

Diplomarbeit

**Veränderungen der fetoplazentaren Blutgefäße  
durch maternalen Gestationsdiabetes**

eingereicht von

**Yvonne Elisabeth Sommer**

03. Dezember 1988

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe**

unter der Anleitung von

**Univ.-Prof. Dr. phil. Gernot Desoye**

**Dr. rer. nat. Ursula Hiden**

Graz, 30. Oktober 2013

(Unterschrift)

## *Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 30.10.2013*

*Unterschrift*

## **Danksagungen**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. phil. Gernot Desoye für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Diplomarbeit bedanken. Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Ursula Hiden, für die großartige Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit, für das ständige Korrekturlesen und die guten Tipps, die sie mir immer wieder gegeben hat. Auch bei Frau Heidi Miedl und dem gesamten Laborteam möchte ich mich herzlich für all die Hilfe bedanken.

Meinen Eltern Heinz und Elsbeth Sommer möchte ich von ganzen Herzen für all die liebevolle Unterstützung bedanken, die sie mir während des Studiums und meines bisherigen Lebens entgegengebracht haben. Sie haben immer an mich geglaubt und ohne sie wäre ich niemals da so weit gekommen. Gleiches gilt für meine Geschwister Anne, Martin und Hendrik, die immer ein offenes Ohr haben und auf die ich mich immer verlassen kann.

Großer Dank geht auch an meinen Freund Stefan Neunherz, für seine Hilfe und seine unglaubliche Geduld. Er hat mir nicht nur bei technischen Fragen zur Seite gestanden, sondern mich auch immer wieder mit den richtigen Worten motiviert.

Auch all meinen Freunden, die mich durch das Studium und teilweise auch schon seit der Schulzeit begleitet haben, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken!

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Gestationsdiabetes (GDM) gehört in Europa zu den häufigsten Schwangerschaftskomplikationen. Als GDM wird eine Glukoseintoleranzstörung definiert, die erstmalig in der Schwangerschaft aufgetreten oder diagnostiziert worden ist. Die veränderte maternale Stoffwechsellage nimmt auf anatomischer und molekularer Ebene Einfluss auf Aufbau und Funktion der Plazenta. Komplikationen können sowohl für die Mutter, als auch für das ungeborene Kind kurzfristig und auch langfristig auftreten, so haben z.B. Kinder von Frauen mit Schwangerschaftsdiabetes ein erhöhtes Risikoprofil für kardiovaskuläre Erkrankungen im Erwachsenenalter. Außerdem entwickeln sie im Laufe ihres Lebens häufiger Übergewicht und Diabetes mellitus Typ 2. Deshalb ist es wichtig GDM und dessen Folgen zu untersuchen um die ablaufenden Prozesse zu verstehen und ihnen durch prophylaktische oder therapeutische Maßnahmen entgegen wirken zu können.

**Methodik:** Im ersten Teil der Diplomarbeit wurden aus je zwölf arteriellen und zwölf venösen fetoplazentaren Gefäßen von Frauen mit Gestationsdiabetes und von einer Kontrollgruppe, RNA mittels Tri-Reagent-Methode hergestellt und danach cDNA mittels Superscript-II synthetisiert. Anschließend wurde die Expression folgender Marker mit RT-PCR in Duplikaten gemessen und mit dem Houskeeping-Gene L30 verglichen: VEGFA, FLT1, sFLT1, KDR, FGF2, FGFR1, FGFR2, CDH5, MMP1, VCAM1, SELE, CD34. Im zweiten Teil der Arbeit wurde aus kultivierten Endothelzellen aus sechs arteriellen und sechs venösen Gefäßen von Frauen mit GDM und einer Kontrollgruppe nach gleichem Prinzip cDNA hergestellt und die Marker, die im ersten Teil einen signifikanten Unterschied in der Expression zeigten, mittels RT-PCR untersucht. Die Daten wurden mit der  $2\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet.

**Ergebnisse:** Im ersten Teil der Arbeit zeigten folgende Marker eine signifikant erhöhte Expression in venösen Gefäßen im Vergleich zu den Kontrollen: FGFR2 (2,38-fach), FLT1 (2,5-fach), sFLT1 (3,86-fach) und KDR (1,41-fach). Bei den Markern FGFR1, MMP1 und SELE konnte kein eindeutiger Unterschied festgestellt werden, jedoch eine Tendenz. FGFR1 wurde 1,32-mal häufiger und SELE um etwa 90 % vermindert in Venen bei GDM exprimiert. Bei der

Untersuchung der isolierten Endothelzellen zeigte nur FLT1 in arteriellen Endothelzellen eine um 6,3-fach vermehrte Expression.

**Conclusio:** Zwar wurden in den ganzen Gefäßen Unterschiede von einigen Markern für endotheliale Dysfunktion nachgewiesen, jedoch konnten diese bei der Untersuchung von isolierten Endothelzellen nicht bestätigt werden. Deshalb sind weiterführende Untersuchungen notwendig um die Ergebnisse zu konkretisieren.

## Abstract

**Introduction:** Gestational diabetes mellitus (GDM) is one of the most common complications of pregnant women in Europe. GDM is defined as first occurrence of impaired glucose tolerance during pregnancy. Due to maternal metabolic alterations in pregnancy the placental structure and function are affected on an anatomical and molecular level. Long and short term complications can occur for the mother, as well as for the unborn child. These children have a higher risk for cardiovascular diseases and diabetes mellitus type 2 in adulthood. Furthermore the risk for GDM and obesity is increased. Therefore it is important to further study GDM and its implications.

**Methods:** In the first part twelve arterial and venous fetoplacental vessels from women with GDM as well as a control group were examined. RNA was isolated using the Tri-Reagent method. Afterwards cDNA was synthesized using Superscript-II. The expression of the following markers were measured with RT-PCR and compared to the housekeeping-gene L30: VEGFA, FLT1, sFLT1, KDR, FGF2, FGFR1, FGFR2, CDH5, MMP1, VCAM1, SELE, CD34. In the second part cultivated endothelial cells from six arterial and venous vessels from women with GDM as well as a control group were used. cDNA was synthesized using the same method. The expression of the markers who showed a significant change in the first part using RT-PCR was measured. The data were analyzed with the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -method.

**Results:** In the first part following markers showed an increased expression in veins compared to the control group: FGFR2 (2.38 fold), FLT1 (2.5 fold), sFLT1 (3.86 fold) und KDR (1.41 fold). FGFR1, MMP1 and SELE did not show distinct differences in the expression but tendencies were observed. FGFR1 was expressed 1.32 fold and SELE was reduced by 90 % in veins. The examination of isolated endothelial cells showed an increased expression of FLT1 (6.3 fold) in arterial vessels.

**Conclusion:** Although a difference in the expression of various markers in venous fetoplacental vessels were determined, these findings in isolated endothelial cells could not be confirmed. Further studies are necessary to validate the results.

# Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNGEN .....	II
ZUSAMMENFASSUNG .....	III
ABSTRACT .....	V
INHALTSVERZEICHNIS .....	VII
GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN.....	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	XI
TABELLENVERZEICHNIS .....	XIII
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 PLAZENTA: AUFBAU, FUNKTION.....	1
1.2 GESTATIONSDIABETES MELLITUS.....	2
1.2.1 Ätiologie und Pathogenese.....	2
1.2.2 Diagnostik .....	4
1.2.3 Klassifikation des Gestationsdiabetes .....	5
1.2.4 Komplikationen und Einfluss von GDM auf Mutter und Kind.....	5
1.3 DIABETES MELLITUS UND ENDOTHELIALE DYSFUNKTION .....	6
1.4 VERÄNDERUNGEN DER PLAZENTA BEI GDM .....	7
1.5 KARDIOVASKULÄRES RISIKOFAKTOREN IN KINDERN VON FRAUEN MIT SCHWANGERSCHAFTSDIABETES – FETALES PROGRAMMING .....	8
1.5.1 Fetale Programmierung.....	8
1.6 HYPOTHESE .....	9
1.7 UNTERSUCHTE MARKER.....	10
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>12</b>
2.1 PROJEKTPLANUNG.....	12
2.2 PROBENAUSWAHL .....	13
2.3 RNA-ISOLIERUNG – TRI-REAGENT-METHODE.....	14
2.3.1 Arbeitsanleitung .....	14
2.4 QUANTIFIZIERUNG DER RNA-PROBEN .....	15
2.5 REVERSE TRANSCRIPTION: SUPERSSCRIPT-II .....	15
2.5.1 Arbeitsanleitung .....	15
2.6 REAL-TIME PCR.....	16

2.6.1	<i>RT-PCR Arbeitsanleitung</i>	16
2.6.2	<i>Auswertung der RT-PCR-Ergebnisse – <math>2^{\Delta\Delta Ct}</math>-Methode</i>	19
2.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	19
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>20</b>
3.1	PATIENTENDATEN	20
3.1.1	<i>Mütterliche Daten</i>	20
3.1.2	<i>Kindliche Daten</i>	21
3.2	AUSWERTUNG DER RT-PCR DATEN DER GANZEN GEFÄßE	22
3.2.1	<i>Fold Change</i>	22
3.2.2	<i>Unterschied der Expression untersuchter Marker zwischen arteriellen und venösen Kontrollen</i>	31
3.3	AUSWERTUNG DER RT-PCR DATEN DER KULTIVIERTEN ENDOTHELZELLEN	32
3.3.1	<i>Fold Change</i>	32
3.3.2	<i>FLT1</i>	34
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>35</b>
4.1	PATIENTENDATEN	35
4.2	GANZE GEFÄßE	35
4.3	ENDOTHELZELLEN	38
4.4	CONCLUSIO	39
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>40</b>

## Glossar und Abkürzungen

BCP	Bromochloropropane
BMI	Body Mass Index
CD34	Cluster of Differentiation 34
CDH5	Cadherin 5
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP mix	deoxynucleotide mix
DTT	Dithiothreitol
EDRF	endothelium-derived relaxing factors
eNOS	Endotheliale Stickoxid-Synthase
FAM	fluoreszierenden Reporter
FC	Fold Change
FGF2	fibroblast growth factor 2
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2
FLT1	fms-related tyrosine kinase 1
GDM	Gestationsdiabetes mellitus
GLUT	Glukosetransporter
hCG	humanes Choriongonadotropin
hPL	humanes Plazentalaktogen
KDR	Kinase insert domain receptor
MM1	Mastermix 1
MM2	Mastermix 2
MMP1	Matrix Metallopeptidase 1
NO	Stickoxid
oGTT	oraler Glukosetoleranztest
PCR	polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
SELE	Selectin E

sFLT1	soluble fms-related tyrosine kinase 1
SSW	Schwangerschaftswoche
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFA	vascular endothelial growth factor A

