

Diplomarbeit

**Auswirkungen von Gestationsdiabetes auf Humanmilch-
Oligosaccharide**

eingereicht von

Anna Maria Walzl

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Drⁱⁿ. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Universitätsklinikum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Geburtshilfe

unter der Anleitung von

Univ.-Ass. Priv.-Doz. Mag.pharm. Dr.rer.nat. Evelyn Jantscher-Krenn

Univ.-Prof. Dr.med. MHBA Herbert Fluhr

Graz, 12.01.2025

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.

Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass, sofern bei der Erstellung dieser Arbeit Künstliche Intelligenz (KI) Werkzeuge zur Generierung und/oder Korrektur bestimmter Textpassagen verwendet wurden, dieser Einsatz unter Einhaltung ethischer Grundsätze, akademischer Integrität und den Vorgaben meiner Universität erfolgte, sowie in Folge dies transparent gemacht und in angemessener Weise gekennzeichnet wurde.

Graz, am 12.01.2025

Anna Maria Walzl eh.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und mich bei dir Evelyn für deine tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung dieser Diplomarbeit bedanken. Du strahlst eine solch ansteckende Begeisterung für diese Thematik aus, die mich immer wieder aufs Neue fasziniert hat. Ich bin froh Teil der aufregenden Arbeit geworden zu sein. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr.med. MHBA Herbert Fluhr für die Unterstützung bedanken.

Ich möchte mich auch bei allen bedanken die mich auf meinem Weg durch das Medizinstudium und auch davor mit aller Kraft unterstützt haben. Als Erstes und am bedeutendsten zu erwähnen ist mein Papa Wolfgang, der am Tag meiner Aufnahmeprüfung von Stuttgart nachts aufgrund eines Flugausfalls mit einem Mietauto nach Kärnten, laut ihm „STUNDEN“ gefahren ist, um mich rechtzeitig in die Messehalle Graz zu bringen. Natürlich ist hier auch zu erwähnen, dass er seit 26 Jahren IMMER an meiner Seite gestanden ist. Ein dickes fettes Dankeschön an dich, den besten Papa der Welt!

Aber was wäre er und auch ich ohne meine Mama Sylvia, die mich mit ihrer Liebe zur Medizin als Oberschwester von klein auf mit ihrer Leidenschaft angesteckt hat und ohne Ausnahme IMMER für mich da war. Ohne dich Mama, wäre ich heute niemals da, wo ich jetzt bin. Ein unendliches Dankeschön auch an dich.

Ein Riesendankeschön gebührt auch meiner Schwester. Als Schwester hätte ich mir keine Bessere als dich vorstellen können, Lena! Du bist mir in meinen Höhen und Tiefen ausnahmslos mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Du inspirierst mich täglich mit deinem Talent und Engagement in deiner Arbeit als Innenarchitektin. Ich könnte als Schwester nicht stolzer auf dich sein. Danke für absolut alles. Ich freue mich auf weitere großartige Zeiten mit dir.

Patrick Trink - was wäre ich ohne dich? Du bist in mein Leben gepurzelt und bist für mich in kürzester Zeit zu einem meiner wichtigsten Menschen geworden. Ich bewundere dich für deine Stärke und Art Dinge hinzunehmen und damit umzugehen. Wenn ich alles aufzählen würde, wofür ich dir dankbar bin, würde die Arbeit nie fertig werden, deshalb sag ich einfach nur DANKE. Und du weißt, was sich hinter diesem Danke alles verbirgt.

Ein weiteres Dankeschön, möchte ich an dieser Stelle einem ganz besonderen Mann, Patrick Hochegger aussprechen. Du bist ein wahnsinnig toller Mensch und immer für uns da. An der Seite meiner Schwester bereicherst du unsere Familie enorm. Danke für alles.

Zu guter Letzt auch ein Riesendankeschön an unseren Jakob Stiegler. Du zauberst mit deiner warmherzigen Art allen schnell ein Lächeln aufs Gesicht, was zu einer der besten Eigenschaften zählt, die man besitzen kann.

Zusammenfassung

Hintergrund: Gestationsdiabetes mellitus (GDM) ist definiert als eine Glukoseintoleranz unterschiedlichen Schweregrades, die zum ersten Mal während der Schwangerschaft auftritt. GDM birgt erhebliche kurz- und langfristige Gesundheitsrisiken für die Mutter, den sich entwickelnden Fetus und deren Nachkommen. Humanmilch-Oligosaccharide (HMO) sind hoch bioaktive Glykane in der Muttermilch, die dem gestillten Kind viele Vorteile bieten. Die HMO-Konzentration in der Muttermilch variiert in Abhängigkeit von genetischen Faktoren wie dem mütterlichen Sekretorstatus, aber auch von veränderbaren Faktoren wie Ernährungs- und Lebensgewohnheiten, oder Stoffwechszustand. Wir stellten die Hypothese auf, dass HMO in der Muttermilch durch GDM in der vorangegangenen Schwangerschaft verändert werden.

Methoden: Wir hatten Zugang zu Proben aus einer Studie, die am UT Southwestern Medical Center, Texas durchgeführt wurde und bei der Muttermilchproben zu 4 Zeitpunkten, während eines hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuch 5-7 Wochen und 15-17 Wochen postpartum gesammelt wurden. Muttermilch (5µl) wurde mit Wasser verdünnt und mit einem internen Standard (lineares B6-Trisaccharid) versetzt. Lipide, Proteine und Salze wurden durch Festphasenextraktion (C18-, Carbograph-Säulchen) entfernt. Die isolierten, getrockneten HMO wurden mit 2-Aminobenzamid (2AB) fluoreszenzmarkiert und nach Entfernung überschüssigen 2ABs, mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion getrennt.

Ergebnisse: Milch von Müttern, die während der Schwangerschaft GDM hatten, enthielt 5-7 Wochen nach der Geburt niedrigere Konzentrationen von LDFT-, LNnT-, LSTb-, LSTc-, LNH1- und DSLNT. Wir zeigen auch, dass sich die HMO-Konzentrationen in der Muttermilch unabhängig vom GDM-Status, im Verlauf des Clamp-Versuchs veränderten. LDFT, LNFP1 und LNDFH verringerten sich signifikant während des Clamp-Versuchs. LNT hingegen wies einen signifikanten Anstieg auf. Wir beobachteten auch niedrigere 6'SL-, LSTc- und LNH2-Konzentrationen im Verlauf der Laktation. LNnT war negativ mit dem BMI nach der Geburt korreliert. Höhere C-Peptid- und Insulin-Werte waren mit niedrigeren HMO-Konzentrationen in Muttermilch assoziiert.

Schlussfolgerung: Unsere Studie zeigte signifikante Unterschiede der HMO-Konzentrationen in der Muttermilch zwischen Müttern mit und ohne GDM. Dies war die erste Studie bei der die HMO-Konzentrationen über einen hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuch untersucht wurden. Es sind weitere Studien mit größeren Studienpopulationen erforderlich, um die Ergebnisse zu untermauern.

Abstract

Background: Gestational diabetes mellitus (GDM) is defined as a glucose intolerance of varying severity that appears for the first time during pregnancy. GDM poses significant short-and long-term health risks to the mother, developing fetus, and offspring. Human milk oligosaccharides (HMO) are highly bioactive glycans in human milk with many benefits for the breast-fed-infant. HMO concentration in human milk varies with genetic factors such as maternal secretor status, but also with modifiable factors such as diet, lifestyle, or metabolic status. We hypothesized that HMO in human milk are altered by GDM in the previous pregnancy.

Methods: We had access to human milk samples collected at four time points during a hyperglycemic-euglycemic clamp 5-7 weeks and 15-17 weeks postpartum at UT Southwestern Medical Center Texas. Human milk (5 μ l) was diluted with water and internal standard (linear B6 trisaccharide) was added. Lipids, proteins and salts were removed by solid phase extraction (C18/Carbograph). Isolated dried HMO were fluorescently labeled with 2-aminobenzamide (2AB) and separated by HPLC with fluorescence detection after removal of excess 2AB using silica.

Results: Milk from mothers who had experienced GDM during pregnancy showed significantly lower concentrations of LDFT, LNnT, LSTb, LSTc, LNH1 and DSLNT at 5-7 weeks postpartum. HMO concentrations in human milk also changed independently of GDM status during the clamp experiment. LDFT, LNFP1 and LNDFH in milk significantly decreased during the clamp, while LNT showed a significant increase. Comparing HMO concentrations at 5-7 and 15-17 weeks postpartum, we observed a decrease of 6'SL, LSTc and LNH2 with time. LNnT was negatively correlated with postpartum BMI. Higher C-peptide and insulin levels were associated with lower HMO concentrations in human milk.

Conclusion: Our study showed significant differences in HMO-concentrations in human milk between mothers with and without previous GDM. In addition, this was the first study to look at changes in HMO-concentrations over a hyperinsulinemic-euglycemic clamp experiment. Further studies with larger study populations are needed to corroborate the results.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und deren Erklärung.....	1
Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 Gestationsdiabetes	6
1.1.1 Definition.....	6
1.1.2 Epidemiologie.....	6
1.1.3 Pathophysiologie	7
1.1.4 Diagnostik.....	8
1.1.5 Maternale Komplikationen	10
1.1.6 Kindliche Komplikationen	11
1.1.7 Therapie	13
1.2 Vorteile der Muttermilch und Stillen.....	17
1.2.1 Bestandteile der Muttermilch: Woher die Effekte kommen.....	19
1.3 Human-Milch Oligosaccharide.....	20
1.3.1 Struktur und Synthese.....	20
1.3.2 Postulierte positive HMO Effekte	21
1.3.3 HMO Variabilität.....	27
1.3.4 Einfluss von Glukosemetabolismus auf HMO in Muttermilch und mögliche Folgen? 30	
2 Hypothese und Ziele.....	31
3 Material und Methoden	32
3.1 Studiendesign	32
3.1.1 Erster Studienbesuch	33
3.1.2 Zweiter Studienbesuch	33
3.2 Follow up Studie.....	34
3.3 Studienpopulation.....	34
3.4 HMO Analyse.....	35
3.4.1 HMO-Isolierung und Analyse durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion	35
3.4.2 Identifikation und Integration der HMO-Peaks.....	38
3.5 Statistischen Methoden.....	39

4	Ergebnisse.....	40
4.1	Merkmale der Studienpopulation	40
4.2	HMO-Konzentrationen in der Muttermilch.....	42
4.3	Einfluss von GDM auf HMO-Konzentration in Muttermilch.....	43
4.4	HMO-Konzentrationen in Muttermilch im Laufe des hyperinsulinämisch- euglykämischen Clamp-Versuchs bei Müttern mit und ohne vorangegangenen GDM.	47
4.5	HMO-Konzentrationen im Verlauf der Laktation bei Müttern mit vorangegangenen GDM-Schwangerschaften	51
4.6	Korrelation von HMO-Konzentrationen mit mütterlichem BMI	55
4.7	Korrelation von HMO in Muttermilch mit dem Glukosestoffwechsel postpartum 56	
5	Diskussion	59
	Literaturverzeichnis	67

Abkürzungen und deren Erklärung

2'FL	2'-Fukosyllaktose
2-AB	2-Aminobenzamid
3'S-3FL	3'-Sialyl-3-Fukosyllaktose
3'SL	3'-Sialyllaktose
3FL	3-Fukosyllaktose
6'SL	6'-Sialyllaktose
ACN	Acetonitril
AS	Aminosäuren
AUC	area under the curve
BMI	Body Mass Index
CRP	C-reaktives Protein
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankung
DSLNT	Disialyl-Lakto-N-Tetraose
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
FS	Fettsäuren
Fuc	Fukose
FUT2	α 1-2 Fukosyltransferase
FUT3	α 1-3/4 Fukosyltransferase
Gal	Galaktose
GDM	Gestationsdiabetes mellitus
GIT	Glukoseinfusionsrate
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
HAPO	Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes
HbA1c	glykiertes Hämoglobin
HMO	Humane Milch Oligosaccharide
IADPSG	International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group
IDF	International Diabetes Federation
IFG	gestörte Nüchternglukose

IGT	eingeschränkte Glukosetoleranz
IQ	Intelligenzquotient
IRB	International Review Board
LDFT	Laktodifukotetraose
Le	Lewis Blutgruppen System
LGA	large for gestational age
LNDFH	Lakto-N-Difukohexaose
LNFP1/2/3	Lakto-N-Fukopentaose 1/2/3
LNH1/2	Lakto-N-Hexaose 1/2
LNnT	Lakto-N-Neotetraose
LNT	Lakto-N-Tetraose
LSTa/b/c	Sialyl-Lakto-N-Tetraose a/b/c
MNT	medizinische Ernährungstherapie
NDDG	National Diabetes Data Group
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
Neu5AC	N-acetyl-Neuraminsäure
NGT	normale Glukosetoleranz
NMDA	N-Methyl-D-Aspart
oGTT	oraler Glukosetoleranztest
RSV	Respiratorisches Synzyti-Virus
Se- Le-	<i>Le</i> -negative Nicht-Sekretoren
Se- Le+	<i>Le</i> -positive Nicht-Sekretoren
Se	Sekretor
Se+ Le-	<i>Le</i> -negative Sekretoren
Se+ Le+	<i>Le</i> -positive Sekretoren
SSW	Schwangerschaftswoche
TFA	Trifluoressigsäure
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Positive Effekte des Stillens auf Mutter (blau) und Kind (grün).....	18
Abbildung 2 HMO Strukturen.....	20
Abbildung 3 Postulierte positive Effekte auf das gestillte Baby und die stillende Mutter..	21
Abbildung 4 Schema des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuch.....	34
Abbildung 5 Schema der Probenvorbereitung und HMO-Isolierung für die HPLC-Analyse	35
Abbildung 6 HMO-Peaks der für die Analyse verwendeten HMO der Milchprobe (blau) im Vergleich mit dem HMO-Standard (rot)	38
Abbildung 7 HMO-Konzentrationen in der Muttermilch der gesamten Studiengruppe	42
Abbildung 8 Konzentrationen fukosylierter HMO (AUC normalisiert auf den internen Standard) in der Muttermilch nach Schwangerschaften mit und ohne GDM.	44
Abbildung 9 Konzentrationen sialylierter HMO und Gesamt-HMO-Konzentrationen (AUC normalisiert auf den internen Standard) in der Muttermilch nach Schwangerschaften mit und ohne GDM.....	45
Abbildung 10 Konzentrationen unmodifizierter HMO (AUC normalisiert auf den internen Standard) in der Muttermilch nach Schwangerschaften mit und ohne GDM	46
Abbildung 11 Konzentrationen von HMO in der Milch während eines hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamp-Versuchs bei Müttern mit und ohne vorherigem GDM.	48
Abbildung 12 HMO-Konzentrationen in der Muttermilch während eines hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamp-Versuch bei Frauen unabhängig vom früheren GDM-Status.	50
Abbildung 13 Vergleich der Konzentrationen fukosylierter HMO (AUC normalisiert auf den internen Standard) in der Muttermilch 5-7 Wochen und 15-17 Wochen postpartum bei Müttern mit vorangegangenen GDM-Schwangerschaften.	52
Abbildung 14 Vergleich der Konzentrationen sialylierter HMO (AUC normalisiert auf den internen Standard) in der Muttermilch 5-7 Wochen und 15-17 Wochen postpartum bei Müttern mit vorangegangenen GDM-Schwangerschaften.	53

Abbildung 15 Vergleich der Konzentrationen unmodifizierter HMO (AUC normalisiert auf den internen Standard) in der Muttermilch 5-7 Wochen und 15-17 Wochen postpartum bei Müttern mit vorangegangenen GDM-Schwangerschaften.	53
Abbildung 16 HMO-Konzentrationen im Verlauf des oGTT bei Müttern mit vorangegangenen GDM-Schwangerschaften zu zwei Zeitpunkten in der Laktation.	54
Abbildung 17 Korrelation individueller HMO-Konzentrationen mit dem BMI 5-7 Wochen postpartum	55
Abbildung 18 Korrelation individueller HMO-Konzentrationen mit den C-Peptidwerten zum Zeitpunkt 120 min des oGTT	57
Abbildung 19 Korrelation individueller HMO-Konzentrationen mit den Insulinwerten zum Zeitpunkt 120 min des oGTT	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnostische Blutglukose Grenzwerte des oGTT 75g Glukose nach den IADPSG-Kriterien (28)	9
Tabelle 2: Zielwerte des Blutzuckerspiegels (3,59)	15
Tabelle 3 Bekannte Retentionszeit der HMO im HMO-Standard.....	38
Tabelle 4 Charakteristika der Studienpopulation	41

1 Einleitung

1.1 Gestationsdiabetes

1.1.1 Definition

Gestationsdiabetes (GDM) oder auch Schwangerschaftsdiabetes ist definiert als Glukoseintoleranz, die erstmals während einer Schwangerschaft auftritt (1).

1.1.2 Epidemiologie

GDM stellt die häufigste Stoffwechselstörung in der Schwangerschaft dar (2) und betrifft rund 10% aller Schwangerschaften in Österreich (3,4). Die weltweiten Prävalenzen von GDM variieren aufgrund unterschiedlicher epidemiologischer Untersuchungen in verschiedenen Bevölkerungsgruppen hinsichtlich des Untersuchungszeitpunkts, risikoadaptierten oder generellen Screenings, sowie der verwendeten diagnostischen Testverfahren mit unterschiedlichen Diagnosekriterien (5). Unter der Einhaltung der Kriterien der International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group (IADPSG) wurde 2021 eine vergleichende Schätzung der globalen Prävalenz von GDM durch die International Diabetes Federation (IDF) im Rahmen einer Metaanalyse von 57 Studien durchgeführt. Die gepoolte globale standardisierte Prävalenz lag bei 14% (95% Konfidenzintervall: 13,97-14,04%) aller Schwangerschaften (6).

Studien zufolge ist die Prävalenz in den letzten Jahren beträchtlich angestiegen. Gründe für den weltweiten Anstieg sind zum einen Änderungen bei Screeningverfahren, als auch die Festlegung neuer diagnostischer Grenzwerte. Zudem nehmen auch wesentliche Risikofaktoren, wie vor allem Adipositas und auch das erhöhte Alter (>35 Jahre) schwangerer Frauen, immer stärker zu (5).

Ebenso wird die Entstehung von GDM durch weitere Faktoren begünstigt. Dazu gehören die ethnische Zugehörigkeit, das Vorliegen einer positiven Familienanamnese für Diabetes mellitus Typ II, GDM in einer vorangegangenen Schwangerschaft, in der Anamnese erhobener Prädiabetes (Nüchternblutzucker ≥ 100 mg/dl, Status post (St. p.), Geburtsgewicht ≥ 4500 g in einer früheren Schwangerschaft und weitere Erkrankungen der Insulinregulation wie das Polyzystische Ovar-Syndrom (3,5,7–10).

1.1.3 Pathophysiologie

Die gesamte Komplexität der pathophysiologischen Mechanismen von GDM ist noch nicht vollständig geklärt (5). Während einer gesunden Schwangerschaft steigt der Insulinbedarf physiologisch an. Der Grund dafür ist die zunehmende Insulinresistenz im Laufe der Schwangerschaft. Der fetale Energiebedarf wird größtenteils durch Glukose gedeckt, welche über einen Konzentrationsgradienten passiv über die Plazenta zum Fetus transportiert wird. Da der Fetus in der fortgeschrittenen Schwangerschaft immer mehr Glukose zu sich umleitet, reduziert sich der maternale Glukosespiegel. Um den Konzentrationsgradienten aufrecht erhalten zu können, kommt es zu einem Anstieg plazentarer und lokaler Hormone, welche eine Insulinresistenz bewirken und die hepatische Glukoseproduktion erhöhen (11–16). Gleichzeitig kommt es zu einer Vermehrung der β -Zellen und zu einer Erhöhung der glukosestimulierten Insulinsekretion, um eine übermäßige Glukosezufuhr zum Fetus zu vermeiden (17). Nach der Geburt nimmt die β -Zellmasse wieder ihre ursprüngliche Größe an (18,19).

In erster Linie basiert die Pathophysiologie von GDM auf einer β -Zell-Dysfunktion in Kombination mit Gewebeinsulinresistenz (20). Durch die β -Zell-Dysfunktion kommt es entweder zu einem vollständigen Versagen der Insulinsekretion oder zu einem relativen Insulinmangel. Die Insulinresistenz, welche zusätzlich zur physiologischen Erhöhung der Insulinresistenz im Laufe der Schwangerschaft besteht, kann dadurch nicht mehr kompensiert werden (21,22). Unterschieden wird zwischen einem insulinresistenten GDM (50-60%), einem insulinmangelbedingten GDM (15-30%) und einem GDM bei dem beide pathophysiologischen Faktoren vorliegen (23).

Kausal für die Insulinresistenz sowie auch für die Insulinsekretionsstörung ist zum Teil eine genetische Prädisposition. Übergewicht, schlechter Lebensstil, sowie der Einfluss von Umweltfaktoren wirken sich negativ auf die Ausprägung der genetisch prädisponierten Insulinresistenz und Insulinsekretionsstörung aus. Somit dürfte bereits präkonzeptionell eine herabgesetzte Insulinsensitivität vorliegen, die durch den physiologischen Anstieg der Insulinresistenz während der Schwangerschaft verstärkt wird und durch die hormonell bedingte Steigerung der hepatischen Glukoseproduktion nicht ausreichend kompensiert werden kann (5). Zudem können auch subklinischen Entzündungen, die durch die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen in der Plazenta sowie auch im Fettgewebe entstehen, die Insulinresistenz erhöhen (24,25).

1.1.4 Diagnostik

In Österreich wird bei allen Frauen zwischen der 24.-28. Schwangerschaftswoche (SSW) im Rahmen der zweiten Mutter-Kind-Pass Labor-Vorsorge ein generelles Screening zur Diagnostik einer möglichen Glukosetoleranzstörung empfohlen. Für dieses Screening wird der orale Glukosetoleranztest (oGTT) herangezogen (3,10,26). Da die pathophysiologischen Grundlagen des GDM bereits präkonzeptionell gelegt werden, gibt es immer mehr wissenschaftliche und klinische Beweise für das Vorliegen von GDM in der Frühschwangerschaft. Immer mehr Frauen weisen bereits im 1. Trimenon Hyperglykämie und Insulinresistenz auf, welche mit einem erhöhten Risiko für Fehlgeburten und kongenitale Anomalien verbunden sind, auch wenn der glykämische Grenzwert für Diabetes mellitus Typ II unterschritten wird (23).

Bei Schwangeren, die ein hohes Risiko für GDM haben, ist bereits vor der 24. SSW eine Untersuchung hinsichtlich einer Glukosestoffwechselstörung sinnvoll. Im Falle eines klinischen Verdachtes (Diabetessymptome wie beispielsweise Polydipsie, Glucosurie oder Polyurie/Makrosomie) ist eine sofortige Untersuchung, unabhängig vom Schwangerschaftsalter, durchzuführen. Mögliche Testverfahren sind die Messung der Nüchternglukose sowie Spontanglukose, die Bestimmung des glykierten Hämoglobin (HbA1c) und die Durchführung eines oGTT (10).

1.1.4.1 Oraler Glukosetoleranztest

Der oGTT wird in der 24.-28. SSW durchgeführt. Aufgrund der tageszeitlichen Schwankungen der Glukosetoleranz, sollte der Test zwischen 06:00 und 09:00 morgens nach einer Nahrungskarenz von acht bis zwölf Stunden begonnen werden. Während des oGTT wird die Blutglukose der Schwangeren zu drei Zeitpunkten gemessen (3,10). Die Messung der Blutglukose erfolgt dabei ausschließlich venös, entweder direkt im venösen Plasma oder im venösen Vollblut, dessen Wert anschließend eine Umrechnung mit dem Faktor 1,11 in einen venösen Plasmawert erfordert (10).

In den Tagen vor dem Test darf die Schwangere ihre Essgewohnheiten, insbesondere im Hinblick auf den Kohlenhydratanteil, nicht verändern (5). Ebenso ist eine Einnahme von kontrainsulinären Medikamenten (z.B. Cortisol, Thyroxin) am Morgen des Testtages zu vermeiden. Beim Vorliegen von akuten Erkrankungen, Fieber oder einer Hyperemesis gravidarum ist eine Verschiebung des oGTT um einige Tage erforderlich. Nach chirurgischen Eingriffen am Magen-Darm-Trakt, wie beispielsweise bariatrische Operationen, ist der oGTT aufgrund der beschränkten Aussagekraft und der Gefahr eines möglichen Dumping-Syndroms kontraindiziert (5,10).

Am Testbeginn sollte die Schwangere unmittelbar nach der Bestimmung der Nüchternglukose eine Glukoselösung, bestehend aus 75g Glukose gelöst in 300ml Wasser, in einer Zeit von 5min schluckweise trinken. Während des gesamten oGTT sollte die Schwangere eine sitzende Position einnehmen und unnötige körperliche Tätigkeiten vermeiden. Die Blutglukose wird dann erneut nach der ersten Stunde (60min) und nach der zweiten Stunde (120min) gemessen (3,10).

In den IADPSG-Kriterien (International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group), sind die diagnostischen Grenzwerte des oGTT auf der Grundlage der Ergebnisse der HAPO-Studie (Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes) (27), festgelegt (5,28). Die Diagnosekriterien wurden auch bereits von anderen Organisationen wie der WHO (World Health Organization) und der FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) übernommen (5). Für die Diagnose von GDM ist bereits ein erhöhter Wert ausreichend (10).

Tabelle 1: Diagnostische Blutglukose Grenzwerte des oGTT 75g Glukose nach den IADPSG-Kriterien (28)

Zeitpunkt	Venöses Plasma in mg/dl	Venöses Plasma in mmol/l
Blutglukosewerte nüchtern	≥ 92mg/dl	≥ 5,1mmol/l
Blutglukosewerte nach 1 Stunde	≥ 180mg/dl	≥ 10,0 mmol/l
Blutglukosewerte nach 2 Stunden	≥ 153mg/dl	≥ 8,5mmol/l

1.1.5 Maternale Komplikationen

1.1.5.1 Direkte maternale Komplikationen

Schwangere Frauen mit GDM weisen ein erhöhtes Risiko für schwangerschaftsinduzierte Hypertonie und Präeklampsie auf. Grund dafür sind die ungünstigen Veränderungen im Glukosestoffwechsel, welche die Trophoblasteninvasion und somit auch die Plazentation beeinträchtigen (5,29). In vorangegangenen Studien zeigte sich zudem ein vermehrtes Auftreten von Harnwegsinfekten sowie Candidainfekten während der Schwangerschaft.

Das Vorliegen von GDM ist auch mit einem erhöhten Risiko für Komplikationen im Rahmen der Entbindung und dem Benötigen geburtshilflicher Eingriffe vergesellschaftet. Dazu zählt das erhöhte Risiko für eine Frühgeburt < 37+0 SSW, Schulterdystokie sowie höhergradigen Geburtsverletzungen, insbesondere im Zusammenhang mit einem Polyhydramnion und fetaler Makrosomie. Die am häufigsten benötigten geburtshilflichen Eingriffe sind die primäre Sectio und die Geburtseinleitung (5,27,30–32).

