also sowohl aus maternalen als auch aus embryonalen Komponenten. Am 6. Tag p.c. kommt es zur Implantation, der Einnistung des Keims in das Endometrium. Dabei sind der Zytotrophoblast und der Synzytiotrophoblast – letzterer eine Verschmelzung mehrerer Zellkerne ohne Zellgrenzen - von Bedeutung. Die Zytotrophoblasten dienen als Stammzellen für den größtenprozedienten Synzytiotrophoblasten. Im Uterus eingenistet (Nidation) wächst nun der Embryo heran und differenziert sich weiter. Die anfängliche Versorgung des Keims mit Nährstoffen erfolgt bis zum ca. 12. Tag p.c. über die Deziduazellen der Gebärmutterschleimhaut durch im Zytoplasma eingelagertes Glykogen und Lipide. Am 9. Tag p.c. entstehen Lakunen im Synzytiotrophoblasten, welche sich mit maternalem Blut füllen. Ab dem 13. Tag p.c. bilden sich Zotten aus und wölben sich in diese Lakunen vor. Die Primärzotten bestehen im Zentrum aus Zytotrophoblastenzellen, umgeben von Synzytiotrophoblasten. Die Sekundärzotten entstehen wenig später aus Zellen des extraembryonalen Mesoderms, ein lockeres Bindegewebe, dem Hypoblasten entspringend. Diese wandern in den Primärzottenkern. Einige Zellen des extraembryonalen Mesoderms entwickeln sich in der dritten Woche p.c. zu Kapillaren weiter. So entstehen die Tertiärzotten, die von innen nach außen aus 1. Extraembryonalem Mesoderm mit Kapillaren, 2. Zytotrophoblastenzellen, 3. Synzytiotrophoblasten aufgebaut sind.<sup>2</sup> Ab dem 4. Monat p.c. erfolgt eine Rarefizierung der Zytotrophoblastenzellen, wodurch die Diffusionsstrecke zwischen mütterlichem und fetalem Blut abnimmt. Die reife Plazenta besteht somit einerseits aus dem fetalen Anteil, dem Chorion

frondosum, sowie dem maternalen Anteil, der Dezidua. Beide Anteile verzahnen sich miteinander und bilden damit die eigentliche Plazenta.

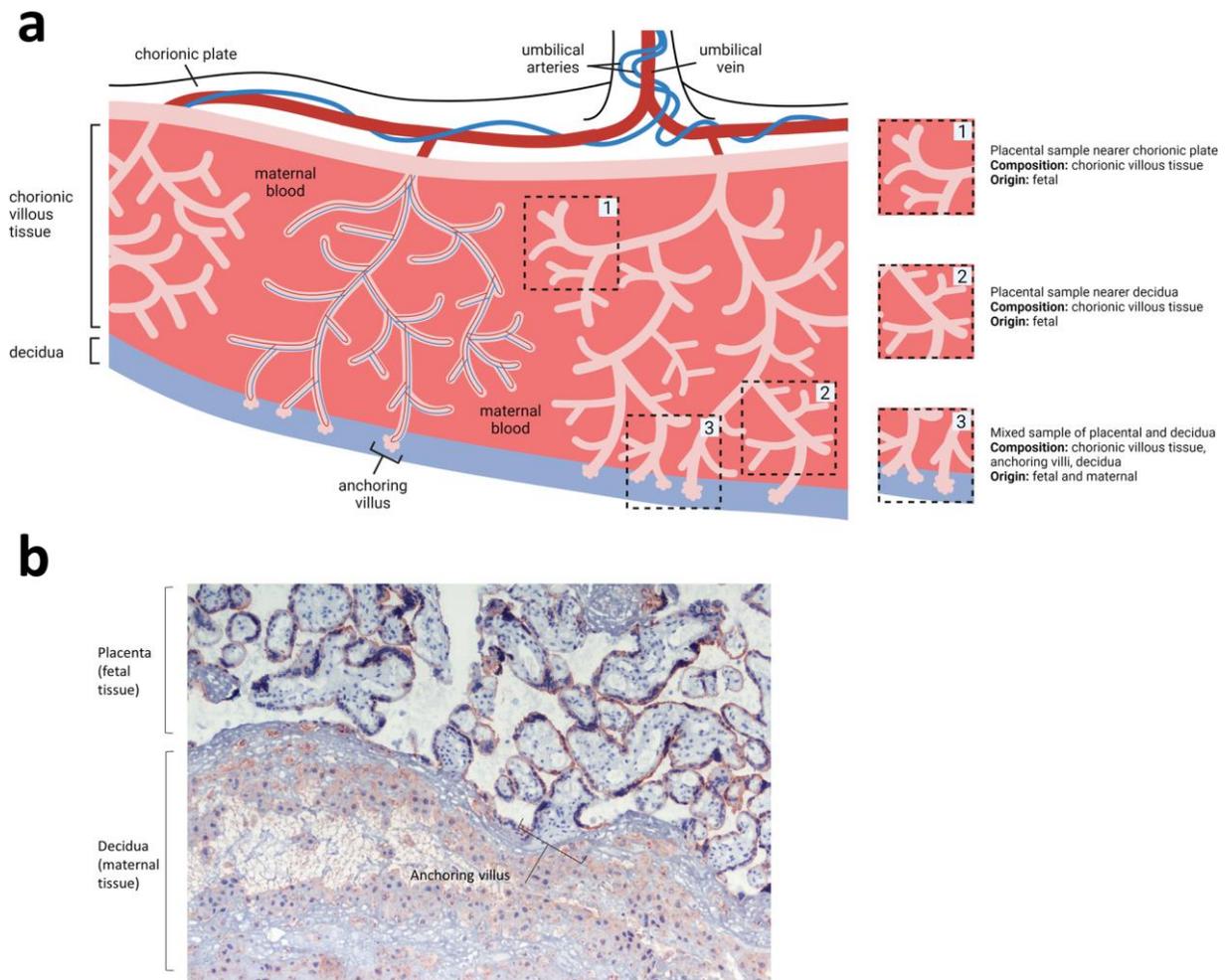


Abbildung 1: Die „fetale Seite“ der Plazenta:

anatomische Fehlannotation des Kohlenstoffpartikel-„Transfers“ durch die menschliche Plazenta (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Beth Holder, Imperial College London, UK)  
3

### 2.1.2 Aufbau der reifen Plazenta und die Plazentaschranke

Das Entwicklungsstadium der voll entwickelten Plazenta ist ab dem 4. Monat p.c. erreicht. Die scheibenförmige Plazenta misst in ihrer reifen Form ca. 15-20 cm im Durchmesser, hat eine Dicke von ca. drei cm und wiegt ungefähr 500g.<sup>4</sup> Gegen Ende der Schwangerschaft nimmt sie bis zu 15% des maternalen Herzzeitvolumens ein, mit einer Durchblutung von 500-750 ml/min.<sup>5</sup> Die Decidua basalis, der maternale Teil der Plazenta, liegt der Uteruswand an und enthält eingewachsene embryonale extravillöse Trophoblastenzellen. Die Plazentasepten sind Ausläufer der Basalplatte und ziehen bis in den intervillösen Raum hinein. Dadurch wird dieser in 10 bis 40 Areale, sog. Kotyledonen, unvollständig unterteilt. Der intervillöse Raum stellt die sog. fetomaternale Zone dar und ist mit maternalem Blut gefüllt. 30-50 kindliche Zottenbäume ragen in diesen Raum hinein. Dadurch entsteht ein Kontakt zwischen mütterlichen und kindlichen Plazentastrukturen. Hier umspült das maternale Blut die kindlichen

Zotten, in denen das kindliche Blut zirkuliert und der fetomaternalen Gas- und Stoffaustausch gewährleistet wird. Die Zottenbäume sind folgendermaßen aufgebaut: Der basale Bereich besteht aus dem paarig angelegten fetalen Aa. umbilicales, welche das sauerstoffarme Blut transportieren, sowie der V. umbilicalis, die das mit Sauerstoff angereicherte Blut enthält. Die Intermediärzotten enthalten fetale Arteriolen, Venolen und Kapillaren. Die Terminalzotten liegen als Endzotten mit ihren Kapillaren frei im intervillösen Raum und treten direkt mit dem maternalen Blut im intervillösen Raum in Kontakt für den fetomaternalen Gas- und Stoffaustausch. Die Plazentaschranke stellt einen selektiven Filter dar und lässt nur bestimmte Nährstoffe, Gase und Substanzen in den fetalen Kreislauf übertreten. Sie ermöglicht somit einen Schutz des Embryos vor dem direkten Kontakt mit mütterlichem Blut und besteht aus mehreren Zellschichten, die den maternalen vom fetalen Blutkreislauf trennen. So entsteht eine Filterfunktion mit kontrolliertem Gas- und Stoffaustausch. Die Plazentaschranke besteht ausschließlich aus fetalem Gewebe:

1. Endothel der kindlichen Blutgefäße
2. Zottenbindegewebe aus dem extraembryonalen Mesoderm
3. Zytotrophoblast
4. Synzytiotrophoblast

Da die Plazentaschranke den fetalen und maternalen Blutkreislauf voneinander trennt, ist die Mutter vor dem Blut des Ungeborenen geschützt und vice versa.<sup>6</sup> Dies ist nötig, da die Schwangerschaft aus biologischer Sicht streng genommen eine Parasit-Wirt-Situation darstellt. Der kindliche Teil der Plazenta, die sog. Chorionplatte, ist aufgebaut aus dem Syncytiotrophoblast, Zytotrophoblast und dem parietalen Blatt des extraembryonalen Mesoderms.

### **2.1.3 Die Funktionen der reifen Plazenta**

Die reife Plazenta hat drei maßgebliche Funktionen: Den Austausch von Gas- und Stoffwechselprodukten zwischen fetalem und mütterlichem Blut, die Bildung von Hormonen, sowie die Gewährleistung der Leihimmunität (Nestschutz) für das Neugeborene durch den transplazentaren Transport von IgG-Antikörpern ab der 20 SSW. Als eigenständiges Organ benötigt die Plazenta selbst ebenfalls Sauerstoff und Nährstoffe und produziert eigene Stoffwechselprodukte. Eine essenzielle Funktion der Plazenta ist der Transport von Gasen und Stoffen. Die Plazentaschranke ist hochdurchlässig für Atemgase. So findet durch Diffusion ein passiver Transport von Sauerstoff aus dem mütterlichen zum fetalen Blut und Kohlendioxid vom fetalen zum mütterlichen Blut statt. Weitere Metabolite wie Kreatinin, Harnstoff, Bilirubin, Wasser und einige Medikamente<sup>7</sup> werden durch einfache Diffusion transportiert. Der Austausch von Glukose und Laktat erfolgt durch erleichterte Diffusion. Der Austausch von Fett- und Aminosäuren, Hormonen und Peptiden, Vitaminen sowie anorganischen Ionen hingegen benötigt einen aktiven Transport. Außerdem werden Lipide, Aminosäuren und IgG-Antikörper

aus dem Umgebungsmedium durch Pinozytose aufgenommen. Eine weitere zentrale Funktion der Plazenta ist die Fähigkeit zur Synthese wichtiger Hormone und anderer Mediatoren. Die Rolle als endokrines Organ ist entscheidend für die Aufrechterhaltung und die Anpassung des maternalen Organismus an die Schwangerschaft. Die plazentaren Hormone sind während der gesamten Schwangerschaft von Bedeutung, da sie der fetalen Entwicklung dienen und eine wichtige Rolle während des Geburtsvorgangs einnehmen. Zentraler Produktionsort der Plazentahormone ist die Zellschicht aus Syncytiotrophoblasten. Andere Trophoblast-Typen sind jedoch ebenfalls fähig zur Hormonproduktion und beeinflussen den Verlauf der Schwangerschaft. Beispielsweise tragen die von extravillösen Trophoblasten produzierten Hormone zur Gefäß- und Gewebeumgestaltung bei und regulieren die Migration und Invasion der extravillösen Trophoblastenzellen.<sup>8</sup> Die wichtigsten plazentaren Hormone sind Östrogen und Progesteron, humanes Choriongonadotropin (hCG), Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), Humane Plazentalaktogen (HPL) und Relaxin.<sup>9</sup>

#### **2.1.4 Die immunologische Rolle der Plazenta**

Das Immunsystem des Ungeborenen ist noch nicht ausgeprägt und birgt demnach keine Gefahr für sich selbst oder die Mutter, da es noch keine Antikörper produziert.<sup>10</sup> Durch transplazentaren Transport erhält der Keim maternale IgG während der Schwangerschaft und IgA während der Stillzeit, sodass eine passive Immunität des Kindes aufgebaut wird.<sup>11</sup> Die Interaktionen und Auswirkungen plazentarer Zytokine, Chemokine und Immunzellpopulationen bzw. deren Zelloberflächenmoleküle und Rezeptoren auf die Entwicklung des fetalen Immunsystems ist Gegenstand aktueller Forschung. Auch scheint die Plazenta eine Rolle bei der Entstehung von Allergien und (Autoimmun)erkrankungen zu spielen.<sup>12</sup> Für eine komplikationslose Schwangerschaft und den im Verlauf wechselnden Anforderungen ist eine gezielte und dynamische Adaption des maternalen Immunsystems unabdingbar:<sup>13</sup> Normalerweise würde das maternale Immunsystem das Ungeborene abstoßen. Die Plazenta fungiert hierbei jedoch als physische Barriere, die diesen Vorgang verhindert. Darüber hinaus schützt die Plazenta den Fetus vor mütterlichen Infektionen, indem sie verschiedene Zytokine und Immunmediatoren produziert, die die Immunantwort der Mutter modulieren und inflammatorische Prozesse reduzieren.<sup>14</sup> Die Syncytiotrophoblasten und auch extravillösen Trophoblastzellen interagieren mit zahlreichen Zellen des Immunsystems durch die Freisetzung verschiedener Zytokine und anderen Immunmediatoren. Eine besondere Rolle hierbei spielen T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Monozyten und Makrophagen, sowie Granulozyten und dendritische Zellen.<sup>15</sup> Es befindet sich eine große Anzahl von Leukozyten in der Decidua, um eine erfolgreiche Schwangerschaft zu unterstützen.<sup>16</sup> So konnte gezeigt werden, dass Leukozyten bis zu 40% aller Dezidualzellen ausmachen und die Subtypen je nach Trimenon in ihrem prozentualen Anteil variieren.<sup>17/18</sup> Als antigenpräsentierende Zellen betreiben plazentare Makrophagen Phagozytose, sezernieren

verschiedene Zytokine und modulieren die Balance der Immunantwort zwischen Mutter und Fetus. T-Zellen und Dendritische Zellen sind ebenfalls entscheidende Zellen für die Regulation des Immungleichgewichts und eine adäquate Immunantwort. Eine Dysbalance der Zusammensetzung dieser Zellpopulationen oder funktionelle Veränderungen können Pathologien in der Schwangerschaft, einschließlich Präeklampsie (PE), intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR), rezidivierende Spontanaborte (RSA), Frühgeburt und angeborenen Infektionen begünstigen.<sup>19 20</sup>

## **2.2 Gestationsdiabetes**

### **2.2.1 Definition und klinische Charakteristika**

Der Gestationsdiabetes (Schwangerschaftsdiabetes, GDM) ist eine Glukosetoleranzstörung, welche erstmals in der Schwangerschaft auftritt oder diagnostiziert wird.<sup>21</sup> Zeitpunkt der Manifestation ist meist das zweite oder dritte Trimenon. Frauen mit GDM haben ein erhöhtes Risiko, zukünftig an einem manifesten Typ-2-Diabetes zu erkranken. Durch die hyperglykämische Stoffwechsellage können Schwangerschaftskomplikationen und auch Spätfolgen für Mutter und Kind entstehen. Die Therapie des GDM beinhaltet eine Lebensstiländerung im Rahmen einer Ernährungsumstellung und Bewegung. Eine Insulintherapie ist indiziert, wenn sich durch die Basismaßnahmen keine Normalisierung der Blutglukosespiegel erreichen lässt.<sup>22</sup>

### **2.2.2 Ätiologie und Pathogenese/Risikofaktoren**

Der Insulinbedarf variiert im Laufe der Schwangerschaft: Im ersten Trimenon ist die Insulinsensitivität erhöht und es besteht eine Neigung zu Hypoglykämien. Im zweiten und dritten Trimenon hingegen entsteht hormonell bedingt eine zunehmende Insulinresistenz. Hyperglykämien treten hier gehäuft insbesondere postprandial auf. Dementsprechend manifestiert sich ein GDM meist im zweiten oder dritten Trimenon und kommt im ersten Trimenon seltener vor.<sup>21</sup> Da der GDM klinisch eine starke Ähnlichkeit mit dem Diabetes mellitus Typ 2 aufweist, liegen bei betroffenen Frauen zumeist die gleichen Risikofaktoren für einen GDM vor, wie bei Frauen mit einem Diabetes mellitus Typ 2. Folgende nachgewiesene Risikofaktoren erhöhen die Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens: Internistische Risikofaktoren sind insbesondere ein hohes Alter, Übergewicht mit einem BMI > 27 kg/m<sup>2</sup>, ein Diabetes mellitus Typ 2 bei Familienangehörigen ersten Grades, sowie eine passager gestörte Glukosetoleranz in der Anamnese.<sup>23</sup> Bei der Durchführung des Screenings auf GDM wird ein Vortest mit 50 g Glukoselösung durchgeführt. Bei positivem Ergebnis erfolgt darauf ein Bestätigungstest mit 75 g Glukoselösung (oGTT). Nach Einnahme der Glukose in Flüssigkeit gelöst liegt eine gestörte Glukosetoleranz bei einem BZ-Wert zwischen 140-200 mg/dl nach 120 min vor. Zu den geburtshilflichen Risikofaktoren gehören ein GDM in vorherigen

Schwangerschaften, habituelle Aborte, sowie die frühere Geburt eines makrosomen Kindes mit einem Geburtsgewicht von > 4.500 g.<sup>24</sup>

### **2.2.3 Epidemiologie**

Stand 2017 betrug die Prävalenz für GDM in Deutschland in der Perinatalstatistik 5,97 % (40.450 Fälle) und zeigte im Vergleich zu 2016 einen Anstieg um 14,6 %. Für Frauen kaukasischer Herkunft besteht ein Wiederholungsrisiko von 35–50 % für GDM in weiteren Schwangerschaften.<sup>25</sup> Aufgrund der hohen Prävalenz ist in Deutschland ein Screening für alle Schwangeren indiziert.<sup>26</sup>

### **2.2.4 Symptome und Klinik**

In den meisten Fällen verläuft ein GDM asymptomatisch oder subklinisch.<sup>27</sup> Während der SS findet eine große Anzahl körperlicher Veränderungen statt, welche der Symptomatik eines GDM ähneln oder diese kaschieren können. Möglicherweise auftretende Symptome sind Übelkeit und Fatigue, sowie ein verstärktes Durstempfinden mit konsekutiver Polydipsie. Diese verursacht wiederum eine Polyurie, welche durch eine zusätzlich anfallende Glucosurie begünstigt wird:<sup>28</sup> Die Glucosurie entsteht durch Überschreiten der renalen Glukoseschwelle, welche zwischen 150 und 200 mg/dl liegt.<sup>29</sup> Osmotisch wird dadurch vermehrt Wasser renal über den Harn eliminiert. Die hyperglykämische Stoffwechsellage dient als Nährmedium für Bakterien, wodurch das Auftreten von Harnwegs- und Hautinfektionen begünstigt wird.<sup>30</sup>

### **2.2.5 Screening und Diagnostik**

Alle Schwangeren sollen generell zum GDM- Screening einen oGTT zwischen der 24 + 0 und der 27 + 6 SSW erhalten. Primär wird ein 50-g-GCT (Glucose Challenge Test, GCT) durchgeführt. Dieser kann unabhängig von Tageszeit und Nahrungsaufnahme durchgeführt werden. Es werden 50 g Glukose in 200 ml Wasser getrunken. Bei Blutglukosewerten im venösen Plasma  $\geq 200$  mg/dl bestätigen sich die Diagnose eines GDM sofort und der 75-g-oGTT entfällt, venöse Blutglukosewerte  $\geq 135$  mg/dl nach 60 Minuten werden als positives Screening gewertet und es folgt optimalerweise ein 75-g-oGTT. Der 75-g-oGTT wird morgens nüchtern durchgeführt. Zuerst wird die venöse Nüchtern-Plasmaglukose gemessen. Danach werden 75 g Glukose gelöst in 300 ml Wasser getrunken. Die Glukosemessungen erfolgen nach 60 min und nach 120 min. Ein nüchtern gemessener Blutglukosewert  $\geq 126$  mg/dl ergibt einen V. a. manifesten Diabetes mellitus, welcher durch eine Nüchtern-Blutglukose-Zweitmessung an einem anderen Tag sowie HbA<sub>1c</sub>-Messung bestätigt werden muss. Beide Nüchtern-Blutglukose-Werte müssen  $\geq 126$  mg/dl liegen. Liegt der Blutglukosewert nach 120 min  $\geq 200$  mg/dl, ist die Diagnose eines Diabetes mellitus ebenfalls bestätigt. Eine zusätzliche HbA<sub>1c</sub>-Messung sollte durchgeführt werden.<sup>31</sup> Ein GDM gilt als diagnostiziert, wenn einer der drei folgenden Blutzuckerwerte erreicht oder überschritten wurde: Nüchtern: 95 mg/dl, nach einer Stunde: 180 mg/dl, nach 2 Stunden: 155 mg/dl.<sup>32</sup>

## 2.2.6 Auswirkungen und Komplikationen eines GDM

Ein GDM kann sich sowohl auf die Mutter als auch auf ihr ungeborenes Kind negativ auswirken: Komplikationen auf maternaler Seite sind ein erhöhtes Risiko für hypertensive Schwangerschaftserkrankungen. Dieser Komplex umfasst die Schwangerschaftsinduzierte Hypertonie (SIH), die Präeklampsie sowie deren Komplikation Eklampsie und das HELLP-Syndrom – ein Akronym für **H**ämolysezeichen, **E**levated liver enzymes, **L**ow **P**latelets.<sup>33</sup> Eine mit hohen Blutzuckerwerten einhergehende Glucosurie begünstigt das Risiko für vaginale-, Haut- und Harnwegsinfekte. Darüber hinaus ist das Risiko für eine postpartale Depression signifikant erhöht.<sup>34</sup> Eine Polyurie des Kindes steigert die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung eines Polyhydramnions. Es gibt Hinweise darauf, dass hohe mütterliche IGF1-Spiegel zu einem stärkeren Plazentawachstum beitragen. Dazu gehören die Hochregulation bestimmter plazentaler Aminosäuretransporter-Isoformen und des Glukosetransporters GLUT-1, die Stimulierung des mTOR-Signalwegs, welcher die Proteinsynthese stimuliert und ein gesteigerter Nährstofftransport, die wesentlich zum fetalen Wachstum und zur Makrosomie des Neugeborenen beitragen könnten.<sup>35</sup> Ein erhöhter Sauerstoffbedarf des Fetus kann eine intrauterine Hypoxie bis hin zum Fruchttod (IUFT) bewirken.<sup>36</sup> Glykogeneinlagerungen in den Kardiomyozyten begünstigen die Entstehung einer Kardiomyopathie. Die verminderte Surfactantbildung trägt zur Pathogenese eines Atemnotsyndroms (IRDS) bei.<sup>37</sup> Dieser Komplex aus Komplikationen wird als „Fetopathia diabetica“ bezeichnet. Postnatal sind die Neugeborenen aufgrund kompensatorisch erhöhter Insulinspiegel durch die hohen maternalen Blutglukosespiegel häufiger von Hypoglykämien und Elektrolytentgleisungen betroffen.<sup>38</sup> Die mit einem GDM assoziierte fetale Makrosomie macht die Notwendigkeit einer operativen Entbindung und höhergradigen Geburtsverletzungen sowie Aborte und Frühgeburtlichkeit wahrscheinlicher. Für das Kind ergeben sich nicht nur akute, sondern auch Langzeitfolgen<sup>37</sup> wie bspw. kardiale und intestinale Fehlbildungen.<sup>39</sup> Blotsky et al analysierten 2019 in einer retrospektiven Kohortenstudie anhand der Versicherungsdaten von 73.180 Familien die Diabetesprävalenz bei Kindern von Müttern mit GDM im Vergleich mit Kindern nichtdiabetischer Mütter: Die Diabetes-Inzidenz war bei Kindern von Müttern mit GDM fast doppelt so hoch und das Risiko, bis zum Alter von 22 Jahren einen manifesten Diabetes zu entwickeln, um 77% erhöht. Bei Kindern mit einem Gestationsalter von < 32 Wochen trat gegenüber ≥ 37 Wochen ein Diabetes mellitus dreimal häufiger auf.<sup>40</sup> Durch eine Fehlprogrammierung der neuroendokrinen Systeme und des Pankreas wird nicht nur die Entstehung eines Typ-2-Diabetes, sondern auch einer Adipositas und schließlich eines metabolischen Syndroms begünstigt.<sup>41</sup>

## 2.2.7 Therapie des GDM

Da in bis zu 90% der Fälle eine Blutzuckereinstellung mit nicht-medikamentösen Basismaßnahmen erreicht werden kann, besteht die Therapie des GDM zunächst aus

konservativen Maßnahmen wie Lebensstilverbesserungen. Diese umfassen eine Ernährungsumstellung und vermehrte körperlicher Aktivität, sowie Schulungen zum Eigenmonitoring des Blutglukosespiegels und Stressmanagement. Sollten die diätetischen Maßnahmen nicht ausreichend sein, erfolgt eine auf das aktuelle Körpergewicht adaptierte Insulintherapie. Unmittelbar nach der Geburt wird das Insulin abgesetzt. Weitere (orale) Antidiabetika sind in Deutschland während der Schwangerschaft bisher nicht zugelassen.<sup>42</sup> Bei Verdacht auf eine starke Insulinresistenz und sehr hohem Insulinbedarf und individueller Indikationsstellung kann eine Therapie mit Metformin im Rahmen einer sog. „Off-Label-Use“ zusätzlich/begleitend zur Insulintherapie erwogen werden.<sup>43</sup>

### 2.2.8 Prognose des GDM

In der Mehrzahl der Fälle ist ein GDM nach Beendigung der Schwangerschaft reversibel. Allerdings besteht fortan ein erhöhtes Risiko von ca. 50% für das Wiederauftreten des GDM in weiteren Schwangerschaften, sowie für die Manifestation eines Diabetes mellitus innerhalb der folgenden Lebensjahre von bis zu 50% pro zehn Lebensjahre.<sup>44</sup>

### 2.2.9 Der Zusammenhang zwischen metabolischem Syndrom, Adipositas und GDM

Übergewicht und Adipositas werden durch den Body-Mass-Index (BMI) definiert. Dieser wird aus dem Quotienten aus Körpergewicht in Kilogramm und dem Quadrat der Körpergröße in Metern berechnet. Ein BMI von 25-29,9 kg/m<sup>2</sup> definiert Übergewicht, Adipositas liegt bei einem BMI von  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> vor (siehe Tabelle 1).

