

Diplomarbeit

Adrenomedullin in Gestationsdiabetes

eingereicht von

Jochen Wilhelm Flosdorff

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut / Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat Christian Wadsack

Zweitbetreuerin

Mag.^a rer.nat. Carolin Besenböck

Graz, 07.06.2016

Eidesstattliche Erklärung

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

Graz, am 07.06.2016

Jochen Wilhelm Flosdorff eh.

Danksagungen

Mein Dank gilt meinem Betreuer Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat Christian Wadsack, meiner Betreuerin Carolin Besenböck, meiner Laborchefin Susanne Kopp und dem ganzen Laborteam, für Aufnahme Anleitung, Betreuung und Unterstützung bei dieser Diplomarbeit.

Für die Unterstützung während des Studiums und das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich des Weiteren bei meiner Familie bedanken.

Zusammenfassung

Hintergrund:

Adrenomedullin, ein 52 Aminosäuren langes Peptidamid, zählt zu den potentesten bisher bekannten Vasodilatoren. Als neuer Biomarker in der Literatur beschrieben, wurde die Substanz bereits bei verschiedenen Krankheitsbildern, wie Sepsis, Schock, Herzinsuffizienz und in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen untersucht. Bei Gestationsdiabetes, auch eine temporäre inflammatorische Krankheit in der Schwangerschaft, wurden systemische Konzentrationen von Adrenomedullin in Neugeborenen noch nicht ausreichend untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen Adrenomedullin und dem Schwangerschaftsdiabetes in einer retrospektiven Beobachtungsstudie zu untersuchen.

Methoden:

Um zu vergleichen, ob sich bei diabetischen Schwangeren (n=37) und nicht diabetischen Kontrollen (n=28) Unterschiede in der Adrenomedullin-Konzentration und Produktion im fetalen Kreislauf finden lassen, wurde aus dem gemischten Nabelschnurblutplasma von Neugeborenen, die Vorstufe von Adrenomedullin Mid-Regional-Proadrenomedullin gemessen und zusätzlich mit klinischen Parametern korreliert. Des Weiteren wurden verschiedene Gewebetypen der Plazenta mittels Westernblot und RealTime-PCR auf die Protein- und mRNA-Expression von Adrenomedullin untersucht.

Ergebnisse:

Im Plasma der Gestationsdiabetesgruppe wurde eine Mid-Regional-Proadrenomedullin Konzentration von 1,25 nmol/l im Vergleich zu den nicht diabetischen Kontrollen 1,06 nmol/l ($p=0,003$) gemessen. Adrenomedullin Expression wurde nur in Hofbauerzellen, in First-Trimester-Plazentagewebe, in nicht diabetischem Term-Plazentagewebe und in diabetischem Term-Plazentagewebe nachgewiesen. Das diabetische Term-Plazentagewebe zeigte die höchste Expression von Adrenomedullin-Protein, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant, bedingt durch hohe biologische Variabilität der eingesetzten Gewebeproben.

Alle bei der RT-PCR verwendeten Proben exprimierten Adrenomedullin-mRNA, wobei die Term-Trophoblasten gegenläufig zu den Ergebnissen beim Westernblot, jedoch übereinstimmend mit den MR-ProADM-Messungen, die höchste mRNA-Expression zeigten und damit eine hohe Ableseaktivität.

Diskussion:

In dieser Pilotstudie konnten signifikante Unterschiede bei den MidRegional-ProAdrenomedullin-Konzentrationen im Nabelschnurblut von diabetischen zu nicht diabetischen Schwangerschaften gezeigt werden. Möglicherweise handelt es sich bei Midregional-ProAdrenomedullin damit um einen zukünftigen Marker, der bei Gestationsdiabetes verwendet werden kann. Um diese Daten abzusichern sind weitere Untersuchungen mit definierten und charakterisierten Gruppen und größerer Anzahl an Plasmaproben notwendig.

Abstract

Background:

Adrenomedullin is a peptide with the length of 52 amino acids. It counts as one of the most potent vessel relaxing peptides. In literature described as a new biological marker this substance has already been researched in different kinds of diseases like sepsis, shock, heart failure and in connection with tumors. Data about gestational diabetes, a temporary inflammatory disease during pregnancy, and systemic concentrations of adrenomedullin are not sufficient yet. The objective of this work is to display a possible connection between adrenomedullin and gestational diabetes in form of a retrospective study.

Methods

To evaluate the difference between diabetic pregnancies (n=37) and non diabetic controls (n=28) with regard to adrenomedullin-concentrations and production, blood from the cord vessels of newborns was taken, to measure the precursor protein MR-proadrenomedullin and additionally to correlate it with other clinical parameters. Furthermore different types and cells from different tissues within the placenta were examined by use of Westernblot and RealTime-PCR to demonstrate the expression of adrenomedullin itself and his mRNA.

Results

Within the plasma of the group with gestational diabetes the mid-regional-proadrenomedullin concentration was 1,25nmol/l. In comparison the non diabetical controls measured 1,06nmol/l (p=0,003). The Westernblots showed that adrenomedullin was expressed in Hofbauer-cells, first-trimester placenta tissue, non diabetic term placenta tissue and diabetic term placenta tissue. The diabetic term placenta tissue displayed the highest expression of adrenomedullin, but due to the high biological variability of the used samples this difference was not significant though.

All examples used in the RT-PCR expressed Adrenomedullin-mRNA. With regard to the Westernblots-results though and in accordance with midregional-proadrenomedullin measurements, the term-trophoblasts showed the highest amount of mRNA and therefore a high activity.

Discussion

In this pilot study significant differences between the concentrations of midregional-proadrenomedullin within the cord vessels of diabetic and non diabetic pregnancies are displayed. It is possible that midregional-proadrenomedullin will be a future Marker, which could be used for the gestational diabetes. To confirm these results further studies with defined and characteristic groups and a higher amount of plasma samples are necessary.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract	vi
Inhaltsverzeichnis	viii
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xi
Abkürzungen	xii
1 Grundlegende Begriffe	1
1.1 Adrenomedullin	1
1.1.1 Einleitung Adrenomedullin (ADM)	1
1.1.2 Struktur, Produktion und Zirkulation	1
1.1.3 Physiologische Funktionen	3
1.1.4 Einfluss von ADM in den Organen und Wirkung auf Zellen	3
1.1.5 ADM bei verschiedenen Krankheitsbildern	6
1.2 Gestationsdiabetes (GDM)	8
1.2.1. Epidemiologie.....	8
1.2.2. Komplikationen.....	9
1.2.3 Diagnostik	12
1.2.4 Therapie	12
1.3 Plazenta	14
1.3.1 Einleitung Plazenta	14
1.3.2 Entwicklung	14
1.3.3 Makromorphologie	15
1.3.4 Histologischer Aufbau	16
1.3.5 Funktionen der Plazenta	17
2 Hypothese und Fragestellungen	22
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Literatursuche	23
3.2 Herstellung der Plasmaproben	23
3.3 Messung von MR-ProADM	24
3.4 Westernblot.....	27
3.5 Quantitative real-time PCR	31

4 Ergebnisse – Resultate	34
4.1 Mid-regional-ProAdrenomedullin (MR-ProADM)	34
4.2 Ergebnisse Westernblot.....	37
4.3 Ergebnisse PCR	42
5 Diskussion	44
5.1 Diskussion MR-ProADM	44
5.2 Diskussion Westernblot	47
5.3 Diskussion RT-PCR Ergebnisse.....	48
6 Literaturverzeichnis	51

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur ADM.....	1
Abbildung 2: Synthese von ADM.....	2
Abbildung 3: Physiologische Eigenschaften von ADM.....	5
Abbildung 4: Humane Plazenta - mütterliche Seite (42)	15
Abbildung 5: Humane Plazenta - fetale Seite (43)	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung der humanen Plazenta (44)	16
Abbildung 5: Schematische Darstellung von MR-ProADM innerhalb von Pre-ProADM ...	26
Abbildung 6: Beziehung MR-ProADM zum Ponderal Index kg/m ³	37
Abbildung 7: Westernblot ADM und β -Actin	37
Abbildung 8: Westernblot ADM/ β -Actin	39
Abbildung 9: Mittelwerte aller Westernblots ADM/ β -Actin	39
Abbildung 10: Westernblot	40
Abbildung 11: Westernblot ADM/ β -Actin auf Clontech-Plazenta normiert	40
Abbildung 12: Verteilung der Ergebnisse ADM/ β -Actin bei GDM vs control	41
Abbildung 13: mRNA-Expression ADM/PPIA.....	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Funktionen von ADM und assoziierte Erkrankungen (1,2,23,24)	7
Tabelle 2: Risikofaktoren für Gestationsdiabetes (2,26,29)	9
Tabelle 3: Komplikationen bei Gestationsdiabetes für Mutter und Kind (26,29)	10
Tabelle 4: Grenzwerte des oralen Glukosetoleranztests (29)	12
Tabelle 5: Zusammensetzung des Plazentagewebes (34)	18
Tabelle 6: Zusammenfassung der autokrinen und parakrinen Faktoren der Plazenta (50,51)	21
Tabelle 7: Interferenzen von MR-ProADM	25
Tabelle 8: Reproduzierbarkeit Intra-Assay-VK	25
Tabelle 9: Reproduzierbarkeit Inter-Assay-VK	26
Tabelle 10: Proteingehalt der Westernblot-Proben	28
Tabelle 11: Proben der Westernblots, biologische Fallzahlen	29
Tabelle 12: Proben für die RT-PCR	31
Tabelle 13: RNA-Gehalt der RT-PCR-Proben	32
Tabelle 14: Klinische Parameter von Mutter und Kind	35
Tabelle 15: MR-ProADM-Konzentration im Nabelschnurblut bei Kontrollen und GDM.....	35
Tabelle 16: MR-ProADM-Konzentrationen im Nabelschnurblut bei Sectiones und Spontangeburt	36