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1. PROJEKTPLAN FÜR DEN PRAKTISCHEN TEIL DER DIPLOMARBEIT .....	12
ABBILDUNG 2. FGFR2; FOLD CHANGE VON GDM UND KONTROLLEN IN ARTERIELLEN UND VENÖSEN GEFÄßEN. DIE DATEN WURDEN ALS MITTELWERT $\pm$ STANDARDFEHLER ANGEGEBEN .....	24
ABBILDUNG 3. FLT1; FOLD CHANGE VON GDM UND KONTROLLEN IN ARTERIELLEN UND VENÖSEN GEFÄßEN. DIE DATEN WURDEN ALS MITTELWERT $\pm$ STANDARDFEHLER ANGEGEBEN .....	25
ABBILDUNG 4. KDR; FOLD CHANGE VON GDM UND KONTROLLEN IN ARTERIELLEN UND VENÖSEN GEFÄßEN. DIE DATEN WURDEN ALS MITTELWERT $\pm$ STANDARDFEHLER ANGEGEBEN. ....	26
ABBILDUNG 5. sFLT1; FOLD CHANGE VON GDM UND KONTROLLEN IN ARTERIELLEN UND VENÖSEN GEFÄßEN. DIE DATEN WURDEN ALS MITTELWERT $\pm$ STANDARDFEHLER ANGEGEBEN .....	27
ABBILDUNG 6. FGFR1; FOLD CHANGE VON GDM UND KONTROLLEN IN ARTERIELLEN UND VENÖSEN GEFÄßEN. DIE DATEN WURDEN ALS MITTELWERT $\pm$ STANDARDFEHLER ANGEGEBEN. ....	28
ABBILDUNG 7. MMP1; FOLD CHANGE VON GDM UND KONTROLLEN IN ARTERIELLEN UND VENÖSEN GEFÄßEN. DIE DATEN WURDEN ALS MITTELWERT $\pm$ STANDARDFEHLER ANGEGEBEN .....	29
ABBILDUNG 8. SELE; FOLD CHANGE VON GDM UND KONTROLLEN IN ARTERIELLEN UND VENÖSEN GEFÄßEN. DIE DATEN WURDEN ALS MITTELWERT $\pm$ STANDARDFEHLER ANGEGEBEN. ....	30
ABBILDUNG 9. FLT1; FOLD CHANGE VON GDM UND KONTROLLEN IN ARTERIELLEN UND VENÖSEN ENDOTHELZELLEN. DIE DATEN WURDEN ALS MITTELWERT $\pm$ STANDARDFEHLER ANGEGEBEN .....	34

ABBILDUNG 10: EXPRESSION DER VEGF-REZEPTOREN BEI NORMALER STOFFWECHSELLAGE DER MUTTER.....	36
ABBILDUNG 11: EXPRESSION DER VEGF-REZEPTOREN BEI GDM .....	36
ABBILDUNG 12: EXPRESSION DER FGF2-REZEPTOREN BEI NORMALER STOFFWECHSELLAGE DER MUTTER.....	37
ABBILDUNG 13: EXPRESSION DER FGF2-REZEPTOREN BEI GDM.....	37

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1. PHYSIOLOGISCHE STOFFWECHSELLAGE DER MUTTER VOR UND WÄHREND DER SCHWANGERSCHAFT (10).....	3
TABELLE 2. DIAGNOSEKRITERIEN DES GDM BEIM OGTT .....	4
TABELLE 3. GENE UND DEREN TAQMAN GENE EXPRESSION ASSAY NUMMERN.....	17
TABELLE 4. PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE REAL-TIME PCR .....	18
TABELLE 5. DATEN VON MÜTTERN MIT GDM UND VON DEN KONTROLLEN.....	20
TABELLE 6. KINDLICHE DATEN VON MÜTTERN MIT GDM UND VON DEN KONTROLLEN ...	21
TABELLE 7. MEAN FOLD CHANGE DER ARTERIELLEN GDM PROBEN MIT P-WERT .....	22
TABELLE 8. MEAN FOLD CHANGE DER VENÖSEN GDM PROBEN MIT P-WERT.....	23
TABELLE 9. UNTERSCHIED DER MEAN FC-WERTE DER VENÖSEN KONTROLLEN IM VERGLEICH ZU DEN ARTERIELLEN KONTROLLEN MIT P-WERT .....	31
TABELLE 10. MEAN FOLD CHANGE DER ARTERIELLEN ENDOTHELZELLEN VON GDM PROBEN MIT P-WERT .....	32
TABELLE 11. MEAN FOLD CHANGE DER VENÖSEN ENDOTHELZELLEN VON GDM PROBEN MIT P-WERT .....	33

# 1 Einleitung

## 1.1 *Plazenta: Aufbau, Funktion*

Die Plazenta ist ein fetales Organ, das in den Uterus der Mutter einwächst, den Fetus verankert und die Versorgung des Fetus garantiert. Sie wird in einen maternalen und fetalen Teil geteilt.

Die maternale Oberfläche besteht aus Dezidua und es können Kotyledonen, plazentare Funktionseinheiten, abgegrenzt werden. In der reifen Plazenta bilden sich 50-70 Kotyledonen von bis zu 4 cm Durchmesser aus.

Die fetale Oberfläche wird von der Chorionplatte gebildet. Die Chorionplatte geht dabei direkt in das Chorion über und ist von Amnion überzogen. Die Nabelschnur inseriert meist zentral der Chorionplatte und die Nabelschnurgefäße verzweigen sich mehrfach, und münden schließlich in die Zottenbäume an der Unterseite der Chorionplatte ein.

Die materno-fetale Kontaktfläche besteht aus einem intervillösen Raum, der mit mütterlichem Blut gefüllt ist und aus Zotten, die von fetaler Seite in diesen Raum einsprossen. Die Zotten sind vom Synzytiotrophoblasten bedeckt, über den der Gasaustausch stattfindet und die materno-fetale Plazentaschranke bildet. Die uterinen Arterien münden in der Regel im Zentrum des intervillösen Raums, sodass das maternale Blut vom Zentrum in die Peripherie zu den Zotten fließt. Der mütterliche Blutstrom wird dabei gleichmäßig durch die Zotten verlangsamt, wodurch der Stoffaustausch begünstigt wird.

Die Funktion der Plazenta ist erstens die fetale Versorgung, zweitens die Hormonproduktion und drittens die immunologische Funktion.

In der Plazenta werden sowohl die Atemgase ausgetauscht, als auch alle erforderlichen Nährstoffe für den Fetus transportiert. Über die uterinen Arterien fließt sauerstoffreiches Blut in den intervillösen Raum. Über Diffusion gelangt der Sauerstoff in den fetalen Kreislauf und führt zu einer fetalarteriellen Sauerstoffsättigung von ca. 60 %. Kohlendioxidreiches Blut wird über die Nabelarterien in die Zottenbäume geleitet und gelangt über Diffusion in den

intervillösen Raum und somit ins maternale Blut.

Nährstoffe gelangen über verschieden Arten, wie Diffusion, aktiver Transport, Endozytose, Transzytose oder ungeklärte Prozesse, in den kindlichen Kreislauf (1). Glukose gelangt über Glukosetransporter (GLUT) in den fetalen Kreislauf und ist abhängig vom dem materno-fetalen Konzentrationsgradienten (2).

In der Plazenta werden sowohl Steroidhormone wie Östrogene und Progesteron, als auch schwangerschaftstypische Hormone wie humanes Choriongonadotropin (hCG) und humanes Plazentalaktogen (hPL) gebildet. Östrogene werden vom Synzytiotrophoblasten produziert und dienen dazu, den Uterus auf die Geburt vorzubereiten. Progesteron wird bis Ende des 1. Trimenons vor allem im Corpus Luteum und danach auch in der Plazenta gebildet. Progesteron wird auch als Schwangerschaftsschutzhormon bezeichnet und hält die Schwangerschaft aufrecht (1). hCG und hPL spielen vor allem im 1. Trimenon eine wichtige Rolle, da sie das Corpus Luteum stimulieren (1,3). Sie werden vom Synzytiotrophoblasten gebildet. Darüber hinaus hat hPL eine ähnliche Struktur und Wirkung wie Prolaktin und Somatotropin, weshalb es die mütterliche Lipolyse steigert und Insulinresistenz induziert (3).

## **1.2 Gestationsdiabetes mellitus**

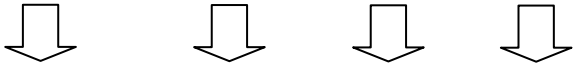
### **1.2.1 Ätiologie und Pathogenese**

Als Gestationsdiabetes (GDM) wird eine Glukoseintoleranzstörung definiert, die erstmalig in der Schwangerschaft aufgetreten oder diagnostiziert worden ist (4). GDM gehört in Europa zu den häufigsten Schwangerschaftskomplikationen, die Prävalenz beträgt dabei 2-6 % (5). Die Pathophysiologie des GDM ähnelt zum Großteil der des Typ-2-Diabetes. Übergewicht und Lebensstil (Ernährung, Bewegung) der Frauen sind wichtige prädispositionierende Faktoren (6). Im Verlauf der Schwangerschaft entwickelt die Mutter eine physiologisch progrediente Insulinresistenz.

Die Insulinresistenz wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zu diesen zählen unter anderem erhöhte Östrogen- und Progesteronwerte, die hPL- und hCG-Sekretion und die veränderte Produktion von Wachstumshormonen, Prolaktin und Kortisol (7,8). Diese Stoffwechsellage wird normalerweise durch eine gesteigerte Insulinproduktion in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas kompensiert. Im Falle des Gestationsdiabetes ist die Insulinproduktion jedoch inadäquat, da die Kompensationsmöglichkeiten und somit die Produktionskapazität der  $\beta$ -Zellen überschritten wird (8,9).

Im Laufe der Schwangerschaft kommt es bei der Mutter zu starken Veränderungen des Stoffwechsels mit dem Ziel, dem Fetus Energie, Glukose, Aminosäuren und Fettsäuren zu Verfügung zu stellen. Durch die Hyperglykämie der Mutter bei GDM kommt es auch im Fetus zu erhöhten Blutglukosewerten wodurch die Insulinproduktion des Kindes angeregt wird um diese wieder zu senken. Die vermehrte Insulinproduktion bleibt zunächst postnatal erhalten und kann bei Neugeborenen zu einer Hypoglykämie führen (1).

**Tabelle 1.** Physiologische Stoffwechsellage der Mutter vor und während der Schwangerschaft (10)

	Mutter				Plazenta	Fetus
	Nahrungs- aufnahme	Insulin- produktion	Fett- masse	Muskel- masse		
Pre-gestation	±	±	±	±		
1., 2. Trimenon	+	+	+	-	+	+
3. Trimenon	++	++	++	--	++	++
						
	Bereitstellung von Glukose, Aminosäuren und Fettsäuren					

## 1.2.2 Diagnostik

Die Diagnose des GDM wird mithilfe des 75 g oralen Glukosetoleranztests (oGTT) gestellt. Der Test wird im Rahmen des Mutter-Kind PASSES bei allen Schwangeren als Screening-Methode in der 24.-28. Schwangerschaftswoche (SSW) gemacht. Bei erhöhtem Risiko kann der Test auch schon früher in der Schwangerschaft durchgeführt werden.

Nach einer mindestens acht stündigen Nahrungskarenz wird der Nüchternblutzuckerwert bestimmt. Anschließend wird der Schwangeren eine Lösung mit 75 g Glukose in 300 ml Wasser zu trinken gegeben. Dann werden die Blutglukosewerte nach einer und nach zwei Stunden gemessen.

Die Diagnose Gestationsdiabetes kann bei folgenden Werten gestellt werden (4,11):

**Tabelle 2.** Diagnosekriterien des GDM beim oGTT

Zeitpunkt	venöses Plasma	
	mg/dl	mmol/l
nüchtern	>92	>5,1
1 h	>180	>10
2 h	>153	>8,5

Liegt der Nüchternblutglukosewert über 126 mg/dl oder der postprandiale Blutglukosewert über 200 mg/dl kann auf die Durchführung des oGTT verzichtet und die Diagnose manifester Diabetes mellitus gestellt werden (11)

### **1.2.3 Klassifikation des Gestationsdiabetes**

Die Klassifikation von GDM erfolgt an der Grazer Universitätsklinik für Geburtshilfe wie folgt (10):

- White A: 1 Blutglukosewert beim oGTT ist überschritten
- White B: Nüchternblutglukosewert ist >95 mg/dl
- White A/B: 2 oder mehr pathologische oGTT-Werte
- White B,C,D: vorbestehender insulinpflichtiger Diabetes mellitus

### **1.2.4 Komplikationen und Einfluss von GDM auf Mutter und Kind**

Das Auftreten und die Häufigkeit von mütterlichen und kindlichen Komplikationen stehen im direkten Zusammenhang mit den mütterlichen Blutglukosewerten (8). Die Komplikationsrate bei GDM kann sowohl für die Mutter, als auch für das Kind verringert werden, wenn die Blutglukosewerte der Mutter möglichst im Normbereich bleiben. Dieses Ziel kann entweder durch Diabeteskost oder durch die zusätzliche Gabe von Insulin erreicht werden.