1.1.5.2 Maternale Langzeitkomplikationen

Frauen mit GDM in der Schwangerschaft haben ein deutlich erhöhtes Risiko nach der Geburt an Diabetes mellitus Typ II zu erkranken (33). Das Ausmaß dieses Risikos wurde in einer vor kurzem durchgeführten systematischen Übersichtsarbeit und Metaanalyse (20 Studien mit n = 1.332.373 Frauen postpartum, darunter 67.956 Frauen mit GDM) deutlich veranschaulicht. Als Resultat zeigte sich für Frauen nach GDM ein 10-fach erhöhtes Risiko Diabetes mellitus Typ II zu entwickeln (34).

GDM in der Vorgeschichte ist im Rahmen des metabolischen Syndroms auch mit anderen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Bluthochdruck, atherogene Dyslipidämie und Adipositas assoziiert, woraus ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen resultiert (5,35–39). Studien zufolge haben Frauen, die während der Schwangerschaft unter GDM litten, ein doppelt so hohes Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis, als Frauen mit unauffälligem Schwangerschaftsverlauf (40).

1.1.6 Kindliche Komplikationen

1.1.6.1 Direkte fetale Komplikationen

GDM stellt eine unmittelbare Gefahr sowohl für den Fetus als auch für das Neugeborene dar. Bei GDM erhöht sich, durch die mütterliche Hyperglykämie in der mittleren bis späten Schwangerschaft, die Konzentration von Fettsäuren (FS) und Aminosäuren (AS) im Blut der Mutter (41). Aufgrund der erleichterten plazentaren Diffusion werden dem Fetus übermäßige Nährstoffe zugeführt, wodurch eine fetale Hyperglykämie resultiert. Es kommt zu einer verstärkten Stimulation der fetalen β -Zellen des Pankreas, was wiederum eine fetale Hyperinsulinämie verursacht (42,43).

Die fetale Hyperinsulinämie ist für die Symptome der diabetischen Fetopathie verantwortlich (5). Die diabetische Fetopathie kann zum Zeitpunkt der Geburt unterschiedliche stark ausgeprägt sein und Symptome wie Hypoglykämie, Hyperbilirubinämie, Polyglobulie, Hypomagnesiämie, Hypokalziämie und das Atemnotsyndrom umfassen (5,44,45).

Insulin beschleunigt zudem über seinen wachstumssteigernden Effekt den fetalen Anabolismus und das Wachstum, sowie die Zunahme des fetalen Fettgewebes. Die Folge davon sind Makrosomie (Geburtsgewicht >4000g) bzw. LGA (large for gestational age), die zu perinatalen Komplikationen wie Schulterdystokie, Verletzungen des Plexus brachialis und perinataler Asphyxie führen können. Perinatale Asphyxie kann mit intrauterinem Fruchttod assoziiert sein (5,46).

1.1.6.2 Kindliche Langzeitkomplikationen

GDM hat aber auch langfristige Auswirkungen auf Kinder. So haben Kinder von Frauen, die in der Schwangerschaft GDM entwickelt haben, ein höheres Risiko an Übergewicht und Adipositas zu leiden sowie an Diabetes mellitus Typ II zu erkranken (10).

Im Rahmen der jüngsten HAPO-Follow-up Studie konnte zwischen den pränatalen Glukosewerten der Mutter und den jeweiligen Glukosewerten der Kinder, einschließlich der damit verbundenen Ereignisse, ein allgemein linearer Zusammenhang erkannt werden (47).

Bei der ursprünglichen HAPO-Studie wurde bei insgesamt 25.505 schwangeren Frauen zwischen der 24. und 32. SSW ein 2h 75g oGTT durchgeführt. Wenn die Nüchternplasmaglukose unter 105mg/dl ($<5,8\text{mmol/l}$) und die 2h Plasmaglukose unter 200mg/dl ($11,1\text{ mmol/l}$) lagen, wurden die Ergebnisse des oGTT doppelt verblindet. Die verblindeten Probandinnen erhielten keine Behandlung (27). Für die HAPO-Follow-up Studie wurden 4.832 Kinder der Teilnehmerinnen, im Alter von 10-14 Jahren, rekrutiert. Dabei wurde gezeigt, dass höhere mütterliche Glukosewerte beim oGTT signifikant mit einem höheren Risiko für gestörte Glukosetoleranz und erhöhte Nüchternglukose im Kindesalter verbunden war. Ebenso ist die Häufigkeit von Übergewicht und Adipositas bei Kindern, deren Mütter höhere Glukosewerte im oGTT aufwiesen, erhöht (47–49).

1.1.7 Therapie

1.1.7.1 Diabetologische Diät/Lifestyle Modifikation

Grundlage der GDM-Behandlung ist die medizinische Ernährungstherapie (MNT) in Kombination mit körperlicher Aktivität und Blutzuckerselbstkontrollen (50). Der Schwangeren wird nach der Diagnosestellung zunächst ein individueller Ernährungsplan erstellt. Der Diätplan ist abhängig vom Körpergewicht, vom Gesundheitszustand und somit dem Ausmaß der körperlichen Aktivität der Schwangeren, sowie von ethnischen und kulturellen Besonderheiten (10,50). Ebenso sollte die werdende Mutter über alle Risiken für den Fetus und sie selbst aus medizinischer Sicht informiert werde, um die maximale Compliance erreichen zu können (50).

1.1.7.1.1 Körperliche Aktivität

Studien zufolge verringert eine kontinuierliche körperliche Aktivität das GDM-Risiko und verbessert zusätzlich die Belastbarkeit der Schwangeren während der Schwangerschaft sowie auch der Geburt (51,52). Im Rahmen einer unproblematischen Schwangerschaft sollte die Aktivitätszeit pro Woche mindestens 150min betragen und Sportarten umfassen, welche sich mit einer Schwangerschaft vereinbaren lassen. Auszuschließen wären hierbei beispielsweise der Kampfsport oder auch Sportarten bei denen eine erhöhte Verletzungs- oder Sturzgefahr bestehen (10).

Bo *et al.* konnte in einer randomisierten Studie mit 200 GDM Schwangeren nachweisen, dass zügiges Gehen pro Tag für 20 Minuten den postprandialen Glukosespiegel, den HbA1c-Wert, das C-reaktive Protein (CRP) und alle neonatalen und mütterlichen Komplikationen reduziert (53).

1.1.7.1.2 Blutzuckerselbstkontrollen

Täglich sollten mindestens 4 Messungen des Blutzuckers durchgeführt und dokumentiert werden. Die 4 Messungen sollten den Nüchternglukosewert am Morgen sowie 3 jeweils 1h postprandiale Werte beinhalten (54). Zusätzlich zu den Blutzuckerwerten ist es sinnvoll, auch die Ernährung sowie die körperliche Aktivität in einer Art Tagebuch zu dokumentieren damit eine Identifizierung der ursächlichen Faktoren für eine (postprandiale) Hyperglykämie ermöglicht werden kann (50,55).

1.1.7.1.3 Ernährung

Der tägliche Kalorienbedarf einer Schwangeren mit Normalgewicht liegt ungefähr bei 24-30kcal/kg (10). Jedoch gibt es nur begrenzt Daten, welche die erforderliche Kalorienzufuhr und ideale Gewichtszunahme bei GDM Schwangerschaften klar festlegen (50). Die täglichen Kalorien werden prozentuell auf die Makronährstoffe verteilt:

- 40-50% Kohlenhydrate
- 30-35% Fett sowie
- 20% Eiweiß (10)

Kohlenhydrate stellen bei Schwangeren mit GDM den entscheidendsten Makronährstoff dar. Durch Verstoffwechslung von Kohlenhydraten steigt der Blutzuckerspiegel, wodurch die postprandiale Hyperglykämie im Wesentlichen von der Kohlenhydratzufuhr abhängt (56). Somit sollten vor allem hochwertige und komplexe Kohlenhydrate in den Diätplan aufgenommen werden, welchen einen niedrigen glykämischen Index haben und dazu beitragen, den Insulinbedarf zu reduzieren, sowie postprandiale Hyperglykämien zu minimieren (57). Morgens sollte die Kohlenhydratmenge, aufgrund der gesteigerten Insulinresistenz, geringer sein im Vergleich zu den späteren Mahlzeiten (5).

Empfohlen ist zudem eine ballaststoffreiche Ernährung (rund 30g/Tag). Die Proteinzufuhr sollte bei 60-80g/Tag liegen. Wichtig ist die Bedarfsdeckung an Vitaminen und Mineralstoffen (Vitamin D, Vitamin B, Folsäure, Kalzium, Magnesium, Eisen, Jod). Um zu hohe postprandiale Blutzuckerspitzen vermeiden zu können, ist eine Aufteilung in ungefähr 3 kleineren Hauptmahlzeiten sowie 2-4 Zwischenmahlzeiten indiziert (3,5,10).

Bei adipösen Schwangeren lautet die Empfehlung der Endocrine Society eine Reduktion der Kalorienaufnahme um ungefähr ein Drittel, um den Blutglukosespiegel zu verbessern, jedoch eine starke Gewichtsabnahme sowie das Auftreten von Katabolismus zu vermeiden (5,10).

1.1.7.2 Medikamentöse Therapie

Laut der American Diabetes Association benötigen rund 15-30% der Schwangeren mit GDM trotz empfohlener MNT und Lifestylemodifikation Pharmakotherapie (58). Bei nicht adäquater Blutzuckereinstellung durch Lebensstilveränderungen wird eine zusätzliche medikamentöse Therapie eingeleitet, um den fetalen Pankreas zu schützen und fetale Hyperinsulinämie sowie diabetische Fetopathie zu vermeiden (3,10). Fetaler Hyperinsulinismus kann indirekt durch die Bestimmung der maternalen mittleren Blutglukose (10 Werte aus dem Kapillarblut) diagnostiziert werden. Bei einem mittleren Blutglukosewert $>100\text{mg/dl}$ liegt eine Indikation für den Start einer Insulintherapie vor (3). Aufgrund der fehlenden Plazentagängigkeit sowie dem besser dokumentierten Wissenstand wird Insulin gegenüber oraler Antidiabetika bevorzugt angewendet (10).

Tabelle 2: Zielwerte des Blutzuckerspiegels (3,59)

Zeitpunkt	Kapilläres Vollblut
Blutglukosewerte nüchtern	$\leq 95\text{mg/dl}$
Mittlere Blutglukosewerte	$\leq 100\text{mg/dl}$
Blutglukosewerte nach 1 Stunde postprandial	$\leq 140\text{mg/dl}$
Blutglukosewerte nach 2 Stunden postprandial	$\leq 120\text{mg/dl}$

1.1.7.2.1 Insulin

Insulin kann, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der auftretenden Hyperglykämie, entweder als Einzeldosis einmal täglich oder auch in mehreren Dosen verteilt über den Tag appliziert werden (55).

Als Basisinsulin wird häufig das intermediär wirkende NPH-Insulin verwendet. Andere Langzeitinsuline wie beispielsweise Glargin oder Detemier können ebenfalls bei Schwangeren eingesetzt werden (10). Eine Einzeldosis des NPH-Insulins bzw. der langwirksamen Insulinanaloga können abends eingenommen werden, um eine morgendliche Hyperglykämie zu vermeiden. Bei Schwangeren mit Neigung zur postprandialer Hyperglykämie, werden schnellwirksame Insuline wie Insulin Lispro und Aspart vor der Mahlzeit, zur Vermeidung von postprandialen Spitzenwerten, verabreicht. Tritt Hyperglykämie vor allem im Lauf des Tages auf, sollte eine Kombination aus langwirksamen/intermediären und kurzwirksamen Insulin zur Behandlung herangezogen werden. Die Gesamtdosis pro Tag sollte 0,7-1,0 Einheiten/kg nicht überschreiten (60).

1.1.7.2.2 Orale Antidiabetika

Mögliche Alternativen zu Insulin während der Schwangerschaft sind, die Biguanide (Metformin) und die Sulfonylharnstoffe (Glibenclamid). Beide Wirkstoffe sind plazentagängig (10). Im Rahmen einer systematischen Übersichtsarbeit und Metaanalyse zeigten Amin M. *et al.* auf, dass Metformin gegenüber Glibenclamid, bevorzugt angewendet werden sollte, da in der Glibenclamid-Gruppe ein signifikanter Anstieg des Risikos für Makrosomie und LGA sowie ein nicht signifikanter Anstieg des Risikos für neonatale Hypoglykämie beobachtet werden konnte (61). Aufgrund der unzureichenden Datenlage, bezüglich der Langzeitauswirkungen auf den Fetus, sind die oralen Antidiabetika nicht als Mittel der ersten Wahl empfohlen (62). Sollte Insulingabe nicht möglich sein oder von der Schwangeren abgelehnt werden, können stattdessen orale Antidiabetika eingesetzt werden (55). Insbesondere bei Frauen mit Übergewicht und Insulinresistenz ist die Gabe von Metformin sinnvoll (10).

1.2 Vorteile der Muttermilch und Stillen

Stillen hat positive Auswirkungen auf Mutter und Kind. In einer longitudinalen Kohortenstudie konnten Stube *et al.* einen direkten Zusammenhang zwischen der Entstehung von Bluthochdruck und dem sofortigen oder frühzeitigen Abstillen aufzeigen. Frauen, mit einer Stillzeit <9 Monate zeigten ein erhöhtes Bluthochdruckrisiko gegenüber Frauen, welche ≥ 12 Monate stillten. Dasselbe gilt für Frauen, die nie gestillt haben, verglichen mit jenen Frauen, die ≥ 6 Monate stillten (63). Da, wie oben bereits erwähnt, GDM ein erhöhtes Risiko für postpartalen Diabetes mellitus Typ II birgt (33) und bereits bekannt ist, dass sich das Stillen positiv auf die frühe postpartale Glukosetoleranz auswirkt, führten Ziegler *et al.* eine prospektive Beobachtungsstudie durch, um den kurz- und langfristigen Einfluss des Stillens auf die postpartale Diabetesentwicklung zu untersuchen. Die Studie ergab ein um $>40\%$ verringertes Langzeitrisiko nach GDM an Diabetes Typ II zu erkranken, wenn Frauen stillten. Am stärksten zeigte sich diese Reduktion, wenn die Frauen mehr als 3 Monate stillten (64). Chowdhury *et al.* stellten in einer Metaanalyse ebenfalls ein um 26% geringeres Brustkrebsrisiko und ein um 35% geringeres Eierstockkrebsrisiko bei Frauen fest, die länger als 12 Monate gestillt hatten, im Vergleich zu Frauen, die nicht gestillt hatten (65).

Neben den Studien, welche die positiven Auswirkungen des Stillens auf die Mutter untersuchten, zeigte eine prospektive Studie von Ortega-Gracia *et al.* eine Reduktion des BMI bei gestillten Kindern von der Geburt bis zum 6. Lebensjahr. Zudem reduziert sich auch das Risiko Diabetes mellitus Typ II zu entwickeln (66). Størdal *et al.* untersuchten den Zusammenhang zwischen der Stillzeit und dem Auftreten von Infektionen in den ersten 18 Lebensmonaten. Es zeigte sich ein verringertes Risiko für infektionsbedingte Krankenhausaufenthalte, je länger die Kinder ausschließlich gestillt wurden. Kinder, die kürzer als 6 Monate gestillt wurden, hatten ein höheres Risiko für einen Krankenhausaufenthalt im Vergleich zu ≥ 12 Monaten gestillten Kinder. Bei einer Stillzeit von 6-11 Monaten zeigte sich jedoch ein ähnliches Risiko, als bei einer Stillzeit von einem Jahr oder mehr (67). Loge *et al.* konnten in einer Metaanalyse eine, durch Stillen verringerte Anfälligkeit für Asthma im Kindesalter, sowie ein reduziertes Risiko für allergische Rhinitis bis zum 5. Lebensjahr und Ekzeme bis zum 2. Lebensjahr aufzeigen (68).

Van Meel *et al.* fanden einen Zusammenhang zwischen einer verkürzten Stilldauer und einem verringerten forcierten expiratorischen Volumen sowie forciertes Vitalkapazität im Schulkindalter (69).

Muttermilch spielt auch bei der Entwicklung des Darmmikrobioms eine wichtige Rolle. Unterschiede im Darmmikrobiom, welche in den ersten sechs Lebensmonaten zwischen gestillten und nichtgestillten Säuglingen existieren, bleiben bis zum 2. Lebensjahr bestehen. Das Darmmikrobiom nicht gestillter Säuglinge oder von Säuglingen mit kurzer Stilldauer weist im Vergleich zu gestillten Säuglingen in den ersten 6 Lebensmonaten eine höhere mikrobielle Vielfalt auf und ähnelt eher dem eines Erwachsenen (70).

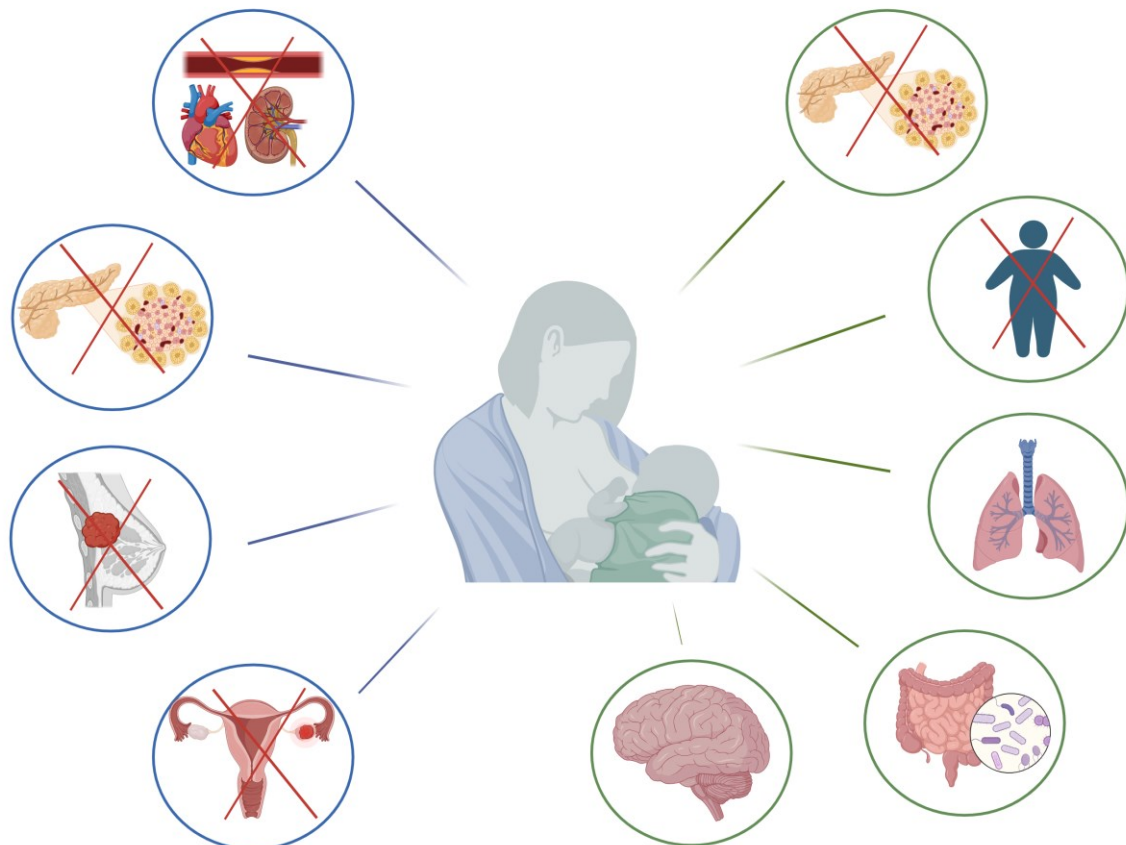


Abbildung 1 Positive Effekte des Stillens auf Mutter (blau) und Kind (grün)

Bei der Mutter wird durch das Stillen das Risiko für kardio-vaskuläre Erkrankungen (63), Diabetes mellitus Typ II (64), sowie Brust- u. Eierstockkrebs (65) gesenkt. Beim Kind fördert die Muttermilch die kognitive Entwicklung (71) und ein gesundes Darmmikrobiom (70,72). Zudem senkt Stillen beim Säugling das Risiko für Infektionen (67), der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II (66), Fettleibigkeit (66), Allergien und Asthma (68,69).

1.2.1 Bestandteile der Muttermilch: Woher die Effekte kommen

Die Hauptbestandteile der Muttermilch sind, neben dem Wasser (87-88%), Kohlenhydrate, Proteine und Fette. Sie zählen zu den festen Bestandteilen der Muttermilch, den sogenannten Makronährstoffen. Insgesamt enthält die Muttermilch rund 124g/l feste Bestandteile, welche sich in

- 7% (60-70g/l) Kohlenhydrate,
- 3,8% (35-40g/l) Fette sowie
- 1% (8-10g/l) Proteine

gliedern lassen (73). Durch die reife Milch erhält der Säugling ca. 65-70 kcal/100ml, wobei 40% der Gesamtkalorienzufuhr aus den Kohlenhydraten und 50% aus den Fetten stammen (74). Kolostrum hingegen ist sehr proteinreich mit einem Proteingehalt von 14-16g/l, dafür jedoch relativ fettarm mit einem Fettgehalt von 15-20g/l (73,75).

Die Laktose, ist als Bestandteil der Kohlenhydrate für den Säugling von enormer Bedeutung, da der Magen-Darm-Trakt noch nicht vollständig entwickelt ist und eine Glukoseverwertung ansonsten nicht möglich wäre (76). Human-Milch Oligosaccharide (HMO) sind komplexe Kohlenhydrate und die dritthäufigsten festen Bestandteile der Muttermilch. Insgesamt machen HMO 20% aller Kohlenhydrate in Muttermilch aus, was rund 12-14g/l in reifer Milch, und >20g/l im Kolostrum entspricht (77,78).

Bei den in Muttermilch vorkommenden Fetten, handelt es sich zu 95-98% um Triglyceride. Zusätzlich beinhaltet die Muttermilch 2 essentielle Fettsäuren (FS), darunter Linolsäure sowie die α -Linolsäure (73). Durch exzessive Gewichtszunahme im Laufe der Schwangerschaft sowie durch ungünstige Ernährung der stillenden Mutter können vermehrt Transfettsäuren in die Muttermilch gelangen, welche ungünstige Auswirkungen auf die Entwicklung und das Wachstum des Säuglings haben können (79,80).

Neben Makronährstoffen enthält die Muttermilch viele Vitamine, Mineralstoffe, Hormone und Wachstumsfaktoren, Immunglobuline, sowie auch ein spezifisches Mikrobiom und MicroRNAs (73).

1.3 Human-Milch Oligosaccharide

1.3.1 Struktur und Synthese

Human-Milch Oligosaccharide (HMO) sind komplexe, unkonjugierte, humanspezifische Kohlenhydrate (81). Insgesamt wurden bereits mehr als 200 unterschiedliche HMO identifiziert (82), deren Bausteine die fünf Monosaccharide Glukose, Galaktose, N-Acetylglukosamin, Fukose sowie Sialinsäure darstellen. Alle HMO besitzen als Grundbaustein Laktose an ihrem reduzierenden Ende. Die Laktose wird durch den Laktosesynthetase-Enzymkomplex im Golgi-Apparat der Brustdrüsenepithelzellen während der Laktation synthetisiert (83,84). Ausgehend von Laktose können mithilfe von Enzymen durch Fukosylierung oder Sialylierung die einfachsten HMO Fukosyllaktose und Sialyllaktose gebildet werden. Verlängerung der Laktose-Einheit und somit Bildung längerer Zuckerketten erfolgt mit Galaktose/N-Acetylglukosamin-Disaccharideinheiten, welche durch Fukosyl- und/oder Sialyltransferasen weiter modifiziert werden können (84)

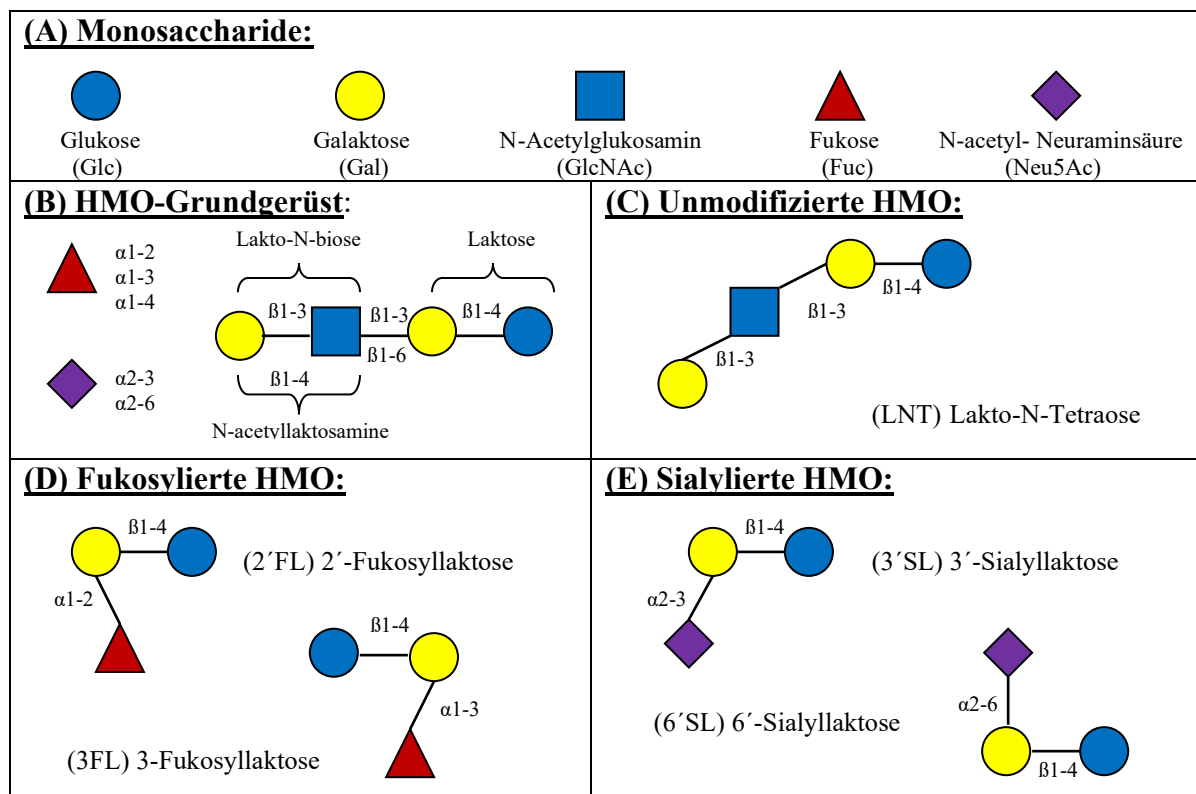


Abbildung 2 HMO Strukturen

(A) Monosaccharidschlüssel der HMO (B) Strukturelle Aufbau der HMO nach einem grundlegenden Bauplan. (C) Eine Verlängerung des Laktosegerüsts ist durch das Hinzufügen von Lakto-N-Biose (Typ I-Ketten) oder N-Acetyllaktosamin (Typ II-Ketten) in unterschiedlichen Bindungen (β 1-3, β 1-4 oder β 1-6) möglich. Um Trisaccharide zu bilden, kann die Laktose in verschiedenen Bindungen auch fukosyliert (D) oder sialyliert (E) sein. Modifizierung der Abbildung nach (85).