Abkürzungen

ADM = Adrenomedullin
AEZ = arterielle Endothelzellen
AMBP-1 = Adrenomedullin binding Protein-1
C = gesundes Term-Plazentagewebe
CGRP = Calcitonin-Gen-Related-Peptide
Control = gesundes Term-Plazentagewebe
CT = Clontech-Plazentagewebe
dAEZ = diabetische arterielle Endothelzellen
dTPG = diabetisches Term-Plazentagewebe
dVEZ = diabetische venöse Endothelzellen
eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FPG = First-Trimeser Plazentagewebe
G = diabetisches Term-Plazentagewebe
GDM = Gestationsdiabetes mellitus
HWZ = Halbwertszeit
mRNA = messenger ribonucleic acid
MR-ProADM = MidRegional-ProAdrenomedullin
NEP = neutrale Endopeptidase
NO = Stickstoffmonoxid
FTT = First-Trimester Trophoblasten
HBZ = Hofbauer-Zellen
oGTT = oraler Glukose-Toleranz-Test
PAMP = Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptid
PPIA = Peptidylprolyl Isomerase A
TPG = Term-Plazentagewebe
RT-PCR = RealTime-Polymerase Chain Reaction
TT = Term-Trophoblasten
VEZ = venöse Endothelzellen

1 Grundlegende Begriffe

1.1 Adrenomedullin

1.1.1 Einleitung Adrenomedullin (ADM)

ADM ist ein Peptid, dessen physiologische Eigenschaften und therapeutische Möglichkeiten seit einigen Jahren Gegenstand der Forschung sind. Entdeckt wurde ADM 1993 von Kitamura et al. in einem Phäochromozytom. Das gelang durch die Messung des Anstieges von cAMP in Thrombozyten (1,2). Ursprünglich wurde angenommen, dass dieses Peptid nur in Tumorzellen synthetisiert wird, inzwischen weiß man allerdings, dass es ubiquitär im Körper vorkommt und von den meisten Geweben produziert werden kann (1). Bei Adrenomedullin handelt es sich einerseits um ein zirkulierendes Hormon, andererseits auch um einen lokalen parakrinen Mediator mit zahlreichen biologischen Aktivitäten (3,4).

1.1.2 Struktur, Produktion und Zirkulation

ADM besteht aus 52 Aminosäuren und strukturell ist es mit den Peptiden CGRP (Calcitonin-Gen-Related-Peptide), Calcitonin und Amylin verwandt. Wichtige Strukturen im Molekül sind ein Ring aus sechs Aminosäuren, die durch Disulfid-Brücken verbunden sind und ein amidiertes C-terminales Tyrosin. Diese beiden Strukturen sind essentiell für die biologische Aktivität von ADM.

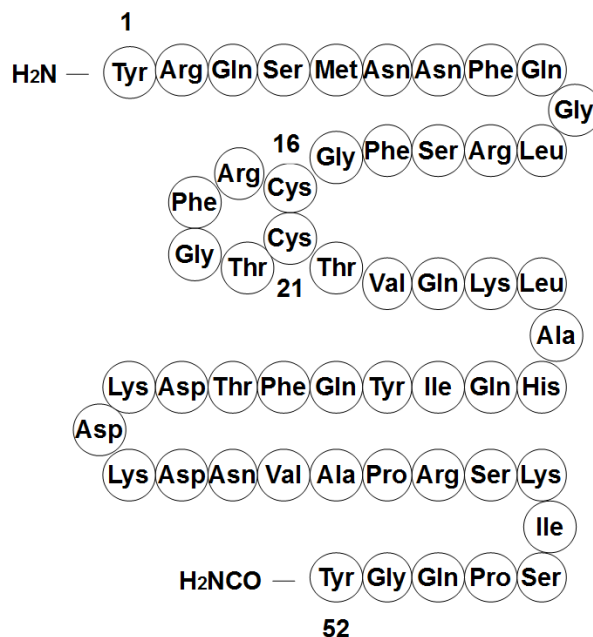


Abbildung 1: Struktur ADM

Codiert wird das Peptid auf Chromosom 11. Das dort liegende Gen besteht aus vier Exons und drei Introns. Die erste Vorstufe von ADM ist als PreproADM bekannt und besteht aus 185 Aminosäuren. Dieses wird zu ProADM konvertiert, welches den Vorgänger von ADM und auch von PAMP (proadrenomedullin N-terminal 20 peptid) darstellt, ein Peptid mit vasodilatatorischen Eigenschaften (1,2,5).

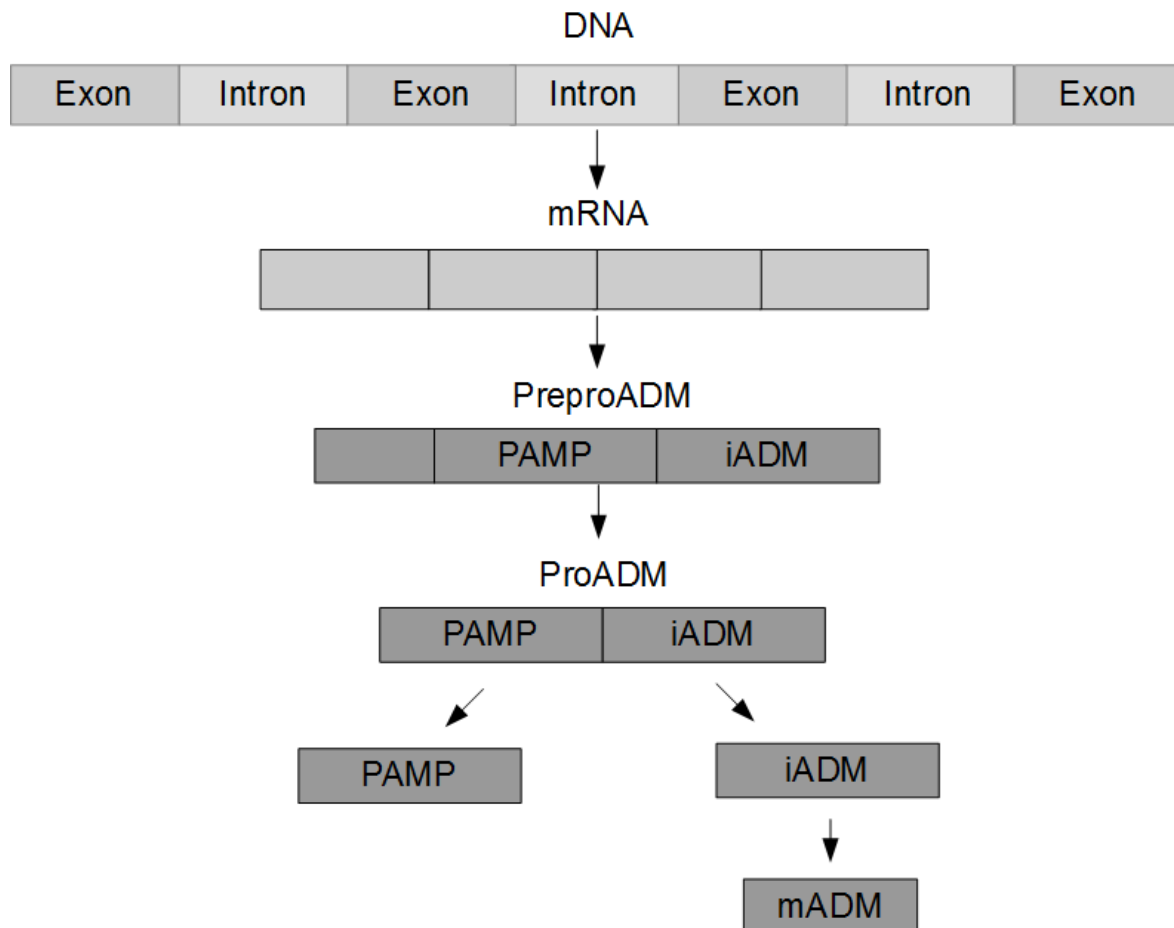


Abbildung 2: Synthese von ADM

ADM wird ubiquitär im Körper synthetisiert. Im Gegensatz zu anderen Peptiden wird ADM allerdings nicht in Sekret-Granula gespeichert, sondern direkt nach Synthese entlassen. Die Konzentration bei einem normalen gesunden Menschen im Blutplasma beträgt 2-10pM/l. Der Hauptteil von ADM wird von den Endothelzellen der Blutgefäße produziert. ADM wird zunächst als immature ADM (iADM) sezerniert und anschließend zu mature ADM (mADM) durch enzymatische Amidation konvertiert (6). Das iADM übernimmt im Plasma einen Anteil von circa 85% (1). Im Plasma ist ADM an das Adrenomedullin-Binding Protein-1 (AMBP-1) gebunden, welches später als Komplementfaktor H identifiziert werden konnte (1,2,7). Die Bindung an den Komplementfaktor H hat den Vorteil, dass rezeptorvermittelte Effekte gesteigert werden, während für die Forschung das Problem besteht, dass ADM von den meisten Assays nicht detektiert werden kann

(1), aufgrund der kurzen HWZ von ADM von ungefähr 20 Minuten. Die Clearance von ADM erfolgt grundsätzlich in der Niere. Nachdem allerdings die Konzentration von ADM in der Lungenarterie höher ist als in der Aorta, vermutet man, dass die Lunge einen Teil der Clearance zusätzlich übernimmt. ADM wird in der Niere in den Glomeruli gefiltert und dort durch die neutrale Endopeptidase (NEP) im proximalen Tubulus metabolisiert. Die Konzentration von ADM im Urin ist 15 Mal höher als im Plasma, jedoch dürfte das eher durch die vermehrte intrarenale Produktion als durch Filterung des systemischen ADM zu Stande kommen. ADM bindet an G-protein gekoppelte Rezeptoren, spezifisch für ADM konnten die beiden Rezeptoren ADM-1 und ADM-2 identifiziert werden. Jedoch besitzt ADM auch Affinität zum CGRP-1 Rezeptor und entfaltet dort biologische Aktivität. Ebenso bindet ADM auch an Calcitonin- und Amylin-Rezeptoren, dort jedoch ohne Wirkung (1,2). Die ADM-Produktion wird unter anderem durch oxidativen Stress und proinflammatorische Proteine gesteigert (2,8,9), zum Beispiel durch TNF-alpha, Interleukin 1 (IL-1), Angiotensin-II und Endothelin-1 (1,8,9).