Bezeichnung	Body-Mass-Index (BMI, Quetelet-Index)*
Untergewicht	<18,5
Normalgewicht	18,5–24,9
Übergewicht (Präadipositas)	25,0–29,9
<u>Adipositas</u> Grad I	30,0–34,9
<u>Adipositas</u> Grad II	35,0–39,9
Adipositas Grad III (sog. Adipositas permagna)	$\geq 40$
*Berechnung des BMI: Quotient aus Körpergewicht in Kilogramm und Körpergröße in Metern zum Quadrat (kg/m <sup>2</sup> )	
*Die Tabelle gilt nur für Erwachsene	

Tabelle 1: Definition von Übergewicht und Adipositas nach Body-Mass-Index<sup>45</sup>

Das metabolische Syndrom stellt einen Komplex aus Risikofaktoren dar, welche kardiovaskuläre Ereignisse wie Schlaganfälle oder Myokardinfarkte begünstigen. Es beinhaltet neben der stammbetonten Adipositas - definiert durch den Taillenumfang in cm - und der

Glukosetoleranzstörung bzw. DM2 die Faktoren Hypertonie und Dyslipoproteinämie. Die Pathogenese des metabolischen Syndroms basiert hauptsächlich auf hyperkalorischer Ernährung in Kombination mit Bewegungsmangel, welche aus diesem Grund die Hauptangriffspunkte in der Therapie darstellen.<sup>46</sup> Bei bestimmten Indikationen muss diese durch den zusätzlichen Einsatz medikamentöser Optionen wie Antidiabetika, Statine oder ACE-Hemmer ergänzt werden.<sup>47</sup> In den Industrieländern steigt der Anteil der übergewichtigen und adipösen Bevölkerung stetig an.<sup>48</sup> Die damit verbundenen negativen Auswirkungen gelten heutzutage als Volkskrankheit<sup>49</sup> und stellen ein weltweites Gesundheitsproblem dar. Mit der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ (DEGS1) lieferte das Robert-Koch-Institut von 2008 - 2011 Daten zu Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland. Die DEGS1 befragte und untersuchte die 18- bis 79-jährige Erwachsenenbevölkerung deutschlandweit (n=7116). Laut der DEGS1 waren in dem genannten Zeitraum 67,1% der Männer und 53,0% der Frauen übergewichtig; die Adipositasprävalenz ist mit 23,3% bei Männern und 23,9% bei Frauen deutlich angestiegen, insbesondere unter jungen Erwachsenen.<sup>50</sup> Im Jahr 2016 betrug der Anteil der adipösen Schwangeren zu Beginn der Schwangerschaft 15%; von diesen Frauen entwickelten wiederum sechs Prozent einen Gestationsdiabetes.<sup>51</sup> Dies macht Adipositas zu der häufigsten Erkrankung unter Frauen im gebärfähigen Alter.<sup>52</sup> Direkte negative Auswirkungen während der Schwangerschaft sowie Langzeitfolgen betreffen Mutter und Kind; Adipositas in der Schwangerschaft geht für beide Seiten mit erhöhter Morbidität und Mortalität einher.<sup>53</sup> Da ca. die Hälfte der übergewichtigen Frauen während ihrer Schwangerschaft zudem übermäßig an Gewicht zunimmt, haben diese Mütter ein höheres Langzeitrisiko für kardioembolische Ereignisse und Adipositas in weiteren Schwangerschaften.<sup>54</sup> Die Neugeborenen übergewichtiger Mütter weisen einen erhöhten Körperfettanteil auf, als Folge steigt die Wahrscheinlichkeit einer Adipositas schon in der frühen Kindheit. Diese kann als Langzeitfolge ein metabolisches Syndrom mit sich bringen<sup>55</sup>, wodurch sich wiederum das Risiko für Adipositas und weitere Folgen für die darauffolgenden Generationen erhöht.<sup>56</sup> Trotz der Erkenntnis eines Zusammenhangs zwischen maternalem Körpergewicht und negativen Folgen sowohl für Mutter und Fetus, sind die genauen zugrunde liegenden metabolischen (Patho)mechanismen bis heute nicht vollständig verstanden.<sup>57</sup> Bisher sind einige mögliche Auslöser und Signalwege untersucht worden, die zu früher placentarer Dysfunktion beitragen: Dazu gehören unter anderem eine erhöhte Insulinresistenz auf maternaler Seite, eine begleitende Hyperinsulinämie, oxidativer Stress, sowie gesteigerte systemische und lokale Inflammation.<sup>58</sup> Versuche an Mausproben, die ebenfalls die Auswirkungen von Adipositas und Diabetes untersucht haben, zeigten, dass es eine Assoziation zwischen hippocampaler Insulinresistenz und maternaler Adipositas gibt. Diese wiederum kann sich durch eine reduzierte Neuroplastizität in den Nachkommen äußern.<sup>59</sup> Ein weiteres Projekt konnte sowohl

anhand von Mausmodellen als auch am Menschen zeigen, dass sportliche Aktivitäten während der Schwangerschaft positive gesundheitliche Effekte auf die Mutter und deren Nachkommen haben und negative Auswirkungen des Übergewichts teilweise kompensieren können. Im Rahmen der Studie wurde unter anderem festgestellt, dass sportliche Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe den Körperfettanteil und das Proteohormon Leptin um 40% signifikant reduzierte. Des Weiteren war der Wachstumsfaktor BDNF („Brain-derived neurotrophic factor“) um 50% angestiegen. Diese positiven Effekte wurden durch eine hochkalorische, fettthaltige Diät vollständig aufgehoben.<sup>60</sup>

### **2.3 Die Rolle der Inflammation bei Übergewicht/Adipositas und GDM**

Da das Immunsystem einen entscheidenden Einfluss auf die Plazentafunktionen während der Schwangerschaft hat, können inflammatorische Prozesse eine pathologische Plazentaentwicklung begünstigen.<sup>61</sup> Adipositas ist gekennzeichnet durch einen chronischen, stillen Zustand der systemischen Inflammation, welcher zu erhöhten Plasmaspiegeln von proinflammatorischen Zytokinen führt. Zu diesen Zytokinen zählen vor allem IL-1 und IL-6, Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) und CRP.<sup>62</sup> Auch das Adipokin Leptin hat im Rahmen der maternalen Adipositas bei der Plazentation und mütterlich-fetalen Austauschprozessen, die das Wachstum und die Entwicklung regulieren, eine nicht unwichtige Bedeutung.<sup>63</sup> Neben der systemischen Inflammation auf maternalen Seite wird derzeit auch der lokale inflammatorische Status im Plazentagewebe untersucht. Dazu gehören neben den o.g. Entzündungsmediatoren die Zellen des Immunsystems, welche aus den Leukozyten und ihren Subgruppen bestehen. Der genaue immunologische und inflammatorische Status der Plazenta und ihre zellulären und molekularen Reaktionen auf ein potenziell schädliches maternales Milieu während der Schwangerschaft ist bisher noch nicht ausreichend charakterisiert: Vorangegangene Studien, welche im Plazentagewebe sowohl die mRNA-Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine untersuchten als auch Immunzellen und deren Subgruppen zwischen adipösen und normalgewichtigen Probandinnen analysierten, kamen häufig zu widersprüchlichen Ergebnissen.<sup>64</sup> Es konnte gezeigt werden, dass sich verstärkte Entzündungsreaktionen sowohl lokal im Plazentagewebe als auch systemisch bei adipösen Müttern finden.<sup>65</sup> Auf lokaler Ebene der Plazenta war die Anzahl ortsständiger Monozyten/Makrophagen bei adipösen Müttern im Vergleich zu normalgewichtigen Frauen zwei- bis dreifach erhöht. Ebenfalls konnte eine Infiltration heterogener proinflammatorischer Makrophagenpopulationen beobachtet werden, die gesteigerte Mengen von IL-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 exprimierten. Auf systemischer Ebene spiegelte sich dies wider durch erhöhte Plasmakonzentrationen von CRP, IL-6 und dem Proteohormon Leptin bei adipösen Schwangeren.<sup>66</sup> Die Ansammlung der Makrophagenpopulationen und Entzündungsmediatoren in der Plazenta sowie die erhöhte Plasmakonzentration der inflammatorischen Zytokine im Blut adipöser Mütter führt zu der Fragestellung, ob und in

welchem Ausmaß das proinflammatorische maternale und fetale Milieu bei der Entstehung oder Begünstigung negativer Folgen bei adipösen Schwangeren beteiligt ist. Beispielsweise besteht die Vermutung, dass das gesteigerte inflammatorische Milieu in der Spätschwangerschaft einen wichtigen Faktor bei der Entstehung einer maternalen Insulinresistenz darstellt.<sup>67</sup> Die Rolle des Leptins im Inflammationsprozess bleibt bislang unklar: Leptin könnte als Inflammationsmediator agieren, sowohl im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, als auch bei anderen inflammatorischen Prozessen. Zudem ist die Leptinresistenz eine ausschlaggebende Ursache für Übergewicht und Adipositas, welche wiederum inflammatorische Prozesse begünstigen könnte.<sup>68</sup> Eine Untersuchung der Auswirkungen von Adipositas auf die Plazenta an Mausmodellen von Appel et al. (2014)<sup>69</sup> zeigte jedoch, dass ein erhöhter Serumspiegel des Zytokins Leptin keine verstärkte Inflammation in der Plazenta der Tiere bewirkte. Histologische Untersuchungen am Plazentagewebe haben ebenfalls deutlich gezeigt, dass eine mütterliche Adipositas mit einer Hyperplasie der glatten Muskulatur in den Gefäßwänden der Plazenta und einer Unreife der placentaren Zottenbäume assoziiert ist.<sup>70</sup> Weitere Experimente am Mausmodell haben gezeigt, dass proinflammatorische Faktoren und oxidativer Stress gegen Ende der Schwangerschaft sowohl bei normalgewichtigen als auch bei adipösen Mäusen zunehmen, jedoch die placentare Leukozyteinfiltration und der Anstieg der proinflammatorischen Faktoren im gWAT (gonadal white adipose tissue) bei adipösen Muttertieren eher verringert war.<sup>71</sup>

### **2.3.1 Immunhistochemie: CD45 als Leukozytenmarker**

CD45 ist ein Transmembranprotein, welches sich auf der Zelloberfläche von Leukozyten und anderen Zellen der Hämatopoese befindet. Es ist auch bekannt unter dem Namen Leukocyte Common Antigen (LCA).<sup>72</sup> Die Faktoren, die die Zusammensetzung und den Aktivierungsstatus von Immunzellen lokal im Plazentagewebe beeinflussen, sind noch unzureichend charakterisiert. Auch über den Einfluss von Adipositas und Gestationsdiabetes auf die Leukozyteninfiltration im Plazentagewebe ist bisher wenig bekannt. Eine Studie von Elhousseini et al. zeigt, dass der Anteil von CD34+ und CD45+ hämatopoetischen Stammzellen unter allen kernhaltigen Zellen im Nabelschnurblut von GDM-Neonaten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war.<sup>73</sup> Eine andere Studie von Nogues et al. hingegen untersuchte das Plazentagewebe selbst immunhistochemisch auf CD45+ -Zellen sowie CD68+ Zellen - ein Makrophagenmarker - und fand in den Plazentazotten einen signifikant niedrigeren Anteil bei Frauen mit Adipositas im Vergleich zur normalgewichtigen Kontrollgruppe.<sup>74</sup> Es zeigen sich also in verschiedenen Studien widersprüchliche Ergebnisse. CD45-exprimierende Zellen können immunhistochemisch detektiert werden. Als sog. „Pan-Leukozytenmarker“ eignet sich CD45 daher für den quantitativen immunhistochemischen Nachweis von entzündlichem Geschehen im humanen Plazentagewebe.<sup>75/6</sup>

### **2.3.2 C-reaktives Protein (CRP)**

Einer der bedeutsamsten Vertreter der Inflammationsmediatoren im Blut ist das CRP. Es gehört zu den sog. Akute-Phase-Proteinen. Durch IL-6 wird die Synthese von CRP in der Leber angeregt. Im Plasma gesunder Menschen beträgt der Grenzwert 0,5 mg/dl. CRP ist Teil sowohl des humoralen als auch des zellulären Immunsystems. CRP bindet an die Phospholipide der Zellmembran und lagert sich so an Pathogene, besonders Bakterien und zerstörte Zellbestandteile (sog. PAMPS) an. Als sog. Opsonin aktiviert das gebundene CRP das Komplementsystem und wird von Makrophagen erkannt. Im Plasma steigt das CRP ca. 6-12 Stunden nach Beginn einer Entzündungsreaktion an; die Halbwertszeit beträgt ungefähr 24 Stunden. Es hat somit eine hohe Sensitivität bei der Detektion von inflammatorischen Prozessen, weist als systemischer Parameter jedoch keine Organ- oder Krankheitsspezifität auf. Ein besonders starker Anstieg findet sich oft bei bakteriellen Infektionen und aktiven akuten Entzündungen. Auch bei nicht-infektiösen und chronischen Entzündungsreaktionen kann das CRP erhöht sein. Dazu gehören insbesondere Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis, Autoimmunkrankheiten, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und Malignome.<sup>77</sup> CRP gilt als Risikoindikator für das metabolische Syndrom:<sup>78</sup> Erhöhte CRP-Plasmaspiegel konnten bei Insulinresistenz, Dyslipidämie, Arteriosklerose und kardiovaskulären Ereignissen nachgewiesen werden.<sup>79</sup> Hier sind die Erhöhungen allerdings tendenziell gering ausgeprägt.<sup>80</sup> Ein Review von Amirian et al.<sup>81</sup> aus dem Jahr 2020 konnte zeigen, dass erhöhte CRP-Level mit dem Risiko für die Entstehung eines GDM in den meisten bisher publizierten Studien assoziiert sind. In der Zukunft könnte CRP für Screening und Diagnostik des GDM herangezogen werden, bisher mangelt es jedoch an soliden Daten.

### **2.3.3 Interleukin 6**

IL-6 ist ein Signalmolekül, das u.a. von Zellen des Immunsystems produziert wird. Es gehört der Gruppe der proinflammatorischen Zytokine bzw. Interleukine an. IL-6 spielt eine wichtige Rolle in der Reaktion des Körpers auf Infektionen und Verletzungen und ist somit an einer Vielzahl von Prozessen der Inflammation, Wundheilung und der Regulation des Immunsystems beteiligt.<sup>82</sup> IL-6 wird von einer Vielzahl von Zellen, insbesondere von Leukozyten wie Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, aber auch bspw. Fibroblasten sowie Trophoblasten und Adipozyten sezerniert. Erhöhte IL-6-Werte finden sich beim Vorliegen von Übergewicht/Adipositas<sup>83</sup> und sind mit einem Risiko für die Entstehung einer Insulinresistenz und eines Typ-2-Diabetes verbunden.<sup>84</sup> Auch geht IL-6 mit einem erhöhten Risiko für weitere Komplikationen im Rahmen eines Diabetes mellitus einher, diese manifestieren sich insbesondere durch kardiovaskuläre Ereignisse. Während der Schwangerschaft ist IL-6 nicht nur maßgeblich an der Pathogenese einer gestörten Glukosetoleranz und Insulinresistenz beteiligt, sondern auch an der Regulation der Plazentafunktion und am fetalen Wachstum. Es

besteht eine Assoziation mit der Entwicklung einer fetalen Makrosomie sowie Frühgeburtlichkeit.<sup>85 86</sup>

#### **2.3.4 Interleukin 8**

Interleukin 8 ist ein ebenfalls nicht unbedeutendes Protein bei der Regulation akuter Entzündungsreaktionen. Das Zytokin wird zeitig lokal an Orten der Inflammation synthetisiert, wo es Zellen des Immunsystems rekrutiert und aktiviert. Es ist auch in saurer Umgebung temperatur- und proteolyseresistent, wodurch es auch suboptimalen Bedingungen standhält.<sup>87</sup> Es wird von Phagozyten und mesenchymalen Zellen während des Inflammationsgeschehens produziert und aktiviert Neutrophile, welche die Chemotaxis, Exozytose und Freisetzung von Sauerstoffradikalen induzieren. IL-8 und weitere Zytokine werden bei Infektion, Entzündung, Ischämie und Trauma in mehreren Geweben produziert und gelten als Hauptursache der lokalen Neutrophilenansammlung.<sup>88</sup> Zudem hat IL-8 eine atherogene Wirkung. In vitro Studien zeigten, dass IL-8 von Adipozyten produziert und sezerniert wird. Plasma IL-8 ist erhöht bei adipösen Individuen, zudem konnte gezeigt werden, dass StudienteilnehmerInnen mit gestörter Glukosetoleranz erhöhte IL-8 Level im Vergleich mit der normoglykämischen Vergleichsgruppe aufwiesen.<sup>89 90</sup> IL-8 wird zusätzlich durch Trophoblasten der Plazenta synthetisiert und trotz der potentiellen Bedeutsamkeit dieses Zytokins als Mediator des Typ-2-Diabetes mellitus, wurde IL-8 im Rahmen des GDM wenig untersucht und bringt teilweise widersprüchliche Studienergebnisse hervor.<sup>91 92</sup>

#### **2.3.5 Interleukin-1-Rezeptor Typ 1**

Der Interleukin-1-Rezeptor Typ 1 gehört zur Superfamilie der Interleukin-1 Rezeptoren. Er fungiert als Rezeptor für die Zytokine Interleukin-1 alpha, Interleukin-1 beta sowie den Interleukin-1 Rezeptor Antagonist. Er ist ein wesentlicher Mediator für zahlreiche zytokinvermittelte Immunantworten und Entzündungsreaktionen. Der IL-1 Signalweg involviert IL-1R1, einen Toll-like receptor, welcher mit dem sog. IL-1R Accessory Protein (IL-1RAcP) heterodimerisiert.<sup>93</sup> IL-1b bindet an das IL-1R1/IL-1RAcP Heterodimer, welcher dann eine Signalkaskade initiiert. Diese endet mit der Translokation des Transkriptionsfaktor Nuclear Factor-kappa B (NF-kB) in dem Zellkern, wo dieser die Transkription pro- und antiinflammatorischer Gene induziert. Dazu gehören unter anderem die Stickstoffmonoxid-Synthase, IL-6, IL-1Ra und die Cyclooxygenase-2 (COX-2), Die COX-2 katalysiert dann die Konversion von Arachidonsäure zu Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Es konnten erhöhte IL-1-Spiegel bei adipösen Menschen nachgewiesen werden. Die stille Inflammation, die mit einer adipösen Stoffwechsellage verbunden ist, kann durch diesen Signalweg zur Entwicklung einer Insulinresistenz, gestörter Glukosetoleranz und Typ-2-Diabetes beitragen.<sup>94</sup> Die Plasmaspiegel des natürlich vorkommenden IL-1Ra sind bei übergewichtigen Menschen dreibis achtfach erhöht und es wird angenommen, dass dies einen Schutzmechanismus auf den Anstieg des zytotoxischen IL-1b bei Adipositas darstellt. Das kritische Gleichgewicht zwischen

IL-1-Agonisten (IL-1a, zellgebunden und IL-1b, zirkulierend) und IL-1Ra spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Anfälligkeit und dem Schweregrad vieler akuter sowie chronischer Krankheiten. Dazu gehören Adipositas und Diabetes aber auch Psoriasis, Fieber und Sepsis, sowie Schlaganfälle.<sup>95</sup> Eine Anzahl von Studien an Mäusen belegt die Bedeutung verschiedener proinflammatorischer Zytokine bei der Entwicklung von Adipositas und Insulinresistenz,<sup>96</sup> dennoch existieren kaum Untersuchungen an humanem Plazentagewebe. Dennoch konnte eine Assoziation des IL1R1-Gens mit dem Risiko für eine Präeklampsie nachgewiesen werden.<sup>97</sup>

### **2.3.6 MCP-1**

MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), auch bekannt unter dem Namen Chemokin Ligand 2 (CCL2), gehört zur Familie der CC-Chemokine. Es ist von entscheidender Bedeutung in der Regulation entzündlicher Prozesse wie Chemotaxis und Expression weiterer Inflammationsfaktoren und Zellen des Immunsystems, insbesondere Monozyten und Makrophagen.<sup>98</sup> Auch MCP-1 ist bei der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen beteiligt. Als eines der am meisten erforschten Chemokine stellt es einen möglichen Interventionspunkt bei der Therapie verschiedenster (Autoimmun)krankheiten wie Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis, Atherosklerose und DM2 dar.<sup>99</sup> MCP-1 wird unter anderem im Plazentagewebe synthetisiert und es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Plasmaspiegel eine entscheidende Rolle für den Ausgang einer Schwangerschaft aufweisen: Proinflammatorischer Zytokine wie MCP-1 begünstigen unter anderem eine IUGR<sup>100</sup> und zeigen eine positive Korrelation mit dem maternalen BMI.<sup>101</sup>

### **2.3.7 Interleukin 10**

Interleukin-10 (IL-10) ist ein antiinflammatorisches Zytokin und wird hauptsächlich von Makrophagen, TH2-Zellen sowie regulatorischen T-Zellen (Treg) gebildet.<sup>102</sup> Interleukin 10 hemmt überschießende Entzündungsreaktionen und kann unter anderem zur Verlaufskontrolle bei chronischen Entzündungen bestimmt werden.<sup>103</sup> Interleukin 10 inhibiert die Aktivierung und Funktion von Immunzellen wie T-Zellen, Monozyten und Makrophagen und reguliert Wachstum und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen, Keratinozyten und Endothelzellen.<sup>104</sup> Die Hauptfunktion von IL-10 liegt jedoch bei der Inhibition und Termination (überschießender) Entzündungsreaktionen und Immunantworten. Besonders wichtig zu erwähnen ist die Schlüsselrolle bei der Differenzierung und Funktion der sog. T-reg (regulatorische T-Zellen), welche eine essenzielle Funktion in der Regulation von Immunantworten einnimmt.<sup>105</sup> <sup>106</sup> Es wirkt antiinflammatorisch und immunsuppressiv auf myeloide Zellfunktionen, was eine solide Basis für seine Verwendung als Monitoring und Therapieangriffspunkt akuter und chronischer Krankheiten mit inflammatorischer Komponente bietet. Die Hemmung der immunstimulierenden Aktivitäten durch IL-10 stellt neue potenzielle Ansätze für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Infektionskrankheiten und Krebs

bereit. Beispielsweise spielt IL-10 eine wichtige Rolle in Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose und systemischer Lupus Erythematoses<sup>107</sup> Als einziges der hämatopoetischen Zytokine besitzt IL-10 eine Reihe sehr ähnlicher Aminosäuresequenzen, sog. Homologe in einer großen Anzahl von Virusgenomen, welche seine Bedeutung in der Regulation der Immun- und Entzündungsreaktion untermauern.<sup>108</sup> IL-10 ist ein wichtiges Zytokin gerade zu Beginn der Schwangerschaft und unter anderem an der Plazentabildung beteiligt. Es wird unter anderem von Trophoblasten synthetisiert<sup>109</sup> und bietet eine Schutzfunktion für die Plazentaeinheit, da es die Sekretion entzündlicher Zytokine wie IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  hemmt. Durch seine immunsuppressive Wirkung spielt es eine Schlüsselrolle bei der Regulation zwischen pro- und anti-inflammatorischen Abläufen, die für eine komplikationslose Schwangerschaft erforderlich sind.<sup>110</sup> Mehrere Tierversuche zeigten, dass eine Dysregulation von IL-10 zur Entstehung von Präeklampsie beitragen kann. Somit hat IL-10 nicht nur eine wichtige Bedeutung als Biomarker der Präeklampsie, sondern auch ein therapeutisches Potenzial.<sup>111</sup> Demnach ist ein umfassenderes Verständnis von IL-10 in der Pathophysiologie von Schwangerschaftskomplikationen von großer Wichtigkeit. Für den GDM ist der genaue Einfluss von IL-10 noch nicht bekannt. Eine Whole-Genome-Studie von 2017 konnte signifikante Unterschiede in der Methylierung von IL-10 Genen zwischen maternalem Blut und Nabelschnurblut in einer GDM-Population nachweisen.<sup>112</sup> Weitere Studien ergaben unterschiedliche Erkenntnisse und fanden sowohl erhöhte als auch erniedrigte IL-10 Serumlevel in hyperglykämischem Milieu in der GDM-Population<sup>113 114 115</sup> Obwohl bisher durchgeführte Studien eine mögliche Assoziation zwischen IL-10 und Diabetes andeuten, gibt es bisher nur unzureichende Daten über die Rolle von IL-10 bei der Entstehung eines GDM.<sup>116</sup> <sup>117</sup> Eine Fall-Kontroll-Studie und eine Kohortenstudie fand eine Assoziation zwischen der Monozytenanzahl im ersten Trimenon als Risikofaktor und diagnostischen Prädiktor für die Entstehung eines GDM sowie einer fetalen Makrosomie: Schwangere mit GDM wiesen eine signifikant erniedrigte Monozytenzahl auf, welche wiederum mit einem erhöhten Glukoselevel, Insulinresistenz und dem Körpergewicht der Neugeborenen korrelierte. Dabei war IL-10 signifikant niedriger und TNF- $\alpha$  sowie IL-6 erhöht bei Frauen mit GDM, sowohl im Plazentagewebe als auch im peripheren Blut.<sup>118</sup>

### **2.3.8 TGF- $\beta$**

Der Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ist ein ubiquitär vorkommendes Zytokin, welches grundlegende Zellfunktionen reguliert, besonders während der Embryogenese. Die sog. TGF- $\beta$ -Superfamilie ist von großer Bedeutung für das Wachstum und die Differenzierung insbesondere von Hautzellen und Reparaturvorgängen im Rahmen der Wundheilung. TGF- $\beta$  hat eine wichtige Bedeutung bei der Zellmotilität, Inflammation und Immunität<sup>119</sup>, auch bei der Apoptose und Tumorgenese spielt TGF- $\beta$  eine Rolle.<sup>120</sup> Zurzeit sind ca. 100 verschiedene Isoformen der TGF- $\beta$  Superfamilie bekannt, alle mit mindestens einer Region ähnlicher

Aminosäuresequenzen (Homologe). Besonders zu nennen ist an dieser Stelle der C-Terminus.<sup>121</sup> Aufgrund seiner vielfältigen Wirkungsweisen im menschlichen Organismus ist TGF- $\beta$  weiterhin an einer Vielzahl von Pathomechanismen beteiligt: Die stimulierende Wirkung auf die Kollagensynthese begünstigt das bindegewebige „Remodeling“ nach Myokardinfarkten sowie des Lungengewebes bei Atemwegserkrankungen.<sup>122</sup> In einer Studie von Yener et al wurde gezeigt, dass das Serum von Probandinnen mit GDM erhöhte Level von TGF- $\beta$  aufwies, als das der gesunden Kontrollgruppe. Die höchsten TGF- $\beta$ -Spiegel zeigten sich bei Probandinnen mit DM2. Vermutlich triggert eine Hyperglykämie die Freisetzung von TGF- $\beta$ , was wiederum den inflammatorischen Zustand begünstigt. Es ist nachgewiesen, dass eine Assoziation zwischen der Sekretion von TGF- $\beta$  und einer Insulinresistenz, sowie arterieller Hypertonie und Atherosklerose vorliegt.<sup>123</sup> Der hyperglykämische Zustand triggert die Freisetzung von TGF- $\beta$ , was die Entstehung einer diabetischen Nephropathie durch die gesteigerte Kollagensynthese begünstigt.<sup>124</sup> Über den Einfluss von TGF- $\beta$  auf die Pathogenese eines GDM sowie die Begünstigung von Atherosklerose auf dem Boden eines GDMs ist bisher noch wenig bekannt. Eine Studie von Mrizak et al führte eine qPCR durch, welche eine (leicht, nicht signifikant) erhöhte Menge an TGF- $\beta$  mRNA im Plazentagewebe der Probandinnen mit GDM im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwies. Dies könnte einen Indikator für plazentare Inflammation bei Frauen mit GDM darstellen. TGF- $\beta$  wird hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen und weiteren antigenpräsentierenden Zellen sowie Tregs sezerniert. Es wurde ein erhöhter Makrophagenanteil mit den Oberflächenmarkern CD68, CD14 und EMR-1 im Plazentagewebe der Probandinnen mit GDM detektiert. Es gibt Hinweise darauf, dass Monozyten den Syncytiotrophoblasten infiltrieren und die Trophoblastenbarriere angreifen, wodurch das Plazentagewebe geschädigt wird. Zusätzlich könnte ein Überschuss an Makrophagen in der Plazenta zu einem chronischen Entzündungszustand innerhalb der Plazenta beitragen.<sup>125</sup> Neben den antigenpräsentierenden Zellen sind auch T-Zellen (besonders Treg), in der Lage, TGF- $\beta$  während inflammatorischer Geschehen zu sezernieren, um eine überschießende Entzündungsreaktion abzufedern. TGF- $\beta$  inhibiert neben weiteren Mediatoren unter anderem die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren wie IL-1, IL-10, IL-8 und TNF- $\alpha$ .<sup>126</sup>

## **2.4 Fragestellungen und Ziel der Arbeit**

Ziel meiner Doktorarbeit war es, ein konkreteres Verständnis über die inflammatorischen Komponenten und Pathomechanismen zu gewinnen, die durch maternales Übergewicht und Adipositas, sowie GDM zustande kommen und negative Folgen für Mutter und Kind mit sich bringen können. Es existiert bereits eine große Anzahl an Studien, die darauf hindeuten, dass ein erhöhter BMI und GDM sich wechselseitig begünstigen und mit einem chronischen inflammatorischen Zustand einhergehen. Die zugrunde liegenden Pathomechanismen und Zusammenhänge sind multifaktoriell bedingt, jedoch noch nicht hinreichend im Einzelnen

erforscht. Sowohl systemisch, aber insbesondere auch auf lokaler Ebene im Plazentagewebe, ist die Datenlage für ein konkretes Verständnis der Pathophysiologie unzureichend. Ziel dieser Arbeit war es, quantitative Analysen ausgewählter Inflammationsmediatoren und Oberflächenmarker vorzunehmen und zu untersuchen, ob diese einen positiven Zusammenhang mit dem klinischen Phänotyp von Mutter und Kind aufweisen: Übergewichtige/adipöse ( $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) Mütter mit und ohne GDM wurden im Vergleich mit einer normalgewichtigen Kontrollgruppe ( $\text{BMI} \geq 18,5$  bis  $< 25 \text{ kg/m}^2$ , ohne GDM) untersucht. Um eine Vergleichbarkeit der Probandinnen zu ermöglichen, wurden ausschließlich schwangere Frauen in die Studie eingeschlossen, die sich einer elektiven Sectio unterzogen. Die Untersuchung erfolgte einerseits auf systemischer Ebene durch die Messung von ausgewählten Inflammationsmarkern im maternalen und Nabelschnurblut, lokal wurde die plazentare mRNA-Genexpression proinflammatorischer Zytokine untersucht. Zudem erfolgte histologisch eine quantitative immunhistochemische Analyse der lokalen Immunzellpopulationen im villösen Plazentagewebe. Das Ziel dieser Arbeit lässt sich durch folgende Forschungsfragen definieren:

1. Gibt es quantitative Unterschiede in der plazentaren Genexpression ausgewählter Inflammationsmediatoren zwischen den Gruppen mit maternalem Übergewicht/Adipositas mit und ohne GDM im Vergleich zur normalgewichtigen Kontrollgruppe ohne GDM?
2. Gibt es quantitative Unterschiede hinsichtlich der CD45+ Leukozytenzahl im humanen Plazentagewebe übergewichtiger/adipöser Mütter mit und ohne GDM im Vergleich zur normalgewichtigen Kontrollgruppe ohne GDM?
3. Korreliert die ermittelte Genexpression der Inflammationsmediatoren und die Leukozytenzahl im Plazentagewebe mit den gemessenen Inflammationsmarkern aus maternalem und Nabelschnurblut?

Gemeinsam mit den weiteren laufenden Projekten unserer Arbeitsgruppe möchte ich zu neuen Erkenntnissen und verstärkter Aufmerksamkeit für dieses Thema beitragen. Durch intensivere Forschung zur Prävention sowie Entwicklung medikamentöser/therapeutischer Ansätze können Risikofaktoren für Mutter und Kind zukünftig reduziert werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

In den folgenden Tabellen werden die Materialien, Software, sowie weitere Bestandteile der Erhebung und Analyse aufgelistet. Tabelle 2 listet die verwendeten Geräte und Softwares für die Datenerhebung, Tabelle 3 zeigt die Softwares sowie die Interaktiven Websites, die für die Arbeit verwendet wurden. In Tabelle 4, Tabelle 5, Tabelle 6 sind die Chemikalien, Puffer und Stammlösungen bzw. so wie die Antikörper für die Immunhistochemie aufgelistet. Im Anschluss listen Tabelle 7 und Tabelle 8 die Oligonukleotide und verwendeten Konzentrationen bzw. die Liste der Verbrauchsmaterialien und deren Verwendung.