Die Komplikationen von Mutter und Kind können in akute und Langzeitfolgen geteilt werden.

Schwangere, die GDM entwickeln, leiden während der Schwangerschaft häufiger unter rezidivierenden Harnwegsinfektionen und Präeklampsie/Eklampsie und weisen eine erhöhte Rate an Kaiserschnitt-Entbindungen und vaginal-operativen Eingriffen in Folge der Makrosomie des Kindes auf (1,8).

Zu den Langzeitfolgen für die Mutter zählt, dass das Risiko für ein erneutes Auftreten von GDM in den folgenden Schwangerschaften bei etwa 50 % liegt (8). Des Weiteren steigt bei Schwangeren mit GDM das Risiko an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken und beträgt ungefähr 10 % pro Jahr nach der Schwangerschaft (7). 10 Jahre postpartal leiden 40-50 % der Frauen an einem manifesten Diabetes mellitus, in den meisten Fällen handelt es sich hierbei um Typ 2 Diabetes mellitus (8).

Im ungeborenen Kind kann GDM akut *in utero* zu Fehlbildungen, Entwicklungsstörungen, Polyhydramnion, erhöhte Frühgeburtenrate und intrauterinen Fruchttod führen (1). Durch das erhöhte transplazentare Glukoseangebot wird die fetale Insulinproduktion gesteigert und kann somit zu einer Hypertrophie bzw. Hyperplasie der fetalen  $\beta$ -Zellen führen. Der Hyperinsulinismus des ungeborenen Kindes fördert die Makrosomie und dadurch die Gefahr der Schulterdystokie, steigert das Risiko für neonatale Hypoglykämie und hemmt die Surfactantproduktion der Alveolen und kann somit zu Atemnotsyndromen führen.

Langfristig ist bei Kindern von Müttern mit unzureichend behandelten GDM das Risiko für die Entwicklung von Übergewicht und/oder Glukosetoleranzstörungen erhöht (8).

### **1.3 Diabetes mellitus und endotheliale Dysfunktion**

Für die Entstehung von der diabetischen Angiopathie ist die endotheliale Dysfunktion ein entscheidender Faktor. Bei Diabetes mellitus wird das Endothel auf unterschiedlichste Art und Weise geschädigt, wobei der Hyperglykämie die entscheidende Rolle zukommt.

Die endotheliale Dysfunktion ist charakterisiert durch die veränderte Vasoregulation, vermehrten oxidativen Stress, Aktivierung von Entzündungsprozessen und herabgesetzter Barrierefunktion (12).

Das Endothel steuert über vasodilatatorisch wirkende Mediatoren (*endothelium-derived relaxing factors*, EDRF) den Muskeltonus der Gefäßmuskulatur. Solche Mediatoren sind unter anderem Stickoxid (NO) und Prostacyclin. Bei Diabetes mellitus kommt es durch verringerte Bildung, gesteigerte Inaktivierung und verminderte Reaktivität der EDRF zu einer verminderten Vasodilatation (13).

## **1.4 Veränderungen der Plazenta bei GDM**

Gestationsdiabetes nimmt auf anatomischer und molekularer Ebene Einfluss auf Aufbau und Funktion der Plazenta.

Macro-anatomisch sind ein signifikant erhöhtes Plazentagewicht und ein verringertes fetoplazentares Verhältnis zu erkennen. Histologisch lassen sich eine erhöhte Anzahl an Gefäßen und Kapillaren in den terminalen Zotten nachweisen. Auf vaskulärer Ebene sind sich sowohl Läsionen, als auch Nekrosen feststellbar (2,14,15). Durch die signifikante Abnahme der interzellulären Verbindungen wie etwa der tight-junctions, wird die Permeabilität gesteigert (2).

Auf molekularer Ebene wird die plazentare Angiogenese durch ein erhöhtes Level an *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und dessen Rezeptoren *kinase insert domain receptor* (KDR) sowie *fms-related tyrosine kinase 1* (FLT-1) verursacht. Gestationsdiabetes beeinflusst vor allem im dritten Trimenon die Angiogenese und die vaskuläre Permeabilität (15).

In Plazenten von Schwangeren mit GDM wurde, im Gegensatz zu den gesunden Kontrollen, erhöhte Expression von endothelialer NO-Synthase (eNOS) nachgewiesen (16). Auf Grund dessen lässt sich vermuten, dass es bei GDM Plazenten zu einer verstärkten Bildung vom vasodilatatorisch wirkenden Stickoxid (NO) kommt. Allerdings konnte in anderen Studien eine reduzierte endothelabhängige Vasodilatation bei Diabetes mellitus beobachtet werden, welches für eine Inaktivierung durch reactive oxygen species (ROS) von NO spricht (13). Des Weiteren konnte in GDM-Plazenten oxidativer Stress durch die Messung von Markern wie 8-Isoprostan und Antioxidantien festgestellt werden (2).

## **1.5 Kardiovaskuläres Risikofaktoren in Kindern von Frauen mit Schwangerschaftsdiabetes – fetales programming**

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Kinder von Frauen mit Schwangerschaftsdiabetes ein erhöhtes Risikoprofil für kardiovaskuläre Erkrankungen im Erwachsenenalter haben. Sie entwickeln im Laufe ihres Lebens häufiger Übergewicht und Diabetes mellitus Typ 2 (17). Außerdem konnten bereits im Jugendalter erhöhte Werte von VCAM1 und SELE festgestellt werden. Beides sind Marker für die endotheliale Aktivität und stehen im Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose (18).

### **1.5.1 Fetale Programmierung**

Eine Ursache für die erhöhten kardiovaskulären Risikofaktoren könnte die fetale Programmierung sein. Es ist bereits bekannt, dass Hormone einen wesentlichen Einfluss auf das neuroendokrine System und somit auch indirekt auf wesentliche Regulations- und Funktionsmechanismen des menschlichen Körpers haben. Weicht die Konzentration eines Hormons vom physiologischen Bereich ab, kann es durch epigenetische Mechanismen zu einer Umprogrammierung und dadurch zu einer dauerhaften morphologischen und funktionellen Veränderung von Organen und Stoffkreisläufen kommen. Dauerhaft kann dies zur Entstehung von diversen Krankheiten führen. Beim GDM kann der fetale Hyperinsulinismus zu einer Umprogrammierung wesentlicher Kontrollsysteme für Metabolismus, Nahrungsaufnahmen und Körpergewicht führen. Dies hat zur Folge, dass die Disposition für Hyperinsulinämie, Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2, das metabolische Syndrom und kardiovaskuläre Krankheiten bereits *in utero* erworben werden kann (19).

## **1.6 Hypothese**

Da verschiedene Studien endotheliale Dysfunktion bei Diabetes mellitus und Veränderungen in der Plazenta speziell bei GDM nachgewiesen haben, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob GDM in den Plazentaendothelzellen zu einer Veränderung von Markern für endotheliale Dysfunktion, sowie von Proteinen, die endotheliale Funktion regulieren, führt. Da der Fetus und Plazenta eine Einheit bilden, kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse auf die endotheliale Funktion des Fetus übertragen werden können.

GDM, als eine der häufigsten Komplikationen in der Schwangerschaft, kann sowohl peri- als auch postnatal schwere Folgen für Mutter und Kind nach sich ziehen. Deshalb ist es umso wichtiger GDM und dessen Folgen genauestens zu untersuchen um die ablaufenden Prozesse zu verstehen und ihnen durch prophylaktische oder therapeutische Maßnahmen entgegen wirken zu können.

## 1.7 Untersuchte Marker

Die ausgewählten Marker sind aus der Literatur bekannte Marker für endotheliale Dysfunktion.

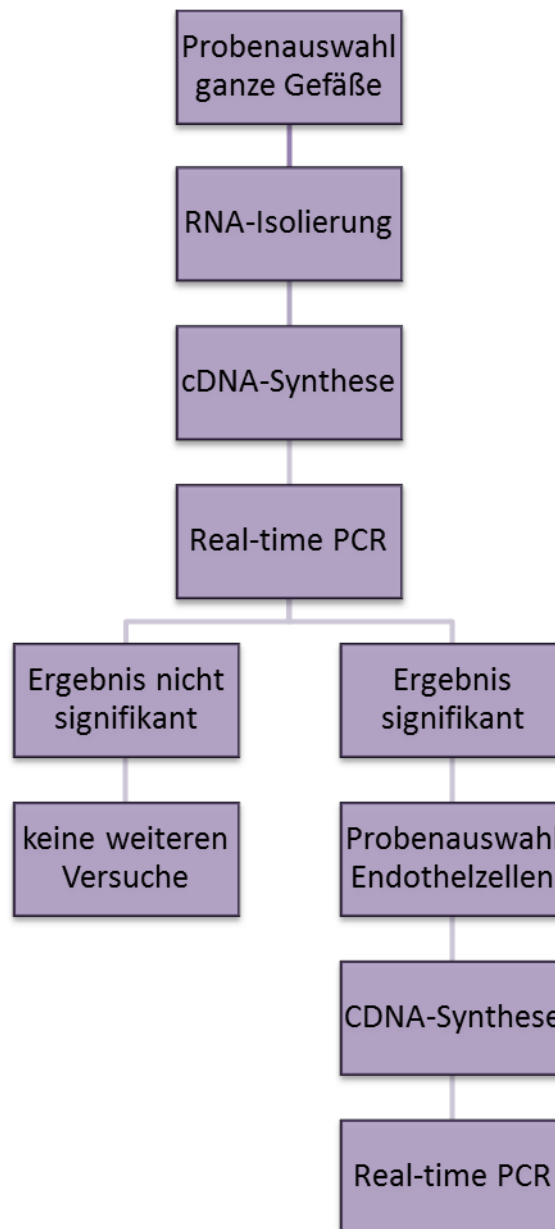
- CD34: = *Cluster of Differentiation 34*; Zell-Adhäsionsmolekül (20) charakteristisch für Endothelzellen. Wurde als Endothelzellmarker verwendet.
- CDH5: = *Cadherin 5*; CDH5 organisiert die Interzellulären Verbindungen (21).
- FGF2: = *fibroblast growth factor 2*; Ist ein Mitogen und reguliert das Zellüberleben, die Zellteilung, Differenzierung, Zellmigration und Angiogenese (22).
- FGFR1: = *fibroblast growth factor receptor 1*; Rezeptor für FGF2 (23)
- FGFR2: = *fibroblast growth factor receptor 2*; Rezeptor für FGF2 (24)
- FLT1: = *fms-related tyrosine kinase 1*; membranständiger Rezeptor für VEGFA; beeinflusst die Angiogenese und Vaskulogenese (25)
- KDR: = *kinase insert domain receptor*; Rezeptor für VEGFA; beeinflusst die Endothelzellproliferation und Migration (26)
- MMP1: = *Matrix Metalloproteinase 1*; Matrix Metalloproteasen spielen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Migration, Differenzierung, Angiogenese und Apoptose. Sie beeinflussen den Abbau der extrazellulären Matrix (27).
- SELE: = *Selectin E*; gehört zu der Familie der Zell-Adhäsionsmoleküle (28)
- sFLT1 = *soluble FLT1*; löslicher VEGFA-Rezeptor. Der Rezeptor bindet VEGFA, jedoch wird keine intrazelluläre Wirkung hervorgerufen. sFLT1 schwächt somit die Wirkung von VEGFA auf die Zellen.