1.3.2 Postulierte positive HMO Effekte

Die Struktur der HMO bestimmt ihre spezifischen Funktionen. Nach der Aufnahme über die Muttermilch gelangen HMO, aufgrund fehlender Glykosidasen im kindlichen Magen-Darm Trakt, in intakter Form bis in den distalen Dünndarm und Dickdarm des Säuglings (85). Von dort aus erreichen HMO in geringer Konzentration auch den kindlichen Blutkreislauf. Studien zufolge wurden das Vorhandensein von HMO im Blut (86,87) sowie im Urin (88,89) von gestillten Säuglingen bestätigt, was wiederum deren systemischen Wirkungen erklärt (90).

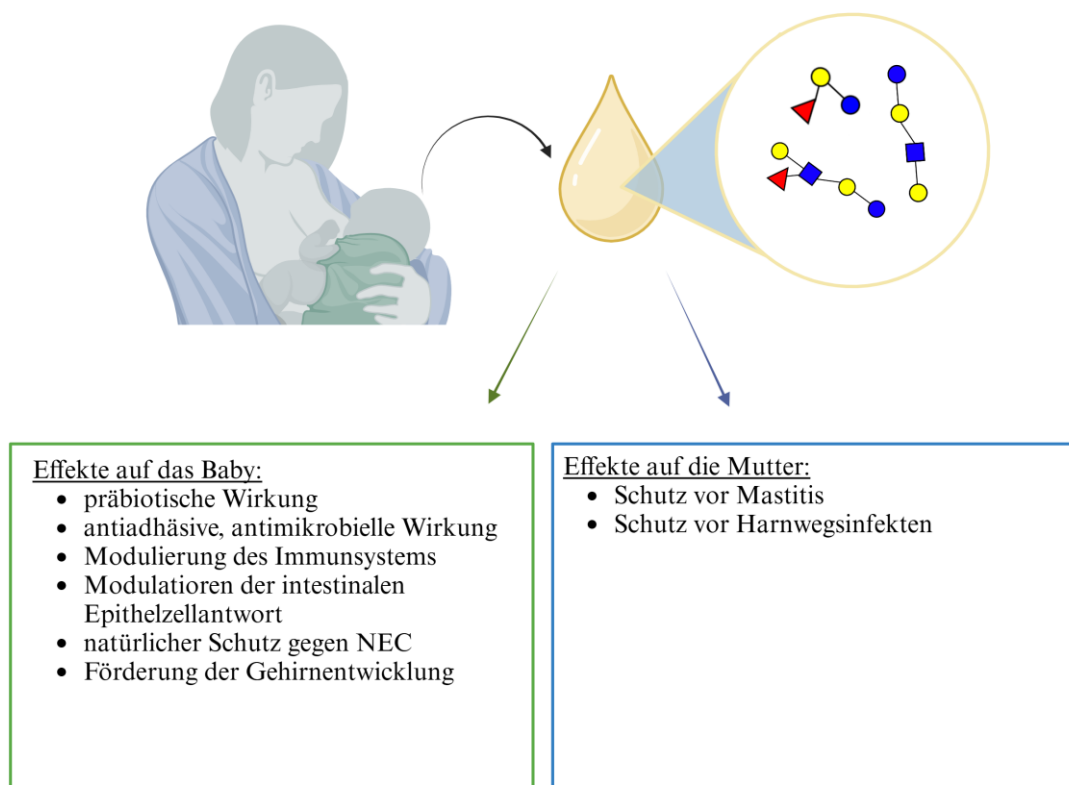


Abbildung 3 Postulierte positive Effekte auf das gestillte Baby und die stillende Mutter

1.3.2.1 HMO als Präbiotika

Bis zum Einsetzen der Geburt gilt der Körper des Säuglings als mehr oder weniger steril. Sobald der Säugling mit lebensfähigen Mikroorganismen konfrontiert wird, beginnt die mikrobielle Besiedlung. Viele äußere Faktoren beeinflussen die Entwicklung des Mikrobioms. Den wichtigsten Einflussfaktor stellt die Säuglingsnahrung dar (72,91–93).

HMO wirken als Präbiotika (94). Aufgrund ihrer Resistenz gegenüber der gastrointestinalen Verdauung gelangt der Großteil der HMO in den Dickdarm des Neugeborenen, wo sie ihre präbiotische Wirkung entfalten, um ein gesundes Darmmikrobiom zu bilden und die Gesundheit des Kindes indirekt verbessern (95). HMO fördern das Wachstum von nützlichen Mikroorganismen (Bifidobakterium-Arten) im Darm, indem sie als Nahrungsquelle für solche dienen (94). *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium breve* sowie *Bifidobacterium bifidum* zählen zu den häufigsten Bifidobakterium-Arten des Darmmikrobioms von gestillten Säuglingen (96). Die Artenvielfalt der Bifidobakterien steht in einer engen Beziehung mit dem Sekretorstatus der Mutter (97). Anhand von Beobachtungsstudien konnte bei gestillten Säuglingen eine von Bifidobakterien dominierte frühe Darmmikrobiota mit einem positiven Sekretorstatus der Mutter assoziiert werden (98). Der Stuhl von gestillten Säuglingen, mit solch einem Mikrobiom, weist einen niedrigeren pH-Wert auf, was einen besseren Schutz vor bestimmten Durchfallerkrankungen bietet (99). Bifidobakterien besitzen insgesamt das vielfältigste und größte Spektrum an katabolen Enzymen, Transkriptionsregulatoren, Transportern und Glykosidhydrolasen die an der HMO-Verwertung beteiligt sind, sodass diese Bakterien eine Vielzahl an HMO metabolisieren können (100,101). Die Bifidobakterien modulieren unter anderem auch das Immunsystem des Neugeborenen (102,103) und schützen vor enteropathogener Besiedelung (104–106). Sie konkurrieren mit potenziell schädlichen Mikroben um dieselbe Nahrungsquelle und produzieren kurzkettige FS und andere Metaboliten, welche das Wachstum von wichtigen Kommensalen fördert und somit potenzielle Krankheitserreger verdrängt (107). Zudem ist bereits bekannt, dass HMO auch durch *Bacteroides*-Arten verstoffwechselt werden können (108). *Bacteroides thetaiotamicron*, als Beispiel, unterstützt das Immunsystem sowie den Stoffwechsel und kommt in einer reifen, gesunden Darmflora vor, in welcher die HMO verwertet werden (109).

1.3.2.2 HMO als antiadhäsive, antimikrobielle Mittel

HMO wirken als antiadhäsive oder antimikrobielle Mittel: sie hemmen direkt das Anhaften oder das Wachstum bestimmter Krankheitserregern (110,111). Sie dienen als Köderrezeptoren an der Schleimhautoberfläche, sodass verschiedene Keime wie Bakterien, Viren und Parasiten nicht mehr an die Epithelzellen binden und somit keine Krankheit verursachen können (112). Bereits 1990 beschrieben Coppa *et al.* das antiadhäsive Potenzial der HMO. Neutrale Oligosaccharide ohne Sia-Bausteine zeigten eine signifikante Adhäsionshemmung von enteropathogenen E.coli (113). Da 1% aller HMO den Körperkreislauf erreichen und über den Urin absorbiert und ausgeschieden werden, können sie z.B. die uropathogene E. coli-induzierte Hämagglutination reduzieren (114), wodurch die Häufigkeit an Harnwegsinfektionen verringert wird (85,113).

Newburg *et al.* wiesen eine Verbindung zwischen dem maternalen Sekretorstatus und der Infekthäufigkeit sowie dem Schweregrad der Erkrankungen bei gestillten Säuglingen nach. Muttermilch mit einem höheren Anteil an 2-verknüpften Fukosyloligosacchariden bietet einen besseren Schutz vor Durchfällen bei Säuglingen (115). Antiadhäsive Wirkungen von bestimmten HMO wurden gegenüber *Campylobacteri jejuni*, EPEC, *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella enterica* serovar *fyrus* nachgewiesen (116,117). Milch-Oligosaccharide blockieren auch Viren wie den Noro- und Rotavirus, welche zu den häufigsten Ursachen von Durchfällen im Säuglings- und Kleinkindalter zählen (118). Ebenso reduzieren manche HMO die Bindung und zytotoxische Wirkung von *Entamoeba histolytica* an humane Darmepithelzellen (119).

Die antiadhäsive oder antimikrobielle Wirkung der HMO beschränkt sich nicht nur auf die Darmschleimhaut und den Harntrakt. Beim Verzehr von Muttermilch werden auch Schleimhautoberflächen im Nasen-Rachen-Raum des Säuglings bedeckt. Zum Teil gelangt die Muttermilch auch in die oberen Atemwege im Rahmen tiefer Aspirationsepisoden (85). Aufgrund dessen reduziert sich bei gestillten Säuglingen die Häufigkeit von Mittelohrentzündungen, welche durch *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* oder *Hämophilus influenzae* ausgelöst wird. Gestillte Säuglinge haben zudem auch ein geringeres Risiko an dem respiratorischen Synzyti-Virus (RSV) zu erkranken (120,121).

1.3.2.3 HMO als Immunmodulatoren

Neben der Fähigkeit der HMO das Immunsystem über die präbiotische und antiadhäsive oder antimikrobielle Wirkung indirekt zu beeinflussen, sind HMO auch in der Lage die Immunantwort direkt zu modulieren. Dies geschieht entweder lokal, durch die Wirkung auf Zellen des Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebes, oder systemisch, da rund 1% der HMO den systemischen Kreislauf erreichen (122–124).

Eiwegger *et al.* beobachteten in einer in-vitro-Studie, bei der T-Zellen aus dem Nabelschnurblut sialylierten HMO ausgesetzt wurden, eine Zunahme der Interferon- γ -produzierenden CD3+CD4+ Lymphozyten, sowie der Interferon- γ - und Interleukin-13-produzierenden CD3+CD8+ Lymphozyten. Sialylierte HMO sind somit in der Lage die Lymphozyten Reifung bei gestillten Säuglingen positiv zu beeinflussen (125). Zudem könnten sialylierte HMO Th-2-Typ-Reaktionen bei Atopie gefährdeten Personen unterdrücken, wodurch sie postnatale allergenspezifische Immunantworten modulieren können. In einem in-vitro-Modell konnte in Lymphozyten von Erwachsenen mit Erdnussallergie durch sialylierte HMO eine Reduktion der IL-4-Produktion beobachtet werden, was auf eine mögliche Nutzung von bestimmten HMO in der Allergieprävention hindeuten könnte (126).

1.3.2.4 HMO als Modulatoren der intestinalen Epithelzellantwort

HMO führen durch eine Veränderung der wachstumsbezogenen Zyklusgene, auch zu einer direkten Modulation der Darmepithelzellreaktion. Sie bewirken eine Reduktion des Zellwachstum und eine Induktion der Differenzierung und Apoptose in kultivierten humaner Darmepithelzellen (127,128).

Um die Effekte von HMO zu bestimmen, wurden Darmzelllinien gemeinsam mit Bakterien oder Lipopolysacchariden, und Oligosacchariden, inkubiert und somit eine bakterielle Infektion modelliert (146,147). Bei Co-Inkubation von HMO, Bifidobakterien und Zellen der Caco-2-Darmzelllinie zeigte sich eine Herunterregulierung bestimmter Darmzellgene, welche einen Zusammenhang mit der Chemokinaktivität haben (129). Bei fehlenden bakteriellen Co-Stimulans hingegen erhöhen HMO in der HT-29-Zelllinie die Expression mehrerer Chemokine (130). Weitere Studien zeigten, dass in HCT-8 und T84-Darmzelllinien verschiedene HMO insbesondere 2'FL die Reduktion der molekularen Signaturen einer Darmentzündung bewirken (129).

1.3.2.5 HMO als natürlicher Schutz gegen NEC

Nekrotisierende Enterokolitis (NEC) zählt zu den am häufigsten vorkommenden Erkrankungen bei Frühgeborenen. Ungefähr 5-12% der Frühchen mit einem Geburtsgewicht <1500g entwickeln NEC. Die Symptome beginnen teils schleichend, können sich jedoch rasch zu einer fulminanten NEC mit den typischen Charakteristika wie portalvenösem Gas und/oder Pneumatosis intestinalis entwickeln (131). Im Rahmen der operativen Sanierung der perforierten Darmabschnitte versterben rund 20-30% der Neugeborenen (132). Frühgeborene, welche NEC überleben, haben ein hohes Risiko für langfristige gastrointestinale Komplikationen sowie neurologischen Entwicklungskomplikationen (131).

Studien zufolge haben gestillte Säuglinge ein 6-10fach reduziertes Risiko an NEC zu erkranken, im Vergleich zu Säuglingen, welche mittels Säuglingsnahrung gefüttert werden (133–135). Jedoch entwickeln auch manche gestillte Säuglinge NEC, was darauf hinweist, dass auch die Zusammensetzung der Muttermilch insbesondere der HMO einen bedeutsamen Faktor darstellt (136).

In einem etablierten Rattenmodell wurde die NEC-Entwicklung durch ein spezifisches HMO, Disialyl-Lakto-N-Tetraose (DSLNT) reduziert und die NEC-assoziierte Mortalitätsrate verbessert (137). Studien mit menschlichen Frühgeborenen zeigten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von NEC im Zusammenhang mit niedrigeren Konzentrationen an DSLNT in der Muttermilch (136,138).

1.3.2.6 HMO als Nährstoffe für die Entwicklung des Gehirns

Insbesondere bei Frühgeborenen, aber auch bei Reifgeborenen, erfordert das rasche Wachstum des Gehirns einen hohen Bedarf an Sialinsäure (Sia). Sia ist ein essenzieller Bestandteil der Hirnganglioside sowie der Polysialinsäureketten (PolySia), welche eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Funktionsfähigkeit des Nervensystems spielen (139,140). Zudem ist sie für den Erhalt der Balance von der Signalweitergabe erforderlich, die über den N-Methyl-D-Aspart-Rezeptor (NMDA-Rezeptor) gesteuert wird (140).

Der Großteil der Sia in der Muttermilch stammt aus den sialylierten HMO. HMO besitzen 2-3x höhere Mengen an Sia als die Glykoproteine und Glykolipide. Letzteres trägt nur rund 1% zur Gesamtmenge an Sia in der Muttermilch bei (141).

Eine Vielzahl an Studien zeigten, dass Muttermilch im Vergleich zu Säuglingsnahrung positive Effekte auf die IQ (Intelligenzquotient)-Testleistung hat (142).

1.3.2.7 Auswirkungen von HMO auch auf die Mutter

HMO können, neben den potenziellen Vorteilen für den gestillten Säugling, auch positive Auswirkungen auf die stillende Mutter haben (85). Muttermilch besitzt keine Sterilität, sondern beinhaltet vielfältige Bakteriengemeinschaften, welche von Frau zu Frau variieren (143,144). Neben der Wirkung als natürliche Probiotika für den gestillten Säugling, können diese Bakterien ebenso als potenzielle Kommensalen dienen oder als Krankheitserreger, welche beispielsweise eine Mastitis verursachen können, angesehen werden. HMO können durch ihre präbiotische Wirkung, ihre Funktion als Antiadhäsiva, oder durch ihre Fähigkeit lokale Immunantworten oder Epithelzellantworten der Brustdrüse direkt hervorzurufen, diese komplexen Bakteriengemeinschaften in der Muttermilch beeinflussen (85).

1.3.3 HMO Variabilität

Die HMO-Zusammensetzung und -Konzentration in der Muttermilch ist von genetischen und nicht genetischen, modifizierbaren Faktoren abhängig (145).

1.3.3.1 Genetische Faktoren

1.3.3.1.1 *Secretor und Lewis Blutgruppensystem*

Das HMO-Profil wird von zwei Blutgruppensystemen, dem *Secretor (Se)*- und dem *Lewis (Le)* System beeinflusst, deren Gene für die Kodierung zweier spezifischer Enzyme verantwortlich sind (85,145). Das *Se*-Gene kodiert für die α 1-2-Fukosyltransferase (FUT2), welche für die Bildung von 2'FL, Lakto-N-Fukopentaose 1 (LNFP 1) und weiteren α 1-2 fukosylierten HMO verantwortlich ist. Frauen, bei denen dieser *Se*-Locus aktiv ist, wird ein positiver Sekretor Status zugeordnet (146). Das Lewis-Gen kodiert für die α 1-3/4-Fukosyltransferase (FUT3), mithilfe derer α 1-4-fukosylierte HMO wie Lakto-N-Fukopentaose 2 (LNFPII) gebildet werden können (147). Mithilfe der genannten Blutgruppensysteme können Milchproben stark vereinfacht den folgenden vier Milchphänotypen zugeordnet werden: *Le*-positive Sekretoren (*Se*⁺ *Le*⁺), *Le*-negative Sekretoren (*Se*⁺ *Le*⁻), *Le*-positive Nicht-Sekretoren (*Se*⁻ *Le*⁺), *Le*-negative Nicht-Sekretoren (*Se*⁻ *Le*⁻) (148).

Da aber auch die Milch von *Se*- *Le*- Frauen fukosylierte HMO wie 3FL und Lakto-N-Fukopentaose 3 (LNFPIII) aufweisen können, zeigt, dass auch *Se*-/*Le*- unabhängige FUTs an der Bildung fukosylierten HMO beteiligt sein könnten (111).

1.3.3.2 Nicht-genetische Faktoren

1.3.3.2.1 *Veränderungen von HMO Profilen mit den Laktationsstadien*

Während der Laktation verändert sich der Gesamt-HMO-Konzentration. Im Kolostrum liegt diese bei $17,7 \pm 3,3$ g/l, nimmt in Übergangsmilch auf $13,3 \pm 6,5$ g/l ab und besitzt in reifer Milch nur mehr eine Konzentration von $11,3 \pm 2,62$ g/l (145). Zudem verändern sich auch die Konzentrationen der spezifischen HMO im Laufe der Laktation. Studien zufolge verringert sich die Konzentration der meisten HMO mit fortschreitender Laktationsdauer. Eine Ausnahme machte 3FL, das über die Laktationsdauer anstieg (149).

1.3.3.2.2 Geographische Unterschiede auf HMO Konzentration

Thum *et al.* zeigten in ihrem Review auf, dass Frauen aus europäischen Ländern sowie der USA höhere Konzentrationen an 2'FL in allen Laktationsstadien aufwiesen als Frauen aus asiatischen Regionen. Für die restlichen HMO konnte keine deutliche Tendenz erkannt werden (149).

1.3.3.2.3 Einfluss von mütterlichem Metabolismus auf die HMO in Muttermilch

Mehrere Studien untersuchten, ob GDM oder Adipositas in der Schwangerschaft die Zusammensetzung der HMO in Muttermilch verändert, mit zum Teil kontroversen Ergebnissen. In einer Studie von Dou *et al.* wurden HMO-Konzentrationen in Kolostrum, Übergangsmilch und reifer Milch bei Frauen mit und ohne GDM in der vorangegangenen Schwangerschaft gemessen. Im Laufe der Laktation zeigte sich eine Abnahme der meisten HMO. 2'FL, 3FL und LNFPII blieben jedoch in einigen Ausnahmen über die Stillzeit in beiden Studiengruppen stabil, wohingegen LFNPIII bei den Frauen mit GDM in der reifen Milch die höchste Konzentration erreichte (150). LNFPIII ist in der Lage, die IL-10 Produktion in dendritischen Zellen und Makrophagen zu stimulieren, Adipozyten für Insulinantwort zu sensibilisieren und im weißen Fettgewebe die Entzündung zu reduzieren (151). Es zeigten sich zudem signifikant höhere Konzentrationen an 3'SL, LNnT, LNFPII und DSLNT in der Se+Le+ GDM Gruppe im Vergleich zu der Se+Le+ gesunden Gruppe (150).

In einer weiteren Studie fanden Li *et al.* signifikant geringere HMO-Konzentrationen im Kolostrum von Müttern mit GDM im Vergleich zu gesunden Müttern, welche jedoch mit zunehmender Laktationsdauer anstiegen (152).

Saben *et al.* untersuchten den Zusammenhang zwischen der HMO-Zusammensetzung und Adipositas-assoziierten mütterlichen Faktoren. Dabei wurden HMO in Milchproben 2 Wochen postpartum analysiert, und mit Parametern der mütterlichen Glukosehomöostase während der Schwangerschaft (30. SSW) assoziiert. Bei Se+ Frauen waren geringere Sialyl-Lakto-N-Tetraose b (LSTb) und Sialyl-Lakto-N-Tetraose c (LSTc) in Milch mit höherer Insulinsensitivität assoziiert. In der Gruppe der Se- Frauen hingegen waren Insulin sowie Nüchtern-Plasmaglukose negativ mit der Gesamt-Sialinsäure (HMO-gebunden) sowie den Konzentrationen von 3'SL und DSLNT assoziiert (153).

McGuire *et al.* bestätigten im Rahmen einer Querschnitts-Beobachtungsstudie mit stillenden Frauen aus 11 Populationen eine negative Korrelation der Konzentration vieler HMO mit dem BMI und dem Gewicht der Mutter. Zudem zeigten sich auch etliche Unterschiede in den HMO zwischen den Populationen, was neben genetischen Faktoren, ein Indiz für die äußeren Einflussfaktoren auf die HMO Biosynthese darstellt (154). Ebenso konnten LeMay-Nedjelski *et al.* aufzeigen, dass nicht GDM in der Schwangerschaft, sondern prä-konzeptioneller BMI, Ethnizität, sowie die Häufigkeit des Stillens die HMO-Konzentration in reifer Muttermilch beeinflussen. Ein Zusammenhang zwischen der HMO-Zusammensetzung und Glukosetoleranzstatus konnte nicht bewiesen werden (155).

In einer Cross-Over-Studie konnten Seferovic *et al.* einen signifikanten Zusammenhang zwischen Konzentrationen spezifischer HMO in der Muttermilch und der mütterlichen Ernährung nachweisen (156). Weitere Studien schienen widersprüchliche Ergebnisse zu liefern, wobei die Limitation bei der Genauigkeit der Messungen aufgrund der Anzahl und Komplexität der zu berücksichtigenden Nahrungsbestandteile erklärt wird (157).

1.3.3.2.4 Einfluss des mütterlichen Metabolismus auf pränatale HMO

Variabilität der HMO aufgrund metabolischer Veränderungen können aber auch schon vor dem Beginn der Laktation beobachtet werden. HMO zirkulieren bereits ab der 10. SSW in geringer Konzentration im mütterlichen Serum und nehmen mit höherem Gestationsalter zu. Im Vergleich zur Muttermilch liegen die Konzentrationen der gesamten HMO im Serum während der Schwangerschaft mit 0,1-1,8 nmol/ml um den Faktor 10,000 niedriger (158). HMO konnten auch im Urin (159) schwangerer Frauen, sowie im Nabelschnurblut (160) und im Fruchtwasser (161) nachgewiesen werden.

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass metabolische Faktoren wie GDM die Konzentrationen bestimmter HMO während der Schwangerschaft im mütterlichen Blut (162) und auch im Nabelschnurblut (163) verändert. Ein unmittelbarer Zusammenhang mit HMO-Konzentrationen im Blut und der Glukose/Insulin Homöostase wurde in einer weiteren Studie deutlich. Weiser-Fuchs *et al.* zeigten einen signifikanten Anstieg der 3'SL Konzentration im Serum eine Stunde nach der Glukosezufuhr aus dem nüchternen Zustand im Rahmen eines 75g oGTT in der 24-28 SSW. Die höhere 3'SL Serumkonzentration über den gesamten oGTT war mit einer niedrigeren Insulinsensitivität, höheren Insulinsekretion

sowie hepatischen Insulinresistenz verbunden (162). Höhere 3'SL sowie 3'SLN Konzentrationen wurden auch im Nabelschnurblut nach Schwangerschaften mit GDM nachgewiesen (163). Zudem zeigte sich in einem in vitro Versuch mit fetoplazentaren Endothelzellen aus gesunden Terminplazenten, dass HMO, insbesondere 3'SL, Auswirkungen auf die Angiogenese haben (163). Die GDM-bedingten Veränderungen der HMO im Nabelschnurblut und der somit induzierten Hypervaskularisation der Plazenta können dazu beitragen, den Fetus vor metabolisch induzierter Hypoxie zu schützen (164). In der Studie von Schönbacher *et al.* wurden HMO im Serum, sowie BMI und Serumlipide bei schwangeren Frauen in der 15., 24. und 32. SSW gemessen. 2'FL und LDFT waren negativ mit dem prä-konzeptionellen BMI korreliert. 3'SL im Serum war mit einem atherogenem Lipidprofil (hohe Triglyzeride, hohes LDL-Cholesterin) assoziiert, während 2'FL mit einem protektivem Lipidprofil (hohes HDL-Cholesterin) assoziiert war. Bei stark übergewichtigen Frauen konnte ein signifikant verzögerter Anstieg von 2'FL und LDFT zwischen der 15. und 24. SSW beobachtet werden (165).

1.3.4 Einfluss von Glukosemetabolismus auf HMO in Muttermilch und mögliche Folgen?

Genetische Faktoren, die Laktationsphasen, die Ethnizität und auch modifizierbare mütterliche Faktoren wie der BMI und die Ernährung beeinflussen die HMO-Zusammensetzung und -Konzentration. Das HMO-Profil ist wiederum entscheidend für die verschiedenen Effekte auf den gestillten Säugling und die Mutter. Es ist bereits bekannt, dass GDM die HMO während der Schwangerschaft im Serum und im Nabelschnurblut verändert, wobei unklar bleibt, ob diese Veränderung die GDM Pathogenese vorantreibt oder ihr entgegenwirkt, bzw. Folgen abmildern kann. Nur wenige Studien untersuchten, ob GDM die HMO in der Muttermilch beeinflusst, mit kontroversen Ergebnissen. Es ist auch nicht klar, ob die HMOs in der menschlichen Milch durch Veränderungen im Glukose-Insulin-Verhältnis beeinflusst werden, wie sie durch einen hyperinsulinämischen Clamp nachgeahmt werden.

2 Hypothese und Ziele

Basierend auf der Beobachtung, dass GDM in der Schwangerschaft die pränatalen HMO im mütterlichen Serum und im Nabelschnurblut beeinflusst, stellten wir die Hypothese auf, dass diese GDM-bedingten Veränderungen auch postpartum bzw. in der Muttermilch bestehen bleiben. Darüber hinaus stellten wir die Hypothese auf, dass HMO in der Muttermilch auch direkt durch Änderungen des Insulinspiegels beeinflusst werden.

Dafür wurde die HMO-Zusammensetzung und -Konzentration in Muttermilchproben, die zu vier Zeitpunkten, während eines hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Experiments von Müttern nach Schwangerschaften mit und ohne GDM gesammelt wurden, untersucht.

Folgende Zielsetzungen wurden verfolgt:

- Vergleich der HMO-Konzentration in Muttermilch (5-7 Wochen postpartum) in Frauen mit GDM in der Schwangerschaft mit Frauen mit normaler Glukosetoleranz
- Analyse der HMO-Konzentration in Muttermilch über im Verlauf eines hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuch

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Für die ursprüngliche Studie wurden stillende und nicht stillende Mütter im Rahmen der planmäßigen Kontrolle im 3. Schwangerschaftstrimester und/oder bei der Routinekontrolle zwischen der 2 und 5 Woche nach der Geburt am University of Texas Southwestern Medical Center Dallas, USA, unter der Leitung von Maria Ramos, MD, rekrutiert.