##### 3.1.1 Geräte und Softwares

Name	Hersteller	Verwendung
<b>7500 Real Time PCR System Thermocycler</b>	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA	RT PCR
<b>Analysewaage LS 220A</b>	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz	diverse
<b>Dampfgarer FS 10 / FS 20 3216</b>	Braun Procter & Gamble Service GmbH, Kronenberg im Taunus, Deutschland	IHC
<b>Gewebeinfiltrationsautomat Leica ASP300</b>	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland	Paraffineinbettung
<b>Heizplatte ND-H500</b>	Bartscher GmbH, Salzkotten, Deutschland	Herstellung histologischer Gewebeschnitte aus Paraffinblöcken
<b>Lichtmikroskop BX43</b>	Olympus Europa Se & Co KG, Hamburg, Deutschland	IHC
<b>Mikroskop Dialux 20 EB</b>	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland	IHC
<b>Mikrotom (Jung BioCut 2035)</b>	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland	Herstellung histologischer Gewebeschnitte aus Paraffinblöcken
<b>Mini- Zentrifuge Sprout</b>	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland	diverse

<b>Paraffinausgussstation EG1150 H</b>	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland	Paraffineinbettung
<b>Pipettierhilfe accu-jet pro</b>	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Germany	diverse
<b>Plattenlesegerät / Nano Quant infinite M200 Pro</b>	Tecan, Männedorf, Schweiz	Proteinbestimmung, RNA- Konzentrationsbestimmung
<b>RCT Magnetrührer</b>	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland	diverse
<b>Schwingmühle MM400</b>	Retsch, Haan, Deutschland	RNA-Isolation
<b>SCN400 Slidescanner mit Autoloader für Hellfeldmikroskopie (20x Objektiv)</b>	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland	Digitalisierung der histologischen Gewebeschnitte
<b>Vortex Mixer V-1 plus</b>	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland	diverse
<b>Wärmeschrank</b>	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland	Schnittanfertigung
<b>Wasserbad für histologische Schnitte</b>	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland	IHC
<b>Wasserbad TFB 45</b>	Medite Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland	Schnittanfertigung
<b>Zentrifuge 5424 R</b>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Proteinisolation
<b>Zentrifuge Rotina 420R</b>	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland	Zentrifugation von Blut und RT PCR-Platten

Tabelle 2: Verwendete Geräte

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendung</b>
<b>7500 Software 2.0.6</b>	Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA	RT PCR
<b>Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)</b>	National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland	RT PCR (Primerdesign)
<b>Client-Server Software Omero</b>	University of Dundee & Open Microscopy Environment	Austauschplattform digitalisierter histologischer Daten
<b>Horseradish Peroxidase: ZytoChem Plus HRP One-Step Polymer anti-Mouse/Rabbit</b>	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland	IHC
<b>ImmPACT DAB-Substrate Kit</b>	Vector Laboratories, Burlingame, USA	IHC
<b>Microsoft Excel</b>	Microsoft®, Washington, USA	Auswertung IHC, RT PCR und klinischen Daten
<b>Primer Express™ Software, Version 3.0.1</b>	Applied Biosystems, Waltham/Massachusetts, USA	RT PCR (Primerdesign)
<b>QuPath 0.3.2</b>	Centre for Cancer Research & Cell Biology at Queen's University, Belfast, Vereinigtes Königreich	Quantitative Analyse der IHC
<b>RNase free DNase</b>	Promega, Mannheim, Deutschland	RT PCR (cDNA-Synthese)
<b>Software Tecan i-control 2.0</b>	Tecan, Crailsheim, Deutschland	RNA- Konzentrationsbestimmung
<b>SPSS 25</b>	IBM New York, USA	Statistische Datenanalyse
<b>UCSC Genome Browser, interaktive Website für Genomanalysen</b>	University of California Santa Cruz, USA	RT PCR (Primerdesign)

<b>Zufallsgenerator-App</b>	Bennett Bock, Deutschland	Quantitative Analyse der
<b>Random Generator – All in</b>		IHC
<b>1, Version 7.4.4</b>		

Tabelle 3: Softwares und interaktive Websites

### 3.1.2 Chemikalien, Puffer und Stammlösungen

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendung</b>
<b>Antibody Diluent</b>	DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark	IHC
<b>Chloroform reinst</b>	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland	RNA-Isolation
<b>Chromatographie Wasser in HPLC- Qualität</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	RNA- Konzentrationsbesti- mmung, RT qPCR
<b>DEPC</b>	Sigma Aldrich®/Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland	RNA-Isolation
<b>DNase-Verdau DNase-I-Puffer</b>	Promega, Mannheim, Deutschland	
<b>dNTP-Mix</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA	RT PCR
<b>dNTP-Mix (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)</b>	Fermentas	RT-PCR (cDNA- Synthese, Mastermix B)
<b>Ethanol ≥99,8 % vergällt</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	IHC
<b>Hämatoxylin (Hämalaun sauer nach Mayer)</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	IHC
<b>Isopropanol</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Einbetten für Histologie
<b>MMLV Buffer</b>	Promega, Mannheim, Deutschland	RT-PCR (cDNA- Synthese, Mastermix B)
<b>MMLV Reverse Transkriptase (DNA-Polymerase)</b>	Promega, Mannheim, Deutschland	RT-PCR (cDNA- Synthese, Mastermix B)
<b>Natriumchloridlösu- ng 0,9%</b>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland	Präparation von Plazentagewebe
<b>Neo-Clear® entparaffiniert</b>	Sigma Aldrich®/Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland	IHC

<b>Neo-Mount</b>	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland	IHC
<b>Oligo-dT-Primer (= 16x T (Thymin))</b>	MWG Eurofins	RT PCR (cDNA-Synthese, Mastermix A)
<b>PBS Pulver L182-50 (nicht mehr verfügbar)</b>	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland	IHC
<b>Peroxidase-Block: Tablette Harnstoff-Wasserstoffperoxidtabletten (FA Roth Nr.: A7641.1)</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	IHC
<b>PFA 4% (ROTI® Histofix 4 %, ready-to-use, phosphatgepuffert, pH 7)</b>	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland	IHC
<b>Pierce SEA BLOCK Blocking Buffer (#37527)</b>	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, USA	IHC
<b>Promega GoTaq™ qPCR Master Mix</b>	Promega, Mannheim, Deutschland	RT PCR
<b>Random Primer</b>	Roche	RT PCR (cDNA-Synthese, Mastermix A)
<b>RNase Inhibitor</b>	Promega, Mannheim, Deutschland	RT-PCR (cDNA-Synthese, Mastermix B)
<b>RNase-free DNaseI</b>	Promega, Mannheim, Deutschland	
<b>Stop-Solution (25mM EDTA)</b>	Promega, Mannheim, Deutschland	cDNA-Synthese
<b>Target Retrieval Solution 10x conc. pH 6</b>	DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark	
<b>TissueTek</b>	Sakura Finetek Germany GmbH,	Präparation von

<b>® O.C.T.™ Compound Einbettmedium</b>	Staufen, Deutschland	Plazentagewebe für Histologie
<b>TRizol® Reagent</b>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA	RNA-Isolation

Tabelle 4: Chemikalien

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Methode</b>
<b>Citratpuffer</b>	Target Retrieval Solution pH6 10x conc. Ad 9 Teile Milli Q Wasser für 1x conc.	IHC
<b>DEPC-Wasser</b>	200µl DEPC auf 100ml MilliQ-Wasser, gut schütteln & 24 Stunden bei RT inkubieren, dann autoklavieren. DEPC zerfällt dabei zu EtOH und CO <sub>2</sub> .	RNA-Isolation
<b>PBS-Pulver</b>	Fertig zusammengesetzt aus folgenden Komponenten: 1,47 mM Kaliumdihydrogenphosphat 8,1 mM Di-Natriumhydrogenphosphat 2,68 mM Kaliumchlorid 136,89 mM Natriumchlorid. Ergibt insgesamt 9,55g/L Phosphate Buffered Saline, Ad 1L VE-Wasser auf 9,55g PBS-Pulver.	IHC
<b>Peroxidase-block (3%)</b>	1 Stk. Harnstoff-Wasserstoffperoxidtablette. Ad 5 ml VE-Wasser	IHC

Tabelle 5: Puffer und Stammlösungen

### 3.1.3 Biologisches Material

Bei dem verwendeten biologischen Material handelte es sich um humane Plazentaprobe. Für die Verwendung und Verarbeitung der humanen Proben liegt ein genehmigter Ethikantrag vor (#14-244).

### 3.1.4 Antikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Verwendung
<b>Primärantikörper: CD45 (D9M8I) XP® #13917</b>	Rabbit mAb IgG	1:2000	Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA)	IHC
<b>Sekundärantikörper: Zytochem Plus HRP One-Step Polymer</b>	anti- Mouse/Rabbit/Rat		ZytoMed Systems GmbH, Berlin, Germany	IHC

Tabelle 6: Antikörper für Immunhistochemie

### 3.1.5 Primersequenzen

Sämtliche Primer wurden selbst designed und von MWG Eurofins hergestellt.

RNA Target	Oligonukleotide 5'- 3'	Konzentration final (im PCR-Mix)
<b>18-S-rRNA</b>	For: CGGCTACCACATCCAAGGAA Rev: GCTGGAATTACCGCGGCT	10,00 µM
<b>IL-10</b>	For: TGAGAACAGCTGCACCCACTT Rev: CAGCTGATCCTTCATTTGAAAGAA	10,00 µM
<b>IL1R1</b>	For: AGGCTGATAAATGCAAGGAACGT Rev: GGTGTCTTGCTGTCATCTTTATACCA	10,00 µM
<b>IL1-β</b>	For: CCC TAA ACA GAT GAA GTG CTC CTT Rev: GGTGGTCGGAGATTCGTAGCT	10,00 µM
<b>IL-4</b>	For: ATATCACCTTACAGGAGATCATCAAAAC Rev: TCGCAGCCCTGCAGAAG	10,00 µM
<b>IL-6</b>	For: AGAGCAACACGGGTTTCAGGTA Rev: GCTGCTTTTCACACATGTTACTCTTG	10,00 µM
<b>MCP1</b>	For: TCGCTCAGCCAGATGCAAT Rev: CGAGCCTCTGCACTGAGATCTT	10,00 µM
<b>TGF- β</b>	For: CCCACAACGAAATCTATGACAAGT Rev: AGAGCAACACGGGTTTCAGGTA	10,00 µM
<b>TNF-α</b>	For: CAGCCTCTTCTCCTTCCTGA Rev: GCCAGAGGGCTGATTAGAGA	10,00 µM
<b>β -Actin</b>	For: GATGGCCACGGCTGCTT Rev: ACCCTCATTGCCAATGGT	10,00 µM

Tabelle 7: Oligonukleotide und verwendete Konzentrationen

### 3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Verwendung
96-Wells Platten	4Tititude, Wotton, Vereinigtes Königreich	RT PCR
Adhäsionsobjektträger Superfrost	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA	IHC
Chirurgische Pinzette	Eickemeyer	Plazentapräparation
Clear Heat Seal für 96-Well-Platten	4Tititude®, Wotton, Vereinigtes Königreich	RT PCR
Deckgläser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	IHC
Doppelspatel gebogen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Herstellung von Puffern/Stammlösungen
Einmalpipette einzeln steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	RT PCR, IHC
Einmal-Skalpelle	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Plazentapräparation
ep Dualfilter T.I.P.S.® - Filterpipettenspitzen (0,1-10 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	diverse
ep Dualfilter T.I.P.S.® - Filterpipettenspitzen (1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Verarbeitung von Nabelschnurblut und maternalem Blut
Falcons in verschiedenen Größen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	RT PCR
gebogene Schere	Eickemeyer	Plazentapräparation
Lagerkästen mit Raster	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Lagerung der Proben
Magnetührstäbe	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Herstellung von Puffern/Stammlösungen
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	IHC, RT PCR
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland	IHC, RT PCR
Pipettenspitzen	Eppendorf,	IHC, RT PCR

	Hamburg, Deutschland	
Pipettenspitzen in verschiedenen Größen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	RT PCR, IHC
Reaktionsgefäße 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	RT PCR
Schraubbecher 100 ml, steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Plazentapräparation
S-Monovette EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Blutentnahme
S-Monovette Heparinplasma	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Blutentnahme
S-Monovette Serum	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Blutentnahme
Stabpipette in verschiedenen Größen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	RT PCR, IHC
Wägeschälchen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Herstellung von Puffern/Stammlösungen

Tabelle 8: Liste der Verbrauchsmaterialien und Verwendung

## 3.2 Methoden der klinischen Arbeit

### 3.2.1 Patientinnenkollektiv

Eine Kooperation zwischen der Kinderklinik und der Frauenklinik der Uniklinik Köln machte die Durchführung der Plazenta-Studie möglich. Für die Verwendung und Verarbeitung der humanen Proben liegt ein genehmigter Ethikantrag vor (#14-244). Wenige Tage vor geplantem Kaiserschnitt wurden die potenziellen Teilnehmerinnen vom Studienteam über das Forschungsprojekt aufgeklärt und mithilfe eines Fragebogens zu den Einschluss- sowie Ausschlusskriterien und weiteren anamnestischen Details befragt (siehe Tabelle 9). Die Einwilligung der Studienteilnehmerinnen erfolgte schriftlich; auch nach der Einwilligung hat die Probandin die Möglichkeit, das Studienteam zu kontaktieren und die Verwendung der Materialien und Informationen zu verweigern.

<b>Einschlusskriterien</b>	<b>Ausschlusskriterien</b>
Unkomplizierte Schwangerschaft(en)	BMI <18,5 kg/m <sup>2</sup>
	Komplikationen während der SS, insbesondere: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Behandlungsbedürftiger Hypertonus</li> <li>• Präeklampsie</li> </ul>
Geplanter Kaiserschnitt	Infektionskrankheiten (z.B. STORCH, Chorioamnionitis)
Entbindung in SSW 35+0 – 41+6	Schwere Vorerkrankungen
	Vorzeitige Entbindung: SSW <35+0
	Mehrlingsschwangerschaft

Tabelle 9: Einschluss- und Ausschlusskriterien

Nach erfüllten Einschlusskriterien und erfolgter Einwilligung wurden die Probandinnen anhand eines Fragebogens anamnestisch zu folgenden Daten befragt (siehe Tabelle 10). Die erfassten Daten wurden in einer Excel-Tabelle pseudonymisiert festgehalten.

<b>Fragebogen zur Aufklärung</b>	
Rauchverhalten	vor SS in SS
Präexistenter Diabetes mellitus Typ 1, Typ 2, GDM	Therapie (Insulin/Diät) Zeitpunkt der Diagnose
Hypertonus vor SS	Ja/Nein
Schwere Vorerkrankungen	insb. an Herz, Niere, Leber, Schilddrüse, Krebserkrankung
Voroperationen (insb. Uterus, Adnexe)	Ja/Nein
Medikamentenanamnese	Antikoagulation (Heparin/Clexane) ASS Cortison (RDS-Prophylaxe) Metformin L-Thyroxin Folsäure Antidepressiva/Psychopharmaka
Berufliche Tätigkeit in SS, wenn ja, bis zu welcher SSW	sitzend, stehend, gehend
Freizeitgestaltung, weitere Kinder	offene Frage
Körperliche Aktivität und Sport	Frequenz, Intensität, vor SS vs. während der SS
Ernährungsform	vegetarisch/vegan Unverträglichkeiten/Allergien
Geburtshilfliche Anamnese	Anzahl Gravidae Anzahl Parae vorherige Sectiones Grund für jetzige Sectio Fruchtbarkeitsbehandlungen

Tabelle 10: Auszug aus dem „Fragebogen zur Aufklärung“

Anhand des BMI-Wertes vor Beginn der Schwangerschaft und dem Vorhandensein eines Gestationsdiabetes mellitus wurde eine Einteilung der Kohorte in drei Gruppen vorgenommen (siehe *Tabelle 11*).

Gruppe	Abkürzung	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Gestationsdiabetes
Kontrollgruppe	KG	18,5 - < 25	nein
Übergewicht / Adipositas, kein GDM	UGAD	> 25	nein
Übergewicht / Adipositas, mit GDM	UGAD+GDM	> 25	ja

Tabelle 11: Kohorteneinteilung

### 3.2.2 Asservierung des biologischen Materials

In der Kreißsaalsprechstunde wurde wenige Tage vor der geplanten Sectio eine präoperative maternale Routineblutabnahme durchgeführt, bei der zusätzlich je eine Serum- und eine EDTA-Vollblut-Monovette für die Studie abgenommen wurde. Die Mutter musste dafür nicht nüchtern sein. Im Labor wurde die Serum-Monovette bei 906 g für 10 min zentrifugiert. Das Serum und EDTA-Vollblut wurden in je zwei 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäße pipettiert und mit vorläufigen Nummern pseudonymisiert (sog. B-Nummer).

### 3.2.3 Gewebeentnahme und Asservieren der Proben am Tag des Kaiserschnitts

Am Tag der Sectio wurde das Studienteam telefonisch über die laufende Sectio informiert. Die Plazenten wurden maximal 30 min post partum von den Hebammen zur Präparation freigegeben. Im Kreißsaal erfolgte die Abnahme von drei Monovetten venösem Nabelschnurblut (EDTA-Blut, Serum und Lithium-Heparin-Blut). Zusätzlich erhielten wir von der Anästhesie ein weiteres Röhrchen maternales Lithium-Heparin-Blut, welches präoperativ im nüchternen Zustand der Mutter aus der Venenverweilkanüle abgenommen wurde. Anschließend wurden die Blutproben und die Plazenta ins Forschungslabor transportiert. Das Serum und Lithium-Heparin-Blut wurden bei 906 g für 10 Minuten bei 20°C zentrifugiert (Rotina 420R). Jede Probe wurde auf jeweils zwei 1,5ml-Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt. Alle Proben wurden mit dem Pseudonym der zugehörigen Plazenta beschriftet und bei -80°C tiefgefroren.

### 3.2.4 Datenerfassung und Fotodokumentation

Die Plazenta wurde vor und nach Präparation fotografiert und mit einer Nummer versehen und folgende Eckdaten dokumentiert (siehe Tabelle 12).

<b>Daten zur Plazenta</b>
Auffälligkeiten der Gewebeschaffenheit
Gestationstag bei Sectio
Patientinnennummer
Plazentagewicht mit Nabelschnur
Plazentagröße in cm (Höhe x Breite x Tiefe)
Insertionsort der Nabelschnur (peripher, eher peripher, zentral)
Vorhandensein von venösem Nabelschnurblut (Serum, Plasma, EDTA-Vollblut)
Name der präparierenden Person

Tabelle 12: Erfassung der Daten zur Plazenta

### 3.2.5 Präparation des Gewebes

Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte aus drei verschiedenen Regionen der Plazenta: Nabelschnurnah-, -mittig und -fern. Zusätzlich wurde eine Probe der Nabelschnur nahe des Insertionsortes entnommen (siehe Abbildung 2). Die insgesamt vier Proben wurden in 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Jede Probe wurde folgendermaßen für weitere Untersuchungen verarbeitet. Für die native Kryokonservierung wurde ein Viertel der Gewebeprobe in ein mit Einbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound) gefülltes Aluminiumförmchen gegeben und unmittelbar auf Trockeneis eingefroren. Nach der Präparation wurde das konservierte Gewebe bei -80°C eingefroren, um später im Kryostaten zu Kryo-Schnitten für mögliche histologische Untersuchungen verarbeitet werden zu können. Zusätzlich erfolgte eine Fixierung in Paraformaldehyd zur späteren Paraffineinbettung zur Anfertigung histologischer Schnitte. Dafür wurde ein weiteres Viertel jeder Probe aufrecht in Gewebekassetten platziert, welche bei 4°C in PFA (ROTI® Histofix 4 %) fixiert wurden. Die Umbettung in 70% Isopropanol erfolgte nach 24-48 Stunden. Die maximale Lagerungszeit bis zur Paraffineinbettung betrug 14 Tage bei 4°C. Die Gewebeeinfiltration mit Paraffin erfolgte automatisch in der Tissue Embedding and Histology Unit des Zentrums für Molekulare Medizin der Uniklinik Köln durch den Gewebeeinfiltrationsautomat (Leica ASP 300). Am Folgetag wurde das Gewebe mit Hilfe der Paraffinausgießstation Leica EG1150- H (Leica Biosystems) in Paraffinblöcke gegossen. Pro Plazenta wurden aus dem entstandenen FFPE-Gewebe (Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet) 10-20 Schnitte am Mikrotom hergestellt. Die 3 µm dicken Paraffinschnitte wurden auf Superfrost-Objektträgern glatt aufgezogen und für 48 h in einem Trockenschrank bei 45°C getrocknet. Die Objektträger wurden mit Nummern pseudonymisiert, um vor Beginn des Färbe- und Auswertungsprozesses eine Verblindung zu ermöglichen.

Die restlichen Gewebeproben wurden für spätere molekularbiologische Untersuchungen wiederum in einen maternalen, villösen und fetalen Bereich gedrittelt und grob zerkleinert nativ in Mikroreaktionsgefäße gegeben. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -80°C.

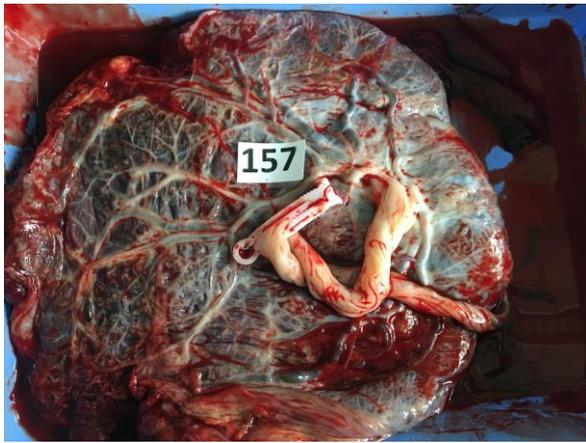


Abbildung 2: Vor Präparation

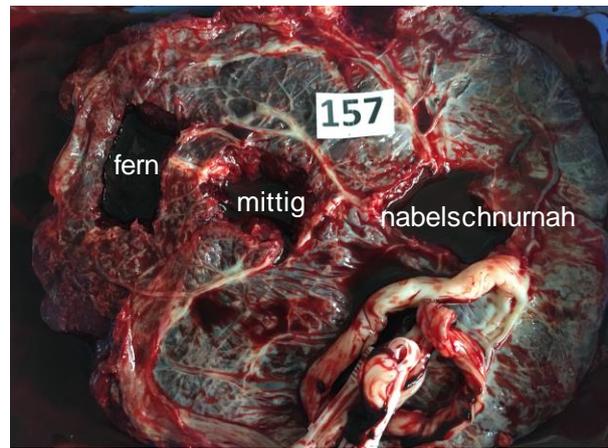


Abbildung 3: Nach Präparation

### 3.2.6 Klinische Chemie: Fetales und maternales Blut

Die zuvor eingefrorenen Blutproben wurden im Institut der Klinischen Chemie (Uniklinik Köln) auf verschiedene Stoffwechsellparameter von Mutter und Kind untersucht. Von besonderer Bedeutung waren Fett- und Zuckerstoffwechselwerte wie Glukose, HbA1c, HDL- und LDL-Cholesterin, Triglyceride. Zusätzlich wurden die Inflammationsmediatoren CRP, IL-6 und IL-8 und die Leukozytenzahl analysiert. Mithilfe dieser Laborwerte wurde später untersucht, ob eine Korrelation mit dem klinischen Phänotyp der Mutter/des Neugeborenen und molekularbiologischen sowie histologischen Veränderungen des plazentaren Gewebes besteht. Am Folgetag der Sectio wurden auf Station weitere Dokumente zu Mutter und Kind eingesehen: Die Angaben in Mutterpass, Geburtenprotokoll, aktuelle Laborbefunde der letzten Blutentnahme, sowie der Neugeborenenverlegungsbericht wurden anonymisiert und gemeinsam mit den zuvor für die Studie erhobenen Daten in Excel übertragen (siehe Anhang). Im Anschluss erfolgte die Auswertung mit der Statistik- und Analyse-Software SPSS (Version 27, BM SPSS Statistics for Windows, Armonk, NY, USA). Für die Auswertung erfuhren wir Unterstützung durch das Institut für medizinische Statistik und Bioinformatik der Universität zu Köln (IMSB).

### 3.3 Methoden der experimentellen Arbeit: Immunhistochemie

#### 3.3.1 Vorbereitung der Gewebeproben

Die Gewebeproben stammen von 60 humanen Plazenten, die unmittelbar nach den geplanten Kaiserschnitten in der Frauenklinik der Uniklinik Köln im Forschungslabor der Kinderklinik präpariert wurden. Für die histologischen Untersuchungen erfolgte eine Einteilung der Patientinnenproben in drei Untergruppen. Es befanden sich jeweils 20 Gewebeprobenuntergruppen für IHC in den Gruppen KG, UGAD+GDM und UGAD.

Für die immunhistologische Färbung wurde das Gewebe aus der mittigen Plazentaregion gewählt. Zum einen gestaltete sich an dieser Stelle die Präparation am günstigsten, zum anderen schafften wir dadurch in den Versuchen möglichst gleiche Bedingungen für alle

Präparate. Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Detektion von gezielten Antigenen in Gewebeproben und Zellen. Hierfür bindet ein mono- oder polyklonaler Primärantikörper an die Epitope der gesuchten Antigene. Dadurch entsteht eine Antigen-Antikörper-Interaktion.<sup>127</sup> Durch das Einbetten des Gewebes in PFA und Isopropanol entstehen jedoch Proteinvernetzungen durch die Bildung von Methylenbrücken (sog. „Cross-Links“). Diese verdecken die darzustellenden Antigene und somit ihre Epitope, an die der Antikörper binden soll. Daher sind neben einer hohen Spezifität und Affinität des Primärantikörpers die begleitenden Reagenzien und Puffer ebenso wichtig für eine erfolgreiche immunhistochemische Färbung. Sie beeinflussen die Bindung des Antikörpers an dessen Epitop. Durch Erhitzen und wieder Abkühlen des Puffers (sog. Heat Induced Epitope Retrieval) werden die Cross-Links aufgebrochen und so die gesuchten Antigene und Epitope demaskiert, an die der Antikörper letztendlich binden kann. Dieser Prozess nennt sich Antigen-Demaskierung. Der nun entstandene Antigen-Antikörper-Komplex kann anschließend immunhistochemisch auf verschiedene Arten visualisiert werden: Eine Möglichkeit der Immunmarkierung stellt die direkte Konjugation von Enzymen, wie beispielsweise die Merrettich-Peroxidasen (HRP) oder Alkalische Phosphatase (AP), mit dem spezifischen Antikörper dar. Wir haben uns für die indirekte Methode der Immunhistochemie entschieden, bei welcher der spezifische Primärantikörper mit einem Sekundärantikörper konjugiert wird. Als Sekundärantikörper diente das Zytochem Plus HRP One-Step Polymer, welches aus mehreren Molekülen Sekundärantikörper besteht, an welche das Enzym Merrettich-Peroxidasen (HRP) kovalent gebunden ist. Die farbliche Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgt über eine Reaktion der Peroxidase mit einem Chromogen, wie beispielsweise AEC (Amino Ethylcarbazol) oder DAB (Diaminobenzidin). Wir haben uns für die Immunmarkierung mit DAB entschieden, welches sich unter dem Lichtmikroskop braun darstellt. Die Reaktion wird durch das Enzym HRP katalysiert: Das Substrat der Peroxidase ist Wasserstoffperoxid, wodurch das DAB oxidiert und somit die gesuchten Strukturen spezifisch braun angefärbt werden.

### **3.3.2 Immunhistochemie mit CD45**

Für die Erfassung CD45-positiver Zellen wurde ein monoklonaler, vom Hasen stammender Primärantikörper verwendet, welcher spezifisch gegen humanes Gewebe gerichtet ist. Die Verdünnung erfolgte 1:2000 in Antibody Diluent (DAKO). Um eine reproduzierbare histologische Färbung und anschließende quantitative Analyse der CD45-Zellen des humanen Plazentagewebes zu ermöglichen, war die Etablierung eines möglichst präzisen Ablaufs von entscheidender Bedeutung. Gerade für quantitative Analysen von immunhistochemisch angefärbtem humanen Plazentagewebe und der Detektion von CD45+ Leukozyten gibt es bisher nur wenige etablierte Methoden. Die Art sowie der Ablauf der Färbungen haben einen großen Einfluss auf die späteren Auswertungen und Ergebnisse. Da wir sämtliche Färbungen

in mehreren Durchgängen per Hand durchführten und diese im Anschluss digitalisiert und automatisch mit Hilfe einer Software quantifiziert wurden, war ein präziser Vorgang bei der Färbung besonders essenziell. Die Etablierung der Färbemethode erfolgte anhand von Testschnitten. Diese wurden aus Paraffinschnitten der humanen Plazentaprobe, die zuvor aus der Studie ausgeschlossen worden waren, hergestellt. Zur Austestung des Antikörpers wurde in jedem Testdurchlauf eine Negativkontrolle mitgeführt, welche nicht mit dem Primärantikörper versehen wurde. Der CD45-Primärantikörper wurde immunhistochemisch mit DAB in den Konzentrationen 1:500, 1:1000 und 1:2000 getestet. Die Färbung fiel in der Verdünnung 1:2000 am besten aus. Die immunhistochemischen Färbungen wurden zudem in unterschiedlichen Inkubationszeiten mit DAB sowie AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol) getestet. AEC ist ein chromogenes Substrat für eine Immunfärbung mit einer Meerrettich-Peroxidase. Nach Oxidation mit Wasserstoffperoxid nimmt es eine rote, in Wasser unlösliche, aber in Ethanol lösliche Färbung an. Für die Immunhistochemie gaben wir das DAB bzw. AEC einzeln auf die Schnitte und stoppten die Zeit, bei der die CD45-Zellen in der Lichtmikroskopie sichtbar wurden, ohne dass unspezifisch Hintergrundgewebe angefärbt wurde. DAB stellt sich in der Lichtmikroskopie braun dar, AEC rötlich. Die besten Resultate ergaben sich für das DAB mit einer Inkubationszeit von 90 s. Zur Darstellung der Morphologie der Zellkerne werden diese mit einem Kernfarbstoff gegengefärbt. Bei DAB wird dafür meist Hämalaun sauer nach Mayer verwendet. Auch hier wurde das Bläuen unter fließendem Leitungswasser in verschiedenen Inkubationszeiten getestet. Hierbei ist wichtig, dass die Zellkernfärbung die immunhistochemische Markierung nicht überlagert. Eine Inkubationsdauer von 4 min mit anschließendem Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min ergab sich hier als bestes Ergebnis. Die mitgeführte Negativkontrolle erfolgte ohne Verwendung des Primärantikörpers. Diese Färbung wurde anschließend lichtmikroskopisch auf eventuelle unspezifische braune Anfärbung von Zellen durch das DAB sowie eine mögliche Anfärbung des Hintergrundes untersucht.