VCAM1: = *vascular cell adhesion molecule 1*; codiert das Oberflächenprotein Sialoglycoprotein in zytokin-aktivierte Endothelzellen und übermittelt die leukozytäre-endotheliale Zelladhese und Signaltransduktion (29).

VEGFA: = *vascular endothelial growth factor A*; Ist ein Mitogen und nimmt besonderen Einfluss auf Endothelzellen und führt zu einer vermehrten Angiogenese und Vaskulogenese, einer erhöhten Permeabilität, Endothelzellwachstum, Zellmigration und Apoptosehemmung (30).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Projektplanung



**Abbildung 1.** Projektplan für den praktischen Teil der Diplomarbeit

## **2.2 Probenauswahl**

Im ersten Teil der Diplomarbeit wurden je zwölf arterielle und zwölf venöse fetoplazentare Gefäße von Frauen mit Gestationsdiabetes und je zwölf arterielle und venöse Gefäße von einer Kontrollgruppe untersucht.

Folgende Ein- bzw. Ausschlusskriterien wurden definiert:

Einschlusskriterien:

- Gestationsdiabetes Typ White A
- Gestationsdiabetes Typ White A/B
- Gestationsdiabetes Typ White B

Ausschlusskriterien:

- Präeklampsie, Eklampsie
- Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2
- Veränderungen und Auffälligkeiten bei der Geburt

Als Kontrollgruppe wurden fetoplazentare Gefäße von Frauen, deren Schwangerschaft ohne Komplikation verlaufen ist, ausgewählt. Im ersten Teil der praktischen Arbeit wurden ganze Gefäße auf Veränderungen untersucht. Im Falle von signifikanten Unterschieden bei bestimmten Markern wurden im zweiten Teil kultivierte Endothelzellen fetoplazentarer Gefäße auf jene Marker hin untersucht. Dabei wurden isolierte, primäre Endothelzellen von je sechs arteriellen und venösen Gefäßen von Schwangeren mit Gestationsdiabetes und von einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Alle Gefäße wurden post partum mit Einverständnis der Mutter von der Study Nurse aus der Plazenta präpariert. Für den ersten Teil wurden diese konserviert und eingefroren, für den zweiten Teil wurden die Endothelzellen aus jeweils sechs arteriellen und sechs venösen Gefäßen von Müttern mit GDM und gesunden Müttern enzymatisch gelöst und kultiviert.

## **2.3 RNA-Isolierung – Tri-Reagent-Methode**

### **2.3.1 Arbeitsanleitung**

Für diese Methode wurde folgendes Material benötigt:

- drei große Bechergläser
  - eines mit 70%igen Alkohol,
  - eines mit Aqua Dest.
  - eines mit Eis
- je Probe ein 12 ml Falcon Tube
- je Probe zwei sterile Eppendorf-Gefäß.
- Homogenisator (Ultra Turrax)

Der Homogenisator (Ultra Turrax) wurde zur Verwendung unter dem Abzug zusammengebaut und aufgestellt.

Die Proben wurden kurz bei Raumtemperatur und dann auf Eis aufgetaut. Zu jeder Probe wurde 1 ml Tri-Reagent in ein 12 ml Falcon-Tube gegeben, und mit dem Ultra-Turrax zerkleinert. Die Proben wurden anschließend mit einer Pipette in ein beschriftetes Eppendorf-Gefäß überführt und bei Raumtemperatur weiter verarbeitet.

Zu jedem Eppendorfgefäß wurden unter dem Abzug 100 µl BCP (=1/10 Vol Tri-Reagent) dazu pipettiert und für ca. 20x um 180° gekippt, für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für weitere 15 Minuten bei 1200 G und 4 °C in der Eppendorfcentrifuge 5415 R zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wurde die obere Phase der Proben in ein neu beschriftetes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, 500 µl Isopropanol (=1/2 Vol Tri-Reagent) hinzu pipettiert, danach ca. 20x um 180° gekippt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurden alle Proben bei 1200 G und 4 °C für 8 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde abpipettiert, verworfen und zu dem Pellet 500 µl 70%igen Ethanol, welches bei -20° lagerte, hinzugegeben und bei 750 G und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und verworfen. Dieser Vorgang wurde anschließend noch einmal wiederholt.

Das Pellet wurde danach unter dem Abzug luftgetrocknet und in 50 µl DEPC-*treated water* gelöst.

## **2.4 Quantifizierung der RNA-Proben**

Die Quantifizierung der RNA-Proben erfolgte mittels photometrischer Messung mit dem Biophotometer plus. Dabei wurde zunächst 100 µl Aqua Dest in die Quarzküvette pipettiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dieser Wert diente als Leerwert für die darauf folgenden Messungen. Für die Messung wurden jeweils 1 µl der RNA Probe und 99 µl Aqua dest zusammenpipettiert. Dann wurde die Verdünnung gemischt. Jede Probe wurde einzeln in die Quarzküvette gefüllt und anschließend bei 260 nm gemessen.

## **2.5 Reverse Transcription: Superscript-II**

### **2.5.1 Arbeitsanleitung**

Unter Reverse Transkription wird die Synthese von DNA aus RNA verstanden.

Nach der Quantifizierung der RNA-Proben wurden die Proben einander angeglichen, sodass die Konzentration aller Proben 1 µg RNA/10 µl Wasser betrug. Alle Proben und Reagenzien wurden während der gesamten Transkription auf Eis gelagert. Zu Beginn wurde der erste Mastermix (MM1) hergestellt, indem pro Ansatz 1 µl Random hexamer primer (Thermo Scientific) und 1 µl dNTP mix (10 mM) plus jeweils zusätzlich 10 % in ein Eppendorftube zusammenpipettiert wurde. Von dem MM1 wurden je 2 µl in ein PCR-Tube vorgelegt und anschließend 10 µl RNA bzw. 10 µl Reinstwasser als Negativkontrolle hinzu pipettiert und gemischt. Die Proben wurden im Thermocycler (BioRad) für 5 Minuten auf 65 °C

erhitzt. Danach wurden die Proben wieder schnell auf Eis gelagert und der zweite Mastermix (MM2) wurde hergestellt, indem pro Ansatz 4  $\mu\text{l}$  *5x first strand buffer* (Invitrogen) und 2  $\mu\text{l}$  0,1M DTT plus zusätzlich 10 % zusammenpipettiert wurden. Zu jedem Ansatz wurden jeweils 6  $\mu\text{l}$  vom MM2 gegeben und vorsichtig gemischt und für 2 Minuten bei 25°C in den Thermocycler gegeben. Im Anschluss wurden zu jedem Ansatz 1  $\mu\text{l}$  Superscript-II hinzugefügt und durch auf- und abpipettieren vermischt. Die Proben kamen für 10 Minuten bei 25 °C, für 50 Minuten bei 42 °C und um die Reaktion zu inaktivieren für 15 Minuten bei 70 °C in den Thermocycler. Die cDNAs wurden bei -20 °C gelagert.

## **2.6 Real-time PCR**

Real-time PCR (RT-PCR) ermöglicht die direkte und genaue Quantifizierung von DNA. Hierfür werden neben den Primern, welche für die Amplifikation des PCR Produkts notwendig sind, spezielle Sonden benötigt, die aus einer spezifischen DNA-Sequenz, einem fluoreszierenden Reporter (FAM) und einem Quencher bestehen. Der Quencher unterdrückt die fluoreszierende Eigenschaft der Sonde, wenn diese einzelsträngig vorliegt. Die Sonden werden während der Polymerisation in 5'-3'Richtung an den komplementären Strang synthetisiert. Dadurch kann der Quencher das Signal nicht mehr unterdrücken und es ist detektierbar. Dieses Signal wird nach jedem Zyklus gemessen. Die Stärke der Fluoreszenz ist proportional zu der Menge des PCR-Produkts.

### **2.6.1 RT-PCR Arbeitsanleitung**

Die 20  $\mu\text{l}$  cDNA wurden mit 180  $\mu\text{l}$  Reinstwasser verdünnt. Pro 96-Well PCR-Platte wurden die Genexpression von je 12 arteriellen und venösen Gefäßen, als Duplikate gemessen. Außerdem wurden bei jeder PCR Negativkontrollen (NTC, Non template control, Ansatz der cDNA Synthese ohne RNA) mitgemacht.

Folgende Marker (Gene expression Assay) wurden getestet:

**Tabelle 3.** Gene und deren TaqMan Gene expression assay Nummern

Marker	Nummer
VEGFA	Hs99999070_m1
FLT1	Hs00176573_m1
sFLT1	Hs01052961_m1
KDR	Hs00911700_m1
FGF2	Hs00266645_m1
FGFR1	Hs00915142_m1
FGFR2	Hs01552926_m1
CDH5	Hs00901463_m1
MMP1	Hs00899658_m1
VCAM1	Hs01003372_m1
SELE	Hs00950401_m1
CD34	Hs02576480_m1
Houskeeping-Gene	
L30	Hs00265497_m1

Ein Einzelansatz bestand aus folgenden Teilen: 10 µl TaqMan universal PCR Mastermix von der Firma Applied Biosystems (New Jersey, USA), 4 µl Reinstwasser, 1 µl Gene expression assay von der Firma Applied Biosystems und 5 µl cDNA. Zu Beginn des Arbeitsablaufes wurde ein Mastermix hergestellt, der für 60 Einzelansätze ausreichte. Der Mastermix wurde wie folgt zusammenpipettiert: 600 µl TaqMan universal Mastermix, 240 µl Reinstwasser und 60 µl Gene expression assay.

**Tabelle 4.** Pipettierschema für die real-time PCR

	Pro Einzelansatz in $\mu\text{l}$	60 Ansätze in $\mu\text{l}$
TaqMan universal Mastermix	10	600
DEPC-treated Water	4	240
Gene expression assay	1	60

Der Mastermix wurde gut gemischt und jeweils 33,3  $\mu\text{l}$  in ein PCR-Röhrchen vorgelegt. In jedes PCR-Röhrchen wurden jeweils 11,1  $\mu\text{l}$  cDNA einer Probe bzw. der Negativkontrolle aus der cDNA-Synthese bzw. Reinstwasser zugegeben und anschließend gemischt. Die Ansätze wurden als Duplikate zu je 20  $\mu\text{l}$  in die PCR-Platte (Micro AMP Optical 96-Well Reaction Plate von Applied Biosystems, Australia) pipetiert. Anschließend wurde die Platte mit einer Klebefolie versiegelt und für 20 Sekunden zentrifugiert und zur Analyse in das RT-PCR Gerät (AB7900 Syllabus) eingesetzt.

### 2.6.1.1 Houskeeping-Gene

Um die relative Quantifizierung der Gene zu ermöglichen wurde ein Houskeeping-Gene (Referenzgen) bestimmt, zu dem die Proben in Relation gesetzt wurden. Solche Referenzgene sind Gene, die unabhängig vom Zelltyp und von experimentellen Bedingungen exprimiert werden. Als Houskeeping-Gene wurde RPL30 ausgewählt. RPL30 synthetisiert ein ribosomales Protein der 60s Untereinheit und ist ubiquitär vorhanden (31).