Folgende Einschlusskriterien galten: Alter der Mutter von 21-49 Jahre, BMI der Mutter 2 Wochen postpartal von 25-35kg/m², Geburt eines Einlings, eine normale Glukosetoleranz (NGT) oder einen im 3. Trimester diagnostizierten diätologisch behandelten GDM (166).

Die Zuordnung zu den entsprechenden Gruppen (gestillt/nicht gestillt) erfolgte anhand der selbst gewählten Fütterungsmethode der Mütter. Mütter, welche ihr Kind stillten und weniger als 177ml zusätzlich an Säuglingsnahrung pro Tag zufütterten, wurden der Stillgruppe zugeordnet. Mütter, die bis zu 3 Wochen nach der Geburt abgestillt und ihr Kind ausschließlich mit Säuglingsnahrung gefüttert haben, werden der nicht stillenden Gruppe zugeordnet.

Folgende Ausschlusskriterien wurden berücksichtigt: das Vorliegen eines insulinbehandelten GDM, Diabetes mellitus Typ II, Präeklampsie, hormonelle Empfängnisverhütung, Leber- oder Nierenerkrankungen, die Einnahme von Medikamenten, welche den Nährstoffwechsel beeinträchtigen, sowie unkontrollierte Schilddrüsenunterfunktion und postpartale Depression.

Die Studie wurde vom Institutional Review Board (IRB), Nr. STU 092010-071, genehmigt. Alle Teilnehmerinnen unterzeichneten eine schriftliche Einverständniserklärung.

3.1.1 Erster Studienbesuch

Die Studie inkludiert zwei Studienbesuche. Im ersten Studienbesuch wurden anamnestische sowie biometrische Daten erhoben. Diese inkludierten beispielsweise das Alter der Mutter, die Dauer der Schwangerschaft, das Gewicht des Kindes zum Zeitpunkt der Geburt sowie Größe, Körpergewicht und dem daraus resultierenden BMI der Mutter. Im Rahmen des ersten Studienbesuches wurde ein zweistündiger Nüchtern-oGTT mit 75g Glukose durchgeführt. Dabei wurde die Messung von Insulin, C-Peptid und Plasmaglukose zu 5 Zeitpunkten (-10, 30, 60, 90 und 120 Minuten) durchgeführt. Ein normaler Nüchternglukosespiegel wurde bei Nüchternplasmaglukosewerten unter 100mg/dl angenommen, eine gestörte Nüchternglukose (IFG) bei Werten von 100-125mg/dl und bei Werten über 126mg/dl ein manifester Diabetes mellitus. Lag der 2h-Plasmaglukosewert unter 140mg/dl handelte es sich um eine normale Glukosetoleranz (NGT), bei Werten von 140-199mg/dl lag eine gestörte Glukosetoleranz vor (IGT) und bei Werten über 200mg/dl wiederum ein manifester Diabetes mellitus (166).

3.1.2 Zweiter Studienbesuch

Während des zweiten Studienbesuches wurde ein hyperinsulinämisch-euglykämischer Clamp-Versuch durchgeführt. Die Nacht vor dem Clamp-Versuch tranken die Teilnehmerinnen mit 70% Deuterium angereichertes Wasser um 22:00, 02:00 und 06:00. Über den gesamten Clamp-Versuch wurde den Teilnehmerinnen Glukose und Palmitat infundiert. Für die Glukose war ein Zielwert von 90mg/dl vorgesehen mit dementsprechender Anpassung der Glukoseinfusionsrate (GIT). Die Clamp bestand aus einer Basalperiode und zwei darauffolgenden Clamp Schritten mit einer jeweiligen Dauer von 2 Stunden. Die Basalperiode repräsentiert die körpereigenen Insulinsekretion. In der ersten Stufe der Clamp erfolgte die Verabreichung einer konstanten, niedrig dosierten Insulininfusion (10mU/m²/min, angepasst an die Körperoberfläche). Im zweiten Schritt der Clamp erfolgte die Konzentrationssteigerung der Insulininfusion auf mittlere oder hohe Werte (20 bzw. 40 mU/m²/min, angepasst an die Körperoberfläche). Milchproben von stillenden Frauen wurden zu 4 Zeitpunkten (0, 120, 240 und 360 Minuten) entnommen, welche den nüchternen Zustand und das Fließgleichgewicht jeder einzelnen Stufe der Clamp darstellen. Die Milchproben wurden daraufhin bei -80° für die HMO-Messung gelagert.

Die Clamp Technik stellt den Goldstandard für die Beurteilung der Insulinsensitivität dar. Sie wird häufig verwendet, um die Insulinwirkung auf die Glukoseverwertung zu messen. Die für einen stabilen Zustand erforderliche Glukosemenge spiegelt die exogene Glukoseverwertung wider, welche benötigt wird, um die Hyperinsulinämie zu kompensieren (167).

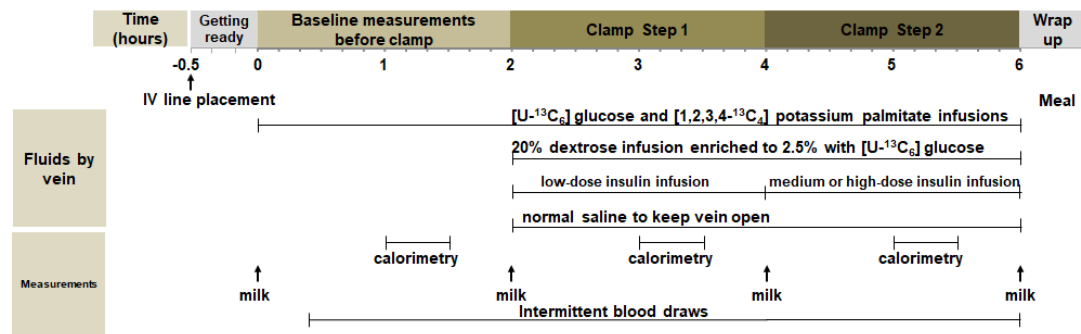


Abbildung 4 Schema des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuch

Die nüchternen Probandinnen erhielten eine konstante Insulininfusion, um die hepatische Glukoseproduktion zu unterdrücken. Zudem wurde gleichzeitig eine 20%ige Dextroselösung in unterschiedlichen Raten, welche mit 2,5% U-¹³C₆ angereichert ist, über die Vene verabreicht, um den kontinuierlich gemessenen Blutzucker im euglykämischen Bereich zu halten. *Unveröffentlichte Daten mit Genehmigung Maria Ramos, MD.*

3.2 Follow up Studie

6 der stillenden Mütter aus der GDM-Gruppe konnten für eine Follow up Studie 15-17 Woche postpartum rekrutiert werden. Es erfolgte ein erneuter hyperinsulinämisch-euglykämischer Clamp-Versuch.

3.3 Studienpopulation

In dieser Diplomarbeit wurden Milchproben der stillenden Frauen untersucht. Die Studienpopulation umfasst insgesamt 18 Frauen, welche in vier unterschiedlichen Gruppen eingeteilt wurden:

- 6 stillende Frauen ohne GDM in der Schwangerschaft
- 12 stillende Frauen mit GDM in der Schwangerschaft

Für die Analyse und Auswertung 5-7 Wochen postpartum standen Proben aller 18 Studienteilnehmerinnen zur Verfügung. Von sechs Frauen aus der GDM-Gruppe standen auch Milchproben von der Follow-up Untersuchung 15-17 Wochen postpartum zur Verfügung.

3.4 HMO Analyse

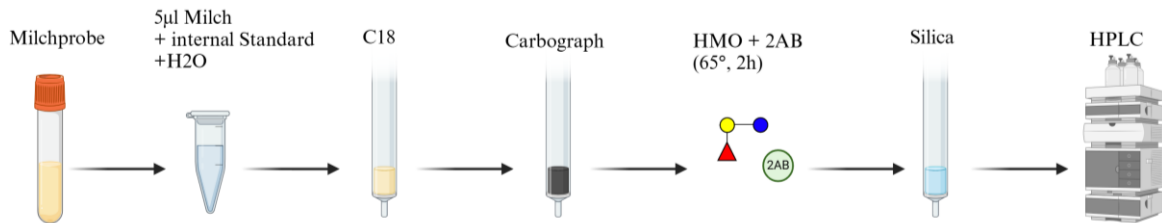


Abbildung 5 Schema der Probenvorbereitung und HMO-Isolierung für die HPLC-Analyse

Muttermilch (5 µl) wurde mit H₂O verdünnt und mit einem internen Standard (lineares B6-Trisaccharid) versetzt. Lipide, Proteine und Salze wurden durch Festphasenextraktion (C18/Carbograph) entfernt. Die isolierten, getrockneten HMO wurden mit 2-Aminobenzamid (2AB) fluoreszierend markiert und nach Entfernung von überschüssigen 2AB mit Hilfe von Silica-Säulchen durch HPLC aufgetrennt und mit Fluoreszenzdetektion detektiert.

3.4.1 HMO-Isolierung und Analyse durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion

3.4.1.1 Probenvorbereitung

Nach Erhalt der Muttermilchproben wurden diese bei -80°C gelagert und für den Probendurchlauf sorgfältig auf Eis aufgetaut. 5 µl der jeweiligen Muttermilchprobe wurde mit 188,8 µl H₂O verdünnt und mit 6,3 µl internen Standard (2 mg/ml) (lineares B6-Trisaccharid) versetzt.

3.4.1.2 Festphasenextraktion mittels C18 Säulchen

Für die Entfernung unpolarer Moleküle wie Proteine und Peptide wurden C18 Säulchen im (Multisep 100 mg/ml; Thermo Scientific #60300-428) verwendet, die zuvor im 96 well-Format in eine Lochplatte gesteckt wurde. Die Säulchen wurden zunächst mit 200 µl 100% Methanol und anschließend mit 200 µl H₂O auf einem Vakuumverteiler konditioniert. Die Säulchen wurden mit 200 µl der jeweiligen Probe beladen, wobei der Durchfluss, der die polaren Oligosaccharide enthielt, in einer frischen Deep-well Platte gesammelt wurde. Daraufhin wurden die Säulchen mit 200 µl H₂O gewaschen und der Durchfluss erneut gesammelt.

3.4.1.3 Festphasenextraktion mittels Carbograph Säulchen

Mittels Carbograph Säulen (Multi-Sep Hypercarb 10mg/1ml; Thermo Scientific #60302-606) wurden im nächsten Schritt Salze aus den Proben entfernt. Zunächst erfolgte die Konditionierung der Säulchen unter zweimaliger Verwendung von je 200µl 80% Acetonitril (ACN/H₂O) mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA), gefolgt von zweimaliger Verwendung von je 200µl H₂O, mithilfe eines Vakuumverteilers. Auf die vorkonditionierten Carbograph Säulchen wurde der Durchfluss der C18-Säulchen geladen. Die Eluierung der gebundenen HMO erfolgte nach Waschschritten mit H₂O unter zweimaliger Verwendung von je 200µl 40% ACN/H₂O mit 0,5% TFA. Der Durchfluss wurde in PCR Strip Tubes zur Trocknung für rund 14h im SpeedVac-Konzentrator überführt.

3.4.1.4 Fluoreszenzmarkierung

Nach der Trocknung der HMO wurde jede Probe mit je 5µl 2-Aminobenzamid Labelling-Reagenz (2-AB) versetzt und 2h lang bei 65°C in einem Thermocycler inkubiert. Bei diesem Schritt erfolgt eine chemische Reaktion, bei der die Zucker am reduzierenden Ende fluoreszenzmarkiert werden, was die Detektion einzelner HMO nach HPLC-Auftrennung ermöglicht. Die Herstellung des 2-AB Reagenz erfolgte mit 65mg 2AB, 65mg Natriumcyanoborhydrid (NaBH₃CN), 650µl Dimethylsulfoxid (DMSO) und 350µl Eisessig.

Zur Unterbrechung des Markierungsprozesses wurde jeder Probe anschließend 95µl 100% ACN zugesetzt.

3.4.1.5 Festphasenextraktion mittels Silica Säulchen

Mittels Kieselgelsäulchen (Hyper-SEP Silica Columns 25mg; Thermo Scientific #60300-486) wurde das überschüssige 2-AB mittels Vakuumverteiler aus der Probe entfernt. Die Säulchen wurden mit 200µl H₂O und 200µl 100% ACN vorkonditioniert. Die Probe wird gemeinsam mit 100µl 100% ACN in die Silica Säule überführt. Überschüssiges 2AB wird durch das viermalige Waschen mit 100% ACN sowie 96% ACN/H₂O aus der Säule entfernt. Die Oligosaccharide, welche die Kieselgel Silica-Partikel zurückgehalten haben, wurden durch zweimalige Verwendung von je 200µl H₂O eluiert, in PCR-Tubes überführt und im SpeedVac-Konzentrator erneut getrocknet.

3.4.1.6 Analyse mittels HPLC

Die am reduzierenden Ende mit 2-AB markierten HMO wurden mit einer TSKgel Amide-80-Säule (150mm x 3,0mm; 3µm Partikelgröße) und einem linearen Gradienten auf einem HPLC-System mittels hydrophiler Interaktionsflüssigkeitschromatographie getrennt. Die 2-AB markierten HMO wurden durch Fluoreszenzdetektion sichtbar gemacht. Die Trennung wird von einem Fluoreszenzdetektor bei 360nm Anregung und 425nm Emission überwacht und bei 35°C durchgeführt.

Für die Analyse wurde folgendes Lösungsmittelsystem verwendet:

- Puffer A: 50mM Ammoniumformiatlösung (NH₄CO₂): 2,6ml Ameisensäure + 950ml H₂O + Ammoniumhydroxid, um den pH-Wert auf 4,4 einzustellen
- Puffer B: 200ml Puffer A + 800ml Acetonitril

3.4.2 Identifikation und Integration der HMO-Peaks

Mittels der ChemStation Software konnte die Identifizierung, Integration und Auswertung der HMO-Peaks durchgeführt werden. Für die Peak-Annotation wurden HMO-Standards (Dextra) verwendet. Nach dem Ziehen einer Baseline erfolgte das manuelle Setzen der Integrationsmarken für die jeweiligen Peaks.

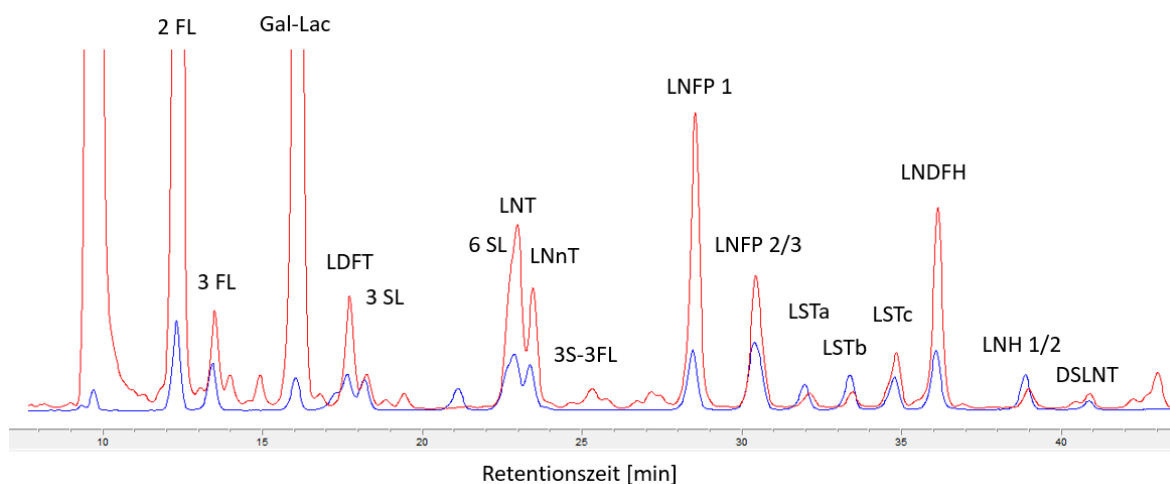


Abbildung 6 HMO-Peaks der für die Analyse verwendeten HMO der Milchprobe (blau) im Vergleich mit dem HMO-Standard (rot)

Tabelle 3 Bekannte Retentionszeit der HMO im HMO-Standard

Abk.	HMO	Retentionszeit (min)
2' FL	2' -Fucosyllactose	10,415
3FL	3 Fucosyllactose	11,582
LDFT	Lactodifucotetraose	16,005
3' SL	3' Salyllactose	16,536
6' SL	6' Salyllactose	21,392
LNT	Lacto-N-Tetraose	21,767
LNnT	Lacto-N-Neotetraose	22,279
3' S-3FL	3' Salyl-3-Fucosyllactose	22,702
LNFP1	Lacto-N-Fucopentaose 1	27,914
LNFP2/3	Lacto-N-Fucopentaose 2/3	30,020
LSTa	Salyl-Lacto-N-Tetraose a	31,751
LSTb	Salyl-Lacto-N-Tetraose b	33,301
LSTc	Salyl-Lacto-N-Tetraose c	34,818
LNDFH	Lacto-N-Difucohexaose	36,270
LNH1/2	Lacto-N-Hexaose 1/2	39,232
DSLNT	Disialyl-Lacto-N-Tetraose	41,559

3.5 Statistischen Methoden

Für die statistische Analyse wurden zunächst die jeweiligen Area under the Curve (AUC) für jeden HMO-Peak in den jeweiligen Milchproben berechnet, auf den internen Standard normiert.

Die ausgewerteten Daten wurden zur weiteren Analyse in GraphPad Prism geladen. Um die Dynamik der einzelnen HMO-Konzentrationen im Verlauf des Hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuch darstellen zu können, wurden die Werte mithilfe des Friedman-Test mit Dunns Mehrfachvergleich getestet. Mithilfe des Mann-Whitney U-Test konnte auf eventuellen Unterschieden zwischen den HMO-Konzentrationen in der Muttermilch von Frauen mit und ohne GDM untersucht werden. Die Korrelation zwischen den HMO und dem BMI wurden durch die Spearman Rangkorrelation bewertet.

Bei $p < 0,05$ wurde eine statistische Signifikanz angenommen. Für die bessere Veranschaulichung wurden Diagramme im GraphPad Prism erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Merkmale der Studienpopulation

Die nachstehende Tabelle zeigt Merkmale der stillenden Frauen, deren Milchproben in dieser Arbeit untersucht wurden (n=18). Das Alter der Studienteilnehmerinnen lag durchschnittlich bei 34 Jahren. Im Durchschnitt hatten die Frauen einen postpartum BMI von 30 kg/m². Die mittlere Schwangerschaftsdauer lag bei 275 Tagen und das durchschnittliche Geburtsgewicht bei 3553 kg. Keiner der dieser Parameter war unterschiedlich bei den Frauen mit und ohne GDM in der Anamnese (Tabelle 4), wobei ein Trend zu einem höheren BMI (31,1 vs. 27,2 kg/m²; p=0,08) in der GDM-Gruppe beobachtet wurde.

Bei allen Frauen zeigte der oGTT (durchgeführt in der 5.-7. Woche postpartum) normale Glukosetoleranz mit einem Mittelwert von 88mg/dl Nüchternglukose und 144 mg/dl 2h Glukose nach 75g oGTT. Die beiden Gruppen (mit und ohne GDM in der Anamnese) unterschieden sich jedoch in der Glukoseregulation. Frauen, die während der Schwangerschaft unter GDM litten, hatten auch 5.-7. Wochen postpartum noch signifikant höhere Nüchternglukosewerte (90±5,6 mg/dl vs. 83±4,8 mg/dl; p=0,025) und signifikant höhere 2h Glukosewerte (157,8±22,2 mg/dl vs. 115,7±13,1 mg/dl; p=0,001) als Frauen mit normaler Glukosetoleranz in der Schwangerschaft.

9 der 12 Frauen mit vorangegangenem GDM zeigten zum Zeitpunkt 5-7 Wochen postpartum noch eingeschränkte Glukosetoleranz (IGT) mit 2h Glukosewerten \geq 140mg/dl; und eine der Frauen hatte erhöhte Nüchternglukose mit Werten $>$ 100mg/dl (IFG). Nur zwei der Frauen mit vorangegangenem GDM zeigten normale Glukosetoleranz, während alle sechs Frauen mit normaler Glukosetoleranz während der Schwangerschaft auch normale Glukosetoleranz und normale Nüchternglukose-Werte nach der Schwangerschaft hatten.

Im Rahmen der ursprünglichen Studie wurden während des oGTTs auch die Insulin- und C-Peptid-Werte im Plasma im nüchternen Zustand und 2h nach Glukosezufuhr bestimmt. Aufgrund fehlender Werte wurde eine Probandin aus der GDM-Gruppe für die Analyse ausgeschlossen. Die Insulinwerte nach GDM-Schwangerschaften und nach gesunden Schwangerschaften unterschieden sich nicht, weder nüchtern (5,4±5,4 μ U/ml vs. 2,6±1,8 μ U/ml; p=0,232) noch 2h nach der Glukosezufuhr (50,0±48,1 μ U/ml vs. 22,2±5,3 μ U/ml;

p=0,186). Auch hinsichtlich der C-Peptide Werte lassen sich zu den beiden oGTT Zeitpunkten, nüchtern (1,4±1,0 ng/ml vs. 1,0±0,1 ng/ml; p=0,362) und 2h nach Glukosezufuhr (7,2±2,2 ng/ml vs. 5,5±0,8 ng/ml; p=0,082), keine signifikanten Unterschiede zwischen Schwangerschaften mit und ohne GDM erkennen (Tabelle 4).

Tabelle 4 Charakteristika der Studienpopulation

		GDM (n=12)	NGDM (n=6)	Alle (n=18)	p Value
Alter (in Jahren)	Mittelwert	33,7	33,5	33,6	p=0,940
	Standardabweichung	3,7	5,7	4,2	
	Minimum	27,0	26,0	26,0	
	Maximum	38,0	42,0	42,0	
Gestationsalter bei der Geburt (in Tagen)	Mittelwert	276	274	275	p=0,668
	Standardabweichung	7	6	6	
	Minimum	266	266	266	
	Maximum	288	281	288	
Geburtsgewicht (g)	Mittelwert	3557	3545	3553	p=0,949
	Standardabweichung	398	292	358	
	Minimum	2830	3045	2830	
	Maximum	4070	3765	4070	
Nüchternglukose (oGTT pp) (mg/dl)	Mittelwert	90,0	83,0	88,0	p=0,025
	Standardabweichung	5,6	4,8	6,2	
	Minimum	80,0	77,0	77,0	
	Maximum	101,0	90,0	101,0	
2h Glukose (oGTT pp) (mg/dl)	Mittelwert	157,8	115,7	143,7	p=0,001
	Standardabweichung	22,2	13,1	28,0	
	Minimum	113,0	97,0	97,0	
	Maximum	191,0	129,0	191,0	
BMI (kg/m ²)	Mittelwert	31,1	27,2	29,8	p=0,080
	Standardabweichung	4,8	2,3	4,5	
	Minimum	25,1	24,5	24,5	
	Maximum	39,8	31,1	39,8	
		GDM (n=11)	NGDM (n=6)	Alle (n=17)	
Insulin nüchtern (oGTT pp) (µU/ml)	Mittelwert	5,4	2,6	4,4	p=0,232
	Standardabweichung	5,4	1,8	4,6	
	Minimum	0,5	0,5	0,5	
	Maximum	16,2	5,2	16,2	
Insulin 2h (oGTT pp) (µU/ml)	Mittelwert	50,0	22,2	40,2	p=0,186
	Standardabweichung	48,1	5,3	40,5	
	Minimum	17,4	15,0	15,0	
	Maximum	182,1	31,4	182,1	
C-Peptid nüchtern (oGTT pp) (ng/ml)	Mittelwert	1,4	1,0	1,2	p=0,362
	Standardabweichung	1,0	0,1	0,8	
	Minimum	0,7	0,8	0,7	
	Maximum	4,2	1,1	4,2	
C-Peptid 2h (oGTT pp) (ng/ml)	Mittelwert	7,2	5,5	6,6	p=0,082
	Standardabweichung	2,2	0,8	2,0	
	Minimum	4,9	4,0	4,0	
	Maximum	12,7	6,8	12,7	

pp, postpartum, p-Value bezieht sich auf die signifikante Differenz zwischen den beiden Studiengruppen: GDM, Frauen mit vorangegangenem GDM; oder NGDM, Frauen nach gesunden Schwangerschaften, festgestellt mit T-Test. Bei den Insulin- und C-Peptid Werten wurde eine Probandin aus der GDM-Gruppe aufgrund fehlender Daten ausgeschlossen.

4.2 HMO-Konzentrationen in der Muttermilch

Abbildung 7 zeigt in einer Übersichtsgrafik die Konzentrationen aller gemessenen HMO in der Muttermilch (AUC normalisiert auf den internen Standard). Für die Übersicht wurden die HMO-Konzentrationen der Milchproben aller 18 Studienteilnehmerinnen (GDM und NGDM) 5-7 Woche postpartum zum Zeitpunkt 0 des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuchs herangezogen.

Folgende HMO wurden in dieser und aller nachstehender Analysen gemessen: 2'-Fukosyllaktose (2'FL), 3-Fukosyllaktose (3FL), Laktodifukotetraose (LDFT), 3'-Sialyllaktose (3'SL), 6'-Sialyllaktose (6'SL), Lakto-N-Tetraose (LNT), Lakto-N-Neotetraose (LNnT), 3'-Sialyl-3-Fukosyllaktose (3'S-3FL), Lakto-N-Fukopentaose 1/2/3 (LNFP1/2/3), Sialyl-Lakto-N-Tetraose a/b/c (LSTa/b/c), Lakto-N-Difukohexaose (LNDFH), Lakto-N-Hexaose 1/2 (LNH1/2) und Disialyl-Lakto-N-Tetraose (DSLNT). Für die Messung von 2'FL, LDFT und LNDFH wurden die Sekretor negativen Frauen, bei dieser und jeder nachstehenden Analyse, ausgeschlossen. Die ausgewerteten HMO werden in Abbildung 7 dargestellt.

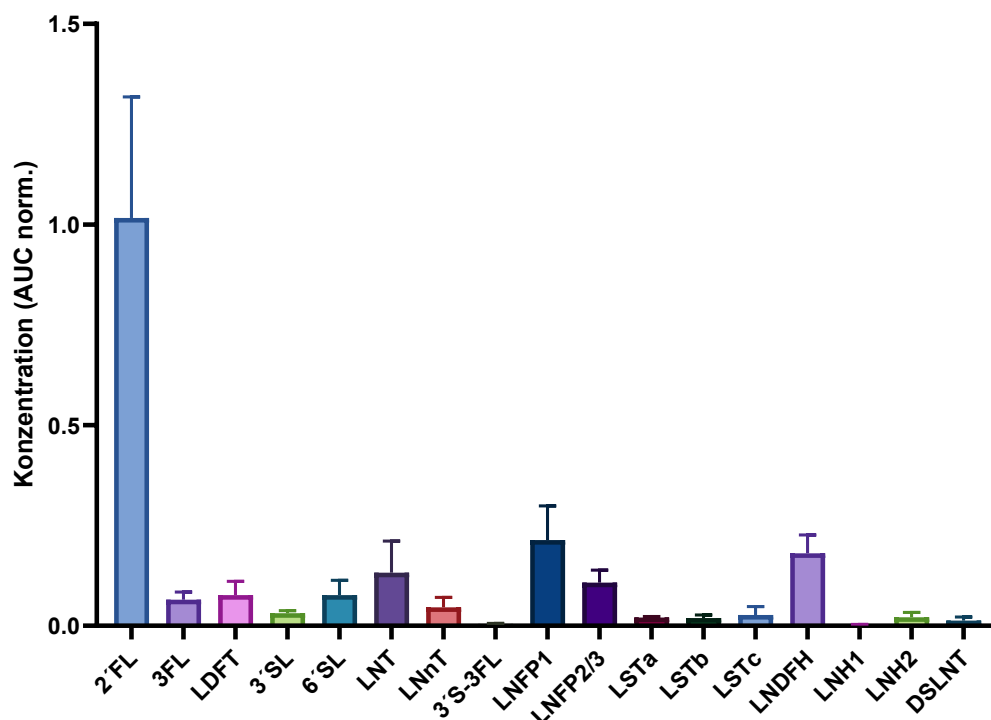


Abbildung 7 HMO-Konzentrationen in der Muttermilch der gesamten Studiengruppe

Gezeigt werden die Mediane und Interquartilsabstände in einem Säulen-Balken Diagramm; n=18.