1.1.3 Physiologische Funktionen

ADM führt durch periphere Vasodilatation zu einer Senkung des peripheren Widerstandes und ist dadurch in der Lage den Blutdruck zu senken. Es wird diskutiert, dass ADM die CGRP-1-Rezeptoren aktiviert und es anschließend zu einem Anstieg von cAMP in vaskulären glatten Muskelzellen kommt. Folge ist die Relaxation der Gefäße. Ein weiterer möglicher Mechanismus wäre, dass ADM die Kalium-Kanäle in glatten Muskelzellen aktiviert, die für eine Zell-Hyperpolarisation sorgen. Ebenso scheint ADM die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), ein Enzym, das die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) und damit eine Vasodilatation katalysiert, über mindestens zwei Wege zu aktivieren. Auf der einen Seite über die Steigerung des intrazellulären Kalziums, auf der anderen Seite über die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase und Protein-Kinase B, welche eNOS unabhängig von Kalzium phosphorylieren und aktivieren. Ebenso scheint ADM die Produktion des Vasokonstriktors Endothelin-1 zu hemmen (1,10).

1.1.4 Einfluss von ADM in den Organen und Wirkung auf Zellen

Aufgrund seines vasodilatatorischen Effektes wird ADM in den vaskularisierten Organen seine Aktivität entfalten. In den Nieren führt ADM zu einer renalen Vasodilatation, mit Steigerung des renalen Blutflusses und der glomerulären Filtrationsrate. ADM und seine Rezeptoren lassen sich auch in verschiedenen Bereichen des Gehirns finden. Am meisten finden sich ADM-Rezeptoren im Thalamus, Hypothalamus, Adeno- und Neurohypophyse. Die höchste Konzentration von ADM findet sich jedoch im Nebennierenmark. In geringerer Menge, aber dennoch deutlich vorhanden, wird ADM und

seine Rezeptoren im Nebennierencortex, besonders in der Zona glomerulosa exprimiert. Obwohl ADM im Nebennierenmark in hoher Konzentration vorkommt konnte ein Einfluss auf die Katecholamin-Produktion bisher nicht nachgewiesen werden. ADM inhibiert die Aldosteronproduktion und stimuliert den Sympathicus und das Renin-Angiotensin-System (11). Das Pankreas produziert ADM in den F-Zellen. Inzwischen ist man der Überzeugung, dass ADM die Insulinproduktion hemmt. In Bezug auf den Knochen wurde nachgewiesen, dass ADM die Osteoblasten stimuliert (1,2,12). Ob diese Eigenschaft neue Möglichkeiten der Therapie von Knochenerkrankungen ermöglicht, ist derzeit Gegenstand der Forschung (1). Im Rahmen des Immunsystems ist bekannt, dass ADM antimikrobielle Eigenschaften besitzt, sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien(13). ADM lässt sich auf der Haut, der Mukosa von Respirations- und Gastrointestinaltrakt, in den Schleimhäuten der ableitenden Harnwege und in der Mundhöhle nachweisen und erfüllt dort möglicherweise seine antimikrobielle Wirkung. Im Speichel liegt die Konzentration von ADM bei 55-65pg/mL und ist damit um ein vielfaches höher als im Serum (13,14). Im Rahmen des Reproduktionssystems findet sich eine Produktion von ADM im Ovar in den Granulosa-Zellen (15). Dort ist die Produktion besonders während der Follikel-Phase hoch (1,15). ADM stimuliert das Wachstum von Granulosa-Zellen und steigert den Effekt des follikelstimulierenden Hormons (FSH). Kurz vor der Ovulation ist die ADM-Konzentration in der Follikel-Flüssigkeit höher als im Plasma. Jedoch auch im Plasma findet sich ein ADM-Anstieg während der Follikel-Phase, der aber während der Luteal-Phase wieder sinkt (1). ADM und seine Rezeptoren finden sich unter anderem im Uterus (16). Die uterine Kontraktilität scheint von ADM inhibiert zu werden. In fetalen Geweben, insbesondere im Synzytiotrophoblasten und extravillösen Trophoblastzellen, wurde ADM schon zu Beginn der Frühschwangerschaft nachgewiesen. Dies weist auf einen Einfluss auf Embryogenese und Entwicklung des Kindes hin. ADM wird auch in der Plazenta exprimiert, sowohl im Synzytiotrophoblasten als auch in fetalen Membranen. ADM spielt somit zahlreiche Rollen während der Schwangerschaft. Es trägt zum Beispiel zur peripheren Vasodilatation der Mutter und damit auch zur hämodynamischen Anpassung, zur lokalen uteroplazentären Zirkulation, Erhaltung der fetoplazentären Perfusion (18), Embryogenese und Plazenta-Entwicklung bei. Sehr hohe ADM-Spiegel zeigen sich auch in der Amnionflüssigkeit. Die ADM Konzentration in der Amnionflüssigkeit ist deutlich höher als im Plasma (1,17). Dort dürfte ADM jedoch eher wegen seiner antimikrobieller Eigenschaften als wegen seiner vasodilatatorischen vorhanden sein (1).

Auf zellulärer Ebene stimuliert ADM die Proliferation von Fibroblasten, Keratinozyten, Endothel-Zellen, Osteoblasten und einigen Tumorzellen, die ihrerseits in der Lage sind ADM zu produzieren. Zellen die von ADM an der Proliferation gehindert werden, sind vaskuläre glatte Muskel-Zellen und Glia-Zellen (1,19).

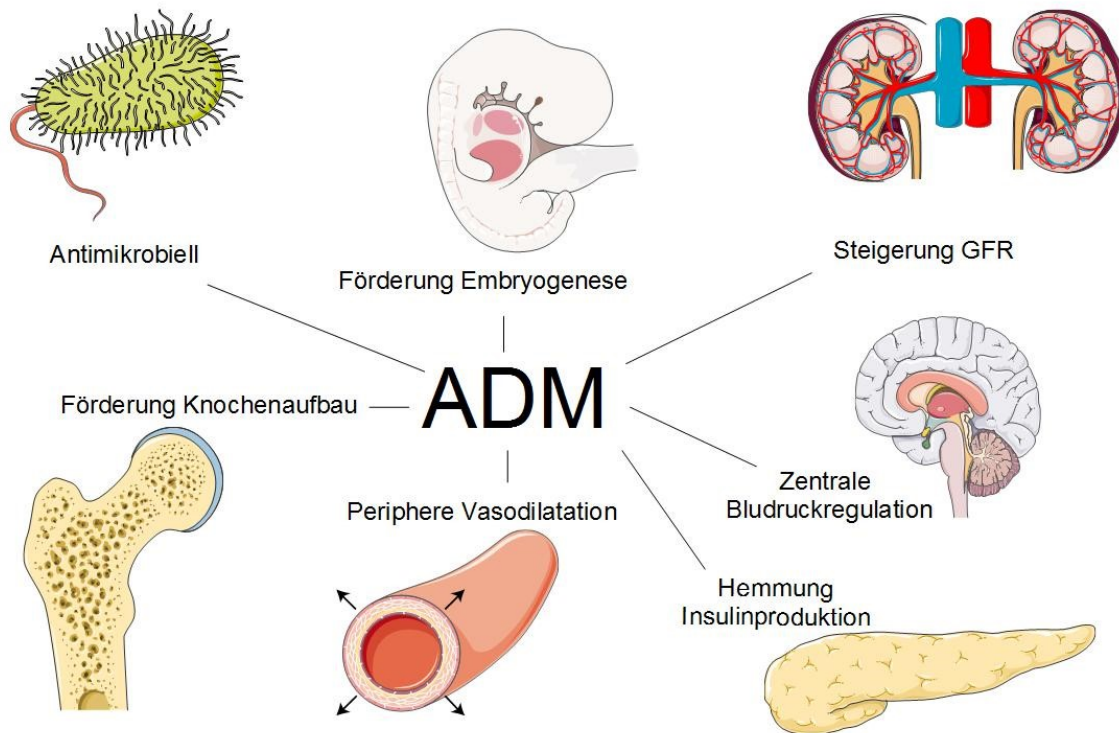


Abbildung 3: Physiologische Eigenschaften von ADM

(Bilder mit freundlicher Genehmigung von servier.ch (20.04.2016))

1.1.5 ADM bei verschiedenen Krankheitsbildern

Inzwischen kennt man zahlreiche Krankheitsbilder, bei denen die Konzentration von ADM im Blut ansteigt. Menschen mit Hypertonie haben einen höheren Plasma-ADM-Spiegel als gesunde Menschen (4). Insbesondere steigt die Konzentration von ADM im Plasma an, wenn die Hypertonie mit Komplikationen wie linksventrikulärer Hypertonie oder Nierenversagen verbunden ist (1,4). Im Rahmen einer Herzinsuffizienz steigt ADM entsprechend dem Schweregrad an, und dient inzwischen als negativer prognostischer Faktor (1,20). Es konnte gezeigt werden, dass im Herzsinus die ADM-Konzentration entsprechend der myokardialen Schädigung ansteigt (21). ADM hat damit evtl. einen positiven Einfluss auf akute Myokardinfarkte, da es zum einen zu einer lokalen Vasodilatation beiträgt und zum anderen die systemischen hämodynamischen Effekte von ADM den Sauerstoffbedarf des Herzens mindern. Plasma ADM steigt auch bei pulmonaler Hypertension an. Bei Glomerulonephritiden kann man ebenfalls einen Anstieg von ADM im Plasma beobachten, wobei dies aber möglicherweise an der verminderten Clearance liegt. Der Anstieg von ADM bei Sepsis und Schock ist wahrscheinlich dadurch begründet (1,20), dass es eine wichtige Rolle bei der ausgeprägten Vasodilatation und Hypotension übernimmt (1). Ob ADM an der Entwicklung von Diabetes mellitus beteiligt ist, ist derzeit noch Gegenstand der Forschung. Der inhibitorische Effekt von ADM auf die Insulin-Produktion konnte inzwischen gezeigt werden, ebenfalls ein vermehrter Anstieg im Plasma bei Typ-2 DiabetikerInnen, wohingegen Typ-1-DiabetikerInnen ein gesteigertes Plasma-ADM nur aufweisen, wenn sie gleichzeitig an Mikroangiopathien leiden. Ein Beispiel für den Anstieg von ADM bei respiratorischen Erkrankungen wäre die COPD (1,4). Ein Beispiel für den Anstieg von ADM im Plasma bei Leberkrankungen konnte bei Leberzirrhose gezeigt werden (4). Der Plasma-ADM-Spiegel ist bei Frauen mit Präeklampsie erhöht und könnte sich in Zukunft als wichtiger Marker dieser Erkrankung etablieren (22).