### **2.6.2 Auswertung der RT-PCR-Ergebnisse – $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode**

Die Ct-Werte der Proben (meanCt-P) und des Houskeeping-Gene (meanCt-L30) wurden gemittelt und voneinander abgezogen. Dies wird als  $\Delta Ct$ -Wert bezeichnet.

$$\Delta Ct = \text{meanCt-p} - \text{meanCt-L30}$$

Anschließend wurde der  $\Delta Ct$ -Wert der Kontrollen (mean $\Delta Ct$ -K) gemittelt und dann von den  $\Delta Ct$ -Werten der Proben ( $\Delta Ct$ -P) subtrahiert.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct-P - \text{mean}\Delta Ct-K$$

Der  $\Delta\Delta Ct$  wird als negative Potenz von 2 errechnet. Dieses Produkt wird als Fold Change (FC) bezeichnet. Der Fold Change gibt den Faktor an, um den sich ein Anfangswert, bezogen auf ein Zielwert, verändert.

$$FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Im Anschluss daran, wurden die Fold Change Werte der Kontrollen gemittelt und als Referenzwerte für die Fold Change Werte von den GDM-Proben (Mean FC GDM) genutzt.

## **2.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse wurden mit Microsoft Excel mittels t-Test statistisch ausgewertet. Als signifikant wurden Ergebnisse definiert, deren p-Wert <0,05 sind. Ebenso wurden die Grafiken mit Microsoft Excel erstellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Patientendaten

#### 3.1.1 Mütterliche Daten

Die Patientendaten der teilnehmenden Mütter wurden im Hinblick auf Alter, *Body Mass Index* (BMI) vor der Schwangerschaft, Gewichtszunahme in der Schwangerschaft, Plazentagewicht bei Geburt, Schwangerschaftswoche bei Entbindung und Geburtsvorgang (Spontan, Sectio) ausgewertet.

**Tabelle 5.** Daten von Müttern mit GDM und von den Kontrollen

	GDM (n=12)	Kontrollen (n=12)	p-Wert
Alter	34,5 ± 6,3	28,5 ± 4,8	0,010
BMI vor Schwangerschaft	32,7 ± 4,4	23,6 ± 4,6	0,028
Gewichtszunahme in SSW (kg)	15,8 ± 5,6	14,5 ± 4,2	0,789
Plazentagewicht (g)	629,2 ± 149,1	597,1 ± 120,4	0,559
Zeitpunkt der Entbindung (SSW)	38,3 ± 2,3	39,3 ± 2,6	0,389
Geburt (Spontan/Sectio)	5/7	7/5	0,339

Die Proben dieser Studie stammten von zwei Müttern mit GDM White A, neun Müttern mit GDM White A/B und einer Mutter mit GDM White B.

### 3.1.2 Kindliche Daten

Bei den kindlichen Daten wurden Durchschnittsgewicht und Durchschnittsgröße der Kinder bei Geburt ermittelt.

**Tabelle 6.** Kindliche Daten von Müttern mit GDM und von den Kontrollen

	GDM (n=12)	Kontrollen (n=10)	p-Wert
Kindsgewicht in g	3026,5 ±713,1	3291,4 ±501,9	0,394
Kindgröße in cm	50,4 ±2,1	50,0 ±2,2	0,653

## 3.2 Auswertung der RT-PCR Daten der ganzen Gefäße

### 3.2.1 Fold Change

In den folgenden Tabellen wird der gemittelte Fold Change der Proben von arteriellen und venösen Gefäßen dargestellt. Die Fold Change Werte der GDM-Proben (Mean FC GDM) wurden an die der Kontrollen (Mean FC Kontrollen) angeglichen. Der Mean FC Kontrollen wurde bei jedem Marker mittels Dreisatz auf 1 gesetzt um eine anschauliche Darstellung zu ermöglichen.

**Tabelle 7.** Mean Fold Change der arteriellen GDM Proben mit p-Wert

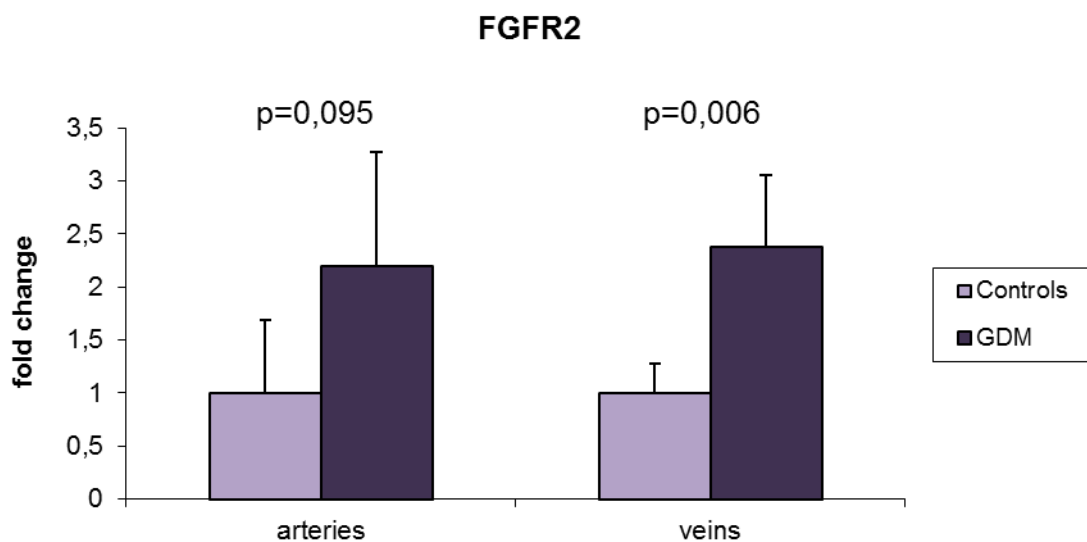
Mittelwert der Unterschiede zwischen GDM und Kontrollen in Arterien		
	arteriell	p-Wert
CD34	0,92	0,391
CDH5	0,87	0,356
FGF2	1,04	0,885
FGFR1	1,21	0,240
FGFR2	2,19	0,095
FLT1	0,91	0,471
KDR	1,11	0,568
MMP1	0,38	0,086
SELE	0,56	0,755
sFLT1	1,25	0,961
VCAM1	0,83	0,351
VEGFA	0,67	0,150

**Tabelle 8.** Mean Fold Change der venösen GDM Proben mit p-Wert

Mittelwert der Unterschiede zwischen GDM und Kontrollen in Venen		
	venös	p-Wert
CD34	1,15	0,624
CDH5	0,96	0,752
FGF2	0,83	0,640
FGFR1	1,32	0,087
FGFR2	2,38	<b>0,006</b>
FLT1	2,50	<b>0,009</b>
KDR	1,41	<b>0,048</b>
MMP1	0,94	0,406
SELE	0,09	0,072
sFLT1	3,86	<b>0,021</b>
VCAM1	0,62	0,589
VEGFA	0,61	0,239

## FGFR2

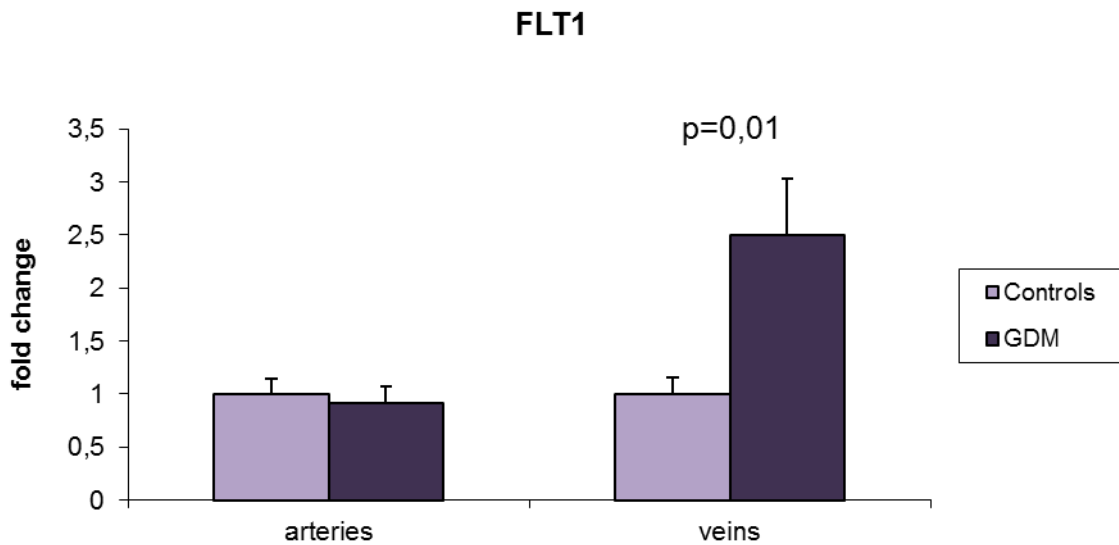
Die Ergebnisse von FGFR2 zeigten in den venösen Gefäßen einen signifikanten Unterschied zwischen den Gefäßen aus den normalen vs. der GDM Schwangerschaften. In den Venen bei GDM wurde FGFR2  $2,38 \pm 0,67$  mal ( $p=0,006$ ) stärker exprimiert als in den Kontrollen. In Abbildung 3 wird der Unterschied zwischen pathologischen Gefäßen im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt. In den Arterien bei GDM zeigte sich im zweiseitigen T-Test keine Signifikanz ( $p=0,095$ ), jedoch im einseitigen T-Test ( $p=0,473$ ). FGFR2 wurde in Arterien bei GDM  $2,19 \pm 1,08$  stärker exprimiert als in den Kontrollen.



**Abbildung 2.** FGFR2; Fold Change von GDM und Kontrollen in arteriellen und venösen Gefäßen. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben

### 3.2.1.1 FLT1

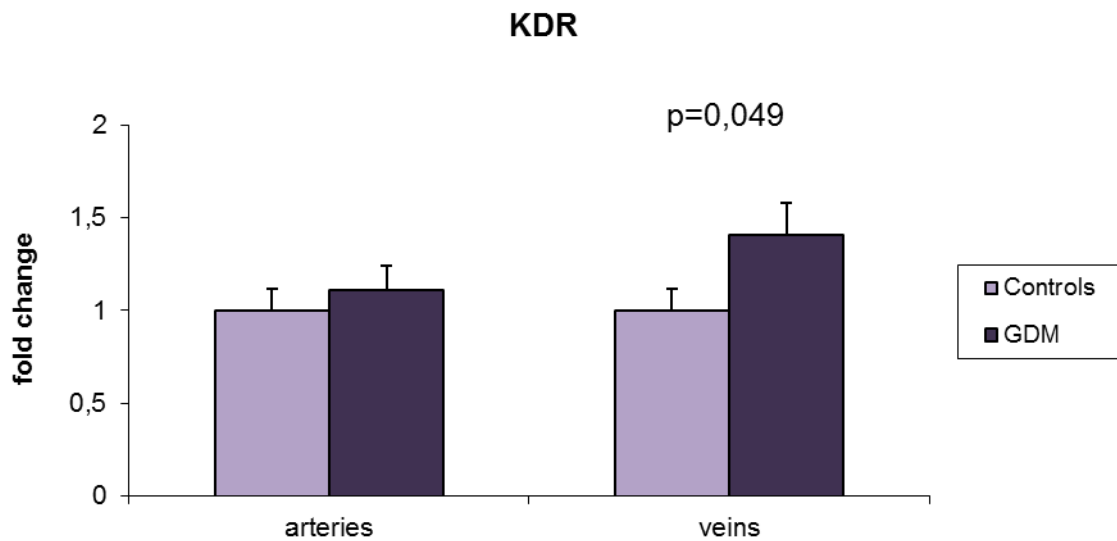
Die Untersuchung von FLT1 ergab in den venösen Proben einen signifikanten Unterschied bei der Expression von FLT1. In venösen Gefäßen bei GDM wurde FLT1  $2,5 \pm 0,53$  mal ( $p=0,01$ ) stärker exprimiert als in den Kontrollen.