4.3 Einfluss von GDM auf HMO-Konzentration in Muttermilch

Insgesamt wurden Milchproben von 18 Studienteilnehmerinnen ausgewertet. 6 Frauen davon hatten eine gesunde Schwangerschaft mit normaler Glukosetoleranz und 12 Frauen hatten GDM in der vorangegangenen Schwangerschaft. Die für die Analyse verwendeten Milchproben wurden im Rahmen des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuchs (5-7 Wochen post partum) gesammelt. Um die HMO-Konzentration in der Muttermilch nach Schwangerschaften mit und ohne GDM zu vergleichen, wurden die Milchproben zum Zeitpunkt 0 des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuchs, herangezogen.

Mithilfe der Durchführung eines Mann-Whitney U-Test wurden signifikante Unterschiede in den HMO-Konzentrationen zwischen den beiden Gruppen detektiert und in Form eines Tukey-Box Plot veranschaulicht. Bei der Auswertung von 2'FL, LDFT und LNDFH wurden die Sekretor negativen Frauen ausgeschlossen.

Wie in Abbildung 8, 9 und 10 gezeigt wird, waren die Konzentrationen von LDFT ($p=0,026$), LNnT ($p=0,045$), LSTb ($p=0,032$), LSTc ($p=0,014$), LNH1 ($p=0,016$) und DSLNT ($p=0,032$) signifikant unterschiedlich zwischen Müttern mit vorangegangenen GDM und ohne GDM. Die Konzentrationen der restlichen gemessenen HMO zeigten keine signifikanten Unterschiede.

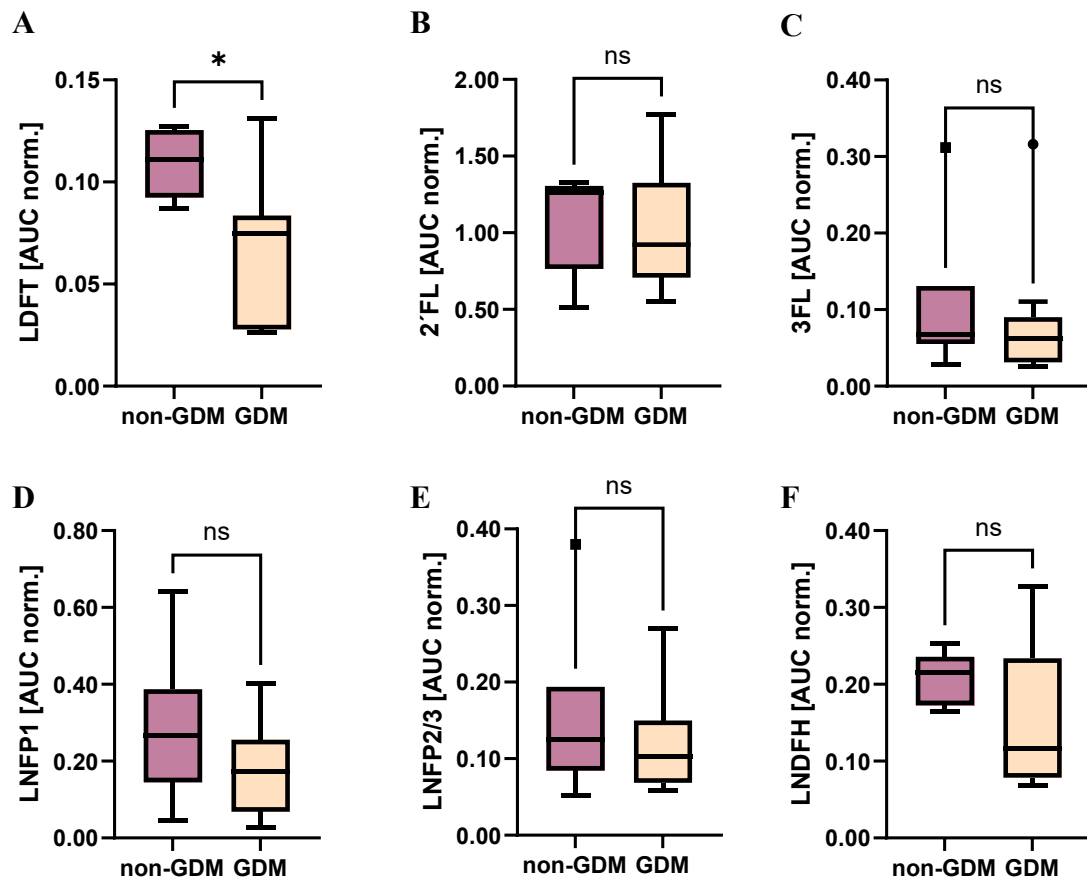


Abbildung 8 Konzentrationen fukosylierter HMO (AUC normalisiert auf den internen Standard) in der Muttermilch nach Schwangerschaften mit und ohne GDM.

(A) LDFT ($p=0,026$) in der Milch war im Mann-Whitney U-Test signifikant niedriger nach Schwangerschaften, die mit GDM kompliziert waren, veranschaulicht mithilfe eines Tukey-Box-Plot. (B) 2'FL ($p=0,768$), (C) 3FL ($p=0,682$), (D) LNFP1 ($p=0,291$), (E) LNFP2/3 ($p=0,553$) und (F) LNDFH ($p=0,432$) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Signifikanzen wurden bei $p<0,05$) angenommen.

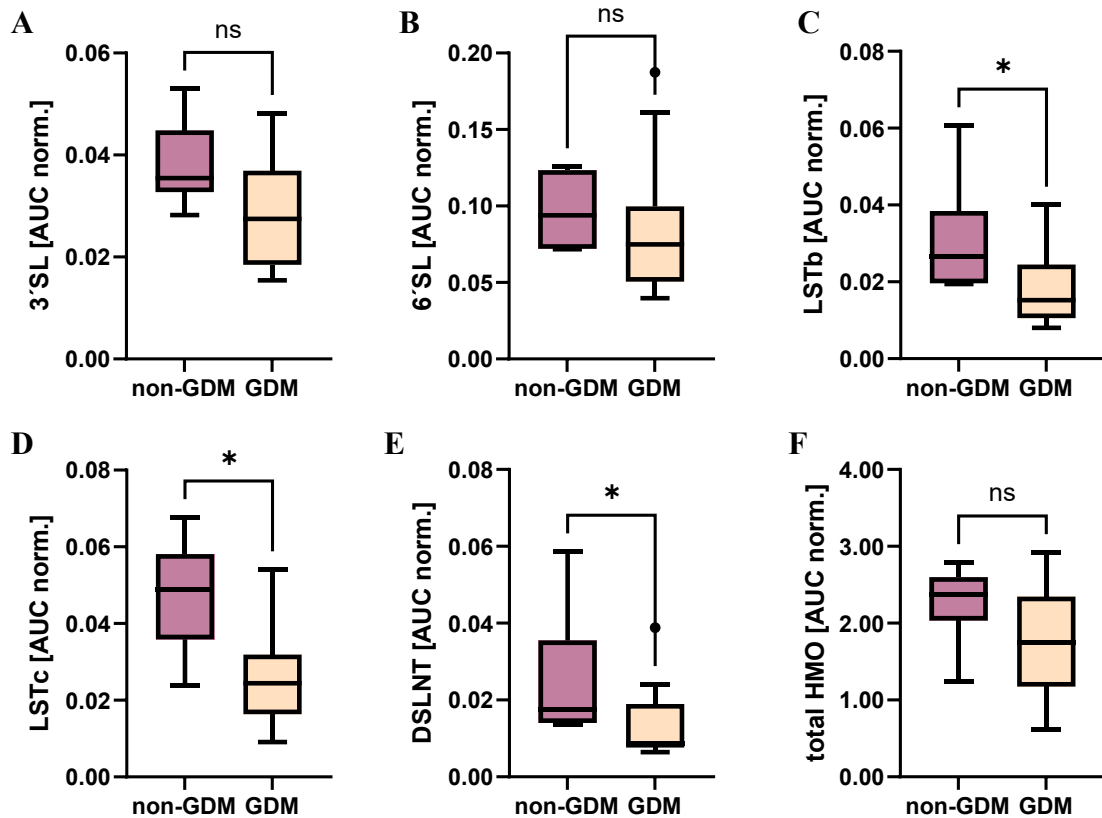


Abbildung 9 Konzentrationen sialylierter HMO und Gesamt-HMO-Konzentrationen (AUC normalisiert auf den internen Standard) in der Muttermilch nach Schwangerschaften mit und ohne GDM

Nach GDM Schwangerschaften waren folgende sialylierte HMO in Milch signifikant niedriger (getestet mittels Mann-Whitney U Test): (C) LSTb ($p=0,032$), (D) LSTc ($p=0,014$) und (E) DSLNT ($p=0,032$). (A) 3'SL ($p=0,103$), (B) 6'SL ($p=0,336$) sowie (F) die Summe aller HMO ($p=0,180$) zeigten keinen signifikanten Unterschieden nach Mann-Whitney U Test dargestellt in einem Tukey-Box-Plot.

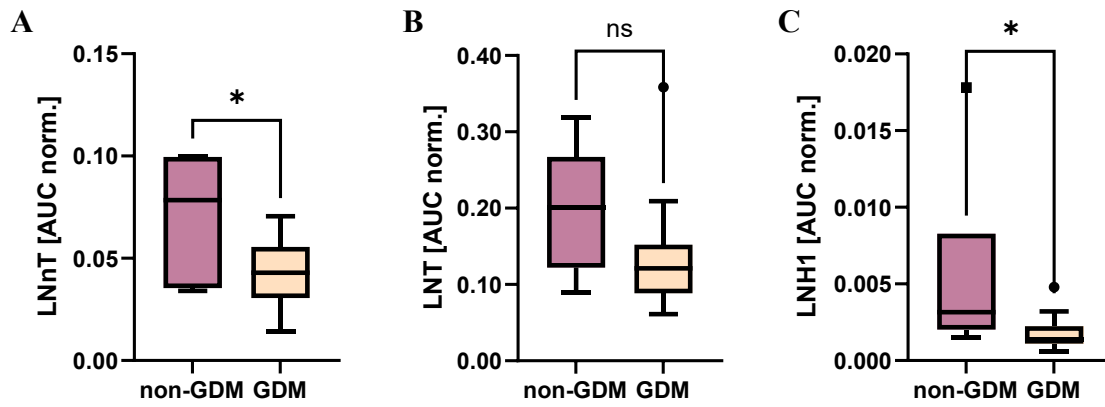


Abbildung 10 Konzentrationen unmodifizierter HMO (AUC normalisiert auf den internen Standard) in der Muttermilch nach Schwangerschaften mit und ohne GDM

GDM führte zu signifikant niedrigeren Konzentrationen von (A) LNnT ($p=0,045$) und (C) LNH1 ($p=0,016$) in der Muttermilch getestet mit Mann-Whitney U-Test, dargestellt als Tukey-Box-Plot. (B) LNT ($p=0,103$) zeigt keinen signifikanten Unterschied.

4.4 HMO-Konzentrationen in Muttermilch im Laufe des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuchs bei Müttern mit und ohne vorangegangenem GDM

Um die Konzentrationen der unterschiedlichen HMO in der Muttermilch von Frauen mit und ohne GDM über die vier Zeitpunkte des hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamp- Versuch zu vergleichen, erfolgte die Analyse der Milchproben von insgesamt 18 Studienteilnehmerinnen. Eine Probandin aus der gesunden Gruppe musste aufgrund fehlender Milchprobe zum vierten Zeitpunkt des Clamp-Versuchs aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Somit blieben in der gesunden Gruppe die Milchproben von 5 Probandinnen.

Die Analyse erfolgte mittels zweifaktoriellen ANOVA und der anschließenden Darstellung der Ergebnisse in Tukey-Box Plots. Die Sekretor negativen Frauen wurden bei der Auswertung von 2'FL, LDFT und LNDFH wieder ausgeschlossen.

Signifikante Unterschiede in den HMO-Konzentrationen von LNnT ($p= 0,016$) und LSTc ($p= 0,029$) zwischen der GDM und gesunden Gruppe, jedoch nicht über den Verlauf, wurden mit der zweifaktoriellen ANOVA festgehalten. Über den Verlauf des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuchs zeigten sich signifikante Unterschiede in den HMO-Konzentrationen von LDFT ($p= <0,001$) und LNT ($p= 0,02$). Für die restlichen HMO konnten keine signifikanten Änderungen gefunden werden. Die Ergebnisse werden in Abbildung 11 dargestellt.

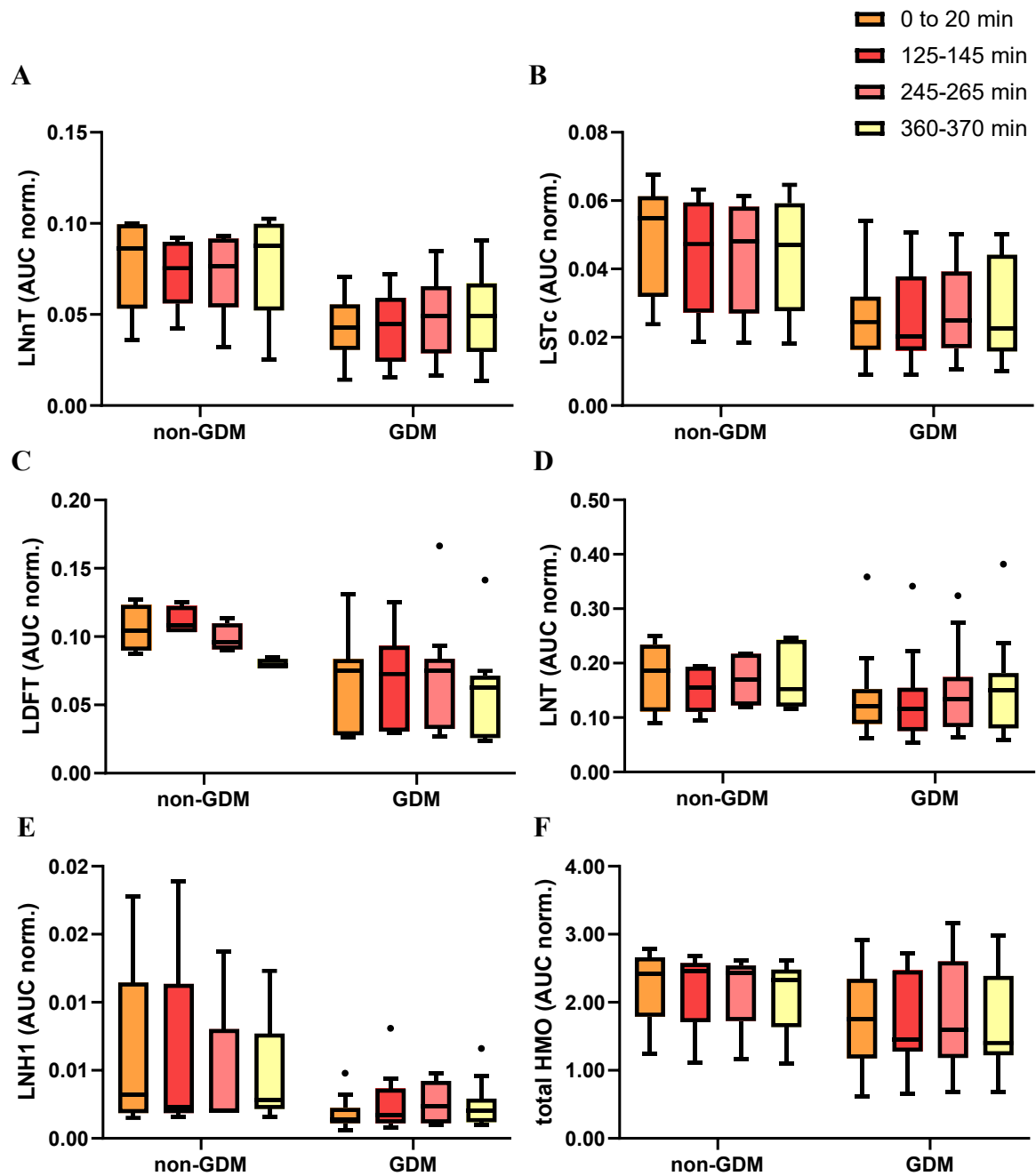


Abbildung 11 Konzentrationen von HMO in der Milch während eines hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamp-Versuchs bei Müttern mit und ohne vorherigem GDM.

Die Turkey-Box-Plots zeigen Konzentrationen von (A) LNnT und (B) LSTc in der Muttermilch von Müttern mit GDM und ohne GDM zu vier Zeitpunkten während des Clamp-Versuchs. Die zweifache ANOVA ergab signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf den GDM-Status ($p < 0,05$). Konzentrationen von (C) LDFT und (D) LNT zeigten einen signifikanten Unterschied über die Zeit ($p < 0,001$ u. $p < 0,05$). (E) LNnH1 sowie (F) die Gesamt-HMO zeigten keine signifikanten Veränderungen.

Wie in Abbildung 11 dargestellt wurde, gibt es Hinweise auf signifikante Unterschiede der verschiedenen HMO-Konzentrationen im Verlauf des hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamp-Versuch. Um eine genauere Aussage darüber treffen zu können, haben wir aufgrund der kleinen Probenmenge, eine Analyse unabhängig vom früheren GDM-Status durchgeführt. Für diese Auswertung wurden dieselben 17 Studienteilnehmerinnen wie im Vorergebnis mit einbezogen.

Signifikante Unterschiede im Zeitverlauf wurden mit Hilfe des Friedman-Tests mit Dunns Mehrfachvergleich ermittelt.

In Abbildung 12 sind die Verläufe der Konzentrationen von 2'FL, LDFT, LNT, LNFP1, LNDFH sowie die Gesamt-HMO über den hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamp-Versuch dargestellt. 2'FL zeigte über den gesamten Verlauf ($p < 0,05$), jedoch insbesondere im letzten Schritt der Clamp nach der Verabreichung von hochdosiertem Insulin eine signifikante Abnahme ($p < 0,001$). LDFT nahm signifikant über den Verlauf ab ($p < 0,001$ und $p < 0,0001$). LNFP1 und LNDFH zeigten ebenfalls eine signifikante Abnahme über den Clamp-Versuch ($p < 0,05$). LNT nahm als einziges HMO signifikant mit der Zeit zu ($p < 0,05$). Die übrigen HMO zeigten keine signifikanten Veränderungen.

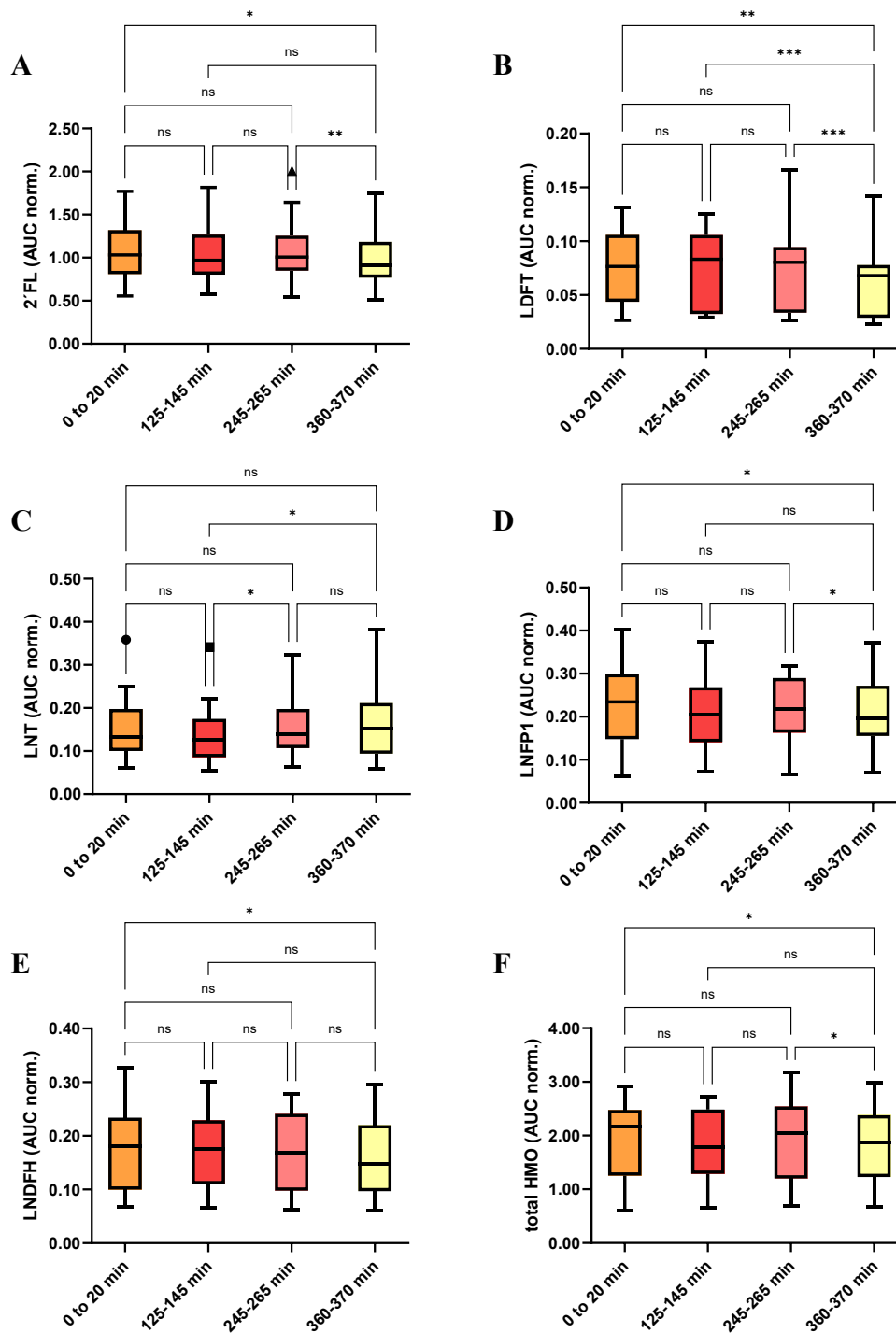


Abbildung 12 HMO-Konzentrationen in der Muttermilch während eines hyperinsulinämischen-euglykämischen Clamp-Versuch bei Frauen unabhängig vom früheren GDM-Status.

Signifikante Unterschiede im Zeitverlauf wurden mit Hilfe des Friedman-Tests mit Dunns Mehrfachvergleich ermittelt. (A) 2'FL nahm im letzten Schritt verglichen mit dem vorherigen Schritt und dem Ausgangswert signifikant ab. (B) LDFT nahm im Verlauf signifikant ab, (C) LNT nahm im Verlauf des Clamp-Versuchs signifikant zu, (D) LNFP1 und (E) LNDFH nahmen signifikant ab. (F) Gesamt-HMO zeigten keine signifikante Veränderung. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.5 HMO-Konzentrationen im Verlauf der Laktation bei Müttern mit vorangegangenen GDM-Schwangerschaften

Um auch eine Aussage darüber treffen zu können, ob und wie sich die verschiedenen HMO-Konzentrationen im Verlauf der Laktation in der Muttermilch nach GDM verändern, verglichen wir Milchproben von 6 Studienteilnehmerinnen 5-7 Wochen postpartum mit Milchproben vom Zeitpunkt 15-17 Wochen postpartum.

Mittels Mann-Whitney U-Test wurden signifikante Unterschiede in 6'SL ($p=0,009$), LSTc ($p=0,009$) und LNH2 ($p=0,002$) Konzentrationen in der Muttermilch zwischen den unterschiedlichen Laktationsperioden festgestellt. Die restlichen HMO zeigten keine signifikanten Veränderungen. Es werden folgende HMO zusätzlich gezeigt: 2'FL, 3FL, LDFT, 3'SL, LNT, LNnT, LNFP1, LNFP2/3 sowie die Gesamt-HMO. Die Ergebnisse werden in Abbildung 13, 14 und 15 dargestellt.

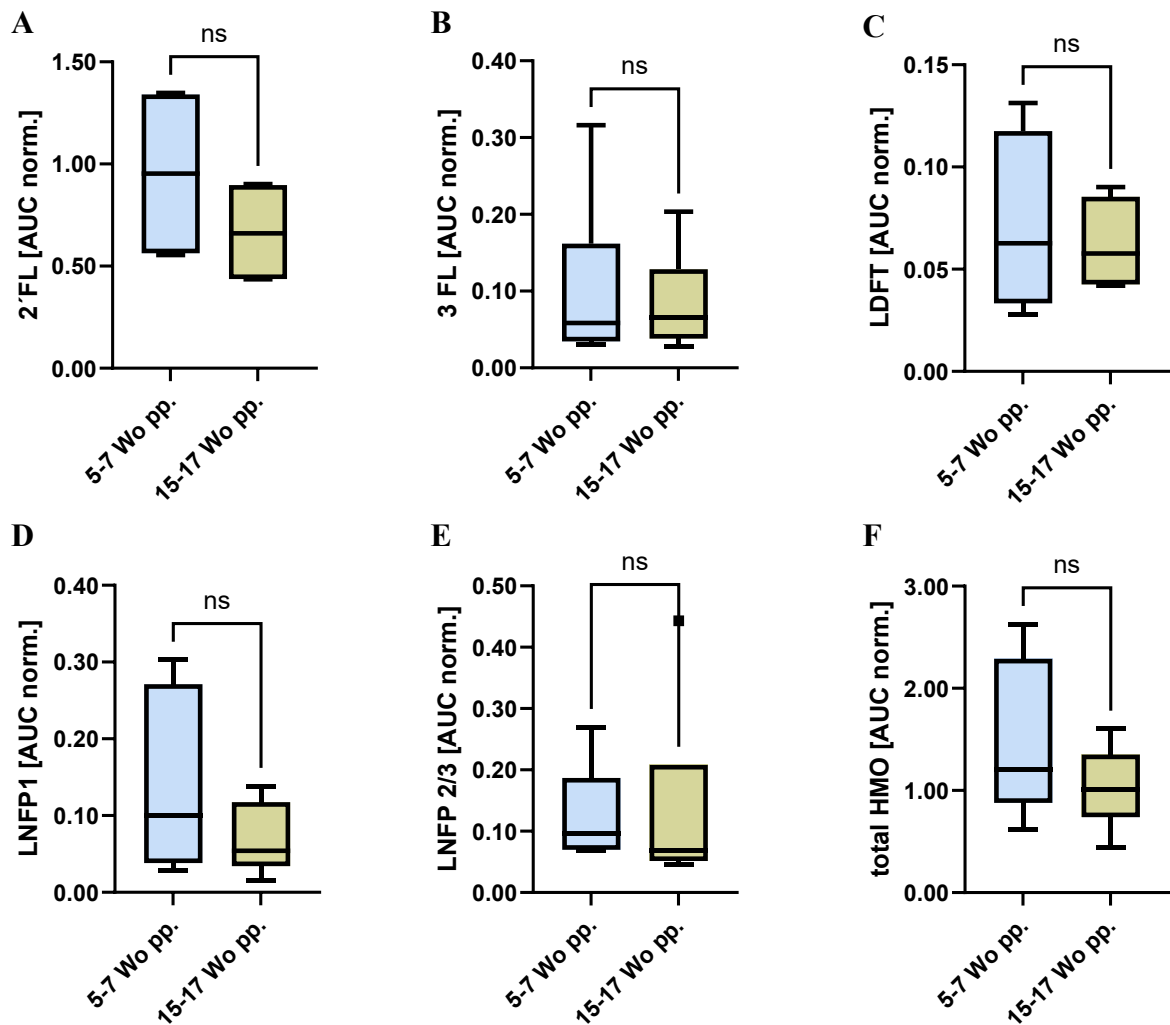


Abbildung 13 Vergleich der Konzentrationen fukosylierter HMO (AUC normalisiert auf den internen Standard) in der Muttermilch 5-7 Wochen und 15-17 Wochen postpartum bei Müttern mit vorangegangenen GDM-Schwangerschaften.