Insgesamt ist ADM mit seinen komplexen Funktionen noch Gegenstand der Forschung und ob ADM als prognostischer Faktor für verschiedene Krankheitsbilder oder als Therapeutikum einen Zweck erfüllen wird, kann derzeit noch nicht mit Sicherheit belegt werden.

Tabelle 1: Funktionen von ADM und assoziierte Erkrankungen (1,2,23,24)

System	Funktionen	Assoziierte Erkrankungen
Herz-Kreislauf	Vasodilatation, Blutdrucksenkung Inhibition der Proliferation glatter Muskelzellen	Sepsis Schock
Niere	Renale Vasodilatation Steigerung GFR Diurese und Natriurese	Nierenversagen
Skelett	Stimulation Osteoblasten Förderung Knochenmineralisation	Osteoporose
Reproduktion	Hemmung Uteruskontraktion Lokale uteroplazentäre Zirkulation Erhaltung der fetoplazentaren Perfusion Embryogenese Plazenta-Entwicklung	Gestationsdiabetes Präeklampsie
Pankreas	Hemmung Insulin Produktion	Diabetes mellitus
Zentrales Nervensystem	Zentrale Blutdruckregulation	Hypertension, Trauma
Immunologisches System	Antimikrobielle Funktion	Infektionen Sepsis

1.2 Gestationsdiabetes (GDM)

Beim Diabetes mellitus handelt es sich um eine metabolische Störung, die mit erhöhten Blutzuckerspiegeln assoziiert ist. Tritt diese Erkrankung im Rahmen der Schwangerschaft auf und wird dort zum ersten Mal mit einem oralen Glukose-Toleranztest diagnostiziert, dann wird dies Schwangerschafts- bzw. Gestationsdiabetes (GDM) genannt (25).

Die vollständige Definition lautet folgendermaßen: „...*Glukosetoleranzstörung, die erstmals in der Schwangerschaft mit einem 75-g oralen Glukosetoleranztest (oGTT) unter standardisierten Bedingungen und qualitätsgesicherter Glukosemessung aus venösem Plasma diagnostiziert wird. Die Diagnose ist bereits mit einem erhöhten Glukosewert möglich*“ (26). Während der Schwangerschaft nimmt die periphere Insulinresistenz zu. In Kombination mit der Produktion von diabetogenen Hormonen, wie Kortisol und Östrogenen, begünstigt die Schwangerschaft grundsätzlich eine diabetogene Stoffwechsellage. Im Gegensatz zum Typ-1 oder Typ-2 Diabetes endet diese Stoffwechsel-Problematik meist nach der Schwangerschaft (27).

1.2.1. Epidemiologie

Wie auch der Diabetes mellitus Typ hat der Gestationsdiabetes im Laufe der letzten Jahre deutlich zugenommen und steigt weiterhin an. Nach einer Veröffentlichung der Deutschen Diabetes Gesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. lag die Prävalenz in Deutschland 2002 für Gestationsdiabetes bei 1,47% und stieg bis 2010 auf 3,7%. Die Prävalenz weltweit schwankt je nach Population zwischen 0,6% und 22% (26). Durch ein fehlendes nationales Register sind keine gesicherten Daten zum Gestationsdiabetes in Österreich zu bekommen (28). Risikofaktoren, die die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines Schwangerschaftsdiabetes steigern, sind in Tabelle 2 aufgelistet

Tabelle 2: Risikofaktoren für Gestationsdiabetes (2,26,29)

Risikofaktoren für Gestationsdiabetes
Diabetes bei Familienangehörigen 1. Grades
Übergewicht $\geq 30\text{kg/m}^2$ präkonzeptionell
Insulinresistenz durch diverse Erkrankungen (z.B. Polyzystisches ovarielles Syndrom)
Medikamente, die den Glukosestoffwechsel beeinflussen (z.B. Glukokortikoide)
Kardio- und zerebrovaskuläre Erkrankungen
Ethnische Gruppen mit erhöhter Disposition zu Diabetes
Höheres Alter
Arterielle Hypertonie
Frühere Schwangerschaft mit GDM
Makrosomes Kind in derzeitiger oder vorangegangener Schwangerschaft
Körperliche Inaktivität
Niedriges HDL und erhöhte Triglyzeride

1.2.2. Komplikationen

Der Diabetes ist während und nach der Schwangerschaft mit Komplikationen assoziiert, die sowohl das Kind als auch die Mutter betreffen.

Tabelle 3: Komplikationen bei Gestationsdiabetes für Mutter und Kind (26,29)

Risiken für Mutter	Risiken für Kind
Präeklampsie/Eklampsie	Makrosomie
Makrosomie	Polyhydramnion
Sectio	Fehlbildungen
Postpartale Uterusatonie	Frühgeburt
Transfusionspflichtige postpartale Blutung	Intrauterine Wachstumsretardierung
Dammriss Grad 3-4	Intrauteriner Fruchttod
Frühgeburt	Postnatale Polyglobulie
DM-Typ2-Entwicklung im späteren Leben	Postnatale Hyperbilirubinämie
Neuer GDM bei späterer Schwangerschaft	Myokardhypertrophie
Harnwegsinfekte (HWI)	Postnatale Hypoglykämie
Soor-Kolpitis	Postnatale Atemstörungen
Verschlechterung vorbestehender Retinopathien	Transitorische Hypokalziämie postnatal
	Transitorische Hypomagnesiämie postnatal
	Postnatale Polyglobulie
	DM-Typ2-Entwicklung im späteren Leben
	Metabolisches Syndrom im späteren Leben

Risiken und Komplikationen der Mutter

Krankheitsbilder wie Präeklampsie, Eklampsie und Verschlechterung vorbestehender Retinopathien treten vermehrt auf. Die ab der zweiten Hälfte der Schwangerschaft auftretende Hyperglykämie und eintretende Lipolyse kann in weiterer Folge zur Bildung von Ketonkörpern, metabolischer Azidose und ketoazidotischem Koma führen (25). Das Gewicht des Kindes kann auf über 4000g steigen, und zu Komplikationen wie Sectio, postpartaler Uterusatonie, transfusionspflichtiger postpartaler Blutung und Dammriss Grad 3-4 (30,31), sowie zu Frühgeburten (32) führen. Frauen die einen Schwangerschaftsdiabetes hatten, erkrankten selbst häufiger an Diabetes mellitus Typ 2 im späteren Leben (33).

Risiken und Komplikationen des Kindes

Glukose kann die Plazentaschranke weitestgehend durch erleichterte Diffusion passieren (34). Der Fetus leidet deshalb bei Auftreten von Gestationsdiabetes an einer Hyperglykämie, die er zunächst versucht mit vermehrter Urinausscheidung zu kompensieren und dies kann zu einem Polyhydramnion führen (6). Abhängig von der Ausprägung des Polyhydramnions sind Komplikationen wie vorzeitiger Blasensprung, Wehenschwäche und Infektionen mögliche weitere Folgen (29). Obwohl Glukose die Plazenta mittels Diffusion passiert, kann das mütterliche Insulin die Plazentaschranke nicht überqueren. Der fetale Organismus steigert deswegen die eigene Insulinproduktion um die Hyperglykämie auszugleichen (35). Der erhöhte Insulinspiegel des Feten wiederum stimuliert die subkutane Fetteinlagerung, so dass der Fetus gegen Ende der Schwangerschaft ein überdurchschnittlich hohes Gewicht erreicht (über 4000g, Geburtsgewicht über der 95. Perzentile) (25). Wenn ein Kind dieses Gewicht und die damit einhergehende Größe besitzt, dann wird dies Makrosomie genannt. Kinder sind ab einer solchen Größe für die Schwangeren schwerer zu gebären und eine mögliche Komplikation für GeburtshelferInnen, die bei makrosomen Kindern vermehrt auftritt, ist die Schulterdystokie (25,29). Ebenfalls erhöhen makrosome Kinder die Wahrscheinlichkeit für Dammrisse Grad 3 und 4 (29). Beim Feten kann es vermehrt zu Fehlbildungen (Fetopathia diabetica), selten auch zu kaudalen Regressionssyndromen kommen (25). Ursache für die Wachstumsretardierung des Kindes ist in der Regel eine Durchblutungsstörung der Plazenta und der damit einhergehenden Unterversorgung des Kindes (25).

Nach Abklemmen der Nabelschnur wird die Blut- und damit auch die Glukosezufuhr der Mutter unterbrochen. Durch den fetalen Hyperinsulinismus kann es deswegen nach der Geburt zu einer postpartalen fetalen Hypoglykämie kommen (36), die im schlechtesten Fall tödlich für das Kind endet. Diese Hypoglykämie kann unmittelbar nach der Geburt oder auch in den ersten Lebenstagen auftreten (25). Hypoglykämien gehen auch mit ZNS-Störungen einher (37,38). Neugeborene von Müttern mit Gestationsdiabetes sind im Vergleich zu gesunden funktionell unreif. Anpassungsstörungen können sich in Form von Gerinnungsstörungen, Atemnotsyndromen und Hyperbilirubinämie äußern. Die perinatale Mortalität und das Risiko eines intrauterinen Fruchttodes sind bei Müttern mit Gestationsdiabetes ebenfalls erhöht (25).