Für die histologischen Färbungen wurde für jede humane Plazenta jeweils ein 3 µm dicker Gewebeschnitt ausgewählt. Die Objektträger mit den humanen Gewebeproben wurden durch Nummern pseudonymisiert, um vor Beginn des Färb- und Auswertungsprozesses eine Verblindung zu ermöglichen. Pro Färbedurchgang wurden 12 randomisiert ausgewählte Schnitte von Hand gefärbt. Jeder Durchgang beinhaltete eine Negativkontrolle, auf die kein Primärantikörper gegeben wurde. Vor jeder Färbung erfolgte die Entparaffinierung sowie Antigendemaskierung: Die in Färbegestelle platzierten Objektträger wurden dreimal für jeweils 15 min mit dem Xylolersatzmittel Neo-Clear® entparaffiniert. Es folgte eine Hydratisierung in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70% Ethanol) für jeweils 1 min sowie 3 Mal 1 min in VE-Wasser. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in vorgewärmten 1x Citratpuffer für 25 min im Dampfgarer inkubiert, danach für mindestens 30 min abgekühlt und

anschließend kurz in VE-Wasser gewaschen. Die Durchführung der weiteren Schritte erfolgte in feuchter Kammer, um ein Austrocknen der Gewebeproben zu vermeiden. Zur Minimierung einer Anfärbung des Hintergrundgewebes, insbesondere von Erythrozyten, wurden die Schnitte mit einem Peroxidase-Block vorbehandelt. Die endogenen Peroxidasen im Gewebeschnitt werden durch Inkubation des Präparates mit 3 %iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung inaktiviert. Eine Harnstoff-Wasserstoffperoxidtablette wurde in 5 ml VE-Wasser aufgelöst, für 10 min auf den Gewebeschnitten inkubiert und diese anschließend für 1 min mit PBS gewaschen. Zur weiteren Reduktion von Hintergrundanfärbungen erfolgte eine Inkubation mit Pierce SEA BLOCK Blocking Buffer für 90 min. Der CD45-Primärantikörper wurde in Antibody Diluent in einem Verhältnis von 1:2000 verdünnt. Auf jeden Gewebeschnitt kamen 200 µl, die anschließende Inkubation erfolgte über 24 h bei 4°C in der feuchten Kammer. Als Zweitantikörper fungierte der ZytoChem Plus HRP One-Step Polymer anti-Mouse/Rabbit/Rat (ZytoMed Systems). Dieser wurde für 30 min auf die Gewebeproben gegeben und später für 3 Mal 5 min mit PBS abgewaschen. Um die Antikörper-Antigen-Reaktion sichtbar zu machen, wurde das ImmPACT DAB-Substrate Kit (Vector Laboratories, Inc) verwendet. 3,3'-Diaminobenzidin reagiert mit dem Enzym HRP, welches durch Oxidation des DAB einen Farbumschlag bewirkt und sich in der Hellfeld-Mikroskopie braun darstellt. Das DAB wurde im Verhältnis von 1:33 mit dem ImmPACT DAB Diluent verdünnt, auf jeden Schnitt wurden 200 µl gegeben. Die Inkubationszeit betrug für jede Probe 90 s. Die Reaktion wurde in VE-Wasser abgestoppt. Zur Darstellung der Zellkerne wurden alle Proben für 4 min in Hämatoxylin (Hämalaun nach Mayer) getränkt und danach für eine Dauer von 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Durch die Behandlung mit Leitungswasser wird ein höherer pH-Wert erreicht, wodurch der blaue Farbton entsteht. Die Dehydratisierung des gefärbten Gewebes erfolgte in aufsteigender Ethanolreihe (70%, 80%, 96% für je 1 min, dann 99,8% für 2 min). Im Anschluss wurden die Proben im Neo-Clear® für 2 Mal 5 min inkubiert. Als Eindeckmedium fungierte Neo-Mount. Die fertigen Gewebeproben wurden über Nacht bei RT getrocknet. <sup>128</sup>

### **3.3.3 Digitalisierung der Gewebeproben und Analyse mit QuPath**

Die Objektträger wurden im SCN400 Slidescanner mit Autoloader für Brightfield Images (Leica) im 20x Objektiv eingescannt, in die Client-Server Software Omero (University of Dundee & Open Microscopy Environment) importiert und die Daten dort gespeichert.

Die quantitative Auswertung der digitalisierten Gewebeschnitte erfolgte mit der Software QuPath (Quantitative Pathology & Bioimage Analysis). Es erfolgte die Quantifizierung der durchschnittlichen CD45-Zellzahl bezogen auf die erkannte Gewebefläche sowohl in µm<sup>2</sup> als auch umgerechnet in mm<sup>2</sup>.

### **3.3.4 Erkennung und Auswahl der untersuchten Gewebeproben**

Zuerst wurde für jede Gewebeprobe die Grenzen der Gesamtfläche auf dem Objektträger manuell markiert und als sogenannte „Annotation“ festgelegt. Das markierte Gewebe wurde

anschließend durch die Software in jeweils sechs identisch große Areale, sog. „Tiles“ bzw. „Samples“, unterteilt (Befehlsfunktion: 1. Analyse, 2. Tiles and Superpixels, 3. Create Tiles) (siehe Abbildung 4). Pro Plazentaprobe analysierten wir mit Hilfe eines Zufallsgenerators (Bennett Bock) jeweils sechs randomisiert ausgewählte Tiles. Wiesen die ausgewählten Gewebeproben Artefakte wie bspw. Falten, Luftblasen, Risse auf, wurden diese Samples von der Analyse ausgeschlossen.

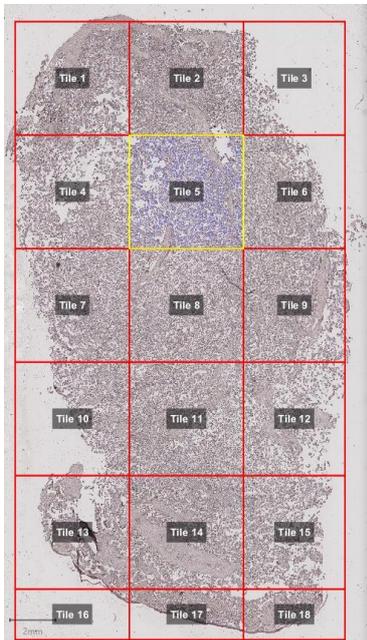


Abbildung 4: Unterteilung der Gewebeproben in randomisiert ausgewählte Tiles mittels QuPath (Scale Bar = 2 mm)

### 3.3.5 Automatisierung der Gewebeerkennung

Die Gewebeproben wurden in mehreren Durchgängen von Hand gefärbt, wobei die Intensität der Färbungen heterogen ausfiel. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu erzielen, führten wir vor der eigentlichen Auswertung für jede Plazenta einen Testdurchlauf in QuPath durch, in dem die Einstellungsparameter angepasst wurden (siehe Tabelle 13). Insgesamt galten für alle Tiles innerhalb einer Plazenta schlussendlich identische Programmeinstellungen und -kriterien sowohl für die Detektion und Erfassung des Gewebes, als auch für die angefärbten CD45-Zellen. Für den Testdurchlauf wurde zuerst eine kleine Annotation in einem für das Gewebe repräsentativen Areal festgelegt. Es erfolgte die Einstellung der Gewebeerkennung. Zur Optimierung der Vergleichbarkeit wurde stets die weiße Hintergrundfläche auf dem Objektträger von der Gewebefläche subtrahiert, sodass nur die tatsächliche Plazentagewebefläche in die Auswertung mit einbezogen wurde (Befehlsfunktion in QuPath: 1. analyze, 2. deprecated 3. positive pixel count). Die sog. „Stained Pixel Area“ wurde von dem Programm in  $\mu\text{m}^2$  angegeben. So wurde das Gewebe auf dem Objektträger erkannt und die weiße Hintergrundfläche und unspezifische Anfärbungen von der

auszuwertenden Fläche abgezogen. Für jedem „Tile“ betrug die Flächengröße 6250000  $\mu\text{m}^2$  bzw. 6,25  $\text{mm}^2$ .

<b>Gewebeererkennung in QuPath (Stained Pixel Area)</b>	
Parameter	Einstellung
Downsample factor	2
Gaussian sigma	2 $\mu\text{m}$
Hematoxylin threshold (“Negative”)	0,15 OD Units
DAB threshold (“Positive”)	1 OD Unit

Tabelle 13: Beispielparameter für die Geweererkennung in QuPath

### 3.3.6 Automatisierung der Zellerkennung

Nach der Erkennung und Determinierung der Gewebefläche durch die Software erfolgte die Quantifizierung der Zellzahl, welche anschließend auf die erkannte Gewebefläche bezogen wurde. Vor der eigentlichen Auszählung durch das Programm wurden auch hier in dem Probeareal die Zellen manuell ausgezählt und morphologische Parameter definiert, um sicherzustellen, dass das Programm die CD45-positiven Zellen zuverlässig erfasst. Die CD45-Zellen wurden automatisch durch das Programm detektiert und die ermittelte Zellzahl anschließend auf das Gewebe in  $\mu\text{m}^2$  bezogen. Innerhalb der Annotation ermöglichte die Funktion „Positive Cell Detection“ eine automatische Erkennung und Auszählung der immunhistochemisch angefärbten Zellen. In Tabelle 14 sind die morphologischen Kriterien für die Zellerkennung durch das Programm beschrieben.

<b>CD45+ Zellen: Morphologische Kriterien für die Zellerkennung in QuPath</b>		
<b>Setup parameters</b> (für jede Plazenta identisch)	Detection image	Hematoxylin OD
	Requested pixel size	0,5 Mikrometer
<b>Nucleus parameters</b> (für jede Plazenta identisch)	Background radius	8 µm
	Median filter radius	0 µm
	Sigma	1,5 µm
	Min area	25
	Max area	80
	Threshold	0,22
<b>Intensity parameters</b> (variierte für jede Plazenta, innerhalb einer Plazenta für alle Tiles identisch)	Max background intensity	2
	Cell expansion	0 µm
<b>Cell parameters (für jede Plazenta identisch)</b> <b>Intensity threshold parameters</b> (variierte für jede Plazenta, innerhalb einer Plazenta für alle Tiles identisch)	Score compartment	Nucleus: DAB OD mean
	Threshold 1+	0,5-0,7 (variierte nach Färbung=Limitation?)
	Threshold 2+	0,4
	Threshold 3+	0,6

Tabelle 14: Beispielparameter für „Positive Cell Detection“ in QuPath

Nach dem Probedurchlauf und der Kalibrierung der morphologischen Kriterien für die Zellerkennung wurden diese für jeweils sechs randomisiert ausgewählte Tiles innerhalb einer Plazenta angewendet. Es wurden also innerhalb einer Plazenta sowohl für die Geweberkennung, als auch für die Detektion der Zellen stets die identischen Einstellungsparameter verwendet (siehe Abbildung 5).

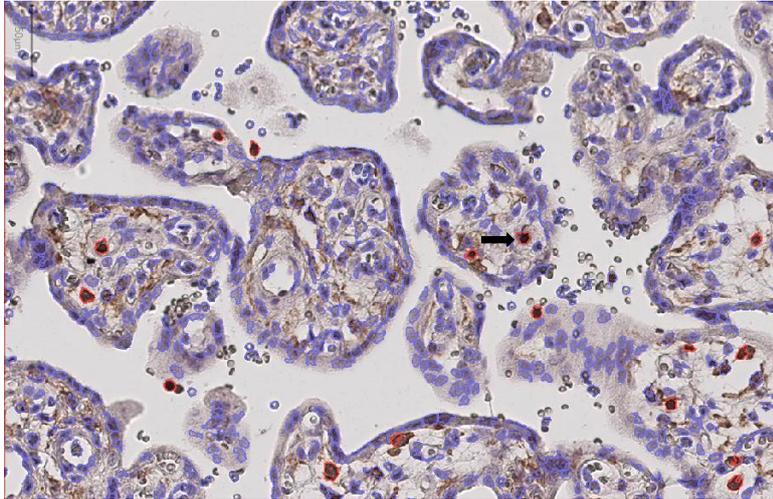


Abbildung 5: Beispiel für die Gewebeerkennung (lila) und „Positive Cell Detection“ (rot). Scale Bar unten links: 50  $\mu$ m

### 3.4 Methoden der experimentellen Arbeit: Molekularbiologie

#### 3.4.1 RNA-Isolation

TRizol® Reagent ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat. Es bewirkt eine starke Denaturierung von Proteinen und inaktiviert RNAsen. Bei der Lyse erhält TRizol die Integrität der RNA, während andere Störfaktoren wie Zellbestandteile beseitigt werden. RNA wird im Vergleich zu DNA deutlich schneller spontan oder enzymatisch durch RNasen hydrolysiert, welche ubiquitär vorhanden und äußerst stabil sind.<sup>128</sup> Durch die Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation wird die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase separiert. Die RNA verbleibt in der wässrigen Phase und wird mit Isopropanol ausgefällt. Danach wird die RNA in Nuclease freiem Wasser (DEPC-Wasser) gelöst. Im ersten Schritt wurde TRizol zum Gewebe gegeben, um die Zellen anzudauen. Auf 50 mg Plazentagewebe kamen 0,5 ml TRizol. In 2 ml Mikroreaktionsgefäßen, in welche jeweils eine sterile Edelstahlkugel gegeben wurde, wurde das Gewebe bei 30 Hz für 40 s homogenisiert (Schwingmühle MM400, Retsch) und für 5 min bei RT inkubiert. Im zweiten Schritt erfolgte die Zugabe von Chloroform im Verhältnis 100  $\mu$ l Chloroform auf 0,5 ml Trizol, welches für 15 s gemischt und ebenfalls für 2 bis 3 min bei RT inkubiert wurde. Durch die Zugabe von Chloroform und Zentrifugation für 15 min bei 4°C mit 13683 g wurde die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase separiert. Die RNA-haltige obere wässrige Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von Isopropanol im Verhältnis von 250  $\mu$ l auf 0,5 ml TRizol. Nach erneutem Mischen wurde das Gewebe für 20 min bei 4°C auf Eis inkubiert, anschließend für 15 min bei 21379 g und 4°C zentrifugiert. Das Isopropanol oberhalb der entstandenen Pellets wurde abpipettiert und die Reste abgesaugt. Das Pellet wurde zweimal mit 75% Ethanol gewaschen, auf 0,5 ml TRizol kamen 0,5 ml 75% Ethanol zum Waschen. Die Probe wurde erneut für 5 min bei 21379 g und

4°C zentrifugiert, das Ethanol abgesaugt und das Pellet für 30-60 min getrocknet. Im letzten Schritt wurde das Pellet in 20-200 µl DEPC-Wasser gelöst, erneut gemischt und die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

### **3.4.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA**

Die Menge und Reinheit der RNA in den RNA-Proben wurde spektralphotometrisch mit dem NanoQuant infinite M200 Pro und der zugehörigen Software i-control 2.0 gemessen. Die photometrische Analyse basiert auf den Absorptionseigenschaften von Nukleinsäuren und Proteinen: RNA absorbiert UV-Licht mit einem Maximum von 260 nm Wellenlänge (A<sub>260</sub>), bei Proteinen liegt dieses Maximum bei 280 nm (A<sub>280</sub>). Das Photometer misst den Anteil des UV-Lichts, der die Probe durchleuchtet und somit nicht von dieser absorbiert wird. Je mehr UV-Licht die Probe aufnimmt und je weniger Licht sie durchlässt, desto höher ist die RNA-Konzentration. Der Photodetektor registriert demnach weniger UV-Licht und es ergibt sich eine höhere optische Dichte (OD). Die absorbierte Wellenlänge wird in die RNA-Konzentration umgerechnet:

$$1 \text{ OD Unit} = A_{260} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$$

Um zusätzlich die Reinheit der Proben zu bestimmen, wird die optische Dichte der Nukleinsäuren in Relation zur optischen Dichte von Proteinen gesetzt (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>). Hierfür wird ein Quotient von 1,8-2,0 angestrebt. Vor der Messung wurden die RNA-Proben gemischt, sowie die Blankwerte durch Zugabe von 2 µL DEPC-Wasser auf die NanoQuant Platte gemessen. Jeweils 2 µL der RNA-Proben wurden auf die Platte aufgetragen. Ergab sich eine OD >1, wurde die Probe verdünnt und erneut gemessen. Es resultiert ein OD-Minimum von 0,1 und ein Maximum von 1,0. Nach erfolgter Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

### **3.4.3 Herstellung der cDNA (Reverse Transkription)**

Die zuvor aus dem humanen Plazentagewebe isolierten RNA-Proben wurden durch einen Prozess namens „reverse Transkription“ zu cDNA, der komplementären DNA, umgeschrieben. Insgesamt wurde die RNA von 90 humanen Plazentaprobe verwendet. Die mRNA-Templates bestehen ausschließlich aus Exons, besitzen das Startcodon 5'AUG und enden meist mit einem Poly-A Schwanz. Da RNA instabil ist und leicht von omnipräsenten RNasen verdaut wird, muss sie zunächst in eine stabilere einsträngige cDNA umgeschrieben werden. Der 3'Poly-A Schwanz ist eine Sequenz, die ausschließlich aus Adenosin-Nucleotiden besteht, was eine hervorragende Andockstelle für Primer darstellt. Für die Synthese des ersten cDNA-Stranges werden Oligo (dT) Primer verwendet, welche an den Poly-A Schwanz des 3'Endes der mRNA binden. Ihre Sequenz besteht aus 16 Thymidinen, welche komplementär zudem Adenosin-Schwanz sind. Des Weiteren wurden sog. Random Primer, welche aus einer zufälligen Kombination aller vier Basen A, C, G oder T bestehen, verwendet. Sie betragen eine Länge von sechs bis neun Basen, welche an verschiedenen Positionen aller RNAs binden.

Dadurch werden der Reversen Transkriptase möglichst viele Startpunkte ermöglicht. Das Enzym MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Sie verwendet die RNA als Template und produziert deren komplementäre DNA. Die reverse Transkriptase bindet an die Primerregionen und initiiert die Synthese des komplementären DNA-Stranges.

Für jeden Ansatz wurde 1 µg der isolierten RNA verwendet. Die RNA-Proben wurden in Mikroreaktionsgefäßen mit DEPC-Wasser gemischt. Im ersten Schritt der cDNA-Synthese erfolgte ein DNase-Verdau: Jede Probe wurde mit je 1 µL DNase-I-Puffer sowie RNase-free DNase-I versehen, einer Endonuklease, die einzel- und doppelsträngige DNA spaltet. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei RT. Danach wurde die Reaktion mit je 1 µL Stop-Solution abgestoppt. Als Stop-Solution verwendeten wir 25 mM EDTA. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe des Mastermix A. Der Mastermix A beinhaltet Random-Primer mit 0,6 µL pro Probe, Oligo-dT-Primer mit 0,4 µL pro Probe, sowie jeweils 4 µL DEPC-Wasser. Auf jeden Ansatz kamen somit insgesamt 5 µL des Mastermix A. Die Inkubation erfolgte bei 70°C für 5 min, dann wurden die Proben für 1 min auf Eis gelagert. Im dritten Schritt vervollständigt die DNA-Polymerase den cDNA-Strang, indem sie die RNA als Template verwendet und dort die dNTPs anlegt: Der Mastermix B besteht aus der MMLV Reverse Transkriptase (DNA-Polymerase), RNase Inhibitor, MMLV Buffer, DEPC-Wasser und dem dNTP-Mix. Der dNTP-Mix beinhaltet wässrige Lösungen aus den Nucleotiden dATP, dTTP, dCTP und dGTP. Die Reverse Transkriptase nutzt die dNTPs für die Synthese der komplementären DNA aus den mRNA-Templates. Auf jeden Ansatz kamen 10 µL Mastermix B. Es folgte eine Inkubationszeit von 60 min bei 37°C, dann ein Abstoppen der Reaktion auf Eis für 1 min. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert und später für die qPCR zur Amplifizierung verwendet.

#### **3.4.4 Herstellung der Primer**

Die Qualität der qPCR hängt wesentlich von der Wahl und dem Design der Primer ab. Primer bestehen aus kurzen, einzelsträngigen DNA-Fragmenten, die während der reversen Transkription mit einer Zielregion des RNA-Moleküls hybridisieren. Sie dienen als Ausgangspunkt für die DNA-Synthese durch das Enzym Reverse Transkriptase, das RNA in komplementäre DNA (cDNA) umwandelt. Bei der Erstellung müssen einige Parameter beachtet werden: Primer sind typischerweise etwa 18-25 bp lang. Sie bestehen aus einem Vorwärts- und einem Rückwärtsprimer, die beide komplementär zu verschiedenen Regionen des Ziel-RNA-Moleküls sind. Sie flankiert den sog. Bereich von Interesse und ermöglichen es der Reverse Transkriptase, cDNA auf eine sequenzspezifische Weise zu synthetisieren. Des Weiteren sind die Schmelz- und Annealing-Temperatur von großer Bedeutung und der GC-Anteil sollte zwischen 40-60% liegen. Auch die Sekundärstruktur sollte beachtet werden und die Bildung von sog. Hairpins oder Dimerisierungen vermieden werden, damit der Primer nicht an sich selbst oder andere Primer bindet. Dies wird erreicht, indem der Primer keine

Sequenzen mit mehr als vier homologen bp beinhaltet. Die Erstellung der Primer erfolgte in drei Schritten: Um für das Gen von Interesse eine passende Primersequenz zu finden, musste zunächst die geeignete Zielsequenz bekannt sein. Um diese zu ermitteln, verwendeten wir den UCSC Genome Browser, eine interaktive Website für Genomanalysen, geführt von der University of California Santa Cruz.<sup>129</sup> Der Genome Browser ist als Open Source frei zugänglich und erlaubt unter anderem einen Zugriff auf Daten zu verschiedensten genomischen Sequenzen. Das gesuchte Gen wurde in die Suchzeile eingegeben und dessen jeweilige sog. RefSeq (Referenzsequenz) angezeigt. Aus dieser Sequenz wurden passenden Primer mithilfe des Programms Primer Express™ Software (Applied Biosystems™ Version 3.0) erstellt. Um die Spezifität und Qualität der Primer zu prüfen, sollten diese mit Sequenzen der Spezies auf Übereinstimmung abgeglichen werden. Dies ermöglichte das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des NCBI. BLAST ist ein Algorithmus und Programm, mit dem biologische Sequenzinformationen analysiert und verglichen werden können. Auch BLAST ist als Open Source Format frei zugänglich.

### 3.4.5 Effizienztestung der Primer

Die Effizienz der Primer wurde mit einer Standardreihe getestet. Dafür wurden zwei humane Gewebeproben jeweils in Duplikaten verwendet (Plazenta 103 und 105). Sämtliche o.g. Primer wurden in folgenden cDNA-Verdünnungen getestet: Unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000. Im ersten Schritt wurden die Primer, welche eine Ausgangskonzentration von 100 µM hatten, mit HPLC-Wasser 1:10 verdünnt auf 10 µM. Je Primer wurden 10 µL GoTaq qPCR Master Mix mit 7 µL HPLC-Wasser verwendet. Je 1 µL des Forward- und Reverse-Primers wurden hinzugegeben. Auf jedes cDNA-Template von 1 µL kamen 19 µL des SYBR-Master Mix. Bei den Negativkontrollen wurde anstatt der cDNA nukleasefreies Wasser verwendet. Die Platte wurde für 3 min bei 256 g zentrifugiert und anschließend die qPCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt (siehe Tabelle 15).

Zyklen	Temperatur	Dauer	Schritt
1	95°C	2 min	1. Denaturierung
40	95°C	15 s	2. Denaturierung
40	60°C	60 s	Primer Annealing
1	95°C	15 s	Elongation

Tabelle 15: Bedingungen qPCR SYBR® Green

Die Effizienz der Primer wurde im Anschluss wie folgt ermittelt: Die Ct-Werte der Verdünnungsansätze werden gegen die jeweilige DNA-Menge aufgetragen und die Steigung der Regressionsgeraden berechnet. Daraus kann die Effizienz mit folgender Formel berechnet werden:<sup>130</sup>

$$\text{Efficiency (\%)} = (10^{(-1/\text{Slope})} - 1) * 100$$

Eine Primer-Effizienz zwischen 90% und 110% gilt als akzeptabel. Des Weiteren erfolgte eine Analyse der Schmelzkurven für jeden Primer, um dessen Spezifität zu testen. Dies ermöglichte eine Differenzierung zwischen der Amplifikation der gesuchten Sequenz und Artefakten, wie beispielsweise Dimerisierungen.

### **3.4.6 Verdünnung von cDNA und Housekeeping-Gen**

Die reine cDNA eignet sich aufgrund ihrer hohen Konzentration oft nicht für das empfindliche Messverfahren der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (quantitative polymerase chain reaction, qPCR). Zudem wird für eine hohe Konzentration an cDNA auch eine größere Menge von Primern benötigt, welche zu Dimerisierung neigen: Insgesamt würde zu viel Hintergrundsignal entstehen, um ein interpretierbares Ergebnis zu erzeugen. Ein weiterer Vorteil der Verdünnung besteht darin, dass die Handhabung mit größeren Volumina beim Pipettieren deutlich einfacher und somit weniger fehleranfällig ist. Für die Verdünnung der cDNA von 1:5 verwendeten wir DEPC-Wasser. Zudem testeten wir für die bevorstehende qPCR verschiedene Housekeeping-Gene sowohl in der SYBR Green-Methode als auch die Taqman-Methode. Wir entschieden uns für die SYBR Green-Methode. Als Housekeeping-Gene wurden jeweils als Duplikate  $\beta$ -Actin, HPRT und 18S-rRNA getestet. Das beste Ergebnis erhielten wir mit 18S-rRNA, welches wir somit als Housekeeping-Gen festlegten.

### **3.4.7 Real-Time Quantitative PCR (SYBR Green)**

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR, beruht auf der Amplifizierung bestimmter DNA-Sequenzen, wobei nur sehr wenig genetisches Material benötigt wird. Der PCR-Mix besteht aus einem Puffer, einer hitzebeständigen Polymerase, der DNA-Probe sowie deren komplementäre Primer und freien Nucleotiden (dNTPs), welche von der DNA-Polymerase als Bausteine für die Synthese des neuen DNA-Stranges benötigt werden. Die vier Basen Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin sind über eine N-glykosidische Bindung mit einem Zucker namens Desoxyribose verbunden (Nukleosid). Ist an das Zuckermolekül dieser Einheit eine Phosphatgruppe gebunden, so entsteht ein Nukleotid. Der PCR-Mix wird in einen Thermocycler gegeben, in welchem die Reaktion in drei Schritten abläuft. Zuerst erfolgt die Denaturierung bei 96°C: Der DNA-Doppelstrang wird aufgespalten, indem die Wasserstoffbrückenbindungen gebrochen werden. Es entstehen zwei Einzelstränge. Der zweite Schritt ist das Annealing bei 50-65°C, in welchem die Forward- und Reverse-Primer an die jeweiligen 3' Enden der Zielsequenz binden. Der dritte Schritt beinhaltet die Elongation bei 72°C: Die DNA-Polymerase synthetisiert mit den freien Nucleotiden den neuen komplementären DNA-Strang. Die Real-Time PCR, auch bekannt als quantitative Echtzeit-PCR (qPCR), ist eine Technik, die verwendet wird, um die Menge spezifischer DNA- oder RNA-Sequenzen in einer biologischen Probe zu messen und zu quantifizieren. In einer konventionellen PCR wird die gesuchte DNA-Sequenz amplifiziert und in einer Endpunkt-Analyse detektiert, sprich also nach Abschluss der Reaktion. Bei der qPCR jedoch wird die

Akkumulation des Amplifikationsprodukts durch Fluoreszenz-Reporter visualisiert und der Progress der Reaktion nach jedem Zyklus erfasst. Die Vermehrung der DNA-Abschnitte wird somit quantitativ in Echtzeit beobachtet: Mit jedem PCR-Zyklus verdoppelt sich im Optimalfall die Menge des PCR-Produkts, was durch eine Intensivierung des Fluoreszenzsignals mit Hilfe eines spezifischen fluoreszierenden Farbstoffs (SYBR Green), der an doppelsträngige DNA bindet, gemessen werden kann. Die Intensität der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge der DNA in der Probe. Es entsteht die klassische qPCR-Kurve. Sie beginnt mit einer Baseline, in der das Fluoreszenzsignal aufgrund fehlender amplifizierter DNA oder RNA niedrig ist. Mit fortschreitenden Amplifikationszyklen beginnt die exponentielle Phase. Hier steigt das Fluoreszenzsignal schnell an durch die signifikante Amplifikation von DNA oder RNA. In der Plateauphase bleibt das Fluoreszenzsignal stabil oder steigt langsamer an, da die meisten Zielsequenzen amplifiziert wurden und weitere Zyklen das Fluoreszenzsignal nicht signifikant erhöhen. Der sog. „Cycle Threshold (Ct)-Wert“ bezeichnet den Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal einen vordefinierten Schwellenwert („Threshold“) überschreitet. Durch den Vergleich des Ct-Werts mit einer Standardkurve, die aus bekannten Konzentrationen einer Referenzprobe generiert wird, kann eine absolute oder relative Quantifizierung der Zielsequenz bestimmt werden. Je weniger Zyklen benötigt werden, um den Threshold zu erreichen, desto niedriger der Ct-Wert. Ein niedriger Ct-Wert bedeutet somit eine hohe Genexpression und vice versa. Für die qPCR werden hauptsächlich zwei Varianten verwendet: SYBR Green ist ein DNA-Interkalationsfarbstoff, der während der PCR an jede doppelsträngige DNA bindet. TaqMan-Sonden hingegen sind spezifisch für die Ziel-DNA- oder RNA-Sequenz und reduzieren somit das Risiko von falsch positiven Ergebnissen. Wir haben uns für die SYBR Green-Methode entschieden. Für die qPCR verwendeten wir den 7500 Real Time PCR System Thermocycler (Applied Biosystems) mit der zugehörigen Software 7500 Software 2.0.6. Für jede Probe wurde das Housekeeping Gen 18S als Duplikat mitbestimmt, was einerseits der Kontrolle diente und andererseits eine Referenz zu den gemessenen Genen ermöglichte. Insgesamt wurde die cDNA von 90 humanen Gewebeproben als Duplikate gemessen, welche in die drei Untergruppen GDM, Übergewicht/Adipositas und die Kontrollgruppe unterteilt wurden. Jede Gruppe beinhaltete 30 humane Gewebeproben. Die Primer wurden mit HPLC-Wasser von 100 µM auf 10 µM verdünnt und der Promega SYBR-Mix angesetzt. Wir verwendeten 96-Well-Platten. Auf jede Platte kam zusätzlich eine Negativkontrolle aus HPLC-Wasser.

Reagenz	Volumen (µl)
GoTaq qPCR Master Mix	10
HPLC H <sub>2</sub> O	7
Primer for (10 µM)	1
Primer rev (10 µM)	1
<b>Gesamt</b>	<b>19</b>
Template	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

Tabelle 16: Reaktionsvolumen pro Template

Das Volumen pro Well betrug jeweils 20 µl (siehe Tabelle 16): Auf jedes Well kamen zuerst je 1µl cDNA, dann 19µl des Mixes. Die fertig pipettierten Platten wurden mit ClearSeal Folien verschlossen und für 3 min bei 256 g zentrifugiert. Lediglich die Messung der Interleukine erfolgte bei 50 Zyklen statt 40. Um die Daten der qPCR quantitativ auszuwerten, wurden die Ct-Werte des Zielgens mit einer Standardkurve aus bekannten cDNA-Konzentrationen verglichen.

Für eine quantitative Analyse der Genexpression eignete sich die relative Quantifizierung mit der sog.  $\Delta\Delta$  Ct Methode, auch  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode genannt. Hierbei werden die Ct-Werte des Zielgens mit denen des Housekeeping-Gens verglichen und für jede Probe die Differenz, der  $\Delta Ct$  Wert, ermittelt.<sup>131</sup>

$$\Delta Ct (Probe) = Ct (Zielgen) - Ct (Referenzgen)$$

Anschließend wird der  $\Delta\Delta$  Ct Wert ermittelt, indem die  $\Delta Ct$  Werte der experimentellen Proben in Relation zu den Proben der Kontrollgruppe gesetzt und auch hier jeweils die Differenz berechnet wird:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (experimentelle Probe) - \Delta Ct (Kontrolle)$$

Die Berechnung der relativen Unterschiede zwischen der experimentellen Gruppe und der Kontrolle („Ratio“) erfolgt dann mit folgender arithmetischer Formel:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Die 2 bezieht sich auf eine 100%ige Effizienz der qPCR. In diesem Fall verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA-Produktmenge und damit auch das Fluoreszenzsignal. Als Referenzgen diente die 18S-rRNA. Die Auswertung der einzelnen Messungen erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm MS Excel (Microsoft Corporation). Vor der Anwendung der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode wurden mögliche Ausreißer innerhalb der Gruppen mit Hilfe des sog. „Ausreißer-Test nach Grubbs“ identifiziert und aus der Analyse ausgeschlossen.