(A) 2'FL ($p=0,343$), (B) 3FL ($p=0,937$), (C) LDFT ($p=0,886$), (D) LNFP1 ($p=0,394$), (E) LNFP2/3 ($p=0,394$) sowie die Konzentration der (F) Gesamt-HMO ($p=0,4$) zeigten in der Milch 5-7 Wochen postpartum im Vergleich zur Milch 15-17 Wochen postpartum im Mann-Whitney U-Test keine signifikanten Veränderungen. Dargestellt in Form von Tukey-Box-Plots. Signifikante Unterschiede wurden bei $p<0,05$ angenommen.

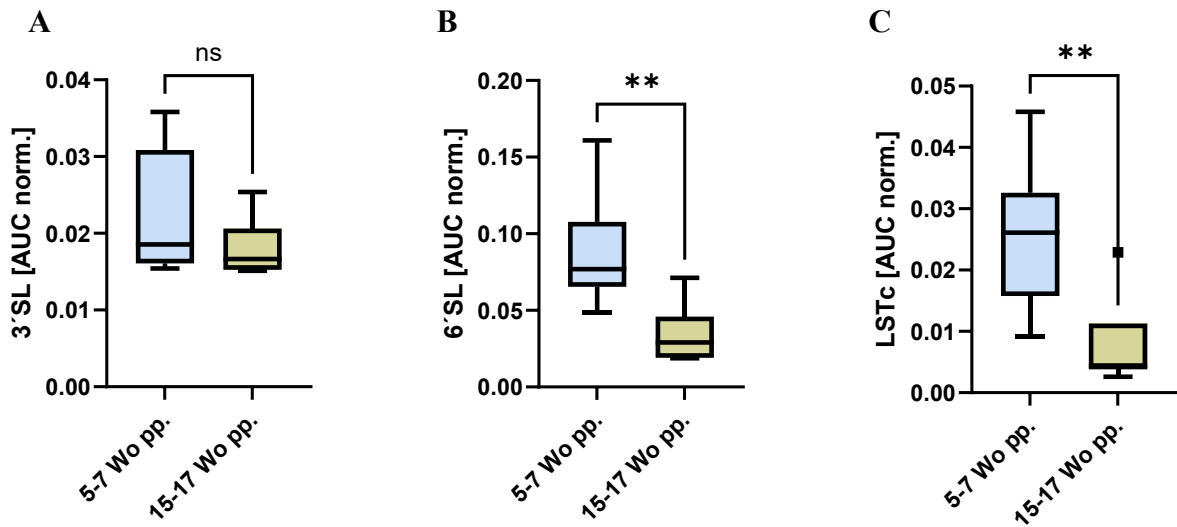


Abbildung 14 Vergleich der Konzentrationen sialylierter HMO (AUC normalisiert auf den internen Standard) in der Muttermilch 5-7 Wochen und 15-17 Wochen postpartum bei Müttern mit vorangegangenen GDM-Schwangerschaften.

Im Mann-Whitney U Test zeigten sich in der Milch 5-7 Wochen postpartum signifikant höhere Konzentrationen an (B) 6'SL ($p=0,009$) und (C) LSTc ($p=0,009$) als nach 15-17 Wochen. (A) 3'SL ($p=0,258$) zeigt keinen signifikanten Unterschied, dargestellt in Tukey-Box-Plots. (** $p<0,01$)

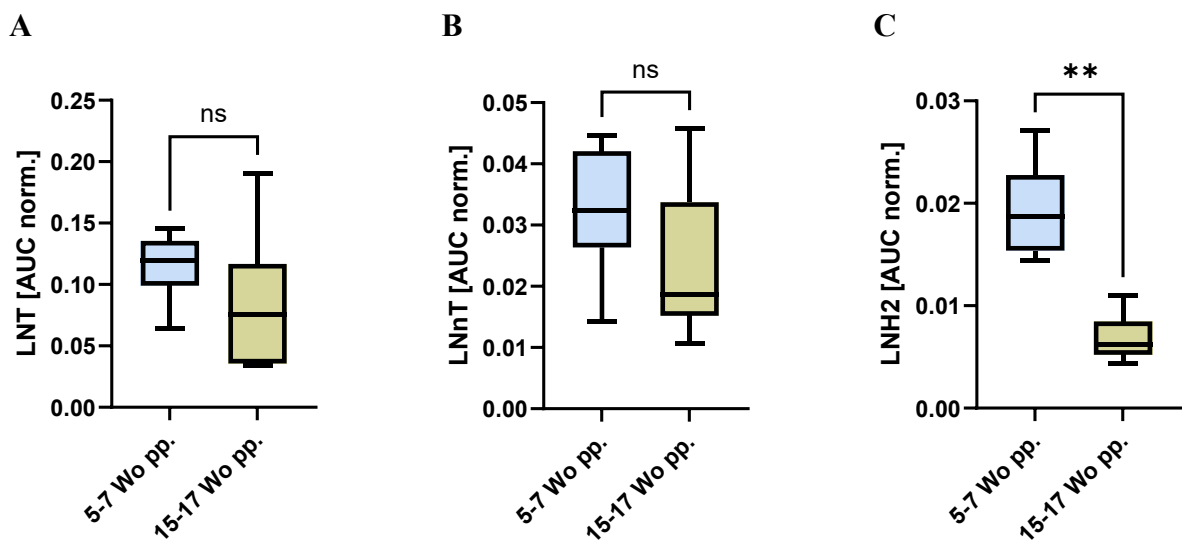


Abbildung 15 Vergleich der Konzentrationen unmodifizierter HMO (AUC normalisiert auf den internen Standard) in der Muttermilch 5-7 Wochen und 15-17 Wochen postpartum bei Müttern mit vorangegangenen GDM-Schwangerschaften.

(A) LNT ($p=0,18$) und (B) LNnT ($p=0,24$) zeigte keine signifikanten Veränderungen. (C) LNH2 ($p=0,002$) zeigt im Mann-Whitney U-Test signifikante höhere Konzentrationen in der 5-7 Woche postpartum, dargestellt in einem Tukey-Box-Plot. (** $p<0,01$).

Im zweiten Schritt der Analyse, wurden die HMO-Konzentrationen über alle vier Zeitpunkte der Clamp, zwischen der 5-7 Woche und 15-17 Woche postpartum miteinander verglichen. Mithilfe der zweifaktoriellen ANOVA konnten signifikante Unterschiede in den Konzentrationen von 6'SL ($p= 0,018$), LSTc ($p= 0,009$) und LNH2 ($p=0,0001$) zwischen den beiden Laktationsperioden in Bezug auf den GDM-Status jedoch nicht über den Verlauf des Clamp-Versuchs nachgewiesen werden. Die restlichen HMO zeigten keine signifikanten Veränderungen. Die Abbildung 16 zeigt diese signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Laktationsperioden.

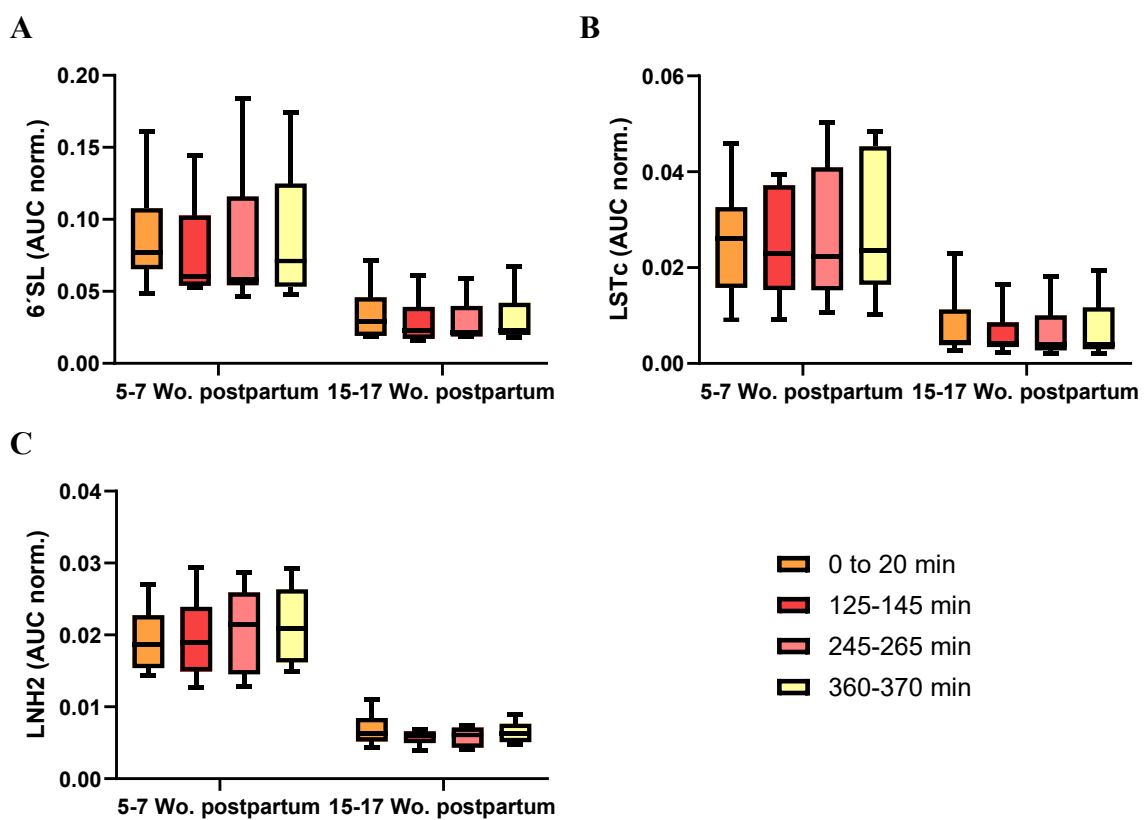


Abbildung 16 HMO-Konzentrationen im Verlauf des oGTT bei Müttern mit vorangegangenen GDM-Schwangerschaften zu zwei Zeitpunkten in der Laktation.

Der Tukey-Box-Plot zeigt die Konzentrationen von (A) 6'SL ($p= 0,018$), (B) LSTc ($p= 0,009$) und (C) LNH2 ($p= <0,001$) in der Muttermilch von Müttern mit GDM zu vier Zeitpunkten während des Clamp-Versuchs getrennt nach Zeitpunkten der Laktation, 5-7 Wochen postpartum und 15-17 Wochen postpartum. Die zweifache ANOVA ergab signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

4.6 Korrelation von HMO-Konzentrationen mit mütterlichem BMI

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen postpartalem BMI und individuellen HMO-Konzentrationen zu untersuchen, wurden die Milchproben von 18 Studienteilnehmerinnen zum Zeitpunkt 0 des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuch 5-7 Wochen postpartum mit dem BMI während der Studie korreliert.

Für die Analyse verwendeten wir den Spearman Rangkorrelationskoeffizienten und stellten die Ergebnisse in Form von Streudiagrammen dar. LNnT zeigte eine signifikant negative Korrelation mit dem BMI ($r = -0,5$; $p = 0,04$). Die restlichen HMO waren nicht signifikant mit dem BMI assoziiert. Für die Darstellung wurden nur einzelne der nicht signifikanten HMO ausgewählt. Abbildung 17 zeigt Spearman-Rangkorrelationen zwischen dem BMI und 2'FL, LNnT, LNFP1 und den Gesamt-HMO, dargestellt in Streudiagrammen.

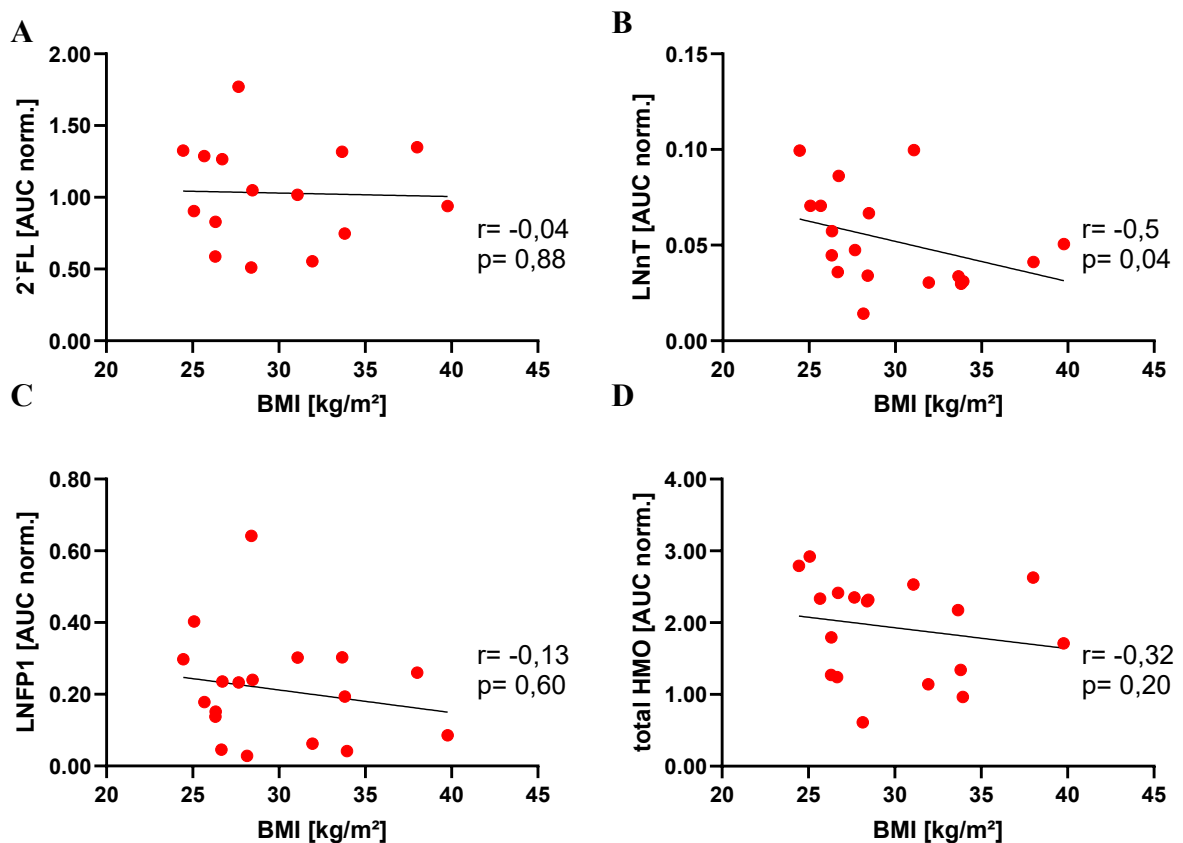


Abbildung 17 Korrelation individueller HMO-Konzentrationen mit dem BMI 5-7 Wochen postpartum Spearman Korrelationskoeffizienten (r) und p-Werte (p) von (A) 2'FL, (B) LNnT, (C) LNFP1 und (D) Gesamt-HMO, können den Streudiagrammen entnommen werden. Signifikanzen wurden bei $p < 0,05$ angenommen.

4.7 Korrelation von HMO in Muttermilch mit dem Glukosestoffwechsel postpartum

Um mögliche Zusammenhänge zwischen Parametern der Glukosestoffwechselregulation (Glukose-, C-Peptid- und Insulinwerte) postpartum mit den unterschiedlichen HMO-Konzentrationen zu erkennen, wurden hierfür wiederum Milchproben von insgesamt 17 Studienteilnehmerinnen zum Zeitpunkt 0 des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuch 5-7 Wochen postpartum mit den Insulin-, C-Peptid und Glukosewerten zum Zeitpunkt -10 min (10 min vor dem Trinken der Glukoselösung) und 120 min (2h nach der oralen Glukoseaufnahme) des oGTT (durchgeführt im Rahmen des ersten Studienbesuchs) analysiert. Eine Studienteilnehmerin aus der GDM-Gruppe musste aufgrund fehlender Daten ausgeschlossen werden.

Nach der Analyse mit den Spearman Rangkorrelationskoeffizienten wurden signifikante Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern der postpartalen Glukosestoffwechselregulation und den verschiedenen HMO-Konzentrationen mithilfe von Streudiagrammen grafisch dargestellt (Abbildung 18 und 19).

Die Analyse mittels Spearman Rangkorrelationskoeffizienten ergab keine signifikanten Korrelationen zwischen den Glukosewerte (baseline bei -10 min und 120 min nach oraler Glukoseaufnahme) und HMO-Konzentrationen in der Milch.

Die basalen C-Peptid-Konzentrationen zum Zeitpunkt -10 min des oGTT zeigten ebenfalls keine signifikanten Korrelationen mit ausgewerteten HMO. Allerdings fanden wir negative Korrelationen zwischen den C-Peptid Werten zum Zeitpunkt 120 min des oGTT und LNT ($r = -0,539$; $p = 0,028$), LSTb ($r = -0,517$; $p = 0,036$) und LNH1 ($r = -0,618$; $p = 0,009$) (Abbildung 18).

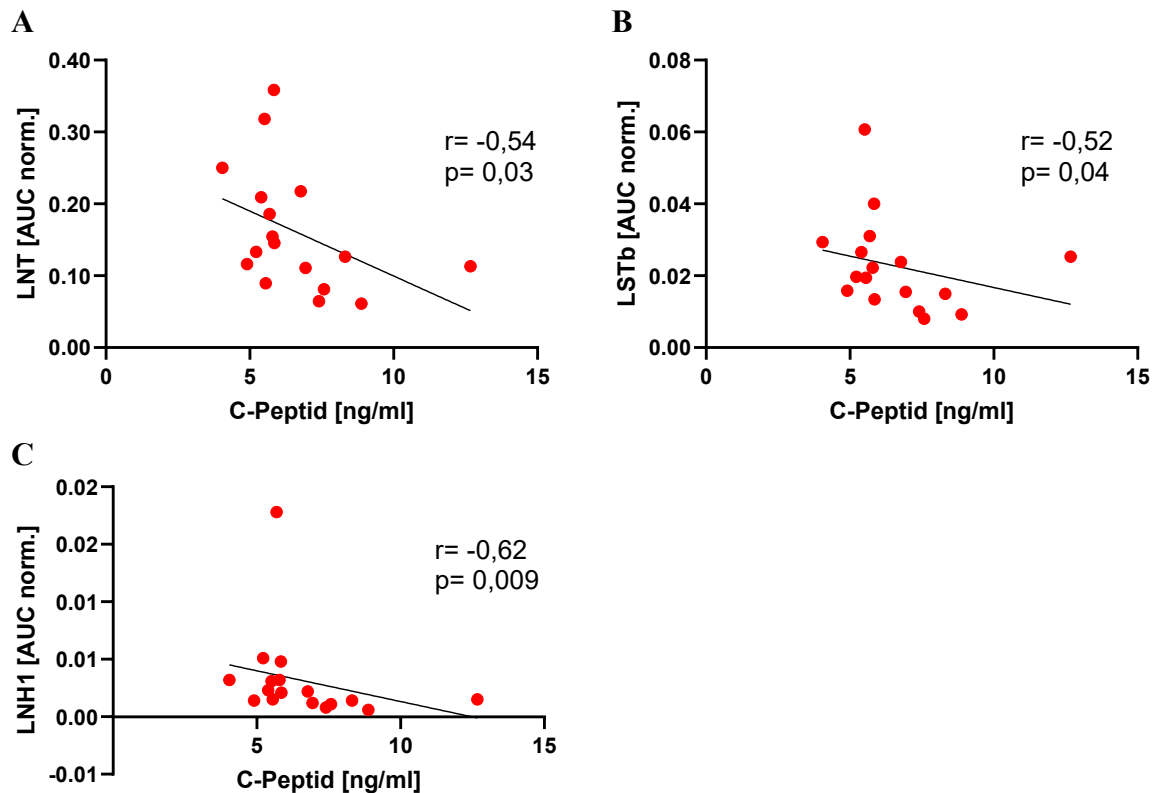


Abbildung 18 Korrelation individueller HMO-Konzentrationen mit den C-Peptidwerten zum Zeitpunkt 120 min des oGTT

Spearman Korrelationskoeffizienten (r) und p -Werte (p) von (A) LNT, (B) LSTb und (C) LNH1, können den Streudiagrammen entnommen werden. Signifikanzen wurden bei $p < 0,05$ angenommen.

Auch die basalen Insulinwerte zum Zeitpunkt -10 min des oGTT waren nicht mit individuellen HMO-Konzentrationen der Muttermilch korreliert. Spearman Rangkorrelationsanalysen zeigten jedoch signifikante negative Korrelationen von Insulinwerten zum Zeitpunkt 120 min des oGTT mit LNT ($r = -0,533$; $p = 0,029$), LNnT ($r = 0,573$; $p = 0,018$), LSTa ($r = -0,497$; $p = 0,044$) und LNH1 ($r = -0,628$; $p = 0,008$). Die Ergebnisse werden in Abbildung 19 in Form von Streudiagrammen dargestellt.

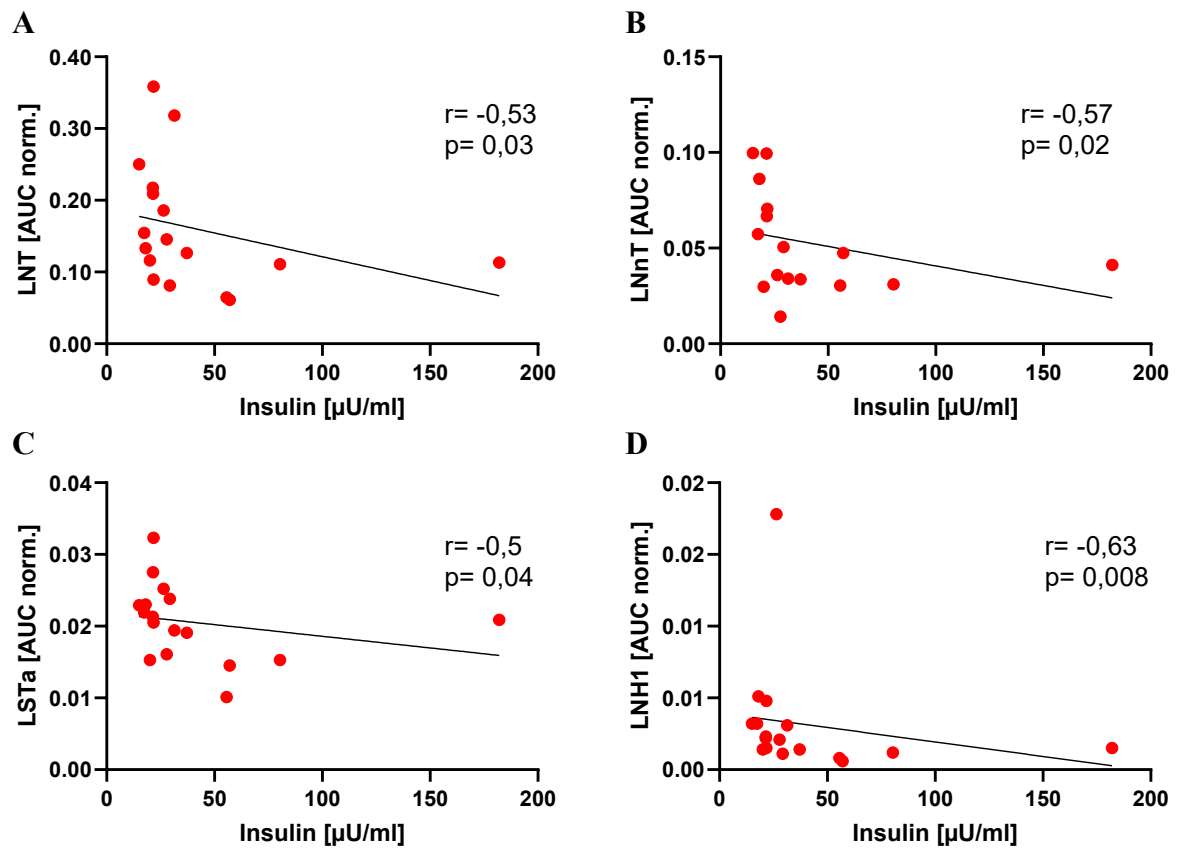


Abbildung 19 Korrelation individueller HMO-Konzentrationen mit den Insulinwerten zum Zeitpunkt 120 min des oGTT

Spearman Korrelationskoeffizienten (r) und p -Werte (p) von (A) LNT, (B) LNnT, (C) LSTa und (D) LNH1 können den Streudiagrammen entnommen werden. Signifikanzen wurden bei $p < 0,05$ angenommen.

5 Diskussion

In dieser Diplomarbeit wurden HMO-Konzentrationen in der Muttermilch von Müttern mit und ohne GDM in der vorangegangenen Schwangerschaft verglichen. Weiters wurden Assoziationen von HMO-Konzentrationen mit BMI und Parametern des Glukosemetabolismus während der Laktation untersucht. Außerdem beobachteten wir Veränderungen der HMO-Konzentrationen im Verlauf eines hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuchs, und verglichen HMO-Konzentrationen in Muttermilch der 5.-7. Woche mit Proben der 15.-17. Woche der Laktation.

Die wichtigsten Ergebnisse im Überblick: 1) Nach Schwangerschaften mit GDM waren die Konzentrationen von LDFT, LNnT, LSTb, LSTc, LNH1 und DSLNT in der Milch 5-7 Wochen postpartum signifikant niedriger als nach unkomplizierten Schwangerschaften. 2) Unabhängig vom früheren GDM-Status zeigt sich im Verlauf des Clamp-Versuchs eine signifikante Abnahme von 2'FL, LDFT, LNFP1 und LNDFH sowie eine signifikante Zunahme von LNT. 3) 6'SL, LSTc und LNH2 waren in der Muttermilch von Frauen mit GDM in der vorangegangenen Schwangerschaft 5-7 Wochen postpartum signifikant höher als in der 15-17 Woche postpartum. 4) LNnT korrelierte negativ mit dem postpartalen BMI. 5) Höhere C-Peptid- und Insulin-Werte zum Zeitpunkt 120 min des oGTT waren mit niedrigeren HMO-Konzentrationen in Muttermilch assoziiert: Wir fanden negative Korrelationen zwischen C-Peptid-Werten und LNT, LSTb und LNH1 sowie negative Korrelationen zwischen den Insulinwerten und LNT, LNnT, LSTa und LNH1.