**Abbildung 3.** FLT1; Fold Change von GDM und Kontrollen in arteriellen und venösen Gefäßen. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben

### 3.2.1.2 KDR

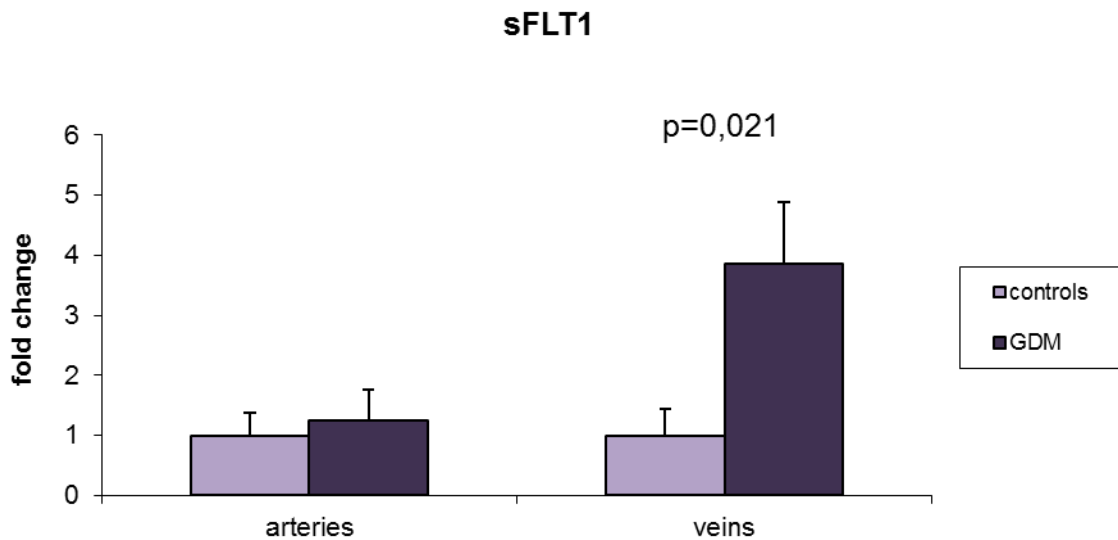
Die Berechnung der FC-Werte von KDR zeigte bei den venösen Proben einen signifikanten Unterschied in der Expression. KDR wurde bei GDM  $1,42 \pm 0,17$  mal ( $p=0,049$ ) stärker exprimiert als in den Kontrollen.



**Abbildung 4.** KDR; Fold Change von GDM und Kontrollen in arteriellen und venösen Gefäßen. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

### 3.2.1.3 sFLT1

Bei der Untersuchung von sFLT1 zeigten die venösen Proben einen signifikanten Unterschied bei der Expression. sFLT1 wurde bei GDM  $3,86 \pm 1,03$  mal ( $p=0,021$ ) stärker exprimiert als in den Kontrollen.

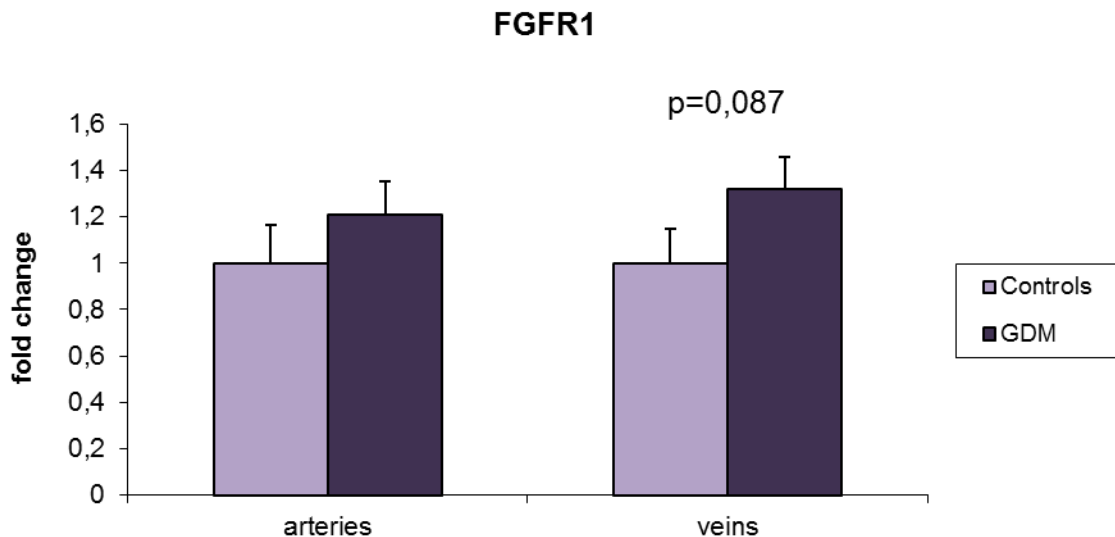


**Abbildung 5.** sFLT1; Fold Change von GDM und Kontrollen in arteriellen und venösen Gefäßen. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben

### 3.2.1.4 FGFR1

Bei der Untersuchung von FGFR1 zeigten die venösen Proben keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,087$ ) bei der Expression in Gefäßen aus GDM-Plazenten und gesunden Kontrollen. Da das Ergebnis jedoch nah an der festgelegten Grenze der Signifikanz lag, wurde auch die Expression von FGFR1 bei Endothelzellen untersucht.

FGFR1 wurde in den venösen Gefäßen bei GDM  $1,3 \pm 0,14$  mal ( $p=0,087$ ) stärker exprimiert als bei den Kontrollen.

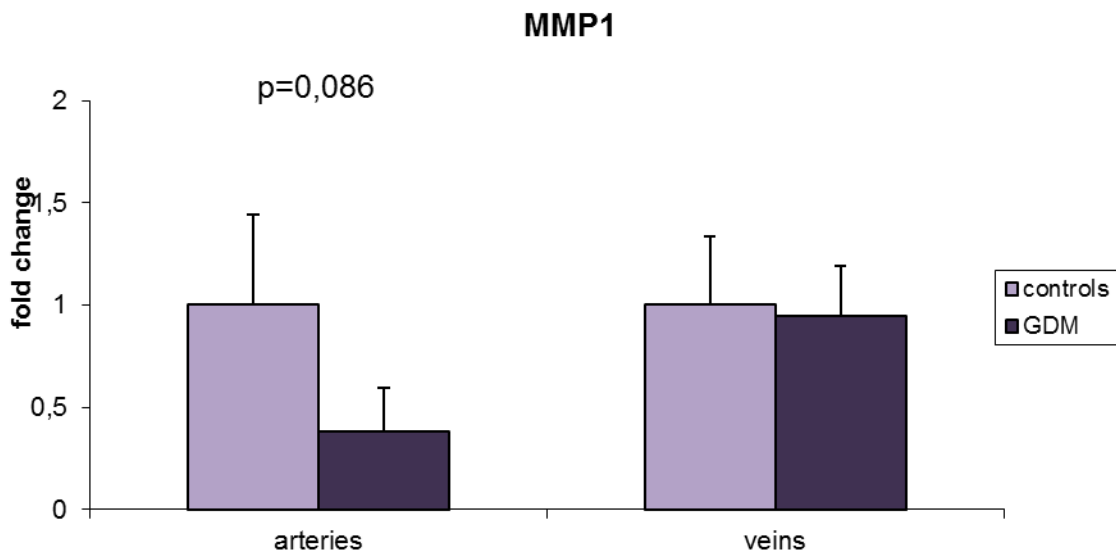


**Abbildung 6.** FGFR1; Fold Change von GDM und Kontrollen in arteriellen und venösen Gefäßen. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

### 3.2.1.5 MMP1

Ähnlich wie bei FGFR1 zeigte der Marker MMP1 in den arteriellen Proben keinen eindeutig signifikanten Unterschied in der Expression ( $p=0,086$ ). Da das Ergebnis jedoch nahezu signifikant war, wurde auch die Expression von MMP1 in isolierten Endothelzellen untersucht.

In den Arterien bei GDM wurde MMP1 nur zu  $38 \% \pm 22 \%$  ( $p=0,086$ ) des Niveaus der Kontrollen exprimiert.

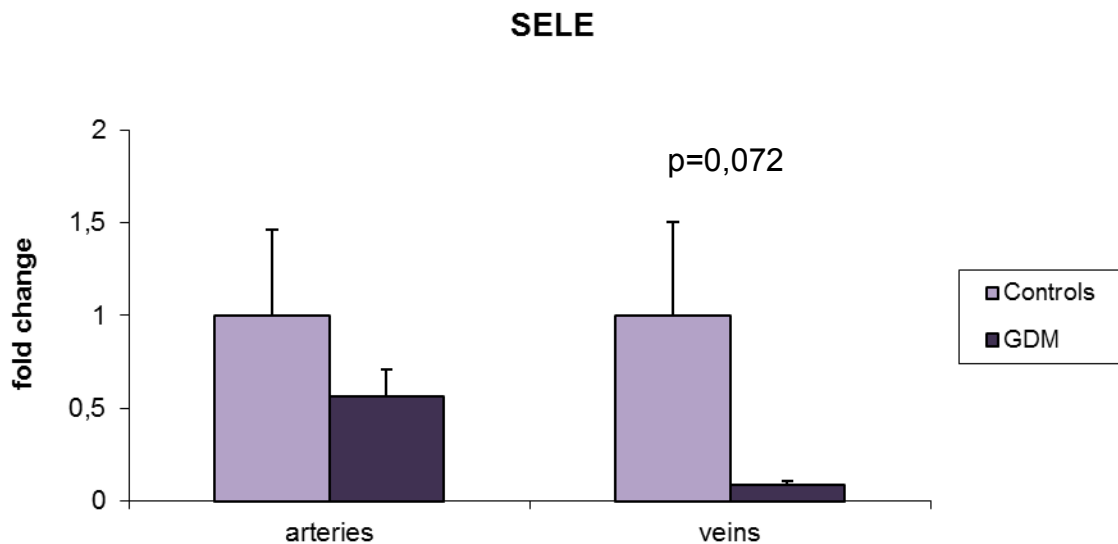


**Abbildung 7.** MMP1; Fold Change von GDM und Kontrollen in arteriellen und venösen Gefäßen. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben

### 3.2.1.6 SELE

Bei der Untersuchung von SELE zeigten die venösen Proben keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,072$ ) bei der Expression in Gefäßen aus GDM-Plazenten und gesunden Kontrollen. Da das Ergebnis aber auch nahezu signifikant war, wurde ebenfalls die Expression von SELE in isolierten Endothelzellen untersucht.

In den Venen bei GDM wurde SELE nur zu  $9\% \pm 2\%$  ( $p=0,072$ ) des Niveaus der Kontrollen exprimiert.