### 3.5 Statistische Analyse

Für die Auswertung erfuhren wir Unterstützung durch das Institut für medizinische Statistik und Bioinformatik der Universität zu Köln (IMSB).

Für kategoriale Variablen werden Häufigkeitstabellen mit Anzahl und fehlenden Werten berechnet. Metrische Variablen werden in deskriptiven Übersichtstabellen mit Anzahl, fehlenden Werten, Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

Für die statistische Auswertung der klinischen Daten, der Inflammationsmarker im Blut sowie der Immunhistochemie wurde eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, da diese den Vergleich von Mittelwerten bei mehr als zwei Gruppen ermöglicht. Die ANOVA testet, ob ein signifikanter Unterschied der abhängigen Variable zwischen den verschiedenen Gruppen auftritt, und zwar bei angenommener Nullhypothese ( $H_0$  = Es gibt keinen Unterschied bei mindestens zwei der verglichenen Gruppen). Wir verwendeten für beide Methoden den Post-Hoc-Test nach Bonferroni, welcher durch paarweise Vergleiche testet, ob Mittelwerte zwischen jeweils zwei Gruppen statistisch signifikante Unterschiede aufwiesen. Für die statistischen Vergleiche wurden p-Werte kleiner als 0,05 als statistisch signifikant erachtet (d.h.  $\alpha=5\%$ ). Der Post-Hoc-Test nach Bonferroni korrigiert implizit das Signifikanzniveau für multiple Vergleiche. Für die ANOVAs werden folgende Metriken ausgegeben: Das korrigierte  $R^2$ , die F-Statistik, und der p-Wert des Modells. Das korrigierte  $R^2$  ist eine angepasste Version des  $R^2$ -Werts, der angibt, wie gut die unabhängigen Variablen die Varianz der abhängigen Variable erklären. Während das normale  $R^2$  den Anteil der erklärten Varianz angibt, berücksichtigt das korrigierte  $R^2$  die Anzahl der Prädiktoren (unabhängigen Variablen) im Modell und die Stichprobengröße. Dies verhindert eine Überbewertung des Modells, wenn mehr Variablen hinzugefügt werden. Ein höheres korrigiertes  $R^2$  bedeutet, dass das Modell die Daten besser erklärt, während ein niedrigerer Wert darauf hindeutet, dass zusätzliche Prädiktoren keinen wesentlichen Beitrag zur Erklärung der Varianz leisten.

Die F-Statistik in der ANOVA zeigt an, ob die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen signifikant unterschiedlich sind, was auf einen signifikanten Effekt der unabhängigen Variablen hinweist. Es ist möglich, dass ein Gesamtmodell in der ANOVA signifikant ist, während einzelne Paarvergleiche im Post-Hoc-Test nach Bonferroni-Korrektur nicht signifikant sind. Dies liegt daran, dass die Bonferroni-Korrektur die p-Werte anpasst, um die Wahrscheinlichkeit von Fehlinterpretationen (Typ-I-Fehler) bei mehrfachen Vergleichen zu reduzieren, wodurch strengere Kriterien für die Signifikanz angewendet werden.

Für die Auswertung der Genexpression in der qPCR verwendeten wir den t-Test für unverbundene Stichproben und verglichen die Mittelwerte der Kontrolle vs. die der Vergleichsgruppe. Die Mittelwerte sind die Durchschnitte der relativen Abweichung der relativen Genexpression vom Targetgen anhand der Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Die Mittelwerte der Kontrolle sind per definitionem = 1, da sich die relativen Abweichungen vom Mittelwert durchschnittlich zu 0 berechnen müssen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Stichprobe und Demografie

Von den ursprünglich 225 Patientinnen in der humanen Plazentakohorte wurden für die Analyse insgesamt 222 (89,88%) Patientinnen eingeschlossen. Ausschlussgründe sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Grund	n	Verbleibende Fälle
Kein BMI vorhanden	4 (1,62%)	243
BMI<18,5 (Untergewicht)	4 (1,62%)	239
Keine Info über GDM	1 (0,40%)	238
BMI < 25 + GDM	16 (6,48%)	<b>222</b>

Tabelle 17: Ausschlussgründe aus der Analyse

Für die Analyse sämtlicher Daten wurde die humane Plazentakohorte in drei Gruppen unterteilt (siehe *Tabelle 11*). Die Verteilung der Patientinnen auf die Gruppen sowie die n-Zahl und die Anteile (%) sind in Tabelle 18 gelistet.

Gruppe	Bezeichnung	n (%)
1	KG	88 (39,64%)
2	UGAD	73 (32,88%)
3	UGAD + GDM	61 (27,48%)
<b>Gesamt</b>		<b>222 (100%)</b>

Tabelle 18: Gruppenbezeichnungen und -größe

Von den 222 Studienteilnehmerinnen erfüllten n=61 (27,48%) die Kriterien für einen GDM. Insgesamt 134 Patientinnen (n=73 UGAD + n=61 UGAD+GDM; 60,36%) wiesen Übergewicht und/oder Adipositas auf.

Das durchschnittliche Alter der Patientinnen lag in allen Gruppen zwischen 33 und 34 Jahren, und der Mittelwert der gesamten Stichprobe bei 33,40 ( $\pm$  5,01) Jahren. Ebenso war die Stichprobe hinsichtlich der Körpergröße homogen (MW der gesamten Stichprobe 1,66m  $\pm$  0,06m). Hinsichtlich des Gewichts wies die Gruppe UGAD+GDM den höchsten durchschnittlichen Wert auf (MW: 92,10  $\pm$  19,19kg), gefolgt von der Gruppe UGAD (MW: 81,68  $\pm$  12,27kg) und der Kontrollgruppe (MW: 61,05  $\pm$  6,77kg). Damit einhergehend fiel auch das Geburtsgewicht in den Gruppen der UGAD und UGAD+GDM höher aus als in der KG, wobei sich die Länge der Neugeborenen kaum unterschied (siehe Tabelle 19). Homogene Werte zwischen den Gruppen zeigten sich ferner hinsichtlich der SSW bei Entbindung, dem Kopfumfang und dem pH des Bluts der Nabelarterie. Numerische Differenzen ließen sich beim

systolischen und diastolischen RR in der Erstdokumentation feststellen, sowie auch bei der letzten Dokumentation vor Sectio. Die inferenzielle Überprüfung dieser deskriptiven Differenzen auf statistische Signifikanz erfolgt im anschließenden Kapitel.

Variable	Anzahl	Gruppe			Gesamt
		UGAD	UGAD+GDM	KG	
		<b>73</b>	<b>61</b>	<b>88</b>	<b>222</b>
<b>Alter (Jahren)</b>	Fehlend	0	0	0	0
	MW	33,53	33,61	33,14	33,40
	SD	4,99	4,76	5,25	5,01
<b>Größe (m)</b>	Fehlend	0	0	0	0
	MW	1,65	1,65	1,67	1,66
	SD	0,06	0,06	0,07	0,06
<b>Gewicht in kg (bei Erstdokumentation)</b>	Fehlend	0	0	0	0
	MW	81,68	92,10	61,05	76,37
	SD	12,27	19,19	6,77	18,39
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>) v or SS</b>	Fehlend	0	0	0	0
	MW	29,82	33,88	21,93	27,81
	SD	3,99	6,24	1,74	6,50
<b>Systolischer RR (Erstdokumentation)</b>	Fehlend	2	0	1	3
	MW	114,59	119,52	113,61	115,58
	SD	12,02	14,12	10,84	12,40
<b>Diastolischer RR (Erstdokumentation)</b>	Fehlend	2	0	2	4
	MW	73,15	73,70	70,20	72,14
	SD	9,09	11,26	8,16	9,50
<b>Systolischer RR (letzte Dokumentation v or Sectio)</b>	Fehlend	1	1	1	3
	MW	120,06	120,15	115,68	118,34
	SD	12,42	12,05	13,87	13,04
<b>Diastolischer RR (letzte Dokumentation v or Sectio)</b>	Fehlend	1	1	1	3
	MW	73,39	74,82	70,95	72,81
	SD	9,67	10,13	10,44	10,19
<b>SSW bei Entbindung</b>	Fehlend	0	0	0	0
	MW	39,16	39,13	39,08	39,12
	SD	0,79	0,65	0,81	0,76
<b>Geburtsgewicht (g)</b>	Fehlend	0	0	0	0
	MW	3435,27	3642,64	3290,38	3434,82
	SD	581,16	476,01	469,55	527,80
<b>Geburtsgewicht in Perzentilen</b>	Fehlend	0	0	1	1
	MW	50,08	62,87	41,24	50,13
	SD	31,41	27,71	28,73	30,52
<b>Geburtslänge (cm)</b>	Fehlend	0	0	0	0
	MW	51,92	52,77	51,47	51,98
	SD	3,05	2,64	2,43	2,75
<b>Kopfumfang (cm)</b>	Fehlend	0	0	0	0
	MW	35,32	35,86	35,05	35,36
	SD	1,41	1,45	1,31	1,42
<b>Nabelarterie pH</b>	Fehlend	2	1	4	7
	MW	7,33	7,31	7,33	7,32
	SD	0,04	0,04	0,04	0,04
<b>Plazentagewicht (g)</b>	Fehlend	2	0	1	3
	MW	679,28	703,31	653,13	675,59
	SD	163,48	144,29	139,04	149,53

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Tabelle 19: Deskriptive Analyse ausgewählter Variablen zur Plazentakohorte.

MW= Mittelwert, SD = Standardabweichung.

## 4.2 Klinische Daten

### 4.2.1 Geburtsgewicht

Hinsichtlich des Geburtsgewichts zeigten sich bereits in der deskriptiven Analyse numerische Unterschiede von bis zu ca. 350g zwischen den Gruppen UGAD+GDM und KG. Der Mittelwert der Neugeborenen in der Gruppe UGAD lag mit 3.435g ( $\pm 581$ g) zwischen denen der Gruppen UGAD+GDM und KG (siehe Tabelle 20).

	Anzahl	Fehlend	Mittelwert	Std.- Abw eichung	Minimum	Maximum
Geburtsgewicht in g						
KG	88	0	3.290,38	469,55	2.310	4.620
UGAD+GDM	61	0	3.642,64	476,01	2.000	4.760
UGAD	73	0	3.435,27	581,16	2.100	5.275
Gesamt	222	0	3.434,82	527,80	2.000	5.275

Tabelle 20: Deskriptive Statistik - Geburtsgewicht in g

Bei der Analyse der Unterschiede zwischen den Gruppen mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und anschließender Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni zeigt sich ein signifikantes Gesamtmodell ( $F=8,57$ ;  $p<0,01$ ) bei einem korrigiertem  $R^2=0,06$ . Die Unterschiede des Geburtsgewichts zwischen Patientinnen der Kontrollgruppe und der Gruppe UGAD+GDM waren basierend auf der ANOVA signifikant: Bei letzterer fiel das Geburtsgewicht um 352g statistisch signifikant höher aus ( $p<0,01$ ) als in der KG. Weitere signifikante Unterschied ließen sich nicht identifizieren, obgleich das Gewicht der Neugeborenen einen Unterschied von rund 200g zwischen den Gruppen UGAD+GDM und UGAD ausmachte ( $p=0,06$ , siehe Tabelle 21).

Post-Hoc Analyse nach Bonferroni		Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.- Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
(I) Gruppe	vs. (J)				Untergrenze	Obergrenze
UGAD	UGAD+GDM	-207,37	88,57	0,06	-421,05	6,32
	KG	144,9	80,83	0,22	-50,11	339,91
UGAD+GDM	UGAD	207,37	88,57	0,06	-6,32	421,05
	KG	352,26*	85,07	<0,01	147,04	557,49
KG	UGAD	-144,9	80,83	0,22	-339,91	50,11
	UGAD+GDM	-352,26*	85,07	<0,01	-557,49	-147,04

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 260706,252.

\*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

Tabelle 21: ANOVA + Bonferroni - Geburtsgewicht in g

#### 4.2.2 Systolischer Blutdruck vor Sectio

Der systolische Blutdruck bei der letzten Messung vor Sectio lag mit durchschnittlich 120,15mmHg in der Gruppe UGAD+GDM und 120,06mmHg in der Gruppe UGAD höher als in der Kontrollgruppe mit 115,68mmHg. Die Standardabweichungen fielen in allen drei Gruppen mit Werten zwischen 12,05 und 13,87 mmHg ähnlich aus, was für eine gleichstarke Streuung des Parameters in den drei Gruppen spricht (siehe Tabelle 22).

	Anzahl	Fehlend	Mittelwert	Std.- Abweichung	Minimum	Maximum
Systolischer RR (letzte Dokumentation vor Sectio)						
KG	88	1	115,68	13,87	90	142
UGAD+GDM	61	1	120,15	12,05	85	147
UGAD	73	1	120,06	12,42	90	150
Gesamt	222	3	118,34	13,04	85	150

Tabelle 22: Deskriptive Statistik - Systolischer Blutdruck in mmHg bei letzter Dokumentation vor Sectio

Die anschließend durchgeführte ANOVA ( $F=3,01$ ,  $p=0,05$ , korrigiertes  $R^2=0,02$ ) konnte keine signifikanten Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen identifizieren. Die p-Werte für die Differenzen zwischen UGAD und KG von 4,38mmHg sowie zwischen der Gruppe UGAD+GDM und KG von 4,47 fielen beide Male nicht statistisch signifikant aus ( $p=0,12$  bzw.  $p=0,10$ ; siehe *Tabelle 23*).

Post-Hoc Analyse nach Bonferroni		Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.- Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
(I) Gruppe	vs. (J)				Untergrenze	Obergrenze
UGAD	UGAD+GDM	-0,09	2,26	1,00	-5,54	5,35
	KG	4,38	2,06	0,10	-0,59	9,34
UGAD+GDM	UGAD	0,09	2,26	1,00	-5,35	5,54
	KG	4,47	2,17	0,12	-0,76	9,70
KG	UGAD	-4,38	2,06	0,10	-9,34	0,59
	UGAD+GDM	-4,47	2,17	0,12	-9,70	0,76

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 166,928.

\*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

Tabelle 23: ANOVA+Bonferroni - Systolischer Blutdruck in mmHg bei letzter Dokumentation vor Sectio

### 4.2.3 Diastolischer Blutdruck vor Sectio

Ein ähnliches Bild zeichnete sich hinsichtlich des diastolischen Blutdrucks bei der letzten Messung vor Sectio: Abermals lagen die Werte in der Kontrollgruppe niedriger als in den beiden Gruppen UGAD+GDM und UGAD (siehe Tabelle 24).

	Anzahl	Fehlend	Mittelwert	Std.- Abweichung	Minimum	Maximum
Diastolischer RR (letzte Dokumentation vor Sectio)						
KG	88	1	70,95	10,44	56	97
UGAD+GDM	61	1	74,82	10,13	55	102
UGAD	73	1	73,39	9,67	55	102
Gesamt	222	3	72,81	10,19	55	102

Tabelle 24: Deskriptive Statistik - Diastolischer Blutdruck in mmHg bei letzter Dokumentation vor Sectio

Um die Unterschiede zwischen den Gruppen auf statistische Signifikanz zu analysieren, wurde wieder eine ANOVA durchgeführt ( $F=2,76$ ,  $p=0,06$ , korrigiertes  $R^2=0,02$ ). Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei untersuchten Gruppen feststellen (siehe Tabelle 25). Die p-Werte für die Vergleiche zwischen UGAD+GDM und UGAD ( $p=1,00$ ), UGAD+GDM und KG ( $p=0,07$ ) und UGAD und KG ( $p=0,40$ ) fielen alle nicht unter die Bonferroni-korrigierte Signifikanzgrenze von 5%.

Post-Hoc Analyse nach Bonferroni		Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.- Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
(I) Gruppe	vs. (J)				Untergrenze	Obergrenze
UGAD	UGAD+GDM	-1,43	1,77	1,00	-5,69	2,84
	KG	2,43	1,61	0,40	-1,45	6,32
UGAD+GDM	UGAD	1,43	1,77	1,00	-2,84	5,69
	KG	3,86	1,70	0,07	-0,23	7,96
KG	UGAD	-2,43	1,61	0,40	-6,32	1,45
	UGAD+GDM	-3,86	1,70	0,07	-7,96	0,23

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 102,213.

\*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

Tabelle 25: ANOVA+Bonferroni - Diastolischer Blutdruck in mmHg bei letzter Dokumentation vor Sectio

### 4.2.4 Geburtslänge

Die Länge der Neugeborenen lag für die gesamte Population bei einem durchschnittlichen Wert von 51,98cm ( $\pm 2,75$ cm). Betrachtet man die Werte nach Gruppen, so lagen alle Werte

nah beieinander und wiesen Abweichungen von nicht mehr als 2 cm auf. Die Standardabweichungen betrug maximal 3,05cm, und zwar in der Gruppe UGAD, wie in Tabelle 26 dargestellt.

	Anzahl	Fehlend	Mittelwert	Std.- Abweichung	Minimum	Maximum
Geburtslänge (cm)						
KG	88	0	51,47	2,43	45	57
UGAD+GDM	61	0	52,77	2,64	46	58
UGAD	73	0	51,92	3,05	45	62
Gesamt	222	0	51,98	2,75	45	62

Tabelle 26: Deskriptive Statistik Geburtslänge (cm)

Das anschließend berechnete Modell der ANOVA ( $F=4,19$ ,  $p=0,02$ , korrigiertes  $R^2=0,03$ ) zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen UGAD+GDM und KG auf, wobei die Größe der Neugeborenen in der Kontrollgruppe um 1,30 cm geringer ausfiel als in der Experimentalgruppe ( $p=0,01$ ). Weitere signifikante Differenzen ließen sich nicht feststellen (siehe Tabelle 27).

Post-Hoc Analyse nach Bonferroni							
(I) Gruppe	vs. (J)	Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.- Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall		
					Untergrenze	Obergrenze	
UGAD	UGAD+GDM	-0,85	0,47	0,21	-1,99	0,28	
	KG	0,45	0,43	0,89	-0,59	1,48	
UGAD+GDM	UGAD	0,85	0,47	0,21	-0,28	1,99	
	KG	1,30*	0,45	0,01	0,21	2,39	
KG	UGAD	-0,45	0,43	0,89	-1,48	0,59	
	UGAD+GDM	-1,30*	0,45	0,01	-2,39	-0,21	

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 7,326.

\*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

Tabelle 27: ANOVA+Bonferroni - Geburtslänge (cm)

#### 4.2.5 pH-Wert im Blut der Nabelarterie

Die deskriptive Analyse der Nabelarterie zeigte, dass es kaum Abweichungen zwischen den Gruppen gab. Der durchschnittliche pH-Wert für die gesamte Stichprobe lag bei 7,32 ( $\pm 0,04$ ; siehe Tabelle 28).

	Anzahl	Fehlend	Mittelwert	Std.- Abweichung	Minimum	Maximum
Nabelarterie pH						
KG	88	4	7,33	0,04	7,18	7,43
UGAD+GDM	61	1	7,31	0,04	7,16	7,41
UGAD	73	2	7,33	0,04	7,22	7,43
Gesamt	222	7	7,32	0,04	7,16	7,43

Tabelle 28: Deskriptive Statistik Nabelarterie (pH)

Die ANOVA zeigte ein korrigiertes  $R^2=0,04$  ( $F=5,91$ ,  $p<0,01$ ) und somit ein statistisch signifikantes Modell. Die Unterschiede zwischen der Gruppe UGAD+GDM im Vergleich mit den anderen beiden Gruppen UGAD ( $p=0,02$ ) und KG ( $p=0,01$ ) wiesen statistische Signifikanz auf (siehe Tabelle 29). Im Abschnitt Diskussion wird auf diese Bedeutung und den Unterschied von statistischer Signifikanz zu klinischer Relevanz eingegangen.

Post-Hoc Analyse nach Bonferroni		Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.- Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
(I) Gruppe	vs. (J)				Untergrenze	Obergrenze
UGAD	UGAD+GDM	,02*	0,01	0,02	0,01	0,04
	KG	-0,01	0,01	1	-0,01	0,01
UGAD+GDM	UGAD	-,02*	0,01	0,02	-0,04	-0,01
	KG	-,02*	0,01	0,01	-0,04	-0,01
KG	UGAD	0,01	0,01	1	-0,01	0,01
	UGAD+GDM	,02*	0,01	0,01	0,01	0,04

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = ,002.

\*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

Tabelle 29: ANOVA+Bonferroni - Nabelarterie (pH)

#### 4.2.6 Plazentagewicht

Das Gewicht der Plazenta lag mit 703,31g ( $\pm$  144,29g) am höchsten in der Gruppe UGAD+GDM, gefolgt von einem mittleren Wert von 679,28g ( $\pm$  163,48g) in der Gruppe UGAD. Mit durchschnittlich 653,13g ( $\pm$  139,04g) war das Gewicht der Plazenta am niedrigsten in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 30).

	Anzahl	Fehlend	Mittelwert	Std.- Abweichung	Minimum	Maximum
Plazentagewicht in g						
KG	88	1	653,13	139,04	425	1.228
UGAD+GDM	61	0	703,31	144,29	303	1.024
UGAD	73	2	679,28	163,48	331	1.094
Gesamt	222	3	675,59	149,53	303	1.228

Tabelle 30: Deskriptive Statistik Plazentagewicht (g)

Die ANOVA ( $F=2,07$ ,  $p=0,13$ , korrigiertes  $R^2=0,01$ ) konnte keine signifikanten Gruppenunterschiede feststellen. Auch die Differenz von rund 50 g zwischen UGAD+GDM und der KG wies mit einem p-Wert von 0,13 keine statistische Signifikanz auf, wie in Tabelle 31 dargestellt.

#### Post-Hoc Analyse nach Bonferroni

(I) Gruppe	vs. (J)	Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.- Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
UGAD	UGAD+GDM	-24,03	25,98	1,00	-86,71	38,65
	KG	26,15	23,80	0,82	-31,27	83,57
UGAD+GDM	UGAD	24,03	25,98	1,00	-38,65	86,71
	KG	50,18	24,85	0,13	-9,78	110,14
KG	UGAD	-26,15	23,80	0,82	-83,57	31,27
	UGAD+GDM	-50,18	24,85	0,13	-110,14	9,78

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 22141,536.

\*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

Tabelle 31: ANOVA+Bonferroni - Plazentagewicht (g)

#### 4.3 Inflammationsmarker im fetalen und maternalen Blut

Im Kapitel folgen die Analysen für die erhobenen Inflammationsmarker im maternalen und fetalen Blut. Das C-reaktive Protein (CRP) wurde sowohl im fetalen als auch im maternalen Blut bestimmt, befand sich jedoch in den fetalen Proben bei sämtlichen Messungen unterhalb

der Nachweisgrenze von <0,6 mg/l und wurde daher nicht ausgewertet. Die Leukozyten-Anzahl im fetalen Blut wurde nicht bestimmt. Daher werden CRP und Leukozyten nur maternal ausgewertet, und IL-6 und IL-8 hingegen sowohl maternal als auch fetal analysiert.

#### 4.3.1 CRP maternal (mg/l)

Die Werte für CRP wurden nur bei einem Teil der Grundgesamtheit im maternalen Blut erhoben (siehe Tabelle 32). Die Mittelwerte lagen bei 4,00 mg/l ( $\pm 3,83$  mg/l) in der KG, 3,38 mg/l ( $\pm 3,05$ mg/l) in der Gruppe UGAD+GDM und bei 10,91 mg/l ( $\pm 19,19$  mg/l) in der Gruppe UGAD.

	Anzahl	Mittelwert	Standard-abweichung	Minimum	Maximum
CRP in mg/l					
KG	8	4,00	3,83	1,2	12,5
UGAD+GDM	6	3,38	3,05	0,6	9,2
UGAD	7	10,91	19,91	0	55,6

Tabelle 32: Deskriptive Statistik CRP (mg/l) maternal

Bei der ANOVA (siehe Tabelle 33) war das Gesamtmodell mit einem korrigiertem  $R^2 = -0,01$  bei einem Wert der F-Statistik von 0,86 ( $p = 0,44$ ) nicht statistisch signifikant. Dieser Analyse lagen insgesamt  $n = 21$  Patientinnen zu Grunde. Es zeigten sich keine Differenzen der Mittelwerte beim Post-Hoc-Vergleich zwischen den einzelnen drei Gruppen. Der CRP-Wert der KG lag um 0,62mg/l niedriger in als in der Gruppe UGAD+GDM. In der Gruppe UGAD betrug die Differenz auf die Kontrollgruppe +7,50 mg/l, was jedoch nach Bonferroni-Korrektur keine statistische Signifikanz aufzeigte ( $p = 0,80$ ).

Post-Hoc Analyse nach Bonferroni		Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.-Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
(I) Gruppe	vs. (J)				Untergrenze	Obergrenze
KG	UGAD	-6,91	6,13	0,82	-23,1	9,27
	UGAD+GDM	0,61	6,40	1	-16,27	17,51
UGAD	KG	6,91	6,103	0,82	-9,27	23,1
	UGAD+GDM	7,50	6,59	0,80	-9,87	24,93
UGAD+GDM	KG	-0,61	6,40	1	-17,51	16,28
	UGAD	-7,50	6,59	0,80	-24,93	9,87

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 140,46

\*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

Tabelle 33: ANOVA+Bonferroni - CRP (mg/l) im maternalen Blut

### 4.3.2 Leukozytenzahl maternal (x 10<sup>9</sup>/l)

Die Anzahl der Leukozyten im maternalen Blut konnte insgesamt bei 194 von 222 Patientinnen erhoben werden. Die meisten Beobachtungen lagen in der Kontrollgruppe vor (siehe Tabelle 34). Die Mittelwerte variierten von 9,36 x 10<sup>9</sup>/l (± 2,22) in der Kontrollgruppe bis hin zu 10,01 x 10<sup>9</sup>/l (± 2,03) in der Gruppe UGAD+GDM.

	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum
Leukozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)					
KG	76	9,36	2,22	5,02	15,81
UGAD+GDM	56	10,01	2,03	5,2	16,39
UGAD	62	9,97	2,37	5,73	16,55

Tabelle 34: Deskriptive Statistik Leukozyten maternal

Bei der Leukozytenzahl zeigte sich lediglich geringe Differenzen zwischen den Mittelwerten aller drei Gruppen. Die ANOVA (F=1,59, p=0,19, korrigiertes R<sup>2</sup>=0,01) zeigte weder im Gesamtmodell noch in den Zwischengruppenvergleichen der Post-hoc-Analyse signifikante Differenzen zwischen den Gruppen (siehe Tabelle 35).

Post-Hoc Analyse nach Bonferroni					95% Konfidenzintervall	
(I) Gruppe	vs. (J)	Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.- Fehler	Sig.	Untergrenze	Obergrenze
KG	UGAD	-0,61	0,38	0,32	-1,53	0,3
	UGAD+GDM	-0,65	0,39	0,29	-1,59	0,29
UGAD	KG	0,61	0,38	0,32	-0,3	1,53
	UGAD+GDM	-0,04	0,41	1,00	-1,03	0,95
UGAD+GDM	KG	0,65	0,39	0,29	-0,29	1,59
	UGAD	0,04	0,41	1,00	-0,95	1,03

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 4,91.

\*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

Tabelle 35: ANOVA+Bonferroni - Leukozytenzahl im maternalen Blut

### 4.3.3 IL-6 maternal (pg/ml)

Die IL-6-Mittelwerte im maternalen Blut variierten leicht zwischen den Gruppen, wobei die UGAD+GDM-Gruppe den höchsten Mittelwert von 4,59 aufwies, während die Kontrollgruppe und die UGAD-Gruppe ähnliche Mittelwerte von 3,64 bzw. 3,92 hatten; die Standardabweichungen zeigten eine größere Streuung der Werte in der Kontrollgruppe und UGAD-Gruppe im Vergleich zur UGAD+GDM-Gruppe (siehe Tabelle 36).

	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum
IL-6 (pg/ml)					
KG	22	3,64	4,40	0	22
UGAD+GDM	17	4,59	2,79	0	12
UGAD	24	3,92	3,76	0	20

Tabelle 36: Deskriptive Statistik IL6- maternal

Die ANOVA ( $F=0,31$ ,  $p=0,73$ , korrigiertes  $R^2=-0,02$ ) mit anschließender Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni zeigte, dass die Mittelwertdifferenzen der IL-6-Werte zwischen keiner der drei Gruppen signifikant waren (siehe Tabelle 37). Die Mittelwertdifferenzen und die zugehörigen Standardfehler weisen ebenfalls darauf hin, dass die Unterschiede zwischen den Gruppen gering waren (siehe Tabelle 37).

Post-Hoc Analyse nach Bonferroni					95% Konfidenzintervall	
(I) Gruppe	vs. (J)	Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.- Fehler	Sig.	Untergrenze	Obergrenze
KG	UGAD	-0,28	1,12	1	-3,03	2,47
	UGAD+GDM	-0,95	1,22	1	-3,96	2,05
UGAD	KG	0,28	1,12	1	-2,47	3,03
	UGAD+GDM	-0,67	1,20	1	-3,62	2,28
UGAD+GDM	KG	0,95	1,22	1	-2,05	3,96
	UGAD+GDM	0,67	1,20	1	-2,28	3,62

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 14,28.

\*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

Tabelle 37: ANOVA+Bonferroni - IL-6 im maternalen Blut

#### 4.3.4 IL-8 maternal (pg/ml)

Tabelle 38 zeigt die deskriptiven Statistiken für die maternalen IL-8 Werte. Die Kontrollgruppe ( $n=15$ ) hatte einen Mittelwert von 13,33 ( $\pm 24,4$ ), die UGAD+GDM-Gruppe ( $n=25$ ) einen Mittelwert von 9,44 ( $\pm 14,25$ ) und die UGAD-Gruppe ( $n=21$ ) lag mit einem Mittelwert von 11,43 ( $\pm 15,77$ ) dazwischen. Alle Gruppe hatten ein Minimum von 0, wobei die Kontrollgruppe das höchste Maximum von 90 aufwies, gefolgt von der UGAD+GDM-Gruppe mit 64 und der UGAD-Gruppe mit 62.

	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum
IL-8 (pg/ml)					
KG	15	13,33	24,4	0	90
UGAD+GDM	25	9,44	14,25	0	64
UGAD	21	11,43	15,77	0	62

Tabelle 38: Deskriptive Statistik IL-8 maternal

Auch die ANOVA ( $F=0,23$ ,  $p=0,79$ , korrigiertes  $R^2=-0,26$ , siehe Tabelle 39) zu IL-8 wies keine statistisch signifikanten Resultate des Gesamtmodells sowie der Post-Hoc-Tests auf. Zwischen der Kontrollgruppe und der UGAD-Gruppe ergab sich eine Mittelwertdifferenz von 1,90 ( $\pm 5,99$ ), während der Unterschied zur UGAD+GDM-Gruppe 3,89 ( $\pm 5,78$ ) betrug. Der Vergleich zwischen der UGAD- und der UGAD+GDM-Gruppe wies eine Differenz von 1,99 ( $\pm 5,24$ ) auf. Im Vergleich zu IL-6 war die Differenz zwischen der KG und den beiden Experimentalgruppen bei diesem Mediator positiv, d.h. es lagen höhere Werte für IL-8 in der KG vor. Der gesamte Effekt war im Vergleich zu IL-6 exakt umgekehrt, d.h. bei IL-8 lagen die niedrigsten Werte bei der Gruppe UGAD, gefolgt von UGAD+GDM und der KG.