1.2.3 Diagnostik

Das Screening auf Diabetes findet zwischen der 25.-28. Schwangerschaftswoche statt. Dies erfolgt mit Hilfe eines oralen Glukose-Toleranztest (25,29). Bestimmt werden dabei Nüchtern-Blutzucker, Blutzucker nach 1 und nach 2 Stunden nach kontrollierter Zuckeraufnahme.

Tabelle 4: Grenzwerte des oralen Glukosetoleranztests (29)

Grenzwerte Glukosetoleranztest	
Nüchtern	>92mg/dl
Nach 1 Stunde	>180mg/dl
Nach 2 Stunden	> 153mg/dl

Zum Ausschluss einer Präeklampsie werden regelmäßige Urin- und Blutdruck-Kontrollen empfohlen (26). Der Ultraschall ist für die Diagnose des Gestationsdiabetes nicht geeignet, jedoch können mögliche Folgen des Gestationsdiabetes, wie verringertes oder vermehrtes Fruchtwasser, Makrosomie oder Wachstumsretardierungen und Fehlbildungen erkannt werden. Weitere diagnostische Möglichkeiten sind das CTG zur Erkennung von fetalem Stress und die Farb-Doppler-Untersuchung von fetalen Gefäßen. Möglich sind ebenfalls invasive Maßnahmen wie die Amniozentese (29).

1.2.4 Therapie

Schwangerschaften mit Gestationsdiabetes gehören zu der Klasse der Risikoschwangerschaften (26). Die meisten lassen sich diätisch gut behandeln (29). Die Therapie ist individuell anzupassen und erfordert eine qualifizierte Beratung.

Empfohlen wird eine ausgewogene Ernährung in Form von (25):

- 40-50% aus Kohlenhydraten
- 30% aus Fett
- 20% aus Proteinen
- 1800 – 2400kcal/d
- 5-7 Mahlzeiten/d

Des Weiteren wird der Patientin ein angemessenes Ausmaß an Sport empfohlen um die Insulinresistenz zu senken. Sollten die beiden Maßnahmen nicht ausreichen, muss der Schwangeren Insulin appliziert werden. Durch die Applikation von Insulin wird versucht einen normoglykämischen Bereich von 60-120mg/dl zu erreichen. Mögliche Applikationsarten sind die intensivierete Insulintherapie, das Basis-Bolus-Prinzip und die Verwendung von Insulinpumpen. Bei Stress, ausgedehnten Mahlzeiten und Infektionen sind meist höhere Insulindosen zu applizieren. Während der Schwangerschaft unterliegen die zuführbaren Insulindosen einem physiologischen Wechsel. In der ersten Schwangerschaftshälfte ist der Insulinbedarf verringert, ab der zweiten Schwangerschaftshälfte steigt er. Die Blutzuckerkontrolle kann bei guter Compliance von der Schwangeren selber durchgeführt werden und erfolgt bei Diät mehrmals wöchentlich und bei Insulintherapie mehrmals täglich (25). Eine weitere Möglichkeit zur Behandlung des Gestationsdiabetes ist die Off-Label-Use Gabe von Metformin (39).

Weitere mögliche Parameter die sich zur Verlaufskontrolle eignen sind (25):

- Kreatinin
- Harnstoff
- HbA1c
- Fruktosamin

Grundsätzlich besitzen Gestationsdiabetikerinnen bei guter Einstellung kein höheres Geburtsrisiko als gesunde Schwangere (29). Bei Übertragung oder anderen Komplikationen wird die Schwangere meist stationär aufgenommen und eine Geburt eingeleitet oder eine Sectio durchgeführt. Während des Geburtsvorganges und in den ersten Stunden nach der Geburt sinkt der Insulinbedarf (25). Der Blutzucker muss kontrolliert und eine mögliche Hypoglykämie verhindert werden. Frauen mit Gestationsdiabetes benötigen normalerweise anschließend kein Insulin mehr (25). Insgesamt ist der Gestationsdiabetes in seiner Pathophysiologie noch nicht vollständig verstanden und auftretende Komplikationen stellen für die Medizin eine große Herausforderung dar. Aus diesem Grund ist der Gestationsdiabetes nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung.

1.3 Plazenta

1.3.1 Einleitung Plazenta

Die Plazenta ist trotz schon bekannter Funktionen immer noch Gegenstand der Forschung. Die Plazenta ist für die Ernährung des Kindes verantwortlich und unter anderem als Mutterkuchen bekannt. Ein Aspekt, den dieses Organ von den anderen unterscheidet, ist die Tatsache, dass es nur während der Schwangerschaft ein biologisch aktives Organ darstellt.

1.3.2 Entwicklung

Die Entwicklung der Plazenta beginnt etwa um den vierten Tag nach Befruchtung der Eizelle (29). Der Keim hat sich bis zu diesem Tag zu einer sogenannten Blastozyste entwickelt, die aus zwei Anteilen besteht. An der Innenseite liegt der Embryoblast, aus dem später der Embryo entsteht, und außen der Trophoblast (40). Sobald sich die Blastozyste zwischen dem 4. und 6. Tag im Uterus einnistet, in der Regel im Fundus-Bereich, differenziert sich der Trophoblast in zwei Linien. Zum einen in den Zytotrophoblasten und zum anderen in den Synzytiotrophoblasten. Der Zytotrophoblast liegt an der Innenseite des Synzytiotrophoblasten und dient unter anderem zu dessen Regeneration (41). Als Synzytiotrophoblast bezeichnet man die außenliegende Schicht, ein mehrkerniges Synzytium, das mit dem Endometrium in Berührung kommt. Sobald dies geschieht, wachsen die Synzytiotrophoblast-Zellen durch die Lamina epithelialis des Endometriums in die Lamina propria, in der sich die Deziduazellen und die Spiralarterien befinden. Dies gelingt den Synzytiotrophoblastzellen unter anderem dank proteolytischer Enzyme. Um den neunten Tag erscheinen die ersten Lakunen im Synzytiotrophoblast, die später zusammenlaufen und den intervillösen Raum bilden. Durch das Aufbrechen der Spiralarterien füllt sich der Raum mit oxygeniertem Blut der Mutter. In diesen Raum wachsen schließlich Fortsätze vom Synzytiotrophoblasten (41).

Um den 12. Tag wächst der Zytotrophoblast in den Synzytiotrophoblasten ein. Sobald die Zytotrophoblastenzellen, den Synzytiotrophoblasten aus dem Kern seiner Zotten verdrängt haben, werden diese Fortsätze als Primärzotten bezeichnet (29). Ebenfalls um den neunten Tag ist zwischen dem Embryoblast und Zytotrophoblast extraembryonales Mesenchym entstanden, welches um den 15. Tag in die Zotten einwächst, die von da an als Sekundärzotten bezeichnet werden (29). Sobald innerhalb der Sekundärzotten Blutgefäße entstehen, werden sie Tertiärzotten genannt (29). Von den Tertiärzotten leiten sich dann weitere Zottentypen ab, wie Mesenchymalzotten, Intermediärzotten und

Terminalzotten. Zwischen dem intervillösen Raum und den Zotten mit den fetalen Gefäßen erfolgt der Gas- und Stoffaustausch.

1.3.3 Makromorphologie

Ungefähr 30 Minuten nach der Geburt des Kindes wird die Plazenta mit den Eihäuten ausgestoßen. Um sicher zu gehen, dass keine Plazenta-Reste im Uterus verblieben sind und um die Plazenta für die Forschung möglichst funktionstüchtig zu erhalten, wird sie von den GeburtshelferInnen auf folgende Aspekte untersucht (29): Die ausgestoßene Plazenta ist im Durchmesser 15-20cm groß, 2-3cm dick und 500-600g schwer. Sie hat eine rund-ovale Form und eine weiche schwammartige Konsistenz (29). Die fetale Seite der Plazenta besitzt eine rot-violette Farbe. Sie ist überdeckt von Eihäuten und den entsprechenden Gefäßen. In der Regel entspringt die Nabelschnur in der Mitte (29). Die mütterliche Seite ist rötlich-braun und in mehrere runde bis unförmige Funktionseinheiten, den sogenannten Kotyledonen aufgeteilt (29).



Abbildung 4: Humane Plazenta - mütterliche Seite (42)



Abbildung 5: Humane Plazenta - fetale Seite (43)

Abweichungen in Größe, Form und Defekte an den Oberflächen sind Hinweise auf mögliche Pathologien (29).