**Abbildung 8.** SELE; Fold Change von GDM und Kontrollen in arteriellen und venösen Gefäßen. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

### 3.2.2 Unterschied der Expression untersuchter Marker zwischen arteriellen und venösen Kontrollen

Um den Unterschied der Expression der untersuchten Marker in Arterien und Venen vergleichen zu können, wurde der FC-Wert der venösen Kontrollen an den FC-Wert der arteriellen Kontrollen angeglichen. Der FC-Wert der Arterien wurde auf 1 gesetzt.

**Tabelle 9.** Unterschied der Mean FC-Werte der venösen Kontrollen im Vergleich zu den arteriellen Kontrollen mit p-Wert

Mittelwert der Unterschiede venöser Kontrollen zu arteriellen Kontrollen (FC-Wert =1)		
	venös	p-Wert
CD34	0,78	0,391
CDH5	1,24	0,348
FGF2	0,78	0,192
FGFR1	0,74	0,416
FGFR2	0,92	0,856
FLT1	0,88	0,543
KDR	0,87	0,427
MMP1	0,79	0,678
SELE	1,49	0,452
sFLT1	1,30	0,661
VCAM1	0,61	0,310
VEGFA	0,95	0,863

### **3.3 Auswertung der RT-PCR Daten der kultivierten Endothelzellen**

#### **3.3.1 Fold Change**

In den folgenden Tabellen wird der gemittelte Fold Change der Proben von arteriellen und venösen Endothelzellen dargestellt. Es wurden die Marker untersucht, die im ersten Teil der Arbeit signifikante Ergebnisse bzw. eine deutliche Tendenz zeigten. Die Fold Change-Werte der Endothelzellen von GDM-Proben (Mean FC GDM) wurden an die der Kontrollen (Mean FC Kontrollen) angeglichen. Der Mean FC Kontrollen wurde bei jedem Marker mittels Dreisatz auf 1 gesetzt um eine anschauliche Darstellung zu ermöglichen.

**Tabelle 10.** Mean Fold Change der arteriellen Endothelzellen von GDM Proben mit p-Wert

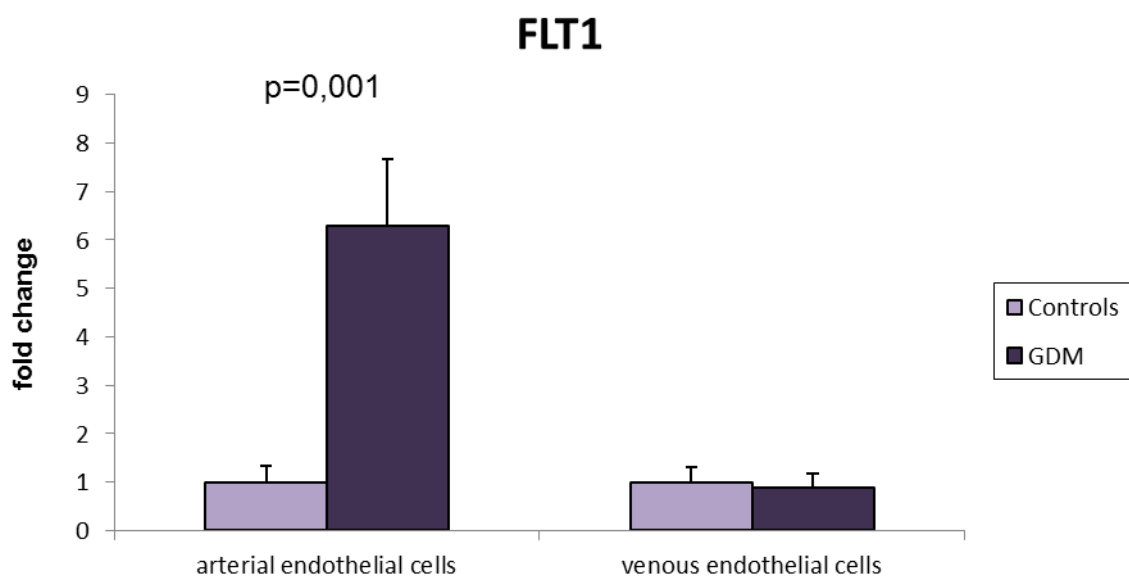
<b>Mittelwert der Unterschiede zwischen GDM und Kontrollen in arteriellen Endothelzellen</b>		
	<b>FC-Wert</b>	<b>p-Wert</b>
<b>FGFR1</b>	1,20	0,278
<b>FGFR2</b>	0,90	0,934
<b>FLT1</b>	6,29	<b>0,001</b>
<b>KDR</b>	0,71	0,750
<b>MMP1</b>	0,53	0,800
<b>SELE</b>	1,99	0,147
<b>sFLT1</b>	0,45	0,786

**Tabelle 11.** Mean Fold Change der venösen Endothelzellen von GDM Proben mit p-Wert

Mittelwert der Unterschiede zwischen GDM und Kontrollen in venösen Endothelzellen		
	FC-Wert	p-Wert
FGFR1	1,25	0,648
FGFR2	0,98	0,941
FLT1	0,90	0,705
KDR	0,98	0,721
MMP1	2,76	0,556
SELE	0,02	0,134
sFLT1	0,89	0,515

### 3.3.2 FLT1

In den Endothelzellen aus arteriellen Gefäßen wurde FLT1  $6,29 \pm 1,37$  mal ( $p=0,001$ ) stärker exprimiert als in den Kontrollen. In Abbildung 8 wird das Ergebnis dargestellt.



**Abbildung 9.** FLT1; Fold Change von GDM und Kontrollen in arteriellen und venösen Endothelzellen. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben

## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, heraus zu finden, ob GDM in den Plazentaendothelzellen zu einer veränderten Expression von Markern führt. Diese Marker stehen für Proteine, die endotheliale Funktion regulieren.

### 4.1 Patientendaten

Bei der Auswertung der Patientendaten fiel besonders der große Unterschied bei der Betrachtung des BMI der GDM-Patientinnen ( $32,7 \text{ kg/m}^2$ ) zu den Kontrollen ( $23,6 \text{ kg/m}^2$ ) auf. Dies korreliert mit einem erhöhten Risiko GDM bei erhöhten BMI zu entwickeln, wobei das Risiko mit der Höhe des BMI steigt (32). Ein weiterer signifikanter Unterschied war beim maternalen Alter zu erkennen. Mütter mit GDM waren bei der Geburt im Durchschnitt sechs Jahre älter als die Mütter der Vergleichsgruppe. Auch dieses Ergebnis korreliert mit dem steigenden Risiko GDM mit steigendem Alter zu entwickeln (32).

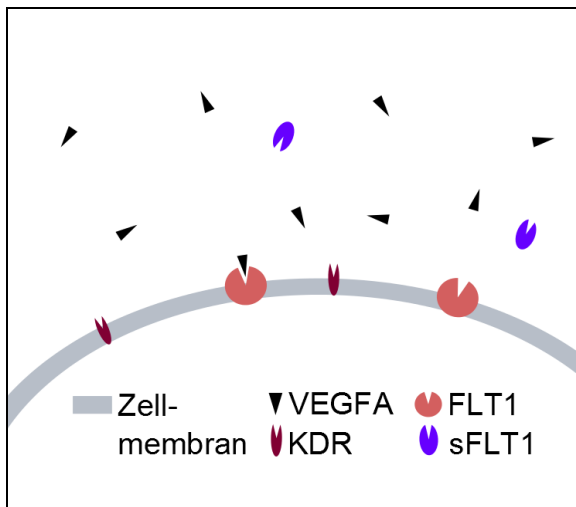
Das Kindsgewicht und die Kindgröße zeigten keinen Unterschied beim Vergleich der zwei Patientinnengruppen, obwohl das Risiko für Makrosomie bei GDM steigt. Es zeigte sich sogar eher eine Tendenz dahingehend, dass die Kinder von Müttern mit GDM leichter waren versus der Kontrollgruppe. Mögliche Erklärungen dafür könnten sein, dass die Kinder im Durchschnitt in der 38,3. SSW zur Welt gekommen (Kontrollen: 39,3. SSW) sind und einer vermutlich guten Einstellung des mütterlichen GDM.

### 4.2 Ganze Gefäße

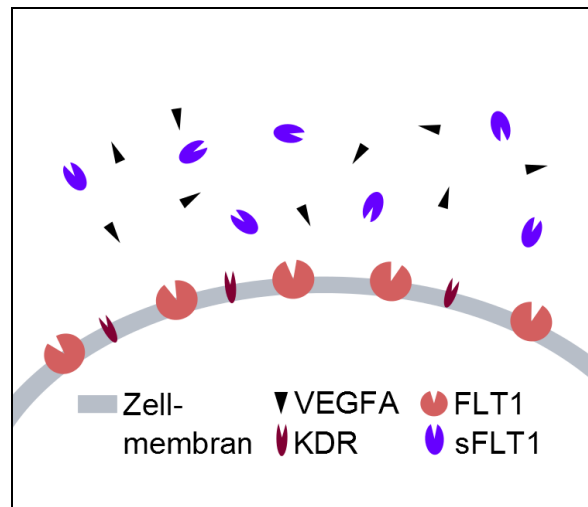
Eine eindeutige Veränderung der Expression von Markern im Vergleich zu den Kontrollen wurde nur in venösen Gefäßen gefunden. Es wurden vor allem die VEGFA-Rezeptoren FLT1 (2,5x häufiger), sFLT1 (3,86x häufiger) und KDR (1,41x häufiger) vermehrt in den Gefäßen exprimiert. Bei der Untersuchung von VEGFA

konnte im Rahmen dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied in der Expression bei GDM festgestellt werden, jedoch ging die Tendenz in Richtung einer verminderten Expression. In anderen Studien wurde sowohl eine verminderte Expression von VEGFA in maternalem und Nabelschnurplasma (2), als auch eine Überexpression von VEGFA und dessen Rezeptoren FLT1 und KDR in plazentaren Gefäßen beschrieben (15). FLT1 und KDR sind membranständige Rezeptoren und wirken somit direkt auf die Zelle. Eine Überexpression der Rezeptoren kann somit zu einer verstärkten Wirkung von VEGFA auf die Gefäße führen, mit vermehrter Angiogenese, die auch histologisch nachweisbar ist (2).

Jedoch konnte auch bei sFLT1 eine deutliche Überexpression festgestellt werden. sFLT1 bindet als löslicher Rezeptor VEGFA in der Peripherie. Ein Teil des VEGFA steht dadurch für die membranständigen Rezeptoren nicht zur Verfügung und die Wirkung auf die Zellen wird abgeschwächt.