Post-Hoc Analyse nach Bonferroni					95% Konfidenzintervall	
(I) Gruppe	vs. (J)	Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.- Fehler	Sig.	Untergrenze	Obergrenze
KG	UGAD	1,90	5,99	1	-12,85	16,66
	UGAD+GDM	3,89	5,78	1	-10,36	18,15
UGAD	KG	-1,90	5,99	1	-16,66	12,85
	UGAD+GDM	1,99	5,24	1	-10,93	14,91
UGAD+GDM	KG	-3,89	5,78	1	-18,15	10,36
	UGAD	-1,99	5,24	1	-14,91	10,93

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 313,49.

\*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

Tabelle 39: ANOVA+Bonferroni - IL-8 im maternalen Blut

#### 4.3.5 IL-6 fetal (pg/ml)

Die Tabelle 40 zeigt die deskriptiven Statistiken für die IL-6-Werte im fetalen Blut. Die Kontrollgruppe ( $n=36$ ) wies einen Mittelwert von 4,64 ( $\pm 4,06$ ) auf, während die UGAD-GDM-Gruppe ( $n=22$ ) denselben Mittelwert von 4,64 ( $\pm 5,09$ ) hatte. Die UGAD-Gruppe ( $n=31$ ) verzeichnete einen Mittelwert von 4,24 ( $\pm 3,85$ ). In allen Gruppen lag der Minimumwert bei 0, wobei die Maximalwerte zwischen 16 pg/ml und 18 pg/ml variierten.

	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum
IL-6 (pg/ml)					
KG	36	4,64	4,06	0	18
UGAD+GDM	22	4,64	5,09	0	18
UGAD	31	4,24	3,85	0	16

Tabelle 40: Deskriptive Statistik IL-6 fetal

Die ANOVA-Analyse selbst ergab einen F-Wert von 0,09 und einen p-Wert von 0,92 (korrigiertes  $R^2 = -0,02$ ), was bedeutet, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden waren. Die Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni (siehe Tabelle 41) zeigte, dass die Mittelwertdifferenzen der IL-6-Werte im fetalen Blut zwischen den drei Gruppen nicht signifikant waren, da alle p-Werte gleich 1 waren. Zwischen der Kontrollgruppe und der UGAD-Gruppe ergab sich eine Mittelwertdifferenz von 0,40 ( $\pm 1,05$ ), während der Unterschied zur UGAD+GDM-Gruppe 0,00 ( $\pm 1,16$ ) betrug. Der Vergleich zwischen der UGAD- und der UGAD+GDM-Gruppe wies eine Differenz von -0,39 ( $\pm 1,19$ ) auf. Die Konfidenzintervalle aller Vergleiche umfassten die Null, was darauf hinwies, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt wurden. Der Fehlerterm, berechnet als Mittel der Quadrate (Fehler) mit einem Wert von 18,26, unterstützte diese Ergebnisse.

Post-Hoc Analyse nach Bonferroni		Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.- Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
(I) Gruppe	vs. (J)				Untergrenze	Obergrenze
KG	UGAD	0,40	1,05	1,00	-2,16	2,95
	UGAD+GDM	0,00	1,16	1,00	-2,82	2,82
UGAD	KG	-0,40	1,05	1,00	-2,95	2,16
	UGAD+GDM	-0,39	1,19	1,00	-3,30	2,51
UGAD+GDM	KG	0,00	1,16	1,00	-2,82	2,82
	UGAD	0,39	1,19	1,00	-2,51	3,30

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 18,26.

\*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

Tabelle 41: ANOVA+Bonferroni - IL-6 im fetalen Blut

#### 4.3.6 IL-8 fetal (pg/ml)

In Tabelle 42 sind die deskriptiven Werte für IL-8-Werte im fetalen Blut abgebildet. Die Kontrollgruppe (n=22) wies einen Mittelwert von 7,86 ( $\pm 9,22$ ) auf, während die UGAD-GDM-Gruppe (n=27) einen Mittelwert von 7,63 ( $\pm 8,74$ ) hatte. Die UGAD-Gruppe (n=24)

verzeichnete einen Mittelwert von 8,38 ( $\pm 10,85$ ). In allen Gruppen lag der Minimumwert bei 0, wobei die Maximalwerte zwischen 35 und 44 variierten.

	Anzahl	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Maximum
IL-8 (pg/ml)					
KG	22	7,86	9,22	0	44
UGAD+GDM	27	7,63	8,74	0	43
UGAD	24	8,38	10,85	0	35

Tabelle 42: Deskriptive Statistik IL-8 fetal

Die ANOVA-Analyse selbst ergab einen F-Wert von 0,04 und einen p-Wert von 0,96 (korrigiertes  $R^2 = -0,02$ ), was darauf hinwies, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden waren. Die Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni zeigte, dass die Mittelwertdifferenzen der IL-8-Werte im fetalen Blut zwischen den Gruppen nicht signifikant waren. Die Mittelwertdifferenz zwischen der Kontrollgruppe und der UGAD-Gruppe lag bei -0,51 ( $\pm 2,84$ ), während der Unterschied zur UGAD+GDM-Gruppe 0,23 ( $\pm 2,76$ ) betrug. Der Vergleich zwischen der UGAD- und der UGAD+GDM-Gruppe ergab eine Differenz von 0,75 ( $\pm 2,70$ ). Die Konfidenzintervalle aller Vergleiche umfassten die Null, was bestätigt, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt wurden (siehe Tabelle 43).

Post-Hoc Analyse nach Bonferroni		Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.- Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
(I) Gruppe	vs. (J)				Untergrenze	Obergrenze
KG	UGAD	-0,51	2,84	1,00	-7,48	6,45
	UGAD+GDM	0,23	2,76	1,00	-6,54	7,01
UGAD	KG	0,51	2,84	1,00	-6,45	7,48
	UGAD+GDM	0,75	2,70	1,00	-5,88	7,37
UGAD+GDM	KG	-0,23	2,76	1,00	-7,01	6,54
	UGAD	-0,75	2,70	1,00	-7,37	5,88

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 92,58.

\*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

Tabelle 43: ANOVA+Bonferroni - IL-8 im fetalen Blut

#### 4.4 Immunhistochemie

Insgesamt wurden 59 Plazenten immunhistochemisch untersucht. Diese verteilten sich gleichermaßen auf die drei analysierten Gruppen (siehe *Tabelle 44*). Ebenso verhielt es sich mit der Anzahl der Samples (siehe S.49). In der Gruppe UGAD+GDM lagen insgesamt 114 Samples vor, in der KG und der Gruppe UGAD jeweils 111. In allen 59 Plazenten konnte die Expression von CD45-Zellen nachgewiesen werden, sowohl im villösen als auch im extravillösen Trophoblasten (siehe Abbildung 6). Gezeigt ist eine immunhistochemische Färbung der Plazenta, bei der CD45-positive Zellen in brauner Farbe dargestellt sind. CD45 dient als Pan-Leukozytenmarker und ermöglicht den Nachweis aller Leukozyten im Gewebe. Die violett-blauen Bereiche repräsentieren das Hintergrundgewebe, welches durch eine Gegenfärbung hervorgehoben wurde. Die schwarzen Pfeile weisen auf spezifische CD45+ Zellen hin, die sich in verschiedenen Bereichen der villösen Struktur befinden. Diese Zellen sind deutlich durch die braune Färbung erkennbar und heben sich vom umgebenden Gewebe ab. Die linke Seite des Bildes zeigt den villösen Trophoblasten, der durch seine charakteristische Struktur gut zu erkennen ist. Auf der rechten Seite ist das extravillöse Gewebe zu sehen, in dem ebenfalls CD45+ Zellen vorhanden sind. Diese Analyse bestätigt die Präsenz von Leukozyten in beiden Plazentaregionen.

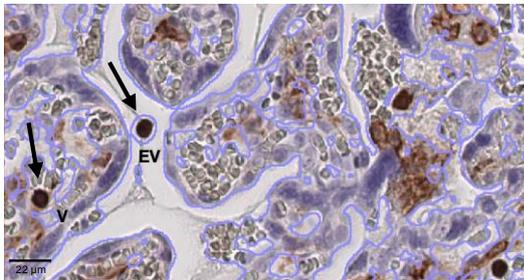


Abbildung 6: CD45-Zellen

Die Pfeile in Abbildung 6 verweisen auf braun angefärbte CD45-Zellen im villösen (links, „V“) und extravillösen (rechts, „EV“) Trophoblasten (Immunhistochemie). Scale bar = 22 µm. Die Rohdaten aus QuPath wurden in Excel exportiert und die ermittelte CD45 -Zellzahl auf die analysierte Gewebefläche bezogen. Pro Plazenta wurde jeweils ein Gewebeschnitt immunhistochemisch gefärbt und analysiert. Innerhalb eines Gewebeschnitts werteten wir jeweils sechs per Zufall gezogene ausgewählte Areale, sog. „Tiles“, mit QuPath aus. Ein „Sample“ entspricht somit einem „Tile“ aus QuPath. Jedes „Tile“ hat eine Flächengröße von 6,25 mm<sup>2</sup>.

Gruppe	Anzahl Plazenten	Anteil	Anzahl der Samples insgesamt	Anteil
KG	20	34%	111	33%
UGAD	19	32%	111	33%
UGAD+GDM	20	34%	114	34%
Gesamt	59		336	

Tabelle 44: Anzahl Plazenten und Anzahl der Samples nach Gruppe.

Tabelle 44 zeigt die Verteilung der Anzahl der Teilnehmerinnen und der entnommenen Proben (Samples) nach den untersuchten Gruppen. Es wurden insgesamt 59 Plazenten von schwangeren Frauen analysiert. Aus jeder der 59 Plazenten wurden mehrere Proben („Anzahl der Samples insg.“) genommen.

#### 4.4.1 CD45-Hauptanalyse

Insgesamt 59 der ursprünglich 60 Patientinnenproben wurden verblindet analysiert (siehe Tabelle 11). Eine Probe konnte aufgrund von Artefakten nicht analysiert werden und fiel somit aus der Auswertung. Die durchschnittlich detektierte Anzahl an positiven CD45-Zellen lag am höchsten in der UGAD-Gruppe, gefolgt von der UGAD+GDM-Gruppe. Die Spannweite der kleinsten bis zu den größten Werten betrug für die KG mehr als 2.000, siehe Tabelle 45.

	Anzahl	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Durchschnittlich detektierte CD45-Zellzahl					
KG	20	299,09	314,24	49,00	2.149,00
UGAD+GDM	20	317,70	278,23	78,00	1.433,00
UGAD	19	334,43	215,43	74,05	1.113,89

Tabelle 45: Deskriptive Analyse der histologischen Analyse CD45 positiver Zellen in Plazentaschnitten

Auch bei der Analyse der CD45 positiven Zellen zeigten sich weder im Gesamtmodell noch in den Post-Hoc-Analysen nach Bonferroni statistisch signifikante Unterschiede zwischen mindestens zwei der verglichenen Gruppen. Wie zuvor in den maternalen Serumproben von IL-6 lag auch bei der Analyse der CD45-Zellen der Wert in der KG am niedrigsten, gefolgt von der Gruppe UGAD+GDM und der Gruppe UGAD (siehe Tabelle 46).

Post-Hoc Analyse nach Bonferroni						
(I) Gruppe	vs. (J)	Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.-Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
KG	UGAD	-18,61	25,336	1	-79,574	42,354
	UGAD+GDM	-35,34	24,851	0,468	-95,135	24,458
UGAD	KG	18,61	25,336	1	-42,354	79,574
	UGAD+GDM	-16,73	24,97	1	-76,812	43,354
UGAD+GDM	KG	35,34	24,851	0,468	-24,458	95,135
	UGAD	16,73	24,97	1	-43,354	76,812

Grundlage: beobachtete Mittelwerte.

Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 138,51.

\*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

Tabelle 46: ANOVA CD45-Zellen

#### 4.5 Genexpressionen der Inflammationsmarker (RT-qPCR)

Ermittelt wurde die relative mRNA-Expression der Gene IL-6, IL10, IL-1R1, TGF- $\beta$  und MCP-1. Ebenfalls mehrfach in der qPCR getesteten Gene waren IL-8, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , diese waren jedoch in der humanen Plazentakohorte nicht auswertbar. Der Grund dafür war vermutlich darin zu finden, dass die Primer nicht spezifisch genug für die Zielgene waren und somit unspezifische Produkte amplifizierten. Primer, die nicht spezifisch genug sind, führen somit zu mehreren Peaks in der Schmelzkurve und machen die Ergebnisse unbrauchbar. Eine weitere Möglichkeit für die Unbrauchbarkeit der Gene mag in der Primer-Dimer-Bildung liegen, da unspezifische Primer auch dazu führen können, dass Primer-Dimere entstehen, die ebenfalls die Analyse verfälschen.

Abbildung 7 veranschaulicht die mangelnde Auswertbarkeit anhand der Melt Curve für TNF- $\alpha$ : Abgebildet sind die Temperatur in Grad Celsius auf der X-Achse sowie die Derivative Reporter (-dF/dT) auf der Y-Achse. Dies ist eine Messung, wie schnell die Fluoreszenz während der Temperaturerhöhung abnimmt. Die Kurve zeigt mehrere Peaks bei verschiedenen Temperaturen, verschiedene Farben repräsentieren unterschiedliche Proben oder Replikate. Die Peaks repräsentieren die Schmelztemperaturen der amplifizierten Produkte. Die Präsenz mehrerer Peaks deutet darauf hin, dass mehrere verschiedene DNA-Produkte amplifiziert wurden. Dies kann auf unspezifische Amplifikation oder Primer-Dimer-Bildung hinweisen. Für eine auswertbare Schmelzkurve sollte idealerweise ein einzelner, klar definierter Peak vorhanden sein, der die Schmelztemperatur des spezifischen Amplifikationsprodukts repräsentiert. Die Vielzahl der Peaks in dieser Grafik deutet darauf hin, dass das Signal durch unspezifische Produkte verfälscht wurde. Die unspezifischen Peaks könnten darauf hinweisen, dass die Primer nicht spezifisch genug für TNF- $\alpha$  sind, oder dass die PCR-Bedingungen optimiert werden müssen, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Da die Grafik mehrere Peaks aufweist, ist sie nicht auswertbar für die Bestimmung der relativen TNF- $\alpha$  Genexpression in der humanen Plazentakohorte. Dies liegt daran, dass es schwierig ist, den spezifischen Beitrag von TNF- $\alpha$  von anderen unspezifischen Amplifikationen zu unterscheiden. Um verwertbare Daten zu erhalten, könnte es notwendig sein, die PCR-Bedingungen zu optimieren. Dies könnte Anpassungen in der Primer-Sequenz, der Annealing-Temperatur oder der Konzentration der Reagenzien beinhalten.

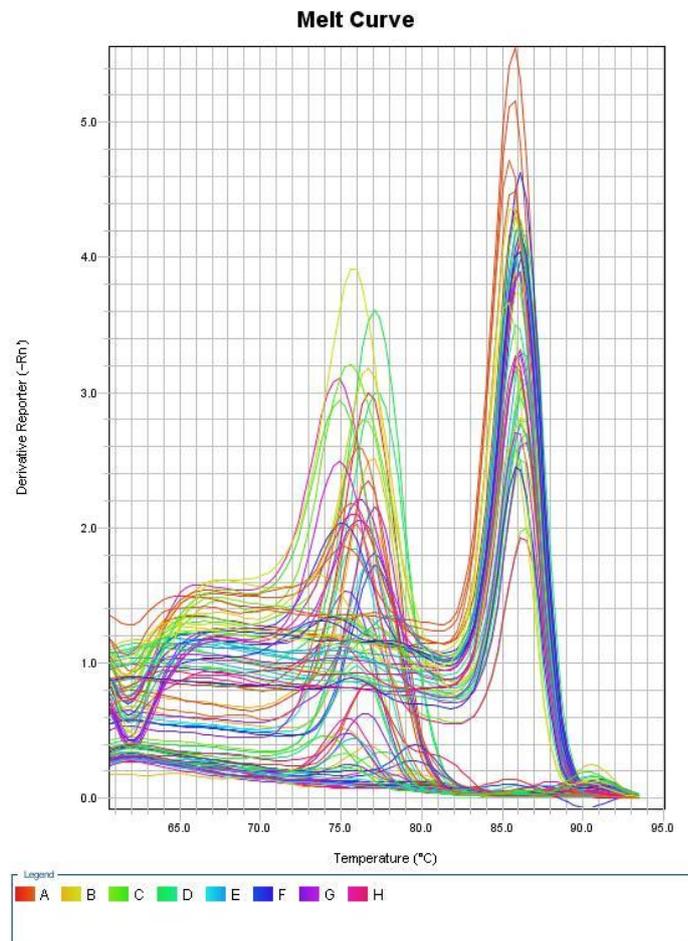


Abbildung 7: Melt Curve TNF- $\alpha$ :

Die Abbildung 7 zeigt die Identifikation spezifischer Amplifikation anhand von Peak-Mustern, hier die Schmelzkurve für TNF- $\alpha$ , die verwendet wurde, um die Spezifität der Amplifikation in den qPCR-Experimenten zu überprüfen. Die X-Achse stellt die Temperatur in Grad Celsius dar, während die Y-Achse die Änderung der Fluoreszenzrate ( $-dF/dT$ ) zeigt. Mehrere Peaks deuten auf unspezifische Amplifikationen hin, was auf die Notwendigkeit hinweist, die PCR-Bedingungen oder Primer zu optimieren.

Abbildung 8 zeigt die Melt Curve von IL-6, wobei die Achsenbeschriftungen der gleichen Logik wie Abbildung 7 folgen. Die Kurve zeigt einen dominanten, klar definierten Peak bei etwa 80°C. Dies deutet darauf hin, dass es ein Hauptamplifikationsprodukt gibt. Die verschiedenfarbigen Proben oder Replikate weisen alle sehr ähnliche Schmelzkurven auf, was auf eine hohe Reproduzierbarkeit hinweist. Das Vorhandensein eines einzigen, klar definierten Peaks deutet darauf hin, dass die Amplifikation spezifisch für das IL-6-Gen ist. Es gibt keine Anzeichen für signifikante unspezifische Amplifikation oder Primer-Dimer-Bildung. Die klare Schmelzkurve zeigt, dass die verwendeten Primer sehr spezifisch für das IL-6-Gen sind und unter den gewählten PCR-Bedingungen keine unspezifischen Produkte erzeugt wurden. Die Konsistenz der Schmelzkurven über verschiedene Proben hinweg zeigt eine hohe Reproduzierbarkeit der qPCR-Ergebnisse, was auf eine robuste und zuverlässige Methode hinweist. Diese Schmelzkurve ist auswertbar und kann zur Ermittlung der relativen IL-6 Genexpression in den untersuchten Proben verwendet werden.

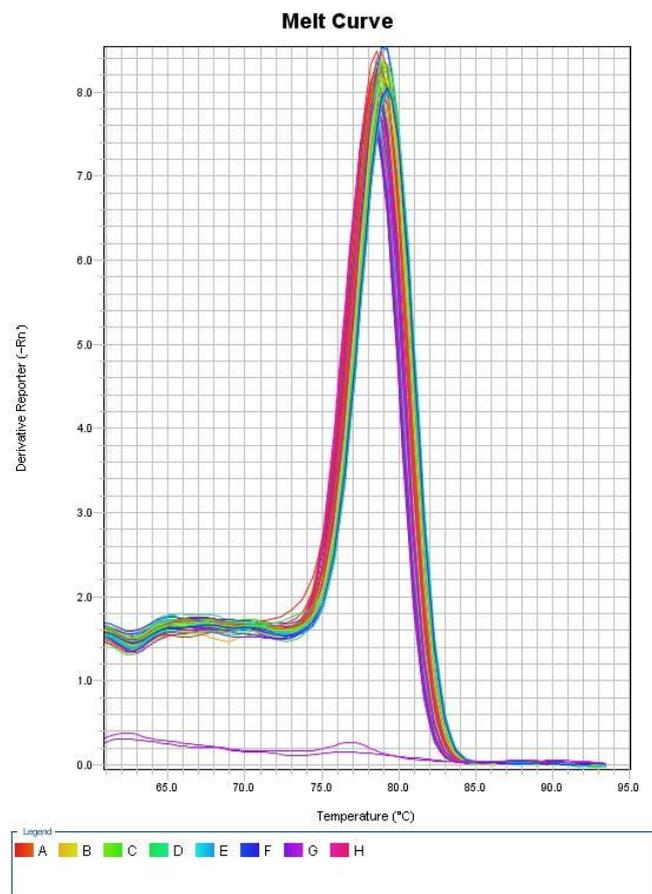
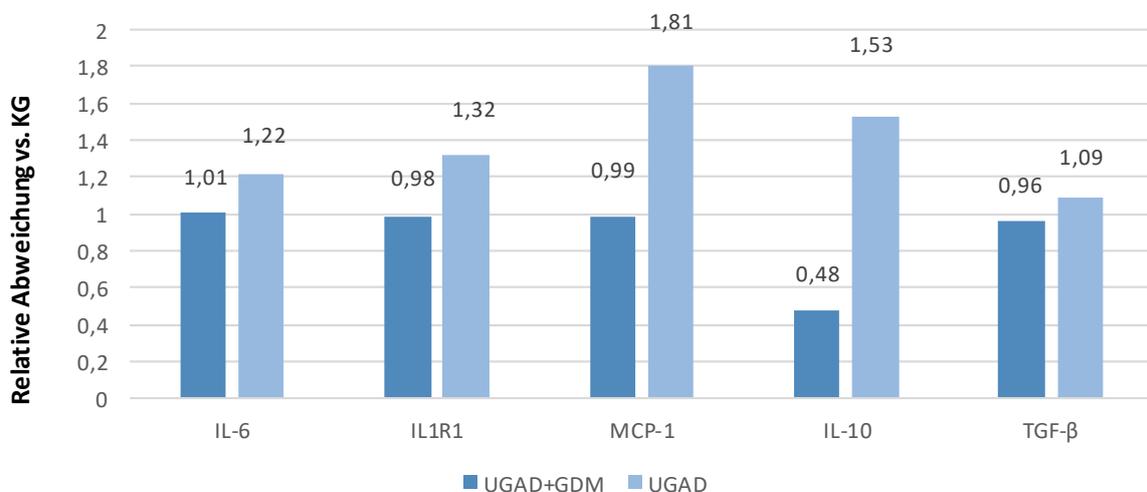


Abbildung 8: Melt Curve IL-6:

Auswertung der Schmelzkurve mit einem klar definierten Peak. Die Abbildung zeigt die Schmelzkurve der IL-6-Amplifikation in verschiedenen Proben. Der deutlich sichtbare Peak bei etwa 80°C zeigt die spezifische Amplifikation des IL-6-Gens an, ohne unspezifische Nebenprodukte. Die Konsistenz der Schmelzkurven über verschiedene Proben hinweg weist auf eine hohe Reproduzierbarkeit und Spezifität der verwendeten Primer hin, was auf eine zuverlässige Genexpression hindeutet.

Auch für die RT-qPCR wurden die drei Gruppen KG, UGAD, UGAD+GDM untereinander verglichen. Da die qPCR nicht für alle Proben auswertbar war, lagen unterschiedliche Fallzahlen für die Analyse vor (siehe Tabelle 47). Per Formel und Definition wies die Kontrollgruppe (n=27 für alle Analysen) als Referenz stets einen Mittelwert von 1 auf. Im Folgenden beziehen sich alle p-Werte auf den Vergleich mit der KG.

Für IL-6 zeigte Gruppe UGAD+GDM (n=22) einen Mittelwert von  $1,01 \pm 0,40$  mit einem p-Wert von 0,94 im Vergleich zur Kontrolle. Die UGAD-Gruppe (n=27) zeigte einen Mittelwert von  $1,22 \pm 0,51$  mit einem p-Wert von 0,18. Für IL1R1 hatte die UGAD+GDM-Gruppe (n=22) einen Mittelwert von  $0,98 \pm 0,42$  mit einem p-Wert von 0,93. Die UGAD-Gruppe (n=27) hatte einen Mittelwert von  $1,32 \pm 0,67$  mit einem p-Wert von 0,15. Für MCP-1 lag der Wert der UGAD+GDM-Gruppe (n=22) bei einem Mittelwert von  $0,99 \pm 0,52$  mit einem p-Wert von 0,96 und war abermals nicht statistisch signifikant, ebenso wie die Differenz der Gruppe UGAD (n=27) mit einem Mittelwert von  $1,81 \pm 1,58$  und einem p-Wert von 0,33 im Vergleich mit der KG. Der hohe Mittelwert war durch einen einzelnen Ausreißer bedingt, der jedoch nach Prüfung nicht durch einen Messfehler entstanden war und somit nicht von der Analyse ausgeschlossen wurde. Für IL-10 hatte die UGAD+GDM-Gruppe (n=19) einen Mittelwert von  $0,48 \pm 0,56$  mit einem p-Wert von 0,15. Die UGAD-Gruppe (n=27) hatte einen Mittelwert von  $1,53 \pm 1,73$  mit einem p-Wert von 0,37. Hinsichtlich TGF- $\beta$  zeigte der p-Wert von 0,89 ebenfalls keine statistisch signifikanten Differenzen der UGAD+GDM-Gruppe (n=22,  $0,96 \pm 0,61$ ) zur KG. Die UGAD-Gruppe (n=27) zeigte einen Mittelwert von  $1,09 \pm 0,64$  mit einem p-Wert von 0,76. Tab. 47 fasst die Ergebnisse zusammen. Somit zeigte die Analyse der relativen Genexpressionen in der RT-qPCR für keinen Vergleich der relativen Werte zwischen Kontroll- und Experimentalgruppen einen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 9).



Referenz: Kontrollgruppe = 1

Abbildung 9: Mittelwerte der relativen Genexpressionen

	Anzahl	Relative Genexpression im Vergleich zu KG	Std.-Abweichung	Std.-Fehler	p-Wert* vs. Kontrolle
<b>IL-6</b>					
KG	27	1,00	0,37	0,07	
UGAD+GDM	22	1,01	0,40	0,09	0,94
UGAD	27	1,22	0,51	0,10	0,18
<b>IL1R1</b>					
KG	24	1,00	1,09	0,22	
UGAD+GDM	22	0,98	0,42	0,09	0,93
UGAD	27	1,32	0,67	0,13	0,15
<b>MCP-1</b>					
KG	27	1,00	0,54	0,10	
UGAD+GDM	22	0,99	0,52	0,11	0,96
UGAD	27	1,81	1,58	0,31	0,33
<b>IL-10</b>					
KG	27	1,00	0,75	0,14	
UGAD+GDM	19	0,48	0,56	0,13	0,15
UGAD	27	1,53	1,73	0,33	0,37
<b>TGF-β</b>					
KG	27	1,00	0,61	0,12	
UGAD+GDM	22	0,96	0,61	0,13	0,89
UGAD	27	1,09	0,64	0,12	0,76

Tabelle 47: RT-qPCR – Gruppenvergleiche der relativen Genexpressionen.

\*t-Test für unverbundene Stichproben: Mittelwert Kontrolle vs. Vergleichsgruppe. Mittelwerte sind die Durchschnitte der relativen Abweichung der relativen Genexpression vom Targetgen anhand der Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (für eine detaillierte Beschreibung des Vorgehens siehe Seite 55). Mittelwerte der Kontrolle sind per definitionem = 1, da sich die relativen Abweichungen vom Mittelwert durchschnittlich zu 0 berechnen müssen.

## 5 Diskussion

Die Assoziation zwischen Adipositas, dem Zustand der chronischen Inflammation und Insulinresistenz ist bereits seit Jahren evident.<sup>132</sup> Die Pathogenese der durch Adipositas verursachten Insulinresistenz ist in vielen Aspekten dennoch weiterhin unklar. Derzeit liegt der Fokus des Großteils wissenschaftlicher Studien zu diesem Thema auf der Inflammation des Fettgewebes selbst, welche dort zu einem bedeutenden Anteil von Makrophagen initiiert wird.<sup>133</sup> Der inflammatorische Zustand ist jedoch nicht lokal auf das Fettgewebe begrenzt, sondern bedingt generalisiert Veränderungen in anderen Organen wie bspw. der Leber, des Muskelgewebes und des Pankreas. Über potentielle Veränderungen der Plazenta als temporär angelegtes Organ sowie die Auswirkungen von Übergewicht und Insulinresistenz während und nach der Schwangerschaft ist bisher wenig bekannt.<sup>134</sup> Der Einfluss des maternalen BMI und eines Gestationsdiabetes auf Inflammationsmarker in maternalem und fetalem Blut sowie die Analyse des humanen Plazentagewebes innerhalb einer Kohorte wurde bisher unzureichend untersucht. Eine Mehrzahl der Experimente zu plazentaren Veränderungen von Inflammationsmarkern fand bisher an Mausmodellen unter Laborbedingungen statt. In dem hier vorliegenden Projekt untersuchten wir den Einfluss maternalen Übergewichts und Gestationsdiabetes auf die quantitative Veränderung proinflammatorischer Faktoren sowohl auf lokaler Ebene in der Plazenta als auch systemisch in maternalem und fetalem Blut.

Im Folgenden werden die Methodik der Arbeit sowie die Ergebnisse aus dem vorausgehenden Kapitel kritisch reflektiert, diskutiert und wissenschaftlich kontextualisiert.

### Patientinnenkollektiv

Ein potentieller Schwachpunkt ist die Rekrutierung der Patientinnen kurz vor dem geplanten Kaiserschnitt. Dies könnte zu einer Selektionsverzerrung führen, da nur Frauen, die für einen geplanten Kaiserschnitt vorgesehen sind, eingeschlossen wurden. Ungeplante Kaiserschnitte und natürliche Geburten wurden aus organisatorischen Gründen und mangelnder Planbarkeit nicht berücksichtigt. Des Weiteren ist die Plazenta aus einer Spontangeburt nicht mit einer Plazenta aus einer geplanten Sectio vergleichbar: Bei der Geburtseinleitung spielen unter anderem inflammatorische Prozesse in der Plazenta eine sehr wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurden nach Rekrutierung alle Studienteilnehmerinnen erneut kontrolliert und potentielle sekundäre Sectiones ausgeschlossen.