HMO-Konzentrationen in der Muttermilch nach Schwangerschaften mit und ohne GDM:

Wir fanden hier, dass GDM die Konzentration einiger HMO in Muttermilch verringerte. Die ursprüngliche Hypothese, dass die durch GDM vermittelten Unterschiede in den pränatalen HMO, die im mütterlichen Serum und im Nabelschnurblut beobachtet wurden, in der Muttermilch bestehen bleiben, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt. Weiser-Fuchs *et al.* und Hoch *et al.* beschrieben einen signifikanten Anstieg von 3'SL im Serum während der Schwangerschaft (162) sowie im Nabelschnurblut (163) bei GDM, was in der Muttermilch nicht beobachtet werden konnte. Ein Erklärungsansatz könnten die deutlich unterschiedlichen HMO Profile in Serum und in Muttermilch sein. Während 3'SL im Serum einen relativ großen Anteil ausmacht (> 50%), ist die relative Konzentration in

Muttermilch wesentlich geringer (<10%) (158), was auf unterschiedliche Rollen von HMO in Schwangerschaft (im Serum) und Stillzeit (in Muttermilch) hindeuten könnte. Es ist auch wichtig zu erwähnen, dass die absoluten HMO-Konzentrationen in Muttermilch im Vergleich zu Serum um ca. 10.000-fach höher sind (158). Dies verdeutlicht, dass die HMO-Syntheseraten in der Schwangerschaft und Stillzeit nicht vergleichbar sind. Ein weiterer Erklärungsansatz für die scheinbar unterschiedliche Beeinflussung von prä- und postpartalen HMO durch GDM könnte auch der unterschiedliche Glukosemetabolismus während der Schwangerschaft und nach der Geburt, insbesondere bei etablierter Laktogenese sein. Im Laufe einer Schwangerschaft kommt es aufgrund des erhöhten Glukosebedarfs, durch steigende plazentare und lokale Hormone, zu einer gesteigerten Insulinresistenz (11–16). Zeitgleiche β -Zell Proliferation und gesteigerte glukosestimulierte Insulinsekretion verhindern normalerweise exzessive Glukosezufuhr zum Fetus (17). Bei GDM kann der Insulinbedarf durch Dysfunktion der β -Zellen und/oder Gewebeinsulinresistenz nicht ausreichend gedeckt werden was zur Hyperglykämie führt (20). Postpartal reduziert sich die β -Zellmasse wieder zu ihrer physiologischen Größe (18,19). In 13-40% der Frauen mit GDM bildet sich die in der Schwangerschaft bestehende Glukosetoleranzstörung nicht wieder vollständig zurück. Rund 20% weisen bereits im ersten postpartalen Jahr unterschiedliche Formen eines gestörten Glukosestoffwechsels auf (5). Somit besteht die Möglichkeit, dass Frauen nach GDM, höhere Insulinspiegel aufweisen als Frauen nach gesunden Schwangerschaften. Umso wichtiger ist das Stillen nach einer Schwangerschaft mit GDM. Für die Laktogenese wird Glukose insulinunabhängig in die Brustdrüse aufgenommen, was zu niedrigeren Glukose- und Insulinspiegel führt (168). McManus *et al.* fanden Hinweise auf eine verbesserte Glukosetoleranz und Insulinreaktion 3 Monate postpartum bei stillenden Frauen im Vergleich zu nicht-stillenden Frauen nach GDM. Allerdings war der Unterschied statistisch nicht signifikant, was möglicherweise auf eine zu geringe Stichprobengröße von 14 stillenden Frauen und 12 nicht-stillenden Frauen zurückzuführen sein könnte (169). Da in dieser Diplomarbeit der Fokus auf HMO in Muttermilch gerichtet war, untersuchten wir nur stillende Frauen. Weiterführend könnten auch die nicht-stillenden Frauen mit und ohne GDM aus der vorliegenden Studie in Hinblick auf Glukosetoleranz und Insulinreaktion untersucht werden, um die Ergebnisse von McManus *et al.* zu erhärten oder zu widerlegen.

Interessanterweise fanden wir trotz der relativ geringen Studiengröße, dass GDM die HMO-Konzentrationen in Muttermilch beeinflussen kann. Einige HMO (LDFT, LNnT, LSTb, LSTc, LNH1 und DLSNT) zeigten signifikant niedrigere Konzentrationen bei Müttern mit GDM in der vorangegangenen Schwangerschaft. Li *et al.* zeigte ebenfalls signifikant geringere HMO-Konzentrationen im Kolostrum von Müttern mit GDM im Vergleich zu Müttern mit normaler Glukosetoleranz während der Schwangerschaft. Am 42. Tag postpartum zeigte sich jedoch ähnliche oder höhere HMO-Konzentrationen als bei Müttern ohne GDM in der vorangegangenen Schwangerschaft (152). Die Erklärung hierfür könnte wiederum der Glukosemetabolismus während der Laktogenese sein, der insbesondere durch längere Stillzeiten verbessert wird (169). Wang *et al.* hingegen konnten niedrigere Konzentrationen von sialylierten HMO, insbesondere 3`SL in Milch von Müttern nach GDM verglichen mit jenen mit normale Glukosetoleranz in den vorausgegangenen Schwangerschaften nachweisen (170), was sich in unserer Studie nicht zeigte. Gründe dafür könnten Unterschiede in der Studienpopulation (ethnische Herkunft, Größe der Studienpopulation) sein. Smilowitz *et al.* konnten in Milchproben 2 Wochen postpartum zwischen Mütter mit GDM und jenen ohne GDM keine signifikanten Unterschiede erkennen (171). Die Studienpopulation mit 8 Probandinnen in der GDM Gruppe und 16 Probandinnen in der gesunden Gruppe zeigt ein anderes Verhältnis als in unserer Studie, was ein möglicher Erklärungsansatz für die signifikanten Unterschiede in unseren Analysen darstellen könnte.

HMO-Konzentrationen in der Muttermilch im Verlauf des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuchs:

Mit dieser Studie wurden erstmals HMO in der Muttermilch im Verlauf eines hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuchs gemessen. Neben einer signifikanten Abnahme von 2`FL, LDFT, LNFP1 und LNDFH konnte eine signifikante Zunahme von LNT in Muttermilch beobachtet werden. Interessanterweise gingen die signifikanten Veränderungen der HMO-Konzentrationen mit durch die Versuchsanordnung steigenden Plasma-Insulin einher.

Insulin spielt eine entscheidende Rolle bei der Steuerung zahlreicher Abläufe zur Vorbereitung der Brustdrüse auf die Laktation. Auch wenn Insulin nachweislich die Milchproteinsynthese auf transkriptioneller sowie auch auf post-transkriptioneller Ebene

beeinflusst, deuten Transkriptomik-Studien darauf hin, dass Insulin eine allgemeinere Funktion bei der Regulation der gesamten Proteinsynthese übernimmt, um den globalen Umbau und die sekretorische Aktivierung zu unterstützen, die für eine adäquate Laktation notwendig sind (172). Basierend auf den Ergebnissen des Clamp-Versuchs kann nur spekuliert werden, ob und inwiefern erhöhte Insulinlevels im Blut in diesem Zusammenhang die Biosynthese von HMO in der Brustdrüse beeinflussen können.

Auch wenn die Aussagekraft dieser hochartifiziiellen Bedingungen während des Clamp-Versuchs limitiert ist (unphysiologische Hyperinsulinämie), könnte dies doch wertvolle Hinweise liefern, ob Insulin Auswirkungen auf die biosynthetische Funktion der Brustdrüse hat, und damit die Zusammensetzung der Muttermilch hinsichtlich HMO verändern kann.

HMO-Konzentrationen im Verlauf der Laktation bei Müttern mit vorangegangenen GDM-Schwangerschaften:

Beim Vergleich der HMO-Konzentrationen zwischen den zwei Zeitpunkten (5-7 und 15-17 Wochen postpartum) fanden wir eine Abnahme der Konzentrationen von 6'SL, LSTc und LNH2. Diese Resultate stimmen mit der Studie von Dou *et al.* überein, in der ebenfalls ein Abfall der HMO-Konzentrationen über die Laktationsdauer sowohl bei Müttern mit GDM als auch bei Müttern ohne GDM gezeigt werden konnte (150). Insgesamt stimmen diese Ergebnisse gut mit der aktuellen Literatur überein, wo eine Abnahme der HMO Konzentration im Laufe der Laktation beschrieben wird (145).

In unserer Studie standen Milchproben von nur 6 Frauen aus der GDM Gruppe zur Analyse zur Verfügung.

Unsere Ergebnisse deuten nicht darauf hin, dass die durch GDM anfangs noch verringerten Konzentrationen bestimmter HMO nach einer verzögerten Reifung der Milch doch an das Konzentrationsniveau ohne vorangegangenen GDM angeglichen würden. Allerdings können wir auch nicht ausschließen, dass HMO-Konzentrationen nach Schwangerschaften ohne GDM schneller absinken. Es wäre daher interessant HMO-Konzentrationen in der Muttermilch in einer größeren Kohorte von Frauen mit GDM und ohne GDM zu analysieren, um genauere Aussagen darüber treffen zu können, wie sich die HMO-Konzentrationen im Verlauf der Laktation insbesondere im Vergleich zwischen GDM

Müttern und gesunden Müttern verändern. Es soll auch erwähnt werden, dass alle Frauen dieser Studie (mit GDM und ohne GDM) einen präkonzeptionellen BMI über 25 aufwiesen, was zusätzlich die Vergleichbarkeit mit anderen Studien reduzieren kann. Erhöhter BMI ist mit verzögerter Still-Initiation (173) und geringere Milchproduktionsrate (174) assoziiert. Da das Milchvolumen durch die Laktose-Produktion reguliert wird (175), könnte mit einer BMI-modulierten verringerten Laktose-Produktion auch eine allgemein oder spezifisch verringerte HMO-Produktion einhergehen.

Korrelation der HMO-Konzentrationen mit dem BMI:

Unsere Studienergebnisse zeigten eine negative Korrelation der LNnT Konzentration in der Muttermilch mit dem postpartalen maternalen BMI unabhängig vom früheren GDM-Status. Dass der BMI einen Einfluss auf die HMO-Konzentrationen sowohl in der Muttermilch als auch im Serum während der Schwangerschaft hat, wurde auch in vorangegangenen Studien gezeigt. Menzel *et al.* konnten in ihrer Studie ebenfalls eine negative Korrelation zwischen dem präkonzeptionellen BMI und der LNnT Konzentration in der Muttermilch bei sekretor-negativen Frauen nachweisen (176). Im Unterschied zu unserer Studie hatten Menzel *et al.* die HMO-Assoziationen mit BMI in sekretor-positive und sekretor-negative Frauen getrennt analysiert. Im Rahmen unserer Studie wurden lediglich bei der Auswertung fukosylierter HMO, welche für die Bildung FUT2 benötigen, die sekretor-positiven Frauen ausgeschlossen.

McGuire *et al.* zeigten eine negative Korrelation des maternalen BMI mit der DLSNT-Konzentration bei ansonsten gesunden Frauen. Ob die Veränderung jedoch ausschließlich auf den BMI zurückzuführen ist, konnte aufgrund der hohen ethnischen Variabilität, in der Studie nicht bewiesen werden (154). Auch in unserer Studie kann eine Verzerrung bezüglich der Ethnizität nicht ausgeschlossen werden.

Negative Korrelationen von BMI und bestimmten HMO im Serum wurden auch von Schönbacher *et al.* in einer Studie während der Schwangerschaft festgestellt. Es zeigte sich eine negative Korrelation von 2'FL und LDFT in Serum in der Mitte der Schwangerschaft mit dem präkonzeptionellen BMI sowie eine verlangsamte Konzentrationszunahme der beiden genannten HMO von der 15. auf die 24. SSW bei stark adipösen Frauen (BMI >35kg/m²) (165). Ähnliche Zusammenhänge zwischen den HMO-Konzentrationen und

dem BMI scheinen sich somit sowohl in der Schwangerschaft als auch in der Laktation zu zeigen.

Da bekannt ist, dass nicht nur der BMI, sondern auch andere mütterliche Faktoren die HMO Zusammensetzung beeinflussen können, sind künftig Studien erforderlich, die sich ausschließlich mit dieser Fragestellung beschäftigen und in welchen alle anderen Störfaktoren minimiert werden können.

Korrelationen der HMO-Konzentrationen mit Glukose, C-Peptid und Insulin:

Eine frühere Studie zeigte, dass bei schwangeren Frauen mit normaler Glukosetoleranz nach oraler Einnahme von Glukose aus dem nüchternen Zustand im Rahmen eines OGTT 3'SL im Serum kurzfristig ansteigt. Bei Frauen mit schlechterer Insulinsensitivität schien dies stärker der Fall zu sein (162). LeMay-Nedjelski *et al.* konnte keinen Zusammenhang zwischen der HMO-Zusammensetzung in Muttermilch und dem Glukosetoleranzstatus feststellen (155). Die meisten Studien deuten auch daraufhin, dass HMO in der Muttermilch relativ stabil und unabhängig von Tageszeit und Einnahme von Mahlzeiten sind (157,177). Ob bei Glukosebelastung HMO in der Muttermilch verändert werden, ist unbekannt. Im Zuge unserer Studie korrelierten wir die HMO Werte in Muttermilch zum Zeitpunkt des Clamp-Versuchs (5-7 Wochen postpartum) mit den Glukosewerten vom postpartalem oGTT (ca. eine Woche davor), Nüchtern-Glukosewerte (Zeitpunkt -10 min) und nach Glukosebelastung (120 min oGTT). Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der HMO-Konzentration und der Blutglukose. Es wäre interessant, im Rahmen eines OGTT Milch vor und nach der Einnahme von Glukose zu vergleichen und somit mögliche direkte Effekte eines Blutglukoseanstiegs auf die HMO-Biosynthese zu untersuchen.

Interessanterweise fanden wir erste Hinweise darauf, dass C-Peptid und Insulin mit HMO-Konzentrationen assoziiert sind. C-Peptid und Insulin nach Glukosebelastung (Zeitpunkt 120 min des oGTT) waren negativ mit HMO in der Muttermilch korreliert.

In dieser Studie, hatten 9 von 12 Frauen mit vorangegangenem GDM eine verschlechterte Glukosetoleranz und zeigten 2h nach der Glukosezufuhr Werte über 140mg/dl, was darauf hindeutet, dass Frauen mit GDM in der Vorgeschichte postpartal noch eine erhöhte Insulinresistenz haben können. Allerdings waren die Insulin- und C-Peptid Werte nicht signifikant unterschiedlich zwischen Frauen mit vorangegangenem GDM und normaler

Glukosetoleranz in der Schwangerschaft. was aber auch an der relativ geringen Studiengröße liegen kann. Die Assoziation von höheren 120 min Insulin und C-Peptid-Werten mit niedrigeren HMO deuten darauf hin, dass geringere Insulinresistenz und höhere C-peptid- /Insulin-Werte mit niedrigeren HMO-Konzentrationen in Muttermilch assoziiert sind. Um die eindeutige Korrelation jedoch zu bestätigen, müsste Milch im Rahmen eines oGTT gewonnen werden, um die entsprechenden HMO-Konzentrationen mit den jeweiligen C-Peptid-/Insulin-Werten zu korrelieren.

Stärken und Limitationen der Studie:

Diese Studie ist die erste, die HMO-Konzentrationen in Milch während eines Clamp-Versuchs untersucht. In Hinblick auf den beträchtlichen Aufwand, den der hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuch erfordert, ist die Größe der Studienpopulation von 18 Probandinnen beachtlich.

Aufgrund der hohen biologischen Varianz in HMO-Zusammensetzung und Konzentration in Milch, bedingt auch durch den Sekretorstatus, ist für Assoziationsstudien oder Vergleiche hinsichtlich GDM-Status eine höhere Teilnehmerinnenzahl notwendig. Für den Vergleich von HMO-Konzentrationen zwischen Müttern mit GDM und jenen ohne GDM standen uns in der GDM Gruppe lediglich 12 und in der gesunden Gruppe 6 Studienteilnehmerinnen zur Verfügung. Da GDM auch in verschiedenen Typen (Defizit in Insulinsekretion, Insulinresistenz oder beides) unterschieden werden kann und sich auch die Behandlung entsprechend unterschiedlich sein kann (Diät, Metformin oder Insulin) sind größere, gut charakterisierte Schwangerschafts- und Laktationsstudien notwendig.

Schlussfolgerung:

Auswirkungen von GDM auf HMO-Konzentrationen in der Muttermilch wurden zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend erforscht. Diese Arbeit liefert interessante Hinweise und Ansatzpunkte für zukünftige Studien. Weitere Studien sollten eine größere Anzahl an Studienteilnehmerinnen und einen längeren Beobachtungszeitraum der Laktation umfassen, und etwaige Auswirkungen von GDM-modifiziertem HMO-Profil auf Wachstum und Entwicklung der Kinder untersuchen.

Diese Studie ist die erste, in der HMO in der Muttermilch im Rahmen eines hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp-Versuchs beobachtet wurden. Es zeigte sich eine stufenweise Reduktion einzelner HMO bei den versuchsbedingt unphysiologisch hohen Insulinwerten. Auch wenn die Aussagekraft dieser artifiziellen Bedingungen limitiert ist, können die Ergebnisse für die Bildung neuer Hypothesen genutzt werden. Negative Korrelationen einzelner HMO mit C-Peptid- und Insulin-Werten untermauern diese Zusammenhänge zusätzlich.

Unsere Studie zeigte, dass (mittels Diät kontrollierter) GDM in der Schwangerschaft die HMO-Konzentration im Serum in Muttermilch verändern kann. Basierend auf unseren Resultaten aus dem Clamp-Versuch, wonach die gleichbleibenden Blutglukosespiegel und gesteigerter Insulininfusionsrate bestimmte HMO-Konzentrationen in Muttermilch sanken, stellt sich die Fragen, wie sich Insulin-Behandlung von GDM auf die HMO-Zusammensetzung auswirkt. Ob GDM Management mit Insulin die HMO-Konzentration in Muttermilch noch weiter reduziert, muss in größeren Studien untersucht werden.

Auch wenn unsere Studie zeigt, dass GDM in der vorangegangenen Schwangerschaft die HMO-Konzentration in der Muttermilch verändert, ist es dennoch von enormer Wichtigkeit, dass betroffene Mütter stillen. Die positiven Effekte der Muttermilch sowie der HMO für Mutter und Kind bleiben bestehen. Zudem wurden auch Hinweise auf eine verbesserte Glukosetoleranz und Insulinreaktion nach dreimonatiger Stillzeit aufgezeigt (169). Ob die GDM-vermittelten Veränderungen der HMO-Zusammensetzung in Muttermilch ungünstigere Auswirkungen für das gestillte Kind haben können, muss erst untersucht werden. Wäre dies der Fall, könnte möglicherweise mit Hilfe von Lebensstiländerungen, Diät, Supplementation etc. in der Stillzeit korrigierend eingegriffen werden, um ein ‚vorteilhafteres‘ HMO Profil in der Muttermilch zu erzielen.

Literaturverzeichnis

1. Baz B, Riveline JP, Gautier JF. ENDOCRINOLOGY OF PREGNANCY: Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects. *Eur J Endocrinol.* 2016 Feb;174(2):R43-51.
2. Johns EC, Denison FC, Norman JE, Reynolds RM. Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2018 Nov;29(11):743–54.
3. Petru E. Gestationsdiabetes. In: *Geburtshilfe.* 8th ed. Servicebetrieb ÖH-Uni Graz GmbH; 2017. p. 140–5.
4. ÖÄZ-Redaktion. Gestationsdiabetes: Steigende Zahlen, fehlende Daten [Internet]. *Ärztzeitung.* 2020 [cited 2024 Jan 11]. Available from: <https://aerztezeitung.at/2020/oaz-artikel/medizin/gestationsdiabetes-steigende-zahlen-fehlende-daten/>
5. S3-Leitlinie Gestationsdiabetes mellitus (GDM), Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. 2018;(2. Auflage).
6. Wang H, Li N, Chivese T, Werfalli M, Sun H, Yuen L, et al. IDF Diabetes Atlas: Estimation of Global and Regional Gestational Diabetes Mellitus Prevalence for 2021 by International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group’s Criteria. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022 Jan;183:109050.
7. Pu J, Zhao B, Wang EJ, Nimbal V, Osmundson S, Kunz L, et al. Racial/Ethnic Differences in Gestational Diabetes Prevalence and Contribution of Common Risk Factors. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2015 Sep;29(5):436–43.
8. Ben-Haroush A, Yogev Y, Hod M. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2004 Feb;21(2):103–13.
9. Giannakou K, Evangelou E, Yiallouros P, Christofi CA, Middleton N, Papatheodorou E, et al. Risk factors for gestational diabetes: An umbrella review of meta-analyses of observational studies. *PLoS One.* 2019 Apr;14(4):e0215372.
10. Clodi M, Resl M. Diabetes mellitus-Anleitung für die Praxis. In: *Wien Klin Wochenschr.* 135th ed. 2023. p. 115–28.
11. Hay WW. Energy and substrate requirements of the placenta and fetus. *Proc Nutr Soc.* 1991 Aug;50(2):321–36.
12. Battaglia FC. Principal substrates of fetal metabolism: fuel and growth requirements of the ovine fetus. *Ciba Found Symp.* 1978 Apr 30;(63):57–74.

13. Baumann MU, Deborde S, Illsley NP. Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine*. 2002 Oct;19(1):13–22.
14. Nolan CJ, Proietto J. The feto-placental glucose steal phenomenon is a major cause of maternal metabolic adaptation during late pregnancy in the rat. *Diabetologia*. 1994 Oct;37(10):976–84.
15. Lain KY, Catalano PM. Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*. 2007 Dec;50(4):938–48.
16. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 1991 Dec;165(6 Pt 1):1667–72.
17. Baeyens L, Hindi S, Sorenson RL, German MS. β -Cell Adaptation in Pregnancy. *Diabetes Obes Metab*. 2016 Sep;18(Suppl 1):63–70.
18. Marynissen G, Aerts L, Van Assche FA. The endocrine pancreas during pregnancy and lactation in the rat. *J Dev Physiol*. 1983 Dec;5(6):373–81.
19. Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S. Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology*. 1995 Dec;136(12):5461–8.
20. Homko C, Sivan E, Chen X, Reece EA, Boden G. Insulin secretion during and after pregnancy in patients with gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Feb;86(2):568–73.
21. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 2005 Mar 1;115(3):485–91.
22. Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*. 2011 Jul 9;378(9786):169–81.
23. Hivert MF, Backman H, Benhalima K, Catalano P, Desoye G, Immanuel J, et al. Pathophysiology from preconception, during pregnancy, and beyond. *Lancet*. 2024 Jul 13;404(10448):158–74.
24. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular Mechanisms for Insulin Resistance in Normal Pregnancy and Gestational Diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Jul 1;30(Supplement_2):S112–9.
25. Vrachnis N, Belitsos P, Sifakis S, Dafopoulos K, Siristatidis C, Pappa KI, et al. Role of Adipokines and Other Inflammatory Mediators in Gestational Diabetes Mellitus and Previous Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Endocrinology*. 2012;2012:1–12.
26. Gesundheitsportal [Internet]. [cited 2023 Oct 25]. Mutter-Kind-Pass-Untersuchungen in der Schwangerschaft. Available from:

<https://www.gesundheit.gv.at/leben/eltern/mutter-kind-pass/untersuchungen-schwangerschaft.html>

27. HAPO Study Cooperative Research Group, Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med*. 2008 May 8;358(19):1991–2002.
28. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care*. 2010 Mar 1;33(3):676–82.
29. Roberts JM, Redman CWG. Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *The Lancet*. 1993 Jun;341(8858):1447–51.
30. Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, McPhee AJ, Jeffries WS, Robinson JS. Effect of Treatment of Gestational Diabetes Mellitus on Pregnancy Outcomes. *N Engl J Med*. 2005 Jun 16;352(24):2477–86.
31. Anderberg E, Källén K, Berntorp K. The impact of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcome comparing different cut-off criteria for abnormal glucose tolerance. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2010 Dec;89(12):1532–7.
32. Jastrow N, Roberge S, Gauthier RJ, Laroche L, Duperron L, Brassard N, et al. Effect of Birth Weight on Adverse Obstetric Outcomes in Vaginal Birth After Cesarean Delivery. *Obstetrics & Gynecology*. 2010 Feb;115(2):338–43.
33. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. 2009 May;373(9677):1773–9.
34. Vounzoulaki E, Khunti K, Abner SC, Tan BK, Davies MJ, Gillies CL. Progression to type 2 diabetes in women with a known history of gestational diabetes: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2020 May 13;m1361.
35. Daly B, Toulis KA, Thomas N, Gokhale K, Martin J, Webber J, et al. Increased risk of ischemic heart disease, hypertension, and type 2 diabetes in women with previous gestational diabetes mellitus, a target group in general practice for preventive interventions: A population-based cohort study. Wareham NJ, editor. *PLoS Med*. 2018 Jan 16;15(1):e1002488.
36. Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Tong J, Wallace TM, Kodama K, et al. Gestational Diabetes Mellitus Increases the Risk of Cardiovascular Disease in Women With a Family History of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2006 Sep 1;29(9):2078–83.
37. Gunderson EP, Chiang V, Pletcher MJ, Jacobs DR, Quesenberry CP, Sidney S, et al. History of Gestational Diabetes Mellitus and Future Risk of Atherosclerosis in Mid-life: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *JAHA*. 2014 Mar 24;3(2):e000490.

38. Retnakaran R. Glucose Tolerance Status in Pregnancy: A Window to the Future Risk of Diabetes and Cardiovascular Disease in Young Women [Internet]. Vol. 5. 2009 [cited 2023 Oct 19]. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1573-3998&volume=5&issue=4&spage=239>
39. Fahed G, Aoun L, Bou Zerdan M, Allam S, Bou Zerdan M, Bouferraa Y, et al. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *IJMS*. 2022 Jan 12;23(2):786.
40. Kramer CK, Campbell S, Retnakaran R. Gestational diabetes and the risk of cardiovascular disease in women: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*. 2019 Jun;62(6):905–14.
41. Freinkel N. Banting Lecture 1980. Of pregnancy and progeny. *Diabetes*. 1980 Dec;29(12):1023–35.
42. Illsley NP. CURRENT TOPIC: Glucose Transporters in the Human Placenta. *Placenta*. 2000 Jan;21(1):14–22.
43. Kim W, Park SK, Kim YL. Fetal Abdominal Obesity Detected At 24 to 28 Weeks of Gestation Persists Until Delivery Despite Management of Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab J*. 2021 Jul;45(4):547–57.
44. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. *N Engl J Med*. 2008 May 8;358(19):1991–2002.
45. Reece EA, Leguizamón G, Wiznitzer A. Gestational diabetes: the need for a common ground. *The Lancet*. 2009 May;373(9677):1789–97.
46. Sweeting A, Wong J, Murphy HR, Ross GP. A Clinical Update on Gestational Diabetes Mellitus. *Endocrine Reviews*. 2022 Sep 26;43(5):763–93.
47. Scholtens DM, Kuang A, Lowe LP, Hamilton J, Lawrence JM, Lebenthal Y, et al. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Follow-up Study (HAPO FUS): Maternal Glycemia and Childhood Glucose Metabolism. *Diabetes Care*. 2019 Mar;42(3):381–92.
48. Lowe WL, Scholtens DM, Kuang A, Linder B, Lawrence JM, Lebenthal Y, et al. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Follow-up Study (HAPO FUS): Maternal Gestational Diabetes Mellitus and Childhood Glucose Metabolism. *Diabetes Care*. 2019 Mar;42(3):372–80.
49. Lowe WL, Lowe LP, Kuang A, Catalano PM, Nodzanski M, Talbot O, et al. Maternal glucose levels during pregnancy and childhood adiposity in the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Follow-up Study. *Diabetologia*. 2019 Apr;62(4):598–610.