1.3.4 Histologischer Aufbau

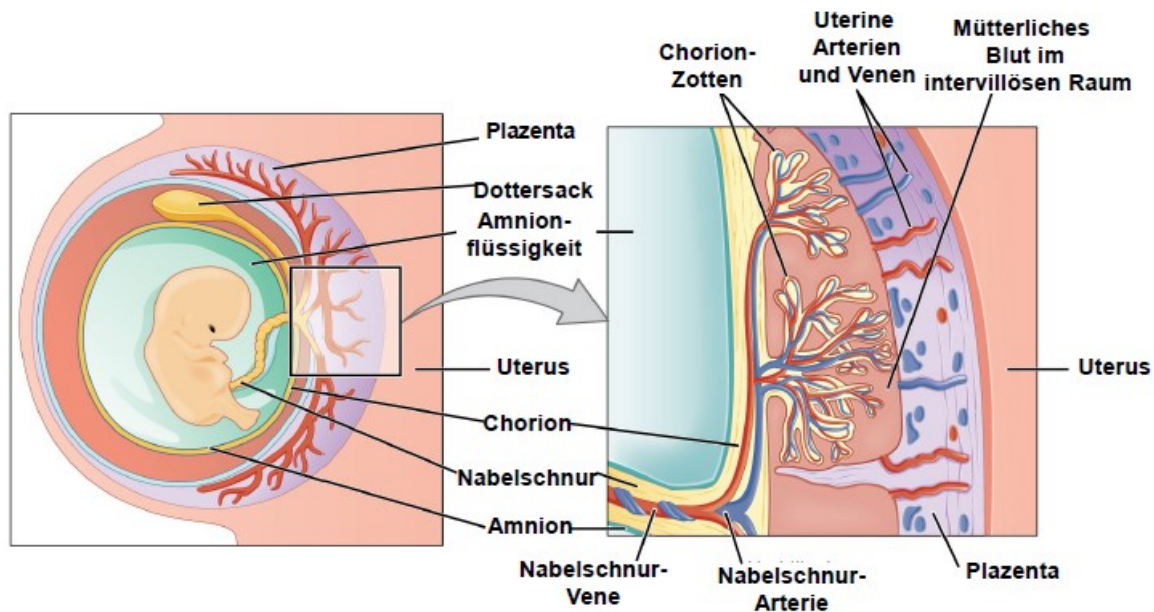


Abbildung 6: Schematische Darstellung der humanen Plazenta (44)

Wenn man die Plazenta histologisch betrachtet, erkennt man, dass sie aus vielen verschiedenen Strukturen aufgebaut ist. Auf der fetalen Seite findet sich zunächst die Chorionplatte, mit dem darauf liegenden Amnion (40). Auf der mütterlichen Seite liegt die Basalplatte, von der Plazentasepten in den zwischen Basalplatte und Chorionplatte liegenden intervillösen Raum hineinragen (41). Im intervillösen Raum befindet sich das mütterliche Blut. Ebenfalls im intervillösen Raum, aber von der Chorionplatte aus, ragen große sich weit verzweigende Stammzotten. Einige der Verzweigungen erreichen die gegenüberliegende Basalplatte und werden Haftzotten genannt (40). Die restlichen Zotten verzweigen sich astförmig bis zu den Terminalzotten, welche die fetalen Blutgefäße enthalten, die für den Gas- und Stoffaustausch zwischen mütterlichen und fetalen Blut verantwortlich sind (29). Auf der Oberfläche der Terminalzotten befinden sich Synzytiotrophoblasten, die zusammen mit der endothelialen Basalmembran und dem fetalen Endothel, die Plazentaschranke bilden (29). Im Gegensatz zu anderen Säugetieren, wie Mäusen oder Schweinen, die 2-3 Schichten besitzen, ist diese materno-fetale Barriere hämomonochorial (29). Hämochorial bedeutet, dass die Synzytiotrophoblastzellen mit dem mütterlichen Blut in direkten Kontakt kommen. Die Bindegewebssepten, die von der Basalplatte aus in den intervillösen Raum

hineinragen, teilen ihn in Kompartimente auf (41). Jedoch erreichen die Septen nicht die Chorion-Platte, so dass die Kompartimente immer noch miteinander kommunizieren können (40). Weitere Zellen, die sich in der Plazenta finden lassen, sind Deziduazellen und Trophoblastzellen. Die örtständigen Makrophagen werden Hofbauerzellen genannt (41).

1.3.5 Funktionen der Plazenta

Die Plazenta besitzt vielfältige Funktionen und ist ein komplexes Organ, das immer noch Gegenstand der Forschung ist. Die Funktionen lassen sich in folgende Gruppen einteilen (25):

- Stoffaustausch
- Barrierefunktion
- Endokrine und parakrine Funktionen
- Immunologische Funktion

Die Plazenta dient als Vermittler der getrennten Lipidmetabolismen von Mutter und Kind und produziert autokrine und parakrine Faktoren.

Stoffaustausch

Eine der wichtigsten Funktionen der Plazenta ist der Austausch von Gasen und Stoffen. Dazu besitzt sie mehrere Möglichkeiten. Die einfachste und am meisten Energie sparende ist die Diffusion. Wasser und Gase nutzen diese Möglichkeit. Hinzu kommt die erleichterte Diffusion, die mit Hilfe von Trägerproteinen funktioniert. Auf diesem Weg transportiert die Mutter Glukose zum Fetus, bzw. der Fetus kann auf diese Weise Milchsäure in den Kreislauf der Mutter abgeben. Zusätzlich verwendet die humane Plazenta noch den Energie verbrauchenden aktiven Transport, der Elektrolyte und Aminosäuren betrifft, und die Transzytose, mit der Lipide aber auch Immunglobuline durch die Plazenta in den fetalen Kreislauf transportiert werden (34,41). Obwohl der mütterliche Kreislauf und der fetale Kreislauf besonders im letzten Trimenon nur durch eine kleine Barriere getrennt sind, findet kein direkter Blutaustausch zwischen beiden statt (40).

Barrierefunktion

Tabelle 5: Zusammensetzung des Plazentagewebes (34)

Plazentaschranke: Gewebe und Zellen
Synzytiotrophoblast
Zytotrophoblastzellen
Basallamina des Trophoblasten
Bindegewebe der Zotten
Basallamina der Kapillarendothelien
Endothelzellen der Zottenkapillaren

Ungefähr ab der 25. Schwangerschaftswoche dünnt die Plazentaschranke teilweise so weit aus, dass viele Bereiche nur noch aus „Synzytiotrophoblasten, fetalem Bindegewebe und fetalem Kapillarendothel“ bestehen (41). Die Funktion der Schranke ist wie schon im Namen erwähnt eine Barrierefunktion. Beispielsweise können Gase, Nährstoffe, Immunglobuline und fetale Abfallprodukte sie passieren. Infektionserreger, Blut und andere Stoffe, die im Kreislauf der Mutter zirkulieren, können in der Regel aber nicht in den fetalen Kreislauf gelangen (34).

Endokrine Funktionen

Die Plazenta ist in der Lage, humanes Choriongonadotropin (HCG) zu produzieren, genauer gesagt übernimmt das der Synzytiotrophoblast (34). Das HCG ist notwendig, um in den ersten beiden Monaten die Funktion des Corpus luteum graviditatis aufrecht zu erhalten. Dieser produziert seinerseits Progesteron und erhält damit die Schwangerschaft, bis die Plazenta weit genug entwickelt ist, um die Produktion von Östrogenen und Progesteron selber zu übernehmen. Wenn im Rahmen der 10. Schwangerschaftswoche die HCG-Produktion abfällt, stellt auch der Corpus luteum seine Funktion ein und bildet sich zurück. Aber das HCG ist nicht nur für die Aufrechterhaltung des Corpus luteum notwendig, sondern auch für die korrekte Entwicklung und Ausbildung der Gonaden und den späteren Deszensus des Hodens (40). Ein weiteres Hormon, das von der Plazenta produziert wird ist das humane Plazenta Laktogen, kurz HPL genannt. Das Hormon, welches vom Synzytiotrophoblasten ausgeschieden wird, dient dazu, die Insulinempfindlichkeit in der mütterlichen Zirkulation zu senken, wodurch der Blutzucker ansteigt. Indirekt wird dadurch auch die fetale Versorgung gewährleistet. (40). Zusätzlich bildet die Plazenta humanes Chorionthyreotropin (34).

Immunologische Funktion

Physiologisch besteht der Nutzen für den Feten darin, dass bei dem Kind ein sogenannter Nestschutz gegen die Erkrankungen besteht, gegen die die Mutter eigene Antikörper bildet. Der Nestschutz kann bis sechs Monate nach der Geburt andauern. Einen absoluten Schutz kann die Plazenta für den Feten jedoch nicht gewähren. Infektionserreger wie Rötelnviren bei Erstinfektion oder *Treponema pallidum* können die Plazentaschranke überwinden. Auch Pharmaka, Drogen, und Alkohol werden direkt oder indirekt über die Plazenta transportiert, sodass hier eine erhöhte Gefahr für den Fetus gegeben ist. Nikotin kann nach Angaben vieler Studien die Plazentaschranke nicht direkt passieren. Es übt seinen schädlichen Einfluss eher durch Verengung der Plazentagefäße aus (40).

Lipidmetabolismus der Plazenta

Die Plazenta transportiert aktiv wie passiv mütterliche Nährstoffe zum Fetus um ein adäquates Wachstum und Entwicklung des Ungeborenen zu ermöglichen. Die Plazenta produziert außerdem Hormone wie Kortisol und Östrogene, die die Lipogenese und Fetteinlagerung von Mutter und Kind in der Schwangerschaft unterstützen. Die humane Plazenta produziert auch Adipokine z.B. Leptin, welches die Bildung von Fettgewebe fördert. Jedoch stammt nur in etwa die Hälfte des Fettes beim Fetus vom Feten selber, so dass nicht nur die lipogenetische Stimulation, sondern auch die Zufuhr von mütterlichen Fettsäuren in die fetale Zirkulation notwendig ist, um dem Fetus ein adäquates Wachstum zu ermöglichen. Aber auch die Plazenta selbst benötigt zum Beispiel exogene Lipide wie Cholesterin für ihre Steroidsynthese und Fettsäuren für die plazentare Oxidation und den Membranaufbau. Der Großteil mütterlicher zirkulierender Fettsäuren liegt jedoch verestert in Form von Triglyzeriden, Phospholipiden, Cholesterin-Estern und Teilen von Lipoproteinen vor. Die freien Fettsäuren können über die humane Plazenta nicht transportiert werden. Postuliert wird, dass an der mütterlichen Seite der Plazenta verschiedene Enzyme (Hydrolasen) aktiviert werden, um Fettsäuren von ihren Triglyzeriden abzuspalten. Die freien Fettsäuren werden anschließend in die fetale Zirkulation über Bindungsproteine oder Rezeptoren aufgenommen. Um das High-density-lipoprotein (HDL) als Cholesterin-Quelle verwenden zu können besitzt die Plazenta auf der Oberfläche SR-BI-Rezeptoren (Scavenger receptor class B type 1). Dabei handelt es sich um Scavenger-Rezeptoren, die in der Lage sind das Lipoprotein zu binden und für die selektive Aufnahme des Cholesterins in die Zelle auf einem noch nicht genau beschriebenen Weg verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu werden das Low-density-Lipoprotein (LDL) und das Very-low-density-Lipoprotein (VLDL) über Endozytose in die Zelle aufgenommen und durch den intrazellulären lysosomalen „Verdauungsweg“

aufgespalten. Es sind noch nicht alle Vorgänge bekannt mit denen es der Plazenta gelingt, die intrazellulären mütterlichen essentiellen Fettsäuren in die fetale Zirkulation abzugeben. Bekannt sind inzwischen zwei ATP-binding-cassette-Transporters, ABCA1 und ABCG1, in den fetalen Endothelzellen, die das Cholesterin an fettarme Apolipoproteine übertragen können. (45,46,47,48)

Autokrine und parakrine Funktionen

Die Plazenta produziert neben Hormonen auch Steroide und verschiedene Proteine. Die meisten werden vom Zyto- und Synzytiotrophoblasten produziert. Die von der Plazenta produzierten Hormone modulieren den mütterlichen Metabolismus um einen Anstieg der mütterlichen Blutglukose-Konzentrationen zu bewirken. Die wichtigsten von der Plazenta produzierten Hormone sind HPL, HGH (human growth hormon), Progesteron, Östrogene und das humane Chorion-Gonadotropin (HCG).