Daher ist die Generalisierbarkeit der Ergebnisse einschränkt. Diesen Aspekt gilt es für die weiteren Punkte der Diskussion insbesondere dann zu bedenken, wenn die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit anderen wissenschaftlichen Erkenntnissen verglichen werden. Ein weiterer Punkt, der zu einer Selektionsverzerrung führen könnte, ist die Tatsache, dass in dieser Studie ausschließlich Probandinnen eingeschlossen wurden, die an einer Uniklinik, sprich einem Krankenhaus der Maximalversorgung entbunden haben, an dem die Anzahl „komplizierter“ bzw. sog. „Risikoschwangerschaften“ tendenziell höher ist, als an regionalen Krankenhäusern. Für eine genauere allgemeine Repräsentierbarkeit hätten daher nicht eine, sondern mehrere Kliniken in die Studie einbezogen werden müssen, was jedoch aus logistischen Gründen nicht möglich war. Positiv hinsichtlich der Heterogenität der Stichprobe ist hervorzuheben, dass es sich bei den werdenden Müttern um ein sehr heterogenes Probandinnenkollektiv mit unterschiedlichsten Lebensbedingungen, Voraussetzungen und „Lifestyle“-Aspekten, wie beispielsweise Ausübung eines Berufes während der Schwangerschaft, Ernährung, Sport, sowie Medikamenteneinnahme handelte.

### Geburtsgewicht

Die Analyse des Geburtsgewichts zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Neugeborene aus der Gruppe UGAD+GDM hatten ein signifikant höheres Geburtsgewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe (KG). Gleichzeitig bestand kein Unterschied zwischen den KG und UGAD-Teilnehmerinnen bzgl. des Geburtsgewichts ihrer Kinder. Dies steht im Einklang mit der Literatur, die darauf hinweist, dass Gestationsdiabetes und Übergewicht der Mutter zu einer erhöhten fetalen Wachstumsrate führen können.<sup>135</sup> Der Unterschied von etwa 350 g ist klinisch relevant, da ein höheres Geburtsgewicht mit einem erhöhten Risiko für Geburtskomplikationen und späterer Adipositas im Kindesalter assoziiert ist.<sup>136</sup>

Dieses erhöhte Geburtsgewicht könnte auch langfristige metabolische Auswirkungen haben, die das Risiko für Typ-2-Diabetes und das metabolische Syndrom im späteren Leben des Kindes erhöhen. Studien haben gezeigt, dass ein höherer Sauerstoffbedarf des Fetus zu

intrauteriner Hypoxie führen kann, was schwerwiegende Folgen bis hin zum Fruchttod haben kann.<sup>36</sup> Nach der Geburt sind Kinder von Müttern mit GDM aufgrund der erhöhten Insulinspiegel im Mutterleib häufiger von Hypoglykämien und Elektrolytstörungen betroffen, was ihre frühkindliche Gesundheit weiter belastet.<sup>38</sup> Nicht nur kurzfristige Effekte lassen sich identifizieren, denn langfristig erhöht sich bei diesen Kindern das Risiko, bereits in jungen Jahren Diabetes mellitus zu entwickeln, insbesondere bis zum Alter von 22 Jahren, wie retrospektive Studien belegen.<sup>40</sup> Darüber hinaus begünstigt eine Fehlregulation der neuroendokrinen Systeme und des Pankreas bei diesen Kindern die Entwicklung von Adipositas und dem metabolischen Syndrom, was die Bedeutung einer sorgfältigen Überwachung und Behandlung von GDM und maternaler Adipositas während der Schwangerschaft unterstreicht.<sup>41</sup>

### Blutdruck

Die Analyse des systolischen und diastolischen Blutdrucks vor der Sectio ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dies deutet darauf hin, dass weder Übergewicht/Adipositas noch GDM einen signifikanten Einfluss auf den Blutdruck unmittelbar vor der Geburt hatten. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einigen Studien, die einen Zusammenhang zwischen Gestationsdiabetes und erhöhtem Blutdruck gefunden haben. So konnten Yamamoto et al. (2018) ebendies in einem systematischen Review zeigen.<sup>137</sup> Möglicherweise könnte die Kontrolle und Behandlung („Lifestyle-Änderungen“ wie Ernährungsumstellung und körperliche Aktivität, sowie Insulintherapie des Gestationsdiabetes in der untersuchten Kohorte zur Normalisierung des Blutdrucks beigetragen haben. Da Kinder von Müttern mit Schwangerschaftsdiabetes ein erhöhtes Risiko vorweisen, selbst in den frühen Lebensjahren Bluthochdruck oder Übergewicht zu entwickeln, hat der Bluthochdruck für die Mutter kritische Relevanz und es sollte das Ziel sein, Blutzuckerwerte im Normbereich zu halten.

### Inflammationsmarker im mütterlichen & fetalen Blut

Die Analyse der Inflammationsmarker IL-6 und IL-8 sowohl im maternalen als auch im fetalen Blut zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dies deutet darauf hin, dass keine der untersuchten Frauen eine Inflammation aufwies, da die gemessenen Werte im Normbereich lagen. Für den Fetus existieren keine etablierten Normwerte, jedoch zeigen die Ergebnisse, dass die Werte in den Gruppen UGAD und UGAD+GDM nicht von denen der Kontrollgruppe abwichen. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu einigen Studien, die erhöhte Entzündungsmarker bei Gestationsdiabetes oder Übergewicht (maternal und fetal) gefunden haben.<sup>138</sup> Die fehlende Signifikanz könnte durch die relativ kleine Stichprobengröße und die hohe Variabilität der Entzündungsmarker innerhalb der Gruppen erklärt werden.

Obwohl in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede in den IL-6-Levels zwischen den Gruppen festgestellt wurden und die Werte im Normbereich lagen, könnte die Beobachtung der IL-6-Levels dennoch von klinischer Relevanz sein. In der Literatur ist bekannt, dass erhöhte IL-6-Serumkonzentrationen mit einer Insulinresistenz bei Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert sind. In früheren Studien konnte der monoklonale IL-6-Rezeptorantikörper Tocilizumab (bei nicht schwangeren ProbandInnen) eine Reduktion der Insulinresistenz bewirken.<sup>139</sup> Diese Erkenntnisse stützen die Hypothese, dass IL-6 auch bei Gestationsdiabetes eine Rolle spielen könnte. Die fehlende Signifikanz in unserer Studie könnte auf die begrenzte Stichprobengröße und die damit verbundene Variabilität der Daten zurückzuführen sein, was durch die hohen Standardabweichungen der Mittelwerte (siehe Tabelle 36) unterstrichen wird. Weitere Untersuchungen mit größeren Stichproben sind notwendig, um festzustellen, ob subtile Erhöhungen von IL-6 klinisch relevante Effekte bei Gestationsdiabetes haben könnten. Auch die Ergebnisse von Lappas et al. (2004)<sup>140</sup> zeigten keinen Unterschied in der Freisetzung von IL-8 und IL-6 aus Plazenta-, Fett- und Skelettmuskelgewebe von Frauen mit GDM im Vergleich zu normal Schwangeren.<sup>140</sup> Entzündungen gegen Ende der Schwangerschaft nehmen generell zu, was Unterschiede zwischen normalgewichtigen und adipösen Schwangeren überdecken kann. Dies gilt besonders im dritten Trimester, wenn entzündliche Prozesse natürlicherweise verstärkt werden, um den Geburtsprozess einzuleiten. Mehrere Studien haben gezeigt, dass in der späten Schwangerschaft die Entzündungsreaktionen in verschiedenen BMI-Gruppen einheitlich eleviert sein können, wodurch die Unterschiede, die früher in der Schwangerschaft sichtbar waren, schwerer zu erkennen sind. Dies deutet darauf hin, dass der Zeitpunkt der Probenentnahme entscheidend ist, und dass in dieser Studie die späte Schwangerschaftsphase möglicherweise zu den nicht signifikanten Unterschieden beigetragen hat.<sup>141</sup>

Die Analyse des C-reaktiven Proteins (CRP) im maternalen Blut ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen Kontrollgruppe (KG), UGAD+GDM und UGAD. Die Ergebnisse unserer Studie stehen somit im Gegensatz zu einigen früheren Untersuchungen, die erhöhte CRP-Werte bei Schwangeren mit Gestationsdiabetes oder Übergewicht dokumentierten. Beispielsweise fanden Retnakaran et al. (2003) erhöhte CRP-Werte bei Frauen mit Gestationsdiabetes, was auf eine systemische Entzündungsreaktion hinweist.<sup>142</sup> Ebenso berichteten Brown et al. (2013), dass erhöhte CRP-Konzentrationen mit einem erhöhten Risiko für hypertensive Schwangerschaftserkrankungen und weitere Schwangerschaftskomplikationen verbunden sind.<sup>143</sup>

Die fehlende Signifikanz in unserer Studie könnte auf die kleine Stichprobengröße und die hohe Variabilität der CRP-Werte innerhalb der Gruppen zurückzuführen sein, denn in Summe lagen dieser Analyse über alle drei Gruppen lediglich n = 21 Beobachtungen vor. Es wurde zwar a priori keine formelle Fallzahlplanung für die Untersuchung durchgeführt, jedoch liegt

die Vermutung nahe, dass bei solch niedrigen Probandinnenzahlen die statistische Belastbarkeit der Ergebnisse nur eingeschränkt gegeben ist. Dies äußert sich auch in der hohen Standardabweichung, insbesondere in der UGAD-Gruppe ( $\pm 19,91\text{mg/l}$ ), siehe Tabelle 32.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zu anderen Studien könnte in den spezifischen Methodiken und den angewendeten Ein- und Ausschlusskriterien liegen. In unserer Studie wurden nur Frauen mit unkomplizierten Schwangerschaften und einem geplanten Kaiserschnitt zwischen SSW 35+0 und 41+6 eingeschlossen. Dadurch wurden mögliche Confounder von vornherein ausgeschlossen. Dies könnte die Homogenität der Stichprobe erhöht, aber auch die Detektion von subtileren Unterschieden zwischen den Gruppen erschwert haben.

Gleichzeitig könnten variabelere Definitionen und Messmethoden zur Diagnose von Gestationsdiabetes und Übergewicht zu den unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Während einige Studien strengere Kriterien und spezifischere diagnostische Tools anwendeten, könnte unsere Studie aufgrund breiterer Einschlusskriterien eine höhere Variabilität in der Probandenauswahl aufweisen. Beispielsweise war der BMI in unserer Studie nur ein Aspekt der Einschlusskriterien, und es wurden keine zusätzlichen metabolischen Marker wie beispielsweise ein aktueller Lipidstatus zur weiteren Klassifizierung der Probandinnen verwendet. Diese Unterschiede in den methodischen Ansätzen und diagnostischen Kriterien könnten zu den abweichenden Ergebnissen im Vergleich zu anderen Studien beigetragen haben.

Es bleibt die Möglichkeit bestehen, dass CRP bei einer größeren und homogeneren Stichprobe signifikante Unterschiede aufzuzeigen vermag. CRP ist bekannt dafür, bei verschiedenen inflammatorischen und metabolischen Störungen erhöht zu sein und könnte potenziell als Marker für die Risikoabschätzung und das Management von Schwangerschaftskomplikationen dienen. Daher sollte die ausbleibende statistische Signifikanz in unserer Studie nicht damit gleichgesetzt werden, dass die identifizierten Unterschiede keine klinische Relevanz bedeuteten.

Ein Marker, der in einigen Studien als potenziell besserer Entzündungsmarker als CRP bei Schwangerschaftskomplikationen wie beispielsweise Infektionen dienen könnte, ist das Procalcitonin.<sup>77</sup> Procalcitonin ist ein Marker, der spezifischer auf bakterielle Infektionen reagiert und in bestimmten Situationen sensitiver sein könnte als CRP. Es hat auch eine Rolle bei der Beurteilung von schweren systemischen Entzündungen und Sepsis gezeigt, was seine potenzielle Nützlichkeit bei der Risikoabschätzung während der Schwangerschaft unterstreicht. Procalcitonin konnte in bestimmten klinischen Szenarien bessere prädiktive Werte als CRP aufweisen und ist daher in Erwägung zu ziehen.

In einer retrospektiven Analyse von Ma et al. (2019) wurde der Effekt von GDM auf die quantitative Expression von Procalcitonin im dritten Trimenon untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Baseline Level von Procalcitonin im mütterlichen Blut, nicht aber im Nabelschnurblut erhöht war<sup>144</sup>

Es bietet sich an zu prüfen, ob dieser Marker in zukünftigen Studien eine bessere Sensitivität und Spezifität bieten könnte.

### Klinische Daten im Blut

In der vorliegenden Studie wurden die Inflammationsmarker im Serum nur einmalig kurz vor der Sectio bestimmt. Diese Methode ermöglicht lediglich eine Momentaufnahme des inflammatorischen Status und könnte dynamische Veränderungen während der Schwangerschaft und der postpartalen Phase übersehen. Christian und Porter (2014) betonen die Bedeutung der longitudinalen Bestimmung von Inflammationsmarkern im Serum, um die Veränderungen über die gesamte Schwangerschaft hinweg und im Wochenbett zu erfassen.<sup>145</sup> Ihre Untersuchung zeigt, dass sich die Serumkonzentrationen proinflammatorischer Marker im Verlauf der Schwangerschaft und nach der Geburt signifikant ändern, und diese Veränderungen stark vom mütterlichen BMI beeinflusst werden. Die einmalige Messung in unserer Studie könnte daher wichtige zeitliche Variationen und potenzielle Zusammenhänge zwischen BMI und inflammatorischen Reaktionen nicht vollständig erfassen.

Zukünftige Studien sollten daher eine longitudinale Designstrategie anwenden, um die dynamischen Veränderungen der Inflammationsmarker über die gesamte Dauer der Schwangerschaft und darüber hinaus zu erfassen. Dies würde ein umfassenderes Verständnis der inflammatorischen Prozesse ermöglichen und könnte helfen, spezifische Zeitpunkte zu identifizieren, an denen das Risiko für Schwangerschaftskomplikationen erhöht ist.

### Plazentagewicht

Das Plazentagewicht war in der Gruppe UGAD+GDM tendenziell höher als in der KG und der UGAD-Gruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz. Ein höheres Plazentagewicht bei Gestationsdiabetes könnte einerseits durch Insulin als Wachstumsfaktor bedingt sein, oder auch auf adaptive Veränderungen der Plazenta hinweisen, um den erhöhten Nährstoffbedarf des Fetus zu decken.<sup>134</sup> Dass die Differenz von rund 50 g Plazentagewicht zwischen den Gruppen UGAD+GDM (703,31 g  $\pm$  144,29 g) und der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 653,13 g ( $\pm$  139,04 g) nicht signifikant ausfiel, konterkariert nicht zwangsläufig die klinische Relevanz dieses Befundes. Immerhin handelt es sich bei der Differenz um einen Gewichtsunterschied von rund 7%. Abermals gilt es die große Streuung der Werte zu berücksichtigen, da sich die Werte aller Patientinnen über alle Gruppen hinweg von 303 g bis

hin zu 1.228 g streckten. Eine mögliche Fehlerquelle in unserer Studie könnte darin liegen, dass wir teilweise Eihäute der Plazenten in das Plazentagewicht einbezogen haben. <sup>142 143 77</sup>

### Immunhistochemie und CD45+ Hauptanalyse plazentaren Gewebes

Die immunhistochemische Analyse der Plazenten im villösen Anteil zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der CD45+ Zellen zwischen den Gruppen. Diese Ergebnisse stimmen mit einigen Studien überein, die keine signifikanten Unterschiede in der Immunzellinfiltration in der Plazenta bei Übergewicht und/oder GDM fanden.<sup>146</sup>

Die Ergebnisse unserer Studie stehen im Einklang mit einigen früheren Untersuchungen, die keine signifikanten Unterschiede in der Immunzellinfiltration in der Plazenta bei Frauen mit Gestationsdiabetes fanden. Bowen et al. (2002) berichteten, dass die Rolle von Zytokinen und Immunzellen in der Plazenta komplex ist und stark von der spezifischen Pathologie und den individuellen Unterschieden abhängt. In ihrer Studie wurde kein signifikanter Unterschied in der Immunzellinfiltration zwischen normal Schwangeren und Frauen mit Gestationsdiabetes gefunden.<sup>147</sup> Nogues et al. fanden in humanen Plazenten adipöser Frauen, welche ebenfalls nach elektiven Sectiones untersucht wurden, eine erniedrigte Leukozyteninfiltration.<sup>64</sup> Im Gegensatz dazu fanden einige Studien erhöhte Immunzellzahlen in Plazenten von Frauen mit Gestationsdiabetes. Lappas et al. (2011) berichteten, dass oxidative Stressmarker und entzündliche Zytokine, einschließlich CD45+ Zellen, in Plazenten von Frauen mit Gestationsdiabetes erhöht waren.<sup>148</sup> Diese Studie untersuchte ebenfalls Term-Plazenten, jedoch wurden spezifische Subpopulationen von Leukozyten, wie T-Lymphozyten und Makrophagen, genauer differenziert und analysiert. Diese Unterschiede in den publizierten und unseren Ergebnissen könnten auf methodische Unterschiede, wie die Wahl der Zellmarker und der verwendeten Antikörper, oder auf die Auswahlkriterien der Patientinnen, einschließlich des Gestationsalters, zurückzuführen sein.

Beide zitierten Studien, Bowen et al. (2002) und Lappas et al. (2011), konzentrierten sich dabei auf verschiedene Regionen der Plazenta, einschließlich des basalen und chorionischen Anteils, während unsere Studie den villösen Anteil untersucht hat. Diese unterschiedlichen Untersuchungsregionen könnten zu den unterschiedlichen Ergebnissen in der Immunzellinfiltration beigetragen haben, da die Zellpopulationen in diesen Regionen variieren können. Weiterhin spielt der Zeitpunkt der Probenentnahme eine Rolle. Studien, die Proben aus verschiedenen Schwangerschaftsphasen (z.B. frühes vs. spätes drittes Trimester) analysieren, könnten unterschiedliche Inflammationsmuster aufweisen, was sich auf die Anzahl der detektierten Immunzellen auswirkt.

Ein weiterer Aspekt ist die Tatsache, dass wir mit dem CD45-Oberflächenmolekül als Pan-Leukozytenmarker sämtliche Leukozyten quantitativ erfassten, jedoch nicht die jeweiligen Subpopulationen und deren prozentualen Anteil, wie beispielsweise regulatorische T-

Lymphozyten (sog. „Treg-Zellen“), NK-Zellen und Makrophagen: In einem Review von Luccia et al. (2020) wurden insgesamt 18 Studien verglichen, die verschiedene Leukozyten-Subpopulationen quantitativ analysierten. Auch hier waren die Ergebnisse allerdings kontrovers: Diese Kontroversen könnten auf die Vielfalt der methodischen Ansätze, die Heterogenität der untersuchten Populationen und die unterschiedlichen Zeitpunkte der Probenentnahme zurückzuführen sein. Beispielsweise könnte die Entnahme der Proben am Termin die Unterschiede verwischt haben, die in früheren Stadien der Schwangerschaft möglicherweise deutlicher ausgeprägt waren.<sup>149</sup> Der CD45-Marker, den wir verwendet haben, deckt eine breite Palette von Leukozyten ab, darunter T-Lymphozyten, B-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen. In Studien wie der von Lappas et al. (2011) wurden spezifischere Zelltypen wie Makrophagen und T-Lymphozyten untersucht, was möglicherweise zu einer höheren Sensitivität bei der Erfassung von Entzündungsreaktionen geführt hat. Es könnte sinnvoll sein, zukünftige Analysen auf spezifische Leukozyten-Subpopulationen zu fokussieren, um differenziertere Aussagen über die Immunzellinfiltration treffen zu können.

Aus der wissenschaftlichen Literatur zum Thema ist bekannt, dass Zytokine wie IL-6 und IL-8 eine entscheidende Rolle bei der Geburtseinleitung spielen.<sup>150</sup> IL-6 beispielsweise ist stark mit der Stimulierung von Prostaglandinen und Oxytocin verbunden, welche für die Wehentätigkeit und den Geburtsvorgang essenziell sind. Ebenso ist IL-8 für die Neutrophilenanreicherung und den Abbau der extrazellulären Matrix während der Zervixreifung und dem Einsetzen der Wehen verantwortlich.<sup>151</sup> Diese zytokinvermittelten Prozesse führen zu einer physiologischen Inflammation zum Ende der Schwangerschaft, welche notwendig ist, um den Geburtsprozess zu initiieren.

In Bezug auf unsere Studie könnte diese physiologische Inflammation erklären, warum keine signifikanten Unterschiede in der Immunzellinfiltration zwischen den Gruppen festgestellt wurden. Da die Inflammation eine natürliche und notwendige Rolle zum Ende der Schwangerschaft spielt, könnten die Unterschiede zwischen normalgewichtigen und adipösen Schwangeren zu diesem Zeitpunkt überdeckt werden.<sup>145</sup>

#### Genexpressionen von Inflammationsmarkern im plazentaren Gewebe (qPCR)

Die Analyse der mRNA-Expression der Gene IL-6, IL-10, IL-1R1, TGF- $\beta$  und MCP-1 im villösen Anteil der Plazentaprobe zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen Kontrollgruppe und UGAD sowie KG und UGAD+GDM. Die Mittelwerte der Genexpressionen lagen in der UGAD+GDM-Gruppe und der UGAD-Gruppe nahe an den Werten der Kontrollgruppe, wobei keine statistisch signifikanten Abweichungen festgestellt wurden. Die Werte der Gruppe UGAD+GDM befanden sich mit der Ausnahme von IL-10 durchweg nah am Richtwert der Kontrollgruppe von 1.

Im Falle der Genexpression von IL-10 der Gruppe UGAD+GDM lag die Fallzahl mit n=19 am niedrigsten für alle Vergleiche. Dieser Anzahl an Beobachtungen kann für die vorliegende Analyse eine ausreichend robuste Aussagekraft attestiert werden, da die Streuung, gemessen durch die Standardabweichung, gering ausfiel (siehe Tabelle 47). Somit sind die im Folgenden gezeigten Ergebnissen methodisch belastbar.

Die Ergebnisse unserer Studie stimmen mit einigen früheren Untersuchungen überein, die keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Inflammationsmarkern bei Gestationsdiabetes fanden. Beispielsweise berichteten Braga et al. (2019), dass die Expression von IL-6 und anderen proinflammatorischen Zytokinen in Plazenten von Frauen mit Gestationsdiabetes nicht signifikant höher war als in Plazenten von gesunden Schwangeren.<sup>152</sup> Auch Kretschmer et al. stellten in Mäusen keine gesteigerte IL-6 mRNA Expression in Plazenten adipöser Mausmodelle fest.<sup>153</sup> Nogues et al. fanden in humanen Plazenten adipöser Frauen, welche ebenfalls nach elektiven Sectiones untersucht wurden, eine erniedrigte IL-6 Expression.<sup>64</sup> Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die Inflammationsreaktion in der Plazenta bei Übergewicht und Gestationsdiabetes nicht stark ausgeprägt ist oder durch andere Faktoren moduliert wird. Im Gegensatz dazu fanden einige Studien erhöhte Expressionslevel von proinflammatorischen Zytokinen bei Frauen mit Gestationsdiabetes. Mrizak et al. (2014) berichteten, dass die Expression von IL-6 in Plazenten von Frauen mit Gestationsdiabetes erhöht war.<sup>154</sup>

### Statistik und Analysemethoden

Die geringe Fallzahl nicht nur der eingeschlossenen Teilnehmerinnen, sondern auch der einzelnen Gewebeproben, mögen einen Einfluss auf die statistische Tragweite der Ergebnisse haben. Es wurde keine formelle Fallzahlplanung vorgenommen, sodass keine Aussage über die statistische Power der Analyse möglich ist. Hinzu kommt, dass die Wahl der Hauptanalyse für die Mittelwertvergleiche mit einer ANOVA mit Bonferroni-Korrektur einem konservativen Verfahren entspricht. Das bedeutet, dass die Chance erhöht ist, dass tatsächlich bestehende Differenzen ggf. nicht identifiziert werden konnten. Dennoch sind wir der Meinung, dass es für eine klinische Analyse wie diese Arbeit sie vorgenommen hat besser ist, konservativ vorzugehen, um die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Rückschlüsse zu reduzieren.

### Limitationen der Arbeit

Diese Studie weist mehrere Limitationen auf, die die Interpretation der Ergebnisse einschränken könnten. Erstens wurden die Probandinnen kurz vor einem geplanten Kaiserschnitt rekrutiert, was eine Selektionsverzerrung darstellt, da nur Frauen mit einem geplanten Kaiserschnitt eingeschlossen wurden. Ungeplante Kaiserschnitte und natürliche Geburten wurden nicht berücksichtigt, was die Generalisierbarkeit der Ergebnisse einschränkt. Darüber hinaus wurden ausschließlich Frauen, die in einer Uniklinik entbunden haben, in die

Studie einbezogen. Dies könnte zu einer Überrepräsentation von Risikoschwangerschaften führen, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die allgemeine Bevölkerung weiter einschränkt.

Eine weitere Limitation betrifft die geringe Fallzahl und die damit verbundene statistische Power. Es wurde keine formelle Fallzahlplanung durchgeführt, was bedeutet, dass die Studie möglicherweise nicht ausreichend statistische Power hatte, um subtile Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen. Dies könnte insbesondere für die Analyse der Inflammationsmarker und die Immunhistochemie relevant sein, wo keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden.

Die einmalige Bestimmung der Inflammationsmarker im Blut kurz vor der Sectio stellt eine weitere Limitation dar. Diese Methode ermöglicht nur eine Momentaufnahme des inflammatorischen Status und berücksichtigt nicht die dynamischen Veränderungen, die während der gesamten Schwangerschaft auftreten könnten. Longitudinale Messungen wären erforderlich, um ein umfassenderes Bild der inflammatorischen Prozesse während der Schwangerschaft zu erhalten.

Die histologischen Analysen der Gewebeproben wurden in mehreren Durchgängen von Hand durchgeführt, wobei die Intensität der Färbungen heterogen ausfiel. Diese Variabilität in der Färbungsintensität könnte auf Unterschiede in der Handhabung und den Färbeprozessen zurückzuführen sein, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beeinflussen kann und somit ggf. verfälschen mag.

Ein weiteres methodisches Problem trat unvermeidlich bei der Verwendung von QuPath auf. QuPath erkannte teilweise Erythrozyten aufgrund ihrer ähnlichen Anfärbung als Gewebe. Dies führte zu einer fehlerhaften Identifizierung, da Erythrozyten nicht zur Bewertung der Gewebeproben herangezogen werden sollten. Diese Fehlklassifikationen könnten die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Analyse beeinträchtigen und erfordern eine sorgfältige Überprüfung und Korrektur der automatisch generierten Daten.

Zudem stellte sich die Auswertung der histologischen Schnitte als zeitaufwändig heraus, da das humane Gewebe sehr groß war und die manuelle Analyse entsprechend lange dauerte. Diese Herausforderung unterstreicht die Notwendigkeit effizienterer Methoden und möglicherweise den Einsatz automatisierter Technologien zur Verbesserung der Analysegeschwindigkeit und -präzision. Trotz dieser Herausforderungen liefert die histologische Analyse wertvolle Einblicke in die Gewebestruktur und Zellzusammensetzung, die für das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen bei Gestationsdiabetes und anderen Schwangerschaftskomplikationen entscheidend sind.

Resümierend bleibt hinsichtlich der Histologie festzuhalten, dass diese Ergebnisse nahelegen, dass zukünftige Studien von standardisierten Färbeprotokollen und verbesserten Analysetechniken profitieren könnten, um die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der histologischen Untersuchungen zu erhöhen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genannten Limitationen die Aussagekraft der Ergebnisse einschränken könnten. Zukünftige Studien sollten versuchen, diese Limitationen zu adressieren, um robustere und generalisierbarere Ergebnisse zu erzielen.

#### Zusammenfassung der Diskussion

In der Zusammenschau aller durchgeführten Analysen zeigt sich ein konsistentes Bild: Keiner der untersuchten Parameter deutet auf eine erhöhte Inflammation bei Schwangeren mit Übergewicht oder Adipositas hin, unabhängig vom Vorliegen eines GDM. Weder die Analyse der Inflammationsmarker im Blut noch die Untersuchung der Immunzellinfiltration in der Plazenta wiesen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einigen Studien, die ebenfalls keine erhöhten inflammatorischen Reaktionen bei Schwangeren mit GDM und/oder Adipositas feststellen konnten. Dies unterstreicht, dass die Daten in ihrer Gesamtheit schlüssig sind und keine Hinweise auf eine verstärkte Entzündungsreaktion liefern, was die Hypothese einer erhöhten Inflammation bei dieser Patientinnengruppe infrage stellt.

Hinsichtlich Methoden und Studienvergleichen ist es wichtig anzumerken, dass die Datenlage in der Literatur insgesamt kontrovers ist, mit einigen Studien, die signifikante Unterschiede in den inflammatorischen Parametern berichten, und anderen, die wie unsere Untersuchung keine signifikanten Unterschiede feststellen konnten. Diese Diskrepanz könnte auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein, einschließlich unterschiedlicher Methodiken, variierender Einschlusskriterien sowie unterschiedlicher Zeitpunkte der Probenentnahme. Unsere Studie, die auf Term-Plazenten und Blutproben basiert, könnte zum Beispiel durch den natürlichen Anstieg von Zytokinen zum Ende der Schwangerschaft beeinflusst worden sein, was die Unterschiede zwischen den Gruppen verwischen könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Cindrova-Davies T, Sferruzzi-Perri AN. Human placental development and function. *Semin Cell Dev Biol* 2022; **131**: 66–77.
- 2 Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. *Development* 2019; **146**. DOI:10.1242/dev.163428.
- 3 Holder B, Aplin JD, Gomez-Lopez N, *et al.* ‘Fetal side’ of the placenta: anatomical mis-annotation of carbon particle ‘transfer’ across the human placenta. *Nat Commun* 2021; **12**: 7049.
- 4 Herrick EJ, Bordoni B. Embryology, Placenta. 2023.
- 5 Engel N, & SJU. Entwicklung des Plazentarkreislaufes. In: Die geburtshilfliche Anästhesie. 2017: 105–7.
- 6 Stangl GI. Ernährung der Schwangeren und pränatale Entwicklung des Kindes . In: Ernährung-Physiologische und Praktische Grundlagen . Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2021: 145–65.
- 7 Włoch S, Pałasz A, Kamiński M. Active and passive transport of drugs in the human placenta. *Ginekol Pol* 2009; **80**: 772–7.
- 8 Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; **5**: 6.
- 9 Costa MA. The endocrine function of human placenta: an overview. *Reprod Biomed Online* 2016; **32**: 14–43.
- 10 Albrecht M, Arck PC. Vertically Transferred Immunity in Neonates: Mothers, Mechanisms and Mediators. *Front Immunol* 2020; **11**: 555.
- 11 Orefice R. Immunology and the immunological response in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2021; **76**: 3–12.
- 12 Pan X, Jin X, Wang J, Hu Q, Dai B. Placenta inflammation is closely associated with gestational diabetes mellitus. *Am J Transl Res* 2021; **13**: 4068–79.
- 13 Graf I, Hecher K, Arck P. Immunologie der Schwangerschaft: von lokalen und systemischen Protagonisten zum High-Content-Immunprofiling. *Die Gynäkologie* 2022; **55**: 631–9.
- 14 Li X, Zhou J, Fang M, Yu B. Pregnancy immune tolerance at the maternal-fetal interface. *Int Rev Immunol* 2020; **39**: 247–63.
- 15 Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod Update* 2003; **9**: 347–57.
- 16 Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 2004; **114**: 397–407.
- 17 Faas MM, de Vos P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta* 2017; **56**: 44–52.
- 18 Bulmer JN, Williams PJ, Lash GE. Immune cells in the placental bed. *Int J Dev Biol* 2010; **54**: 281–94.
- 19 Yang F, Zheng Q, Jin L. Dynamic Function and Composition Changes of Immune Cells During Normal and Pathological Pregnancy at the Maternal-Fetal Interface. *Front Immunol* 2019; **10**: 2317.
- 20 von Rango U. Fetal tolerance in human pregnancy--a crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. *Immunol Lett* 2008; **115**: 21–32.
- 21 Kautzky-Willer A, Harreiter J, Bancher-Todesca D, *et al.* [Gestational diabetes mellitus]. *Wien Klin Wochenschr* 2016; **128 Suppl 2**: S103-12.
- 22 McIntyre HD, Catalano P, Zhang C, Desoye G, Mathiesen ER, Damm P. Gestational diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* 2019; **5**: 47.