50. Vasile FC, Preda A, Ștefan AG, Vladu MI, Forțofoiu MC, Clenciu D, et al. An Update of Medical Nutrition Therapy in Gestational Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res.* 2021 Nov 18;2021:5266919.
51. Zhang C, Solomon CG, Manson JE, Hu FB. A prospective study of pregravid physical activity and sedentary behaviors in relation to the risk for gestational diabetes mellitus. *Arch Intern Med.* 2006 Mar 13;166(5):543–8.
52. Santos IA, Stein R, Fuchs SC, Duncan BB, Ribeiro JP, Kroeff LR, et al. Aerobic exercise and submaximal functional capacity in overweight pregnant women: a randomized trial. *Obstet Gynecol.* 2005 Aug;106(2):243–9.
53. Bo S, Rosato R, Ciccone G, Canil S, Gambino R, Poala CB, et al. Simple lifestyle recommendations and the outcomes of gestational diabetes. A 2 × 2 factorial randomized trial. *Diabetes Obes Metab.* 2014 Oct;16(10):1032–5.
54. Landon MB, Spong CY, Thom E, Carpenter MW, Ramin SM, Casey B, et al. A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. *N Engl J Med.* 2009 Oct 1;361(14):1339–48.
55. Lende M, Rijhsinghani A. Gestational Diabetes: Overview with Emphasis on Medical Management. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Dec;17(24):9573.
56. Peterson CM, Jovanovic-Peterson L. Percentage of carbohydrate and glycemic response to breakfast, lunch, and dinner in women with gestational diabetes. *Diabetes.* 1991 Dec;40 Suppl 2:172–4.
57. Hernandez TL, Mande A, Barbour LA. Nutrition Therapy Within and Beyond Gestational Diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018 Nov;145:39–50.
58. American Diabetes Association. 14. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care.* 2020 Jan;43(Suppl 1):S183–92.
59. Blumer I, Hadar E, Hadden DR, Jovanović L, Mestman JH, Murad MH, et al. Diabetes and Pregnancy: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Nov 1;98(11):4227–49.
60. ACOG Practice Bulletin No. 190: Gestational Diabetes Mellitus. *Obstet Gynecol.* 2018 Feb;131(2):e49–64.
61. Amin M, Suksomboon N, Poolsup N, Malik O. Comparison of glyburide with metformin in treating gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Drug Investig.* 2015 Jun;35(6):343–51.
62. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 15. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care.* 2022 Jan 1;45(Suppl 1):S232–43.

63. Stuebe AM, Schwarz EB, Grewen K, Rich-Edwards JW, Michels KB, Foster EM, et al. Duration of lactation and incidence of maternal hypertension: a longitudinal cohort study. *Am J Epidemiol*. 2011 Nov 15;174(10):1147–58.
64. Ziegler AG, Wallner M, Kaiser I, Rossbauer M, Harsunen MH, Lachmann L, et al. Long-term protective effect of lactation on the development of type 2 diabetes in women with recent gestational diabetes mellitus. *Diabetes*. 2012 Dec;61(12):3167–71.
65. Chowdhury R, Sinha B, Sankar MJ, Taneja S, Bhandari N, Rollins N, et al. Breastfeeding and maternal health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr*. 2015 Dec;104(467):96–113.
66. Ortega-García JA, Kloosterman N, Alvarez L, Tobarra-Sánchez E, Cárceles-Álvarez A, Pastor-Valero R, et al. Full Breastfeeding and Obesity in Children: A Prospective Study from Birth to 6 Years. *Child Obes*. 2018 Jul;14(5):327–37.
67. Størdal K, Lundeby KM, Brantsæter AL, Haugen M, Nakstad B, Lund-Blix NA, et al. Breast-feeding and Infant Hospitalization for Infections: Large Cohort and Sibling Analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017 Aug;65(2):225–31.
68. Lodge CJ, Tan DJ, Lau MXZ, Dai X, Tham R, Lowe AJ, et al. Breastfeeding and asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr*. 2015 Dec;104(467):38–53.
69. van Meel ER, de Jong M, Elbert NJ, den Dekker HT, Reiss IK, de Jongste JC, et al. Duration and exclusiveness of breastfeeding and school-age lung function and asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2017 Jul;119(1):21-26.e2.
70. Ho NT, Li F, Lee-Sarwar KA, Tun HM, Brown BP, Pannaraj PS, et al. Meta-analysis of effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota across populations. *Nat Commun*. 2018 Oct 9;9(1):4169.
71. Girard LC, Doyle O, Tremblay RE. Breastfeeding, Cognitive and Noncognitive Development in Early Childhood: A Population Study. *Pediatrics*. 2017 Apr;139(4):e20161848.
72. Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, Hutchinson DS, Smith DP, Wong MC, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature*. 2018 Oct;562(7728):583–8.
73. Kim SY, Yi DY. Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clin Exp Pediatr*. 2020 Mar 23;63(8):301–9.
74. Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am*. 2013 Feb;60(1):49–74.
75. Saarela T, Kokkonen J, Koivisto M. Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation. *Acta Paediatr*. 2005 Sep;94(9):1176–81.

76. Kunz C, Rodriguez-Palmero M, Koletzko B, Jensen R. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. *Clin Perinatol*. 1999 Jun;26(2):307–33.
77. Thurl S, Munzert M, Boehm G, Matthews C, Stahl B. Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. *Nutr Rev*. 2017 Nov;75(11):920–33.
78. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev*. 2015 Nov;91(11):629–35.
79. Martin CR, Ling PR, Blackburn GL. Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients*. 2016 May 11;8(5):279.
80. Innis SM, King DJ. trans Fatty acids in human milk are inversely associated with concentrations of essential all-cis n-6 and n-3 fatty acids and determine trans, but not n-6 and n-3, fatty acids in plasma lipids of breast-fed infants. *Am J Clin Nutr*. 1999 Sep;70(3):383–90.
81. Jantscher-Krenn E, Bode L. Human milk oligosaccharides and their potential benefits for the breast-fed neonate. *Minerva Pediatr*. 2012 Feb;64(1):83–99.
82. Niñonuevo MR, Lebrilla CB. Mass spectrometric methods for analysis of oligosaccharides in human milk. *Nutrition Reviews*. 2009 Nov 1;67(suppl_2):S216–26.
83. Sadovnikova A, Garcia SC, Hovey RC. A Comparative Review of the Cell Biology, Biochemistry, and Genetics of Lactose Synthesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2021;26(2):181–96.
84. Bode L, Jantscher-Krenn E. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Adv Nutr*. 2012 May 1;3(3):383S-91S.
85. Bode L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 2012 Sep;22(9):1147–62.
86. Goehring KC, Kennedy AD, Prieto PA, Buck RH. Direct evidence for the presence of human milk oligosaccharides in the circulation of breastfed infants. *PLoS One*. 2014;9(7):e101692.
87. Ruhaak LR, Stroble C, Underwood MA, Lebrilla CB. Detection of milk oligosaccharides in plasma of infants. *Anal Bioanal Chem*. 2014 Sep;406(24):5775–84.
88. Dotz V, Rudloff S, Blank D, Lochnit G, Geyer R, Kunz C. ¹³C-labeled oligosaccharides in breastfed infants' urine: individual-, structure- and time-dependent differences in the excretion. *Glycobiology*. 2014 Feb;24(2):185–94.

89. Dotz V, Rudloff S, Meyer C, Lochnit G, Kunz C. Metabolic fate of neutral human milk oligosaccharides in exclusively breast-fed infants. *Mol Nutr Food Res*. 2015 Feb;59(2):355–64.
90. Jantscher-Krenn E, Treichler C, Brandl W, Schönbacher L, Köfeler H, van Poppel MN. The association of human milk oligosaccharides with glucose metabolism in overweight and obese pregnant women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2019 Dec 1;110(6):1335–43.
91. Rautava S. Early microbial contact, the breast milk microbiome and child health. *J Dev Orig Health Dis*. 2016 Feb;7(1):5–14.
92. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:26050.
93. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007 Jul;5(7):e177.
94. Okburan G, Kızıler S. Human milk oligosaccharides as prebiotics. *Pediatr Neonatol*. 2023 May;64(3):231–8.
95. Asakuma S, Hatakeyama E, Urashima T, Yoshida E, Katayama T, Yamamoto K, et al. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *J Biol Chem*. 2011 Oct 7;286(40):34583–92.
96. Arzamasov AA, Osterman AL. Milk glycan metabolism by intestinal bifidobacteria: insights from comparative genomics. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2022;57(5–6):562–84.
97. Cabrera-Rubio R, Kunz C, Rudloff S, García-Mantrana I, Crehuá-Gaudiza E, Martínez-Costa C, et al. Association of Maternal Secretor Status and Human Milk Oligosaccharides With Milk Microbiota: An Observational Pilot Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2019 Feb;68(2):256–63.
98. Dinleyici M, Barbieur J, Dinleyici EC, Vandenplas Y. Functional effects of human milk oligosaccharides (HMOs). *Gut Microbes*. 15(1):2186115.
99. Lewis ZT, Totten SM, Smilowitz JT, Popovic M, Parker E, Lemay DG, et al. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome*. 2015 Apr 10;3:13.
100. Thomson P, Medina DA, Garrido D. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. *Food Microbiol*. 2018 Oct;75:37–46.
101. Sakanaka M, Gotoh A, Yoshida K, Odamaki T, Koguchi H, Xiao JZ, et al. Varied Pathways of Infant Gut-Associated Bifidobacterium to Assimilate Human Milk Oligosaccharides: Prevalence of the Gene Set and Its Correlation with Bifidobacteria-Rich Microbiota Formation. *Nutrients*. 2019 Dec 26;12(1):71.

102. Laursen MF, Sakanaka M, von Burg N, Mörbe U, Andersen D, Moll JM, et al. Bifidobacterium species associated with breastfeeding produce aromatic lactic acids in the infant gut. *Nat Microbiol*. 2021 Nov;6(11):1367–82.
103. Henrick BM, Rodriguez L, Lakshmikanth T, Pou C, Henckel E, Arzoomand A, et al. Bifidobacteria-mediated immune system imprinting early in life. *Cell*. 2021 Jul 22;184(15):3884-3898.e11.
104. Frese SA, Hutton AA, Contreras LN, Shaw CA, Palumbo MC, Casaburi G, et al. Persistence of Supplemented Bifidobacterium longum subsp. infantis EVC001 in Breastfed Infants. *mSphere*. 2017;2(6):e00501-17.
105. Casaburi G, Duar RM, Vance DP, Mitchell R, Contreras L, Frese SA, et al. Early-life gut microbiome modulation reduces the abundance of antibiotic-resistant bacteria. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8:131.
106. Hirano R, Sakanaka M, Yoshimi K, Sugimoto N, Eguchi S, Yamauchi Y, et al. Next-generation prebiotic promotes selective growth of bifidobacteria, suppressing *Clostridioides difficile*. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1973835.
107. Gibson GR, Wang X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol*. 1994 Oct;77(4):412–20.
108. Lin C, Lin Y, Zhang H, Wang G, Zhao J, Zhang H, et al. Intestinal ‘Infant-Type’ Bifidobacteria Mediate Immune System Development in the First 1000 Days of Life. *Nutrients*. 2022 Apr 2;14(7):1498.
109. Masi AC, Stewart CJ. Untangling human milk oligosaccharides and infant gut microbiome. *iScience*. 2021 Dec 1;25(1):103542.
110. Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:699–722.
111. Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu Rev Nutr*. 2005;25:37–58.
112. Cheng YJ, Yeung CY. Recent advance in infant nutrition: Human milk oligosaccharides. *Pediatrics & Neonatology*. 2021 Jul 1;62(4):347–53.
113. Coppa GV, Gabrielli O, Giorgi P, Catassi C, Montanari MP, Varaldo PE, et al. Preliminary study of breastfeeding and bacterial adhesion to uroepithelial cells. *The Lancet*. 1990 Mar 10;335(8689):569–71.
114. Martín-Sosa S, Martín MJ, Hueso P. The Sialylated Fraction of Milk Oligosaccharides Is Partially Responsible for Binding to Enterotoxigenic and Uropathogenic *Escherichia coli* Human Strains. *The Journal of Nutrition*. 2002 Oct 1;132(10):3067–72.

115. Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, Meinzen-Derr J, Guerrero M de L, et al. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology*. 2004 Mar 1;14(3):253–63.
116. Weichert S, Jennewein S, Hübner E, Weiss C, Borkowski J, Putze J, et al. Bioengineered 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose inhibit the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and enteric pathogens to human intestinal and respiratory cell lines. *Nutrition Research*. 2013 Oct 1;33(10):831–8.
117. Facinelli B, Marini E, Magi G, Zampini L, Santoro L, Catassi C, et al. Breast milk oligosaccharides: effects of 2'-fucosyllactose and 6'-sialyllactose on the adhesion of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* to Caco-2 cells. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2019 Sep;32(17):2950–2.
118. Hu L, Crawford SE, Czako R, Cortes-Penfield NW, Smith DF, Le Pendu J, et al. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. *Nature*. 2012 May;485(7397):256–9.
119. Jantscher-Krenn E, Lauwaet T, Bliss LA, Reed SL, Gillin FD, Bode L. Human milk oligosaccharides reduce *Entamoeba histolytica* attachment and cytotoxicity in vitro. *British Journal of Nutrition*. 2012 Nov;108(10):1839–46.
120. Downham MA, Scott R, Sims DG, Webb JK, Gardner PS. Breast-feeding protects against respiratory syncytial virus infections. *Br Med J*. 1976 Jul 31;2(6030):274–6.
121. Abrahams SW, Labbok MH. Breastfeeding and otitis media: a review of recent evidence. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011 Dec;11(6):508–12.
122. Rudloff S, Pohlentz G, Diekmann L, Egge H, Kunz C. Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula. *Acta Paediatr*. 1996 May;85(5):598–603.
123. Rudloff S, Pohlentz G, Borsch C, Lentze MJ, Kunz C. Urinary excretion of in vivo ¹³C-labelled milk oligosaccharides in breastfed infants. *Br J Nutr*. 2012 Apr;107(7):957–63.
124. Gnoth MJ, Rudloff S, Kunz C, Kinne RK. Investigations of the in vitro transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J Biol Chem*. 2001 Sep 14;276(37):34363–70.
125. Eiwegger T, Stahl B, Schmitt J, Boehm G, Gerstmayr M, Pichler J, et al. Human milk--derived oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides stimulate cytokine production of cord blood T-cells in vitro. *Pediatr Res*. 2004 Oct;56(4):536–40.
126. Eiwegger T, Stahl B, Haidl P, Schmitt J, Boehm G, Dehlink E, et al. Prebiotic oligosaccharides: In vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2010;21(8):1179–88.

127. Kuntz S, Rudloff S, Kunz C. Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells. *Br J Nutr.* 2008 Mar;99(3):462–71.
128. Kuntz S, Kunz C, Rudloff S. Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells. *Br J Nutr.* 2009 May;101(9):1306–15.
129. Holscher HD, Davis SR, Tappenden KA. Human milk oligosaccharides influence maturation of human intestinal Caco-2Bbe and HT-29 cell lines. *J Nutr.* 2014 May;144(5):586–91.
130. Lane JA, O’Callaghan J, Carrington SD, Hickey RM. Transcriptional response of HT-29 intestinal epithelial cells to human and bovine milk oligosaccharides. *Br J Nutr.* 2013 Dec;110(12):2127–37.
131. Meister AL, Doheny KK, Travagli RA. Necrotizing enterocolitis: It’s not all in the gut. *Exp Biol Med (Maywood).* 2020 Jan;245(2):85–95.
132. Fitzgibbons SC, Ching Y, Yu D, Carpenter J, Kenny M, Weldon C, et al. Mortality of necrotizing enterocolitis expressed by birth weight categories. *J Pediatr Surg.* 2009 Jun;44(6):1072–5; discussion 1075-1076.
133. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet.* 1990 Dec 22;336(8730):1519–23.
134. Schanler RJ, Lau C, Hurst NM, Smith EO. Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers’ own milk in the feeding of extremely premature infants. *Pediatrics.* 2005 Aug;116(2):400–6.
135. Sisk PM, Lovelady CA, Dillard RG, Gruber KJ, O’Shea TM. Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Perinatol.* 2007 Jul;27(7):428–33.
136. Masi AC, Embleton ND, Lamb CA, Young G, Granger CL, Najera J, et al. Human milk oligosaccharide DSLNT and gut microbiome in preterm infants predicts necrotising enterocolitis. *Gut.* 2021 Dec;70(12):2273–82.
137. Jantscher-Krenn E, Zhrebtsov M, Nissan C, Goth K, Guner YS, Naidu N, et al. The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats. *Gut.* 2012 Oct;61(10):1417–25.
138. Autran CA, Kellman BP, Kim JH, Asztalos E, Blood AB, Spence ECH, et al. Human milk oligosaccharide composition predicts risk of necrotising enterocolitis in preterm infants. *Gut.* 2018 Jun;67(6):1064–70.
139. Wang B. Sialic Acid Is an Essential Nutrient for Brain Development and Cognition. *Annual Review of Nutrition.* 2009 Aug 21;29(Volume 29, 2009):177–222.

140. Biokatalytische Polysialinsäure-Produktion zur Aufrechterhaltung kognitiver Funktionen - BMBF GO-Bio [Internet]. [cited 2024 Jul 10]. Available from: https://www.go-bio.de/gobio/de/gefoerderte-projekte/_documents/cognisia.html
141. Wang B, Brand-Miller J, McVeagh P, Petocz P. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *Am J Clin Nutr*. 2001 Oct;74(4):510–5.
142. Liu F, Simpson AB, D’Costa E, Bunn FS, van Leeuwen SS. Sialic acid, the secret gift for the brain. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023 Nov 17;63(29):9875–94.
143. Martín R, Heilig HGJ, Zoetendal EG, Jiménez E, Fernández L, Smidt H, et al. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res Microbiol*. 2007;158(1):31–7.
144. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UME, Beck DL, Abdo Z, et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One*. 2011;6(6):e21313.
145. Soyylmaz B, Mikš MH, Röhrig CH, Matwiejuk M, Meszaros-Matwiejuk A, Vignæs LK. The Mean of Milk: A Review of Human Milk Oligosaccharide Concentrations throughout Lactation. *Nutrients*. 2021 Aug 9;13(8):2737.
146. Kumazaki T, Yoshida A. Biochemical evidence that secretor gene, Se, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Jul;81(13):4193–7.
147. Johnson PH, Watkins WM. Purification of the Lewis blood-group gene associated alpha-3/4-fucosyltransferase from human milk: an enzyme transferring fucose primarily to type 1 and lactose-based oligosaccharide chains. *Glycoconj J*. 1992 Oct;9(5):241–9.
148. Thurl S, Henker J, Siegel M, Tovar K, Sawatzki G. Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. *Glycoconj J*. 1997 Nov;14(7):795–9.
149. Thum C, Wall CR, Weiss GA, Wang W, Szeto IMY, Day L. Changes in HMO Concentrations throughout Lactation: Influencing Factors, Health Effects and Opportunities. *Nutrients*. 2021 Jun 30;13(7):2272.
150. Dou Y, Luo Y, Xing Y, Liu H, Chen B, Zhu L, et al. Human Milk Oligosaccharides Variation in Gestational Diabetes Mellitus Mothers. *Nutrients*. 2023 Mar 16;15(6):1441.
151. Bhargava P, Li C, Stanya KJ, Jacobi D, Dai L, Liu S, et al. Immunomodulatory glycan LNFPIII alleviates hepatosteatosis and insulin resistance through direct and indirect control of metabolic pathways. *Nat Med*. 2012 Nov;18(11):1665–72.

152. Li X, Ning X, Rui B, Wang Y, Lei Z, Yu D, et al. Alterations of milk oligosaccharides in mothers with gestational diabetes mellitus impede colonization of beneficial bacteria and development of ROR γ t⁺ Treg cell-mediated immune tolerance in neonates. *Gut Microbes*. 2023 Dec;15(2):2256749.
153. Saben JL, Abraham A, Bode L, Sims CR, Andres A. Third-Trimester Glucose Homeostasis in Healthy Women Is Differentially Associated with Human Milk Oligosaccharide Composition at 2 Months Postpartum by Secretor Phenotype. *Nutrients*. 2020 Jul 24;12(8):2209.
154. McGuire MK, Meehan CL, McGuire MA, Williams JE, Foster J, Sellen DW, et al. What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. *Am J Clin Nutr*. 2017 May;105(5):1086–100.
155. LeMay-Nedjelski L, Yonemitsu C, Asbury MR, Butcher J, Ley SH, Hanley AJ, et al. Oligosaccharides and Microbiota in Human Milk Are Interrelated at 3 Months Postpartum in a Cohort of Women with a High Prevalence of Gestational Impaired Glucose Tolerance. *J Nutr*. 2021 Sep 11;151(11):3431–41.
156. Seferovic MD, Mohammad M, Pace RM, Engevik M, Versalovic J, Bode L, et al. Maternal diet alters human milk oligosaccharide composition with implications for the milk metagenome. *Sci Rep*. 2020 Dec 16;10:22092.
157. Biddulph C, Holmes M, Tran TD, Kuballa A, Davies PSW, Koorts P, et al. Associations between Maternal Nutrition and the Concentrations of Human Milk Oligosaccharides in a Cohort of Healthy Australian Lactating Women. *Nutrients*. 2023 Apr 26;15(9):2093.
158. Jantscher-Krenn E, Aigner J, Reiter B, Köfeler H, Csapo B, Desoye G, et al. Evidence of human milk oligosaccharides in maternal circulation already during pregnancy: a pilot study. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2019 Mar;316(3):E347–57.
159. Zopf DA, Ginsburg V, Hallgren P, Jonsson AC, Lindberg BS, Lundblad A. Determination of Leb-Active Oligosaccharides in Urine of Pregnant and Lactating Women by Radioimmunoassay. *European Journal of Biochemistry*. 1979;93(3):431–5.
160. Hirschmugl B, Brandl W, Csapo B, van Poppel M, Köfeler H, Desoye G, et al. Evidence of Human Milk Oligosaccharides in Cord Blood and Maternal-to-Fetal Transport across the Placenta. *Nutrients*. 2019 Nov 4;11(11):2640.
161. Jantscher-Krenn E, von Schirnding L, Trötz Müller M, Köfeler H, Kurtovic U, Fluhr H, et al. Human Milk Oligosaccharides Are Present in Amniotic Fluid and Show Specific Patterns Dependent on Gestational Age. *Nutrients*. 2022 May 14;14(10):2065.
162. Weiser-Fuchs MT, Maggauer E, van Poppel MNM, Csapo B, Desoye G, Köfeler HC, et al. Human Milk Oligosaccharides in Maternal Serum Respond to Oral Glucose

- Load and Are Associated with Insulin Sensitivity. *Nutrients*. 2023 Sep 18;15(18):4042.
163. Hoch D, Brandl W, Strutz J, Köfeler HC, van Poppel MNM, Bode L, et al. Human Milk Oligosaccharides in Cord Blood Are Altered in Gestational Diabetes and Stimulate Feto-Placental Angiogenesis In Vitro. *Nutrients*. 2021 Nov 26;13(12):4257.
 164. Desoye G, Wells JCK. Pregnancies in Diabetes and Obesity: The Capacity-Load Model of Placental Adaptation. *Diabetes*. 2021 Apr;70(4):823–30.
 165. Schönbacher L, Treichler C, Brandl W, Köfeler HC, Fluhr H, Jantscher-Krenn E, et al. Prenatal Human Milk Oligosaccharides (HMOs) in the Context of BMI, Gestational Weight Gain, and Lipid Profile-An Association Study in Pregnant Women with Overweight or Obesity. *Mol Nutr Food Res*. 2024 Jan;68(2):e2300533.
 166. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care*. 2021 Jan;44(Suppl 1):S15–33.
 167. Kim JK. Hyperinsulinemic-euglycemic clamp to assess insulin sensitivity in vivo. *Methods Mol Biol*. 2009;560:221–38.
 168. Gunderson EP, Hedderon MM, Chiang V, Crites Y, Walton D, Azevedo RA, et al. Lactation Intensity and Postpartum Maternal Glucose Tolerance and Insulin Resistance in Women With Recent GDM. *Diabetes Care*. 2012 Jan;35(1):50–6.
 169. McManus RM, Cunningham I, Watson A, Harker L, Finegood DT. Beta-cell function and visceral fat in lactating women with a history of gestational diabetes. *Metabolism*. 2001 Jun;50(6):715–9.
 170. Wang X, Liu J, Li C, Xu Y, Wang X, Lu Y, et al. Pregnancy-Related Diseases and Delivery Mode can Affect the Content of Human Milk Oligosaccharides: A Preliminary Study. *J Agric Food Chem*. 2022 Apr 27;70(16):5207–17.
 171. Smilowitz JT, Totten SM, Huang J, Grapov D, Durham HA, Lammi-Keefe CJ, et al. Human Milk Secretory Immunoglobulin A and Lactoferrin N-Glycans Are Altered in Women with Gestational Diabetes Mellitus¹²³. *J Nutr*. 2013 Dec;143(12):1906–12.
 172. Cohick WS. PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Effects of insulin on mammary gland differentiation during pregnancy and lactation. *J Anim Sci*. 2016 May;94(5):1812–20.
 173. Peng Y, Zhuang K, Huang Y. Incidence and factors influencing delayed onset of lactation: a systematic review and meta-analysis. *Int Breastfeed J*. 2024 Aug 22;19(1):59.
 174. Jin X, Lai CT, Perrella SL, McEachran JL, Gridneva Z, Geddes DT. Maternal Breast Growth and Body Mass Index Are Associated with Low Milk Production in Women. *Nutrients*. 2024 Aug 26;16(17):2854.

175. Haney PM. Glucose transport in lactation. *Adv Exp Med Biol.* 2004;554:253–61.
176. Menzel P, Vogel M, Austin S, Sprenger N, Grafe N, Hilbert C, et al. Concentrations of oligosaccharides in human milk and child growth. *BMC Pediatr.* 2021 Oct 30;21:481.
177. Azad MB, Robertson B, Atakora F, Becker AB, Subbarao P, Moraes TJ, et al. Human Milk Oligosaccharide Concentrations Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal Characteristics, Environmental Factors, and Feeding Practices. *J Nutr.* 2018 Nov 1;148(11):1733–42.