Neben den bekannten Hormonen, produziert die Plazenta auch eine lange Reihe von Peptiden, die von der Invasion der Trophoblasten in den Uterus im ersten Trimester bis zum Ende der Schwangerschaft vielfältige Aufgaben übernehmen. Einen Auszug dieser Peptide findet sich in der Tabelle 6 (49,50,51).

Tabelle 6: Zusammenfassung der autokrinen und parakrinen Faktoren der Plazenta (50,51)

Gruppen	Autokrine und parakrine Faktoren
Wachstums-Faktoren	Epidermal Growth Factor (EGF)
	Transforming Growth Factor B
	Platelet-derived growth factor (PDGF)
	IGF-2
	Colony-stimulating factor-1 (CSF1)
	Vascular Endothelial growth factor (VEGF)
	Placental growth factor (PIGF)
Zytokine	Interleukin-1
Inflammatorische Faktoren	Cortico-releasing hormone
	Tumor Nekrose-Faktor α (TNF- α)
Extracellular degrading matrix proteinases	Diverse Metalloproteasen
Proteo-Hormone und Peptide	Somatostatin
	Metastatin
	Relaxin
	Inhibin
	Follistatin
	Prolaktin
	Urocortin
Zelladhäsions-Moleküle	Integrine

2 Hypothese und Fragestellungen

Bei dem Gestationsdiabetes handelt es sich um eine Risikoschwangerschaft, die immer noch mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität von Mutter und Kind einhergeht. Obwohl die Prävalenz für Gestationsdiabetes zunimmt, sind die Mechanismen über die Entstehung noch nicht vollständig erforscht. Ebenfalls wäre es von Interesse über Biomarker zu verfügen, die mit Gestationsdiabetes verbundene Komplikationen vorhersagen können, um die weitere Behandlung zu optimieren.

Es konnte gezeigt werden, dass Typ-2-DiabetikerInnen im Vergleich zur Normalbevölkerung einen erhöhten Plasma-ADM-Spiegel aufweisen.

Wir nehmen an, dass ProADM bei Gestationsdiabetes in der fetalen Zirkulation erhöht ist. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Befindet sich im gemischten Nabelschnurblut und damit im fetoplazentaren Kreislauf bei Gestationsdiabetes ein erhöhter MR-ProADM-Spiegel als bei nicht diabetischen Kontrollen?
- 2) Besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den MR-ProADM-Konzentrationen im fetalen Plasma bei Schwangerschaften mit und ohne Gestationsdiabetes?
- 3) Findet die Produktion von ADM in der Plazenta statt?
- 4) Welche Zellen/Gewebe sind für die vermehrte ADM-Produktion verantwortlich?

3 Material und Methoden

3.1 Literatursuche

Als Informationsquelle für die Einleitung und Diskussion wurden Unterlagen aus dem Pubmed, Basislehrbücher aus der Universitätsbibliothek der Medizinischen Universität Graz, sowie eine Quelle der Deutschen Diabetes Gesellschaft und Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. und eine Quelle des österreichischen Bundesministeriums für Gesundheit verwendet.

Die Stichworte für die Suche in Pubmed waren:

- Adrenomedullin review
- Proadrenomedullin
- Diabetes
- Pregnancy
- Gestational Diabetes

3.2 Herstellung der Plasmaproben

Das Nabelschnurblut wurde unmittelbar nach der Geburt mit entsprechenden Spritzen und Nadeln aus den Nabelschnüren der Feten entnommen und zur Vermeidung der Gerinnung in Ethylendiamintetraazetat (EDTA)-Röhrchen umgefüllt (VACUETTE® RÖHRCHEN 6 ml K3E K3EDTA 13x100 lila Kappe-schwarzer Ring, non-ridged, Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Österreich). Die Proben wurden in einem zweiten Schritt für 10 Minuten bei 4°C und 3500rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend in 1,5ml Eppendorf-Gefäße transferiert, die bei -80°C eingefroren wurden. Es wurde arterielles und venöses Nabelschnurblut von insgesamt 65 Feten verwendet, davon 28 Proben von Feten gesunder Schwangerer und 37 Proben von Feten von Schwangeren mit Gestationsdiabetes. Die Proben wurden bei Versuchsbeginn aufgetaut und anschließend wurde von den Proben jeweils 150µl in Eppendorfgefäße pipettiert.

3.3 Messung von MR-ProADM

Die Bestimmung von MR-ProADM erfolgte mit B.R.A.H.M.S KRYPTOR®.

Dabei handelt es sich um ein voll automatisches Random-Access-Immunoassay-System, das die Aminosäuresequenz 45-92 von Proadrenomedullin, die Vorstufe des aktiven Adrenomedullin, misst. Der Assay enthält Anti-Pro-ADM sheep polyclonal Antikörper für den spezifischen Nachweis. Diese sind konjugiert mit Europium, Puffer, Rinder-Albumin und Kalium-Fluorid. Das Mess-Prinzip basiert auf der TRACE-Technologie (Time-Resolved Amplified Cryptate Emission), die das Signal, das von einem Immun-Komplex emittiert wird mit einer kurzen Zeitverzögerung misst. Die Basis der TRACE Technology ist ein nicht strahlender Energie-Transfer von einem Donor zu einem Akzeptor. Bei dem Donor handelt es sich um Cryptate, ein käfigartiges Molekül mit einem Europium-Ion im Zentrum. Der Akzeptor wird XL 665 genannt. Dabei handelt es sich um ein Licht sammelndes Algenprotein. Antikörper, die entweder mit Cryptate oder XL 665 markiert sind werden den einzelnen Proben hinzugefügt. Cryptate-markierte AK geben ein langlebiges Signal von 620nm ab, sobald sie von einem Nitrogenlaser mit 337nm Wellenlänge bestrahlt werden. Die mit XL 665 markierten Antikörper geben ein kurz lebiges Signal mit einer Wellenlänge von 665nm ab. Binden jedoch beide Antikörper an ein Antigen, so gibt das Cryptate wegen seiner Nähe zu XL 665 seine Energie an XL 665 ab, wodurch dieses angeregt wird nun ein langlebiges Signal im Bereich von 665nm auszusenden. Mittels des Kryptors wird nun diese Wellenlänge gemessen und anhand der Signal-Intensität indirekt die Konzentration des Antigens bestimmt. Um tatsächlich nur den langlebigen Anteil zu messen, der von den Immunkomplexen entsendet wird, und das Ergebnis nicht durch die kurz lebigen Anteile der ungebundenen Antikörper zu verfälschen, wird nicht gleich zu Beginn gemessen, sondern erst nach 50ms, wenn die kurzlebigen Anteile des Signales nicht mehr emittiert werden. Dadurch wird sichergestellt, dass nur der Anteil des Signals gemessen wird, der durch Antikörper emittiert wird, die an das gesuchte Antigen gebunden sind. Das Signal, das von Cryptate bei 620nm emittiert wird, dient als Referenz und wird simultan gemessen.

Der für das Gerät errechnete Referenzbereich von MR-ProADM für gesunde Normalpersonen (n=144, 87 Männer, 57 Frauen) in EDTA-Plasma liegt im Median bei 0,39 nmol/L. Die 97,5 Perzentile liegt bei 0,55 nmol/L. Die untere Nachweisgrenze für MR-ProADM im Plasma liegt bei 0,05 nmol/L. Die angewandte Norm lautet CLSI EP 17-A. Die funktionelle Assaysensitivität liegt bei 0,25 nmol/L und wurde durch eine Inter-Assay-Präzision von 20% Variationskoeffizient ermittelt. Bis 225 nmol/L kann kein High-Dose-Hook Effekt beobachtet werden. Interferenzen von MR-ProADM mit anderen Stoffen können ab folgenden Konzentrationen auftreten:

Tabelle 7: Interferenzen von MR-ProADM

Körpereigene Substanz	Konzentration im Plasma
cTN1 (kardiales Troponin 1)	Ab 400 ng/mL
Myoglobin	Ab 852 ng/mL
CKMB (Kreatinkinase-Muscle-Brain-Type)	Ab 204 ng/mL
PCT (Procalcitonin)	Ab 59,2ng/mL
MR-ProANP (mid-regional pro-atriale natriuretic peptid)	Ab 905 pmol/L
CT-proET1 (C-terminales-ProEndothelin-1)	Ab 409 pmol/L
CRP (C-reaktives Protein)	Ab 110 µg/mL

Bei Verdünnung hochkonzentrierter Proben liegt die Wiederfindung bei 80-120%.