- 23 Zhang C, Rawal S, Chong YS. Risk factors for gestational diabetes: is prevention possible? *Diabetologia* 2016; **59**: 1385–90.
- 24 Schäfer-Graf U, Laubner K, Hummel S, *et al.* Gestationsdiabetes mellitus (GDM), Diagnostik, Therapie und Nachsorge. *Der Diabetologe* 2021; **17**: 538–48.
- 25 Schäfer-Graf U, Laubner K, Hummel S, *et al.* Gestationsdiabetes mellitus (GDM), Diagnostik, Therapie und Nachsorge. *Der Diabetologe* 2022; **18**: 49–58.
- 26 Yeung RO, Hannah-Shmouni F, Niederhoffer K, Walker MA. Not quite type 1 or type 2, what now? Review of monogenic, mitochondrial, and syndromic diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 2018; **19**: 35–52.
- 27 Weiss PAM. Der Gestationsdiabetes. In: Diabetes und Schwangerschaft. Vienna: Springer Vienna, 2002: 135–296.
- 28 Varlemann H. Durst, Sehstörungen, Müdigkeit... *ProCare* 2019; **24**: 16–8.
- 29 Osaki A, Shimoda Y, Okada J, *et al.* Lower Renal Threshold for Glucose Reabsorption in Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) May Explain the Smaller Contribution of SGLT2 Inhibitors to the Improvement of Plasma Glucose Control Compared with T2DM. *Diabetes Ther* 2019; **10**: 1531–4.
- 30 Kleinwechter H. Erratum: Aktuelles zum Gestationsdiabetes mellitus. *Diabetes aktuell* 2020; **18**: E1–3.
- 31 Schäfer-Graf U, Gembruch U, Kainer F, *et al.* Gestational Diabetes Mellitus (GDM) – Diagnosis, Treatment and Follow-Up. Guideline of the DDG and DGGG (S3 Level, AWMF Registry Number 057/008, February 2018). *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2018; **78**: 1219–31.
- 32 Gestationsdiabetes — D. m. und Schwangerschaft. In: Diabetes 1×1. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg: 25–33.
- 33 Yogev Y, Visser GHA. Obesity, gestational diabetes and pregnancy outcome. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009; **14**: 77–84.
- 34 Marchi J, Berg M, Dencker A, Olander EK, Begley C. Risks associated with obesity in pregnancy, for the mother and baby: a systematic review of reviews. *Obes Rev* 2015; **16**: 621–38.
- 35 Ashraf Soliman, Shayma Ahmad, Fawzia Alyafei, Nada Alaaraj, Nada Soliman. Maternal, placental, and fetal Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-1) and IGF Binding proteins (IGFBPs) in Diabetic pregnancies: Effects on fetal growth and birth size. *World Journal of Advanced Research and Reviews* 2023; **17**: 287–95.
- 36 Simpson LL. Maternal medical disease: risk of antepartum fetal death. *Semin Perinatol* 2002; **26**: 42–50.
- 37 Groten T. Update Gestationsdiabetes. *gynäkologie + geburtshilfe* 2018; **23**: 32–9.
- 38 Joppich G, Schulte FJ. Neurologie der Kinder diabetischer Mütter. Die verschiedenen Formen der Fruchtschädigung beim Diabetes der Mutter. In: Neurologie des Neugeborenen. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1968: 238–46.
- 39 Schäfer-Graf U. Adipositas und Schwangerschaft. *Der Diabetologe* 2016; **12**: 6–12.
- 40 st. Gestationsdiabetes: erhöhtes Diabetesrisiko für das Kind. *MMW Fortschr Med* 2019; **161**: 9–9.
- 41 Gestationsdiabetes: Langzeitrisiken für Mutter und Kind. *CME* 2015; **12**: 1–1.
- 42 Kleinwechter H, Laubner K. Konservative und medikamentöse Therapie des Gestationsdiabetes mellitus. *Der Diabetologe* 2019; **15**: 710–6.
- 43 Schäfer-Graf U, Laubner K, Hummel S, *et al.* Gestationsdiabetes mellitus (GDM), Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Praxisempfehlung – Kurzfassung der S3-Leitlinie (AWMF-Registernummer: 057-008). *Diabetologie und Stoffwechsel* 2020; **15**: S101–11.
- 44 Gestationsdiabetes: Folgen nach der Schwangerschaft? *Heilberufe* 2018; **70**: 22–22.

- 45 Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes Res* 1998; **6 Suppl 2**: 51S-209S.
- 46 Schipf S, Markus MRP, Dörr M. Diabetes mellitus und Metabolisches Syndrom bei Erwachsenen – Prävalenz, Bedeutung und Implikationen für die Prävention und Gesundheitsförderung. 2021: 841–54.
- 47 Willenberg HS, Führer A, Mitzner S. Therapie des metabolischen Syndroms. *Die Nephrologie* 2022; **17**: 319–24.
- 48 Engin A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. 2017: 1–17.
- 49 Kachur S, Lavie CJ, de Schutter A, Milani R V, Ventura HO. Obesity and cardiovascular diseases. *Minerva Med* 2017; **108**: 212–28.
- 50 Mensink GBM, Schienkiewitz A, Haftenberger M, Lampert T, Ziese T, Scheidt-Nave C. Übergewicht und Adipositas in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2013; **56**: 786–94.
- 51 AdiMon-Themenblatt: Schwangerschaft . Berlin, 2020.
- 52 Catalano PM, Shankar K. Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *BMJ* 2017; **356**: j1.
- 53 Roberts KA, Riley SC, Reynolds RM, *et al.* Placental structure and inflammation in pregnancies associated with obesity. *Placenta* 2011; **32**: 247–54.
- 54 Catalano PM, Shankar K. Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *BMJ* 2017; **356**: j1.
- 55 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**: e290-6.
- 56 Gaillard R. Maternal obesity during pregnancy and cardiovascular development and disease in the offspring. *Eur J Epidemiol* 2015; **30**: 1141–52.
- 57 Wentzel P, Eriksson UJ, Herrera E. High-fat diet in pregnant rats and adverse fetal outcome. *Ups J Med Sci* 2019; **124**: 125–34.
- 58 Pantham P, Aye ILMH, Powell TL. Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. *Placenta* 2015; **36**: 709–15.
- 59 Schmitz L, Kuglin R, Bae-Gartz I, *et al.* Hippocampal insulin resistance links maternal obesity with impaired neuronal plasticity in adult offspring. *Psychoneuroendocrinology* 2018; **89**: 46–52.
- 60 Ferrari N, Bae-Gartz I, Bauer C, *et al.* Exercise during pregnancy and its impact on mothers and offspring in humans and mice. *J Dev Orig Health Dis* 2018; **9**: 63–76.
- 61 Harmon AC, Cornelius DC, Amaral LM, *et al.* The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clin Sci (Lond)* 2016; **130**: 409–19.
- 62 Das UN. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition* 2001; **17**: 953–66.
- 63 Tessier DR, Ferraro ZM, Gruslin A. Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity. *Placenta* 2013; **34**: 205–11.
- 64 Nogue P, Dos Santos E, Couturier-Tarrade A, *et al.* Maternal Obesity Influences Placental Nutrient Transport, Inflammatory Status, and Morphology in Human Term Placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2021; **106**: e1880–96.
- 65 Aye ILMH, 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**: 129.
- 66 Challier JC, Basu S, Bintein T, *et al.* Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta* 2008; **29**: 274–81.
- 67 Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, *et al.* TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* 2002; **51**: 2207–13.

- 68 Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V. Role of Leptin in Inflammation and Vice Versa. *Int J Mol Sci* 2020; **21**. DOI:10.3390/ijms21165887.
- 69 Appel S, Turnwald E-M, Alexandre-Alcazar MA, *et al.* Leptin does not induce an inflammatory response in the murine placenta. *Horm Metab Res* 2014; **46**: 384–9.
- 70 Nogues P, Dos Santos E, Couturier-Tarrade A, *et al.* Maternal Obesity Influences Placental Nutrient Transport, Inflammatory Status, and Morphology in Human Term Placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2021; **106**: e1880–96.
- 71 Appel S, Schulze-Edinghausen M, Kretschmer T, *et al.* Maternal obesity attenuates predelivery inflammatory reaction in C57BL/6N mice. *J Reprod Immunol* 2017; **122**: 10–3.
- 72 De Bleecker JL, Engel AG. Immunocytochemical study of CD45 T cell isoforms in inflammatory myopathies. *Am J Pathol* 1995; **146**: 1178–87.
- 73 Elhusseini T. Effects Of Gestational Diabetes Mellitus On Hematopoietic Stem cell quality and IL6 Amount. In: Qatar Foundation Annual Research Conference Proceedings Volume 2018 Issue 2. Hamad bin Khalifa University Press (HBKU Press), 2018. DOI:10.5339/qfarc.2018.HBPD13.
- 74 Nogues P, Dos Santos E, Couturier-Tarrade A, *et al.* Maternal Obesity Influences Placental Nutrient Transport, Inflammatory Status, and Morphology in Human Term Placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2021; **106**: e1880–96.
- 75 Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, *et al.* Massive chronic intervillitis of the placenta associated with malaria infection. *Am J Surg Pathol* 1998; **22**: 1006–11.
- 76 Ward EJ, Bert S, Fanti S, *et al.* Placental Inflammation Leads to Abnormal Embryonic Heart Development. *Circulation* 2023; **147**: 956–72.
- 77 Boenisch S, Fae P, Drexel H, Walli AK, Fraunberger P. Spielen CRP-Spiegel neben IL-6 und PCT noch eine Rolle für Patienten auf Intensivstationen?/Are circulating levels of CRP compared to IL-6 and PCT still relevant in intensive care unit patients? *Laboratoriumsmedizin* 2013; **37**: 1–11.
- 78 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**: 29–35.
- 79 Calabrò P, Golia E, Yeh ETH. CRP and the risk of atherosclerotic events. *Semin Immunopathol* 2009; **31**: 79–94.
- 80 Jeong H, Baek S-Y, Kim SW, *et al.* C reactive protein level as a marker for dyslipidaemia, diabetes and metabolic syndrome: results from the Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *BMJ Open* 2019; **9**: e029861.
- 81 Amirian A, Rahnamaei FA, Abdi F. Role of C-reactive Protein(CRP) or high-sensitivity CRP in predicting gestational diabetes Mellitus: Systematic review. *Diabetes Metab Syndr* 2020; **14**: 229–36.
- 82 Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 2015; **16**: 448–57.
- 83 Huang T, Song J, Gao J, *et al.* Adipocyte-derived kynurenine promotes obesity and insulin resistance by activating the AhR/STAT3/IL-6 signaling. *Nat Commun* 2022; **13**: 3489.
- 84 Rehman K, Akash MSH, Liaqat A, Kamal S, Qadir MI, Rasul A. Role of Interleukin-6 in Development of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2017; **27**: 229–36.
- 85 Kuzmicki M, Telejko B, Szamatowicz J, *et al.* High resistin and interleukin-6 levels are associated with gestational diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol* 2009; **25**: 258–63.
- 86 Amirian A, Mahani MB, Abdi F. Role of interleukin-6 (IL-6) in predicting gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol Sci* 2020; **63**: 407–16.
- 87 Remick DG. Interleukin-8. *Crit Care Med* 2005; **33**: S466-7.

- 88 Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992; **307**: 97–101.
- 89 Straczkowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Dzienis-Straczkowska S, Szelachowska M, Kinalska I. Plasma interleukin 8 concentrations in obese subjects with impaired glucose tolerance. *Cardiovasc Diabetol* 2003; **2**: 5.
- 90 Farhan Mohammed IN, Motawa IA, Abd El Monem Aly M, Mohammed Metwally , Mahmoud Mohammed. Assessment of Interleukin (8) in Type 2 Diabetes Mellitus. *Egypt J Hosp Med* 2018; **72**: 4403–6.
- 91 Lappas M, Permezel M, Rice GE. Release of proinflammatory cytokines and 8-isoprostane from placenta, adipose tissue, and skeletal muscle from normal pregnant women and women with gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 5627–33.
- 92 Sudharshana Murthy KA, Bhandiwada A, Chandan SL, Gowda SL, Sindhusree G. Evaluation of Oxidative Stress and Proinflammatory Cytokines in Gestational Diabetes Mellitus and Their Correlation with Pregnancy Outcome. *Indian J Endocrinol Metab* 2018; **22**: 79–84.
- 93 Dinarello CA. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. *Semin Immunol* 2013; **25**: 389–93.
- 94 Spranger J, Kroke A, Möhlig M, *et al.* Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 2003; **52**: 812–7.
- 95 Osborn O, Gram H, Zorrilla EP, Conti B, Bartfai T. Insights into the roles of the inflammatory mediators IL-1, IL-18 and PGE2 in obesity and insulin resistance. *Swiss Med Wkly* 2008; **138**: 665–73.
- 96 Wieser V, Moschen AR, Tilg H. Inflammation, cytokines and insulin resistance: a clinical perspective. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2013; **61**: 119–25.
- 97 Sivaraj N, K V R, Suvvari TK, Prasad S, Boppana SH, Vegi PK. Association of IL1R1 gene (SNP rs2071374) with the risk of preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2022; **149**: 103463.
- 98 Singh S, Anshita D, Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol* 2021; **101**: 107598.
- 99 Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2009; **29**: 313–26.
- 100 Briana DD, Boutsikou M, Baka S, *et al.* Perinatal Plasma Monocyte Chemotactic Protein-1 Concentrations in Intrauterine Growth Restriction. *Mediators Inflamm* 2007; **2007**: 1–5.
- 101 Aye ILMH, 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**: 129.
- 102 Awasthi A, Carrier Y, Peron JPS, *et al.* A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* 2007; **8**: 1380–9.
- 103 Mitsuyama K, Tomiyasu N, Takaki K, *et al.* Interleukin-10 in the pathophysiology of inflammatory bowel disease: increased serum concentrations during the recovery phase. *Mediators Inflamm* 2006; **2006**: 26875.
- 104 Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 683–765.
- 105 Lobo-Silva D, Carriche GM, Castro AG, Roque S, Saraiva M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J Neuroinflammation* 2016; **13**: 297.

- 106 Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 170–81.
- 107 Beebe AM, Cua DJ, de Waal Malefyt R. The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; **13**: 403–12.
- 108 Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 683–765.
- 109 Thaxton JE, Sharma S. REVIEW ARTICLE: Interleukin-10: A Multi-Faceted Agent of Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* 2010; **63**: 482–91.
- 110 ŽÁK P, SOUČEK M. Correlation of Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin 6 and Interleukin 10 With Blood Pressure, Risk of Preeclampsia and Low Birth Weight in Gestational Diabetes. *Physiol Res* 2019; : 395–408.
- 111 Cubro H, Kashyap S, Nath MC, Ackerman AW, Garovic VD. The Role of Interleukin-10 in the Pathophysiology of Preeclampsia. *Curr Hypertens Rep* 2018; **20**: 36.
- 112 Kang J, Lee C-N, Li H-Y, Hsu K-H, Lin S-Y. Genome-wide DNA methylation variation in maternal and cord blood of gestational diabetes population. *Diabetes Res Clin Pract* 2017; **132**: 127–36.
- 113 van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJM, *et al.* Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes : the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes* 2002; **51**: 1088–92.
- 114 Atègbo J-M, Grissa O, Yessoufou A, *et al.* Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 4137–43.
- 115 Al-Shukaili A, Al-Ghafri S, Al-Marhoobi S, Al-Abri S, Al-Lawati J, Al-Maskari M. Analysis of inflammatory mediators in type 2 diabetes patients. *Int J Endocrinol* 2013; **2013**: 976810.
- 116 Yaghini N, Mahmoodi M, Asadikaram GR, Hassanshahi GH, Khoramdelazad H, Kazemi Arababadi M. Serum levels of interleukin 10 (IL-10) in patients with type 2 diabetes. *Iran Red Crescent Med J* 2011; **13**: 752.
- 117 Saxena M, Srivastava N, Banerjee M. Association of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Mol Biol Rep* 2013; **40**: 6271–9.
- 118 Huang X, Zha B, Zhang M, *et al.* Decreased Monocyte Count Is Associated With Gestational Diabetes Mellitus Development, Macrosomia, and Inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 2022; **107**: 192–204.
- 119 Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol* 1998; **30**: 293–8.
- 120 Massagué J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph DA, Weis FM, Zentella A. Transforming growth factor-beta. *Cancer Surv* 1992; **12**: 81–103.
- 121 Burt DW, Law AS. Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Prog Growth Factor Res* 1994; **5**: 99–118.
- 122 Guo Y, Gupte M, Umbarkar P, *et al.* Entanglement of GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin and TGF- $\beta$ 1 signaling network to regulate myocardial fibrosis. *J Mol Cell Cardiol* 2017; **110**: 109–20.
- 123 Yener S, Demir T, Akinci B, *et al.* Transforming growth factor-beta 1 levels in women with prior history of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; **76**: 193–8.
- 124 Reeves WB, Andreoli TE. Transforming growth factor beta contributes to progressive diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 7667–9.
- 125 Garcia-Lloret MI, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ. Monocytes adhering by LFA-1 to placental syncytiotrophoblasts induce local apoptosis via release of TNF-alpha. A model for hematogenous initiation of placental inflammations. *J Leukoc Biol* 2000; **68**: 903–8.

- 126 Mrizak I, Grissa O, Henault B, *et al.* Placental infiltration of inflammatory markers in gestational diabetic women. *Gen Physiol Biophys* 2014; **33**: 169–76.
- 127 Hantschke M, Palmedo G. Immunhistologische Techniken. In: Histopathologie der Haut. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015: 1–28.
- 128 SELA M, ANFINSEN CB, HARRINGTON WF. The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure. *Biochim Biophys Acta* 1957; **26**: 502–12.
- 129 Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, *et al.* The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 2002; **12**: 996–1006.
- 130 Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath* 2013; **3**: 71–85.
- 131 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 2001; **25**: 402–8.
- 132 Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol* 2011; **29**: 415–45.
- 133 Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* 2003; **112**: 1796–808.
- 134 Plows JF, Stanley JL, Baker PN, Reynolds CM, Vickers MH. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* 2018; **19**: 3342.
- 135 Alfadhli EM. Maternal obesity influences birth weight more than gestational diabetes. *BMC Pregnancy Childbirth* 2021; **21**: 111.
- 136 Maya J, Selen DJ, Thaweethai T, *et al.* Gestational Glucose Intolerance and Birth Weight–Related Complications. *Obstetrics & Gynecology* 2023; **142**: 594–602.
- 137 Yamamoto JM, Kellett JE, Balsells M, *et al.* Gestational Diabetes Mellitus and Diet: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials Examining the Impact of Modified Dietary Interventions on Maternal Glucose Control and Neonatal Birth Weight. *Diabetes Care* 2018; **41**: 1346–61.
- 138 Cioffi DL. Redox Regulation of Endothelial Canonical Transient Receptor Potential Channels. *Antioxid Redox Signal* 2011; **15**: 1567–82.
- 139 Wueest S, Seelig E, Timper K, *et al.* IL-6 Receptor Blockade Increases Circulating Adiponectin Levels in People with Obesity: An Explanatory Analysis. *Metabolites* 2021; **11**: 79.
- 140 Lappas M, Permezel M, Rice GE. Release of Proinflammatory Cytokines and 8-Isoprostane from Placenta, Adipose Tissue, and Skeletal Muscle from Normal Pregnant Women and Women with Gestational Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 5627–33.
- 141 Zacarías MF, Collado MC, Gómez-Gallego C, *et al.* Pregestational overweight and obesity are associated with differences in gut microbiota composition and systemic inflammation in the third trimester. *PLoS One* 2018; **13**: e0200305.
- 142 Retnakaran R, Hanley AJG, Raif N, Connelly PW, Sermer M, Zinman B. C-Reactive Protein and Gestational Diabetes: The Central Role of Maternal Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 3507–12.
- 143 Brown CM, Turner ST, Bailey KR, *et al.* Hypertension in pregnancy is associated with elevated C-reactive protein levels later in life. *J Hypertens* 2013; **31**: 2213–9.
- 144 Ma Y, Ye W, Tang Y. Gestational diabetes mellitus increases the baseline level of procalcitonin in maternal blood but not in umbilical cord blood in late pregnancy. *Medicine* 2019; **98**: e14914.

- 145 Christian LM, Porter K. Longitudinal changes in serum proinflammatory markers across pregnancy and postpartum: Effects of maternal body mass index. *Cytokine* 2014; **70**: 134–40.
- 146 Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the Placenta and Extra-placental Membranes: Roles and Regulation During Human Pregnancy and Parturition. *Placenta* 2002; **23**: 257–73.
- 147 Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the Placenta and Extra-placental Membranes: Roles and Regulation During Human Pregnancy and Parturition. *Placenta* 2002; **23**: 257–73.
- 148 Lappas M, Hiden U, Desoye G, Froehlich J, Mouzon SH, Jawerbaum A. The Role of Oxidative Stress in the Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Antioxid Redox Signal* 2011; **15**: 3061–100.
- 149 De Luccia TPB, Pendelowski KPT, Ono E, *et al.* Unveiling the pathophysiology of gestational diabetes: Studies on local and peripheral immune cells. *Scand J Immunol* 2020; **91**. DOI:10.1111/sji.12860.
- 150 Vilotić A, Nacka-Aleksić M, Pirković A, Bojić-Trbojević Ž, Dekanski D, Jovanović Krivokuća M. IL-6 and IL-8: An Overview of Their Roles in Healthy and Pathological Pregnancies. *Int J Mol Sci* 2022; **23**: 14574.
- 151 Sandoval-Colin DE, Godines-Enriquez MS, Espejel-Núñez A, *et al.* Cervicovaginal Cytokines to Predict the Onset of Normal and Preterm Labor: a Pseudo-longitudinal Study. *Reproductive Sciences* 2023; **30**: 221–32.
- 152 Braga FO, Negrato CA, Matta M de FB da, Carneiro JRI, Gomes MB. Relationship between inflammatory markers, glycated hemoglobin and placental weight on fetal outcomes in women with gestational diabetes. *Arch Endocrinol Metab* 2019; **63**: 22–9.
- 153 Kretschmer T, Schulze-Edinghausen M, Turnwald E-M, *et al.* Effect of Maternal Obesity in Mice on IL-6 Levels and Placental Endothelial Cell Homeostasis. *Nutrients* 2020; **12**: 296.
- 154 Mrizak I, Grissa O, Henault B, *et al.* Placental infiltration of inflammatory markers in gestational diabetic women. *Gen Physiol Biophys* 2014; **33**: 169–76.

## 7 Anhang

Gen	Kontrolle						Anzahl
	MW		SD		Std.-Fehler		
	absolute	relative	absolute	relative	absolute	relative	
IL-6	1,12	1,00	0,42	0,37	0,080	0,071	27
IL-10	4,43	1,00	4,81	1,09	0,982	0,222	24
IL-1R1	1,30	1,00	0,70	0,54	0,136	0,104	27
TGF- $\beta$	1,50	1,00	1,12	0,75	0,216	0,144	27
MCP-1	1,32	1,00	0,81	0,61	0,155	0,117	27

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Tabelle 48: Auswertung RT-PCR der Kontrollgruppe

Es zeigte sich eine lineare, positive Korrelation zwischen der Stained Area und der Anzahl an positiven CD45-Zellen. Dieser Zusammenhang ließ sich sowohl in den Subgruppen als auch in der gesamten Stichprobe identifizieren (siehe Tabelle 49): In der Gruppe UGAD fiel der Korrelationskoeffizient mit 0,90 am höchsten aus. Dies bedeutet einen starken positiven linearen Zusammenhang zwischen dem Wert der Stained Area und der Anzahl an CD45+ Zellen ( $p < 0,05$ ). Für die Grundgesamtheit von  $n=59$  Plazenten fiel der Koeffizient mit  $r=0,78$  ( $p < 0,01$ ) geringfügig niedriger aus. Somit stieg tendenziell bei allen Gruppen die Anzahl von CD45+ Zellen, wenn auch die Größe der Stained Area wuchs. Alle Korrelationen wiesen statistische Signifikanz auf dem Level von 5% auf. Somit wurde mit der selbst etablierten Methode der Zellfärbung eine zuverlässige Detektion der Zellen ermöglicht.

Korrelation von Stained Area & CD45+ Zellen	Pearson's r
KG (n=20)	0,78*
UGAD+GDM (n=20)	0,75*
UGAD (n=19)	0,90*
Gesamt (n=59)	0,76*

\*  $p < 0,05$

Tabelle 49: Korrelation von Stained Area und CD45±positiven Zellen

## 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die „fetale Seite“ der Plazenta: .....	14
Abbildung 2: Vor Präparation      Abbildung 3: Nach Präparation .....	46
Abbildung 4: Unterteilung der Gewebeproben in randomisiert ausgewählte Tiles mittels QuPath (Scale Bar = 2 mm) .....	50
Abbildung 5: Beispiel für die Gewebeerkenkung (lila) und „Positive Cell Detection“ (rot). Scale Bar unten links: 50 µm .....	53
Abbildung 6: CD45-Zellen .....	75
Abbildung 7: Melt Curve TNF- $\alpha$ : .....	78
Abbildung 8: Melt Curve IL-6: .....	79
Abbildung 9: Mittelwerte der relativen Genexpressionen .....	80

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Definition von Übergewicht und Adipositas nach Body-Mass-Index <sup>45</sup> .....	20
Tabelle 2: Verwendete Geräte .....	31
Tabelle 3: Softwares und interaktive Websites .....	33
Tabelle 4: Chemikalien .....	36
Tabelle 5: Puffer und Stammlösungen .....	37
Tabelle 6: Antikörper für Immunhistochemie .....	38
Tabelle 7: Oligonukleotide und verwendete Konzentrationen .....	39
Tabelle 8: Liste der Verbrauchsmaterialien und Verwendung .....	41
Tabelle 9: Einschluss- und Ausschlusskriterien .....	42
Tabelle 10: Auszug aus dem „Fragebogen zur Aufklärung“ .....	43
Tabelle 11: Kohorteneinteilung .....	44
Tabelle 12: Erfassung der Daten zur Plazenta .....	45
Tabelle 13: Beispielparameter für die Gewebeerkenkung in QuPath .....	51
Tabelle 14: Beispielparameter für „Positive Cell Detection“ in QuPath .....	52
Tabelle 15: Bedingungen qPCR SYBR® Green .....	56
Tabelle 16: Reaktionsvolumen pro Template .....	59
Tabelle 17: Ausschlussgründe aus der Analyse .....	61
Tabelle 18: Gruppenbezeichnungen und -größe .....	61
Tabelle 19: Deskriptive Analyse ausgewählter Variablen zur Plazentakohorte .....	62
Tabelle 20: Deskriptive Statistik - Geburtsgewicht in g .....	63
Tabelle 21: ANOVA + Bonferroni - Geburtsgewicht in g .....	63
Tabelle 22: Deskriptive Statistik - Systolischer Blutdruck in mmHg bei letzter Dokumentation vor Sectio .....	64

Tabelle 23: ANOVA+Bonferroni - Systolischer Blutdruck in mmHg bei letzter Dokumentation vor Sectio.....	64
Tabelle 24: Deskriptive Statistik - Diastolischer Blutdruck in mmHg bei letzter Dokumentation vor Sectio.....	65
Tabelle 25: ANOVA+Bonferroni - Diastolischer Blutdruck in mmHg bei letzter Dokumentation vor Sectio.....	65
Tabelle 26: Deskriptive Statistik Geburtslänge (cm) .....	66
Tabelle 27: ANOVA+Bonferroni - Geburtslänge (cm).....	66
Tabelle 28: Deskriptive Statistik Nabelarterie (pH) .....	67
Tabelle 29: ANOVA+Bonferroni - Nabelarterie (pH).....	67
Tabelle 30: Deskriptive Statistik Plazentagewicht (g) .....	68
Tabelle 31: ANOVA+Bonferroni - Plazentagewicht (g) .....	68
Tabelle 32: Deskriptive Statistik CRP (mg/l) maternal.....	69
Tabelle 33: ANOVA+Bonferroni - CRP (mg/l) im maternalen Blut.....	69
Tabelle 34: Deskriptive Statistik Leukozyten maternal.....	70
Tabelle 35: ANOVA+Bonferroni - Leukozytenzahl im maternalen Blut.....	70
Tabelle 36: Deskriptive Statistik IL6- maternal.....	71
Tabelle 37: ANOVA+Bonferroni - IL-6 im maternalen Blut.....	71
Tabelle 38: Deskriptive Statistik IL-8 maternal.....	72
Tabelle 39: ANOVA+Bonferroni - IL-8 im maternalen Blut.....	72
Tabelle 40: Deskriptive Statistik IL-6 fetal.....	73
Tabelle 41: ANOVA+Bonferroni - IL-6 im fetalen Blut.....	73
Tabelle 42: Deskriptive Statistik IL-8 fetal.....	74
Tabelle 43: ANOVA+Bonferroni - IL-8 im fetalen Blut.....	74
Tabelle 44: Anzahl Plazenten und Anzahl der Samples nach Gruppe. ....	76
Tabelle 45: Deskriptive Analyse der histologischen Analyse CD45 positiver Zellen in Plazentaschnitten.....	76
Tabelle 46: ANOVA CD45-Zellen.....	77
Tabelle 47: RT-qPCR – Gruppenvergleiche der relativen Genexpressionen.....	81
Tabelle 48: Auswertung RT-PCR der Kontrollgruppe.....	101
Tabelle 49: Korrelation von Stained Area und CD45±positiven Zellen .....	101