**Abbildung 10:** Expression der VEGF-Rezeptoren bei normaler Stoffwechsellage der Mutter

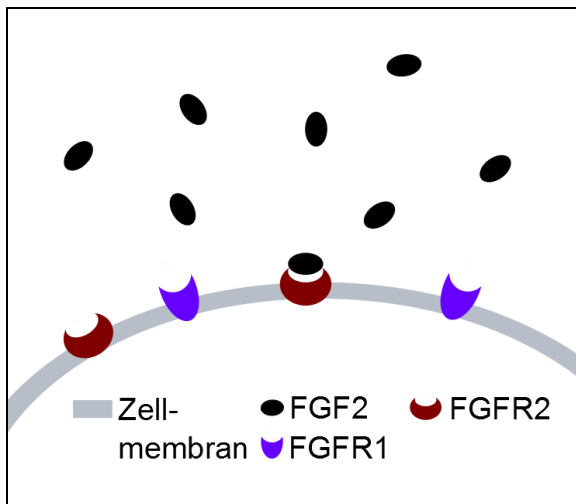


**Abbildung 11:** Expression der VEGF-Rezeptoren bei GDM

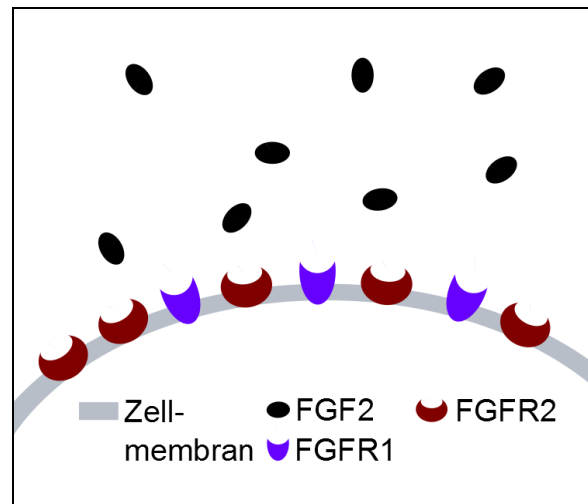
Unklar ist, ob die höhere Anzahl der Rezeptoren wirklich eine höhere VEGFA-Wirkung auf die Zellen verursacht. Dafür müsste die VEGFA-Konzentration so hoch sein, dass die zusätzlich gebildeten Rezeptoren bei GDM auch gesättigt

werden können. Ist dies nicht der Fall, da VEGFA nicht im ausreichenden Maße gebildet wird, hätte eine Überexpression der Rezeptoren keine Auswirkung auf die Zelle. Um diese Frage zu klären, müssten weiterführende Versuche durchgeführt werden, die die Sättigung der Rezeptoren ermitteln.

Weiters zeigte auch FGFR2 einen eindeutigen Unterschied, mit einer 2,38-fach erhöhten Expression. Wie bei den VEGFA-Rezeptoren zeigte der Ligand FGF2 keinen Unterschied, aber eine Tendenz zu einer verminderten Expression im Vergleich zu den Kontrollen, trotzdem kann die Überexpression der Rezeptoren eine verstärkte Wirkung auf die Zellen durch FGF2 bewirken. Auch FGFR1 zeigte eine Überexpression (1,32x häufiger), die jedoch nicht eindeutig signifikant war, aber einen Trend erkennen ließ. FGF2 ist ein Mitogen und reguliert das Zellüberleben, die Zellteilung, Differenzierung, Zellmigration und Angiogenese. Vergleichsstudien zeigten gegenteilige Ergebnisse, demnach wurde FGF2 vermehrt und die FGF-Rezeptoren vermindert exprimiert (2).



**Abbildung 12:** Expression der FGF2-Rezeptoren bei normaler Stoffwechsellage der Mutter



**Abbildung 13:** Expression der FGF2-Rezeptoren bei GDM

SELE und MMP1 zeigten lediglich im einseitigen T-Test einen signifikanten Unterschied. Dabei lag die Expression von SELE in venösen Gefäßen nur bei 9 % des Niveaus der Kontrollen. SELE codiert ein Zell-Adhäsionsmolekül, das bei verminderter Expression weniger produziert wird. Dies kann Zell-Zell-Verbindungen und die Permeabilität negativ beeinflussen. MMP1 wurde in den arteriellen Gefäßen vermindert (zu 38 %) exprimiert. MMPs spielen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Migration, Differenzierung, Angiogenese und Apoptose. Sie beeinflussen den Abbau der extrazellulären Matrix. Diese Funktionen können bei geringerer Expression in verminderter Form ausgeführt werden.

### **4.3 Endothelzellen**

Die Ergebnisse der Endothelzellen konnten die Ergebnisse der ganzen Gefäße nicht bestätigen. Es zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied bei der Expression von FLT1 in den arteriellen Endothelzellen, dabei wurde FLT1 6,3x häufiger exprimiert. Im Vergleich dazu wurde in den ganzen Gefäßen eine um ca. 10 % verminderte FLT1 Expression in den Arterien festgestellt. Diese große Diskrepanz ist kritisch zu betrachten und erneute Untersuchungen mit einer höheren Fallzahl sind erforderlich.

Eine Diskrepanz zwischen Endothelzellen und ganzen Gefäßen zeigte sich auch bei der Expression von FGFR2, FLT1, KDR und sFLT1 in den Venen. Während in den ganzen Gefäßen die Marker vermehrt exprimiert wurden, konnten sie in den Endothelzellen im Vergleich zu den Kontrollen nur vermindert festgestellt werden. Auch hier müssten weitere Versuche erfolgen um die Ergebnisse konkretisieren.

SELE und MMP1 zeigten in den Endothelzellen zwar keinen signifikanten Unterschied, jedoch war die Tendenz der Expression ähnlich wie in den ganzen Gefäßen. SELE wurde stark vermindert in den venösen Gefäßen und MMP1 vermindert in den arteriellen Gefäßen gemessen.

Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse in ganzen Gefäßen und isolierten Endothelzellen können sein, dass die festgestellten Unterschiede nicht durch

Endothelzellen sondern durch andere vaskuläre Zellen hervorgerufen werden. Außerdem könnte durch die Isolierung der Endothelzellen und die darauffolgende, über mehrere Passagen ablaufenden (unter normalen Zellkulturbedingungen) Kultivierung, der Unterschied, der durch das diabetische Stoffwechsellmilieu hervorgerufen wird, verloren gehen. Würde sich ein Ergebnis der ganzen Gefäße in den isolierten und kultivierten Endothelzellen bestätigen, könnte dies ein Hinweis auf bleibende epigenetische Unterschiede sein. Um jedoch solche epigenetischen Unterschiede nachweisen zu können, wären weitere Untersuchungen erforderlich.

#### **4.4 Conclusio**

Obwohl die Ergebnisse zwischen ganzen Gefäßen und Endothelzellen Diskrepanzen aufweisen, können Veränderungen von Markern für endotheliale Dysfunktion in den Plazenten bei GDM aufgezeigt werden. Diese Erkenntnis ist insofern wichtig, da der Fetus und die Plazenta eine Einheit bilden. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der placentaren Gefäße, auf die Gefäße des Fetus übertragen werden können. Die pathologisch veränderte Stoffwechsellage der Mutter kann somit nachhaltige Folgen für das ungeborene Kind nach sich ziehen. Die Tatsache, dass diese Ergebnisse nicht eindeutig sind, macht deutlich, dass noch weitere Studien von Nöten sind. Interessant wäre auch die Frage, ob und wie lang sich die veränderte Expression von Markern nach der Geburt nachweisen lässt.

## 5 Literaturverzeichnis

(1) Kiechle M editor. Gynäkologie und Geburtshilfe. 2. Auflage ed. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2011.

(2) Gauster M, Desoye G, Totsch M, Hiden U. The placenta and gestational diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2012 Feb;12(1):16-23.

(3) Stalla GK editor. Therapielexikon Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2007.

(4) International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel, Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, et al. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care* 2010 Mar;33(3):676-682.

(5) Buckley BS, Harreiter J, Damm P, Corcoy R, Chico A, Simmons D, et al. Gestational diabetes mellitus in Europe: prevalence, current screening practice and barriers to screening. A review. *Diabetic Med* 2012;29(7):844 <last\_page> 854.

(6) Kleinwechter H, Schäfer-Graf U, Bühner C, Hoesli I, Kainer F, Kautzky-Willer A, et al. Gestationsdiabetes mellitus (GDM) Evidenzbasierte Leitlinie zu Diagnostik, Therapie u. Nachsorge der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). 2011.

(7) Gilmartin AB, Ural SH, Repke JT. Gestational diabetes mellitus. *Rev Obstet Gynecol* 2008 Summer;1(3):129-134.

(8) Hien P, Böhm B. Diabetes Handbuch. 5. Auflage ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2007.

(9) J. Weigel. Nachuntersuchung von Kindern aus Schwangerschaften mit Gestationsdiabetes. Berlin: Klinik für Geburtsmedizin des Vivantes Klinikum

Neukölln; 2008.

(10) Petru E. Geburtshilfe. . 6.th ed. Graz: Servicebetrieb ÖH-Uni Graz GmbH; 2007. p. 110-111.

(11) Bancher-Todesca D, Worda C, Klein K, Kautzky-Willer A, Repa A. Leitlinie Gestationsdiabetes. 2010.

(12) Eringa EC, Serne EH, Meijer RI, Schalkwijk CG, Houben AJ, Stehouwer CD, et al. Endothelial dysfunction in (pre)diabetes: Characteristics, causative mechanisms and pathogenic role in type 2 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 2013 Mar;14(1):39-48.

(13) De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 2000 Jul;130(5):963-974.

(14) Daskalakis G, Marinopoulos S, Krielesi V, Papapanagiotou A, Papantoniou N, Mesogitis S, et al. Placental pathology in women with gestational diabetes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008;87(4):403-407.

(15) Leach L. Placental vascular dysfunction in diabetic pregnancies: intimations of fetal cardiovascular disease? *Microcirculation* 2011 May;18(4):263-269.

(16) Schonfelder G, John M, Hopp H, Fuhr N, van Der Giet M, Paul M. Expression of inducible nitric oxide synthase in placenta of women with gestational diabetes. *FASEB J* 1996 May;10(7):777-784.

(17) Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, et al. Overweight and the metabolic syndrome in adult offspring of women with diet-treated gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 Jul;94(7):2464-2470.

(18) West NA, Crume TL, Maligie MA, Dabelea D. Cardiovascular risk factors in children exposed to maternal diabetes in utero. *Diabetologia* 2011 Mar;54(3):504-507.

(19) Plagemann A. Maternal diabetes and perinatal programming. *Early Hum Dev* 2011 Nov;87(11):743-747.

(20) GeneCards The Human Gene Compendium. CD34. 2012; Available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD34&search=CD34>. Accessed 01/09, 2013.

(21) GeneCards The Human Gene Compendium. CDH5. 2012; Available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDH5&search=cdh5>. Accessed 01/09, 2013.

(22) GeneCards The Human Gene Compendium. FGF2. 2012; Available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FGF2&search=fgf2>. Accessed 01/09, 2013.

(23) GeneCards The Human Gene Compendium. FGFR1. 2012; Available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FGFR1&search=FGFr1>. Accessed 09/01, 2013.

(24) GeneCards The Human Gene Compendium. FGFR2. 2012; Available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FGFR2&search=FGFr2>. Accessed 01/09, 2013.

(25) GeneCards The Human Gene Compendium. FLT1. 2012; Available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FLT1>. Accessed 01/09, 2013.

(26) GeneCards The Human Gene Compendium. KDR. 2012; Available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KDR&search=KDR>. Accessed 01/09, 2013.

(27) GeneCards The Human Gene Compendium. MMP1. 2012; Available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MMP1&search=mmp1>. Accessed 01/09, 2013.

(28) GeneCards The Human Gene Compendium. SELE. 2012; Available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SELE&search=sele>. Accessed

03/06, 2013.

(29) GeneCards The Human Gene Compendium. VCAM1. 2012; Available at:  
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VCAM1&search=VCAM1>.

Accessed 03/06, 2013.

(30) GeneCards The Human Gene Compendium. VEGFA. 2012; Available at:  
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VEGFA&search=VEGF>.

Accessed 01/09, 2013.

(31) GeneCards The Human Gene Compendium. RPL30. 2012; Available at:  
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RPL30&search=rpl30>.

Accessed 04/19, 2013.

(32) Torloni MR, Betran AP, Horta BL, Nakamura MU, Atallah AN, Moron AF, et al. Prepregnancy BMI and the risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Obes Rev* 2009 Mar;10(2):194-203.