Angewandte Normen: CLSI EP 6-A

Die Reproduzierbarkeit für den Intra-Assay-Variationskoeffizienten wurde unter Verwendung von Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen ermittelt.

Tabelle 8: Reproduzierbarkeit Intra-Assay-VK

Konzentration	CV (Variationskoeffizient)
Zwischen 0,2 nmol/L und 0,5 nmol/L	≤10 %
zwischen 0.5 nmol/L und 2 nmol/L	< 4 %
zwischen 2 nmol/L und 6 nmol/L	< 2 %
> 6 nmol/L	< 3,5 %

Angewandte Normen: CLSI EP 5-A

Die Reproduzierbarkeit für den Inter-Assay-Variationskoeffizienten wurde unter Verwendung von Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen ermittelt.

Tabelle 9: Reproduzierbarkeit Inter-Assay-VK

Konzentration	CV (Variationskoeffizient)
Zwischen 0,2 nmol/L und 0,5 nmol/L	≤ 20 %
zwischen 0.5 nmol/L und 2 nmol/L	≤ 11 %
zwischen 2 nmol/L und 6 nmol/L	≤ 10 %
> 6 nmol/L	≤ 6 %

Angewandte Normen: CLSI EP 5-A2

Genauere Details und erklärende Videos finden sich in den Quellen 52 und 53.

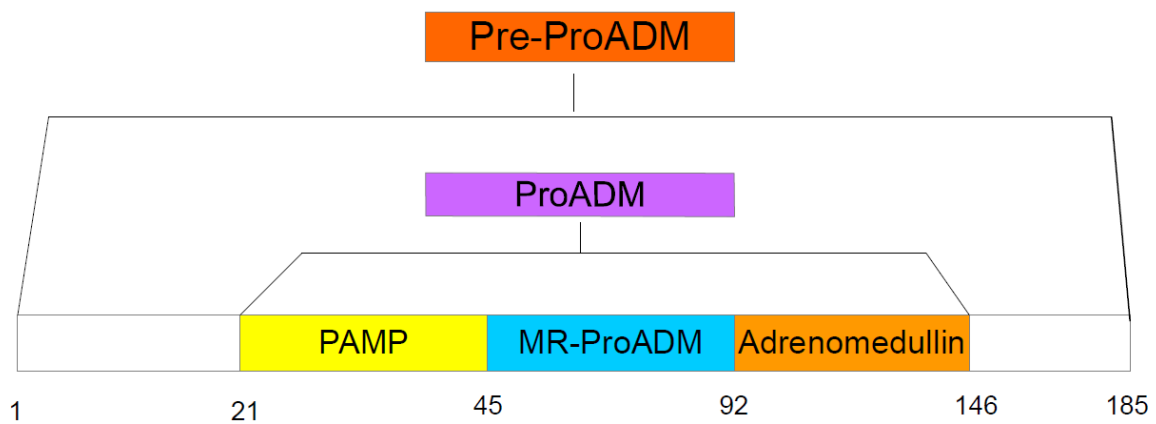


Abbildung 7: Schematische Darstellung von MR-ProADM innerhalb von Pre-ProADM

MR-ProADM = Mid-Regional Proadrenomedullin

PAMP =Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptid

3.4 Westernblot

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen wurden nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Zur Auftrennung der Proteine wurden ein 5%iges Sammelgel (5,9 ml H₂O, 2,5 ml Upper Tris (0,4% SDS, 0,5 M Tris HCl pH 6,8), 1,6 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 75 µl 20% APS, 15 µl TEMED) und ein 10%iges Trenngel (16,2 ml H₂O, 10 ml Lower Tris (0,4% SDS, 1,5 M Tris HCl, pH 8,8), 13,3 ml 30%Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 200 µl APS, 25 µl TEMED) verwendet (Maniatis, 1989). Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS.

Als Molekulargewichtsstandard diente der „High Molecular Weight Standard“ von Sigma.

Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western

Die BCA-Protein-Bestimmung war bei den verwendeten Proben schon durchgeführt worden, sodass die entsprechenden Protein-Konzentrationen bekannt waren.

Tabelle 10: Proteingehalt der Westernblot-Proben

Probe	Proteingehalt µg/µl
Arterielle Endothelzellen gesund	1,33
Arterielle Endothelzellen gesund	1,63
Arterielle Endothelzellen gesund	1,59
Arterielle Endothelzellen diabetisch	1,6
Arterielle Endothelzellen diabetisch	0,97
Arterielle Endothelzellen diabetisch	1,42
Venöse Endothelzellen gesund	3,81
Venöse Endothelzellen gesund	2,1
Venöse Endothelzellen gesund	2,81
Venöse Endothelzellen diabetisch	2,04
Venöse Endothelzellen diabetisch	2,33
Venöse Endothelzellen diabetisch	2,51
Term-Trophoblasten	1,11
Term-Trophoblasten	1,11
Term-Trophoblasten	1,71
First-Trimester-Trophoblasten 7. + 8. SSW	1,49
First-Trimester-Trophoblasten 11. + 12. SSW	1,61
First-Trimester-Trophoblasten 11. + 12. SSW	1,61
Hofbauer-Zellen	1,86
Hofbauer-Zellen	1,36
Hofbauer-Zellen	0,69
First-Trimester Plazentagewebe 7. SSW	2,1
First-Trimester Plazentagewebe 9.SSW	1,6
First-Trimester Plazentagewebe 10. SSW	1,8
Term-Plazentagewebe gesund	2
Term-Plazentagewebe gesund	2
Term-Plazentagewebe gesund	2
Term-Plazentagewebe gesund	2
Term-Plazentagewebe gesund	2
Term-Plazentagewebe gesund	1,72
Term-Plazentagewebe gesund	3,18
Term-Plazentagewebe gesund	2,27
Term-Plazentagewebe diabetisch	1
Term-Plazentagewebe diabetisch	1
Term-Plazentagewebe diabetisch	1
Term-Plazentagewebe diabetisch	4,13
Term-Plazentagewebe diabetisch	2,15
Term-Plazentagewebe diabetisch	2,27
Term-Plazentagewebe diabetisch	1,87
Term-Plazentagewebe diabetisch	1
Term-Plazentagewebe diabetisch	1
Clontech Plazentagewebe	2

Tabelle 11: Proben der Westernblots, biologische Fallzahlen

Humane Plazenta	Pathologien	
Term-Plazentagewebe	normal	n = 8
	diabetisch	n = 9
First-Trimester- Plazenta 7.,9.,10. SSW	normal	n = 3
Clontech-Plazenta (Positiv Kontrolle)	normal	n = 1
Zellen	Pathologien	
Term-Trophoblasten	Normal	n = 3
First-Trimeser-Trophoblasten 7.+ 8.SSW, 11. + 12.SSW	Normal	n = 3
Arterielle Endothelzellen	Normal	n = 3
	Diabetisch	n = 3
Venöse Endothelzellen	Normal	n = 3
	Diabetisch	n = 3
Hofbauer-Zellen	Normal	n = 3

Die Proben wurden zunächst mit Lämmli-Puffer 1:1 verdünnt und anschließend bei 95°C für 5 Minuten erhitzt. Die Erhitzung sorgt dafür, dass sich die gesuchten Peptide von möglichen Bindungsproteinen trennen und Tertiär- und Sekundärstrukturen aufbrechen. Im Anschluss daran wurden die Proben für 15 Sekunden zentrifugiert und auf Eis gelegt. Das ausgewählte Gel (Biorad Mini-Protean TGX 10% Gel #456-1036), sowie die Phorese-Kammern wurden kurz mit Aqua Dest abgespült und mit SDS-Puffer aufgefüllt. Das Auswaschen der 15 Wells mit SDS Puffer und die Untersuchung auf mögliche Schäden erfolgte mittels einer 100µl Pipette. Zur Markierung der Blots wurde der Standard Page Ruler Prestained Protein Ladder 26616 verwendet. Die Proben und der Page Ruler wurden anschließend in die Wells pipettiert und die Phorese-Kammern abgedeckt. Die Elektrophorese lief bei 120V für 1 Stunde zur Auftrennung der Proteine.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit dem Gerät Trans Blot Turbo von Biorad auf eine Membran (Mini Format, 0.2µm PVDF, Single Applicationm Cat. #170-4156 von Bio Rad) übertragen. Die verwendete Einstellung lautete Programm Mixed MW 2.5V 25A für 10 Minuten. Im Anschluss wurden die Membranen für 5 Minuten in Ponceau Red S eingelegt. Mit Hilfe von Quantity One 4.6.9 von Biorad wurden die Bilder entwickelt. Nach

Abwaschen des Ponceau mittels TBE-Puffer, und blocken der Proteine mit Hilfe von 5% Milch (Not Fat dry Milk, Blocking Grad Blocker von Biorad) in TBE-Puffer, wurden die Membranen über Nacht bei 4 Grad mit dem 1. Antikörper (Mouse anti-Human Adrenomedullin, MBS2001363, MyBioSource, San Diego,CA, US) inkubiert. Nach der Inkubation folgte erneut für 1 Stunde die Waschung in der Pufferlösung, 1 Stunde Inkubation in dem sekundären Antikörper (goat anti mouse IgG) und wieder 1 Stunde Reinigung in TBE-Puffer. Der sekundäre Antikörper diente der Detektion der Proteine. Mit Super Sinal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo scientific) wurden am Ende die Membranen entwickelt, in dem die beiden Reagenzien 1:1 miteinander gemischt und danach aufgetragen wurden. Die anschließende Entwicklung erfolgte mit dem Gerät Quantity One 4.6.9 von Biorad. Auswertung der Bilder, statistische und graphische Verarbeitung wurden mit den Programmn Digidoc100, Microsoft Excel und IBM SPSS durchgeführt. Um die Detektionswerte normieren zu können wurden die Membranen nach demselben Prinzip auf β -Actin untersucht.

3.5 Quantitative real-time PCR

Die Experimente wurden mit Proben folgender Gewebe und Zellen durchgeführt:

Tabelle 12: Proben für die RT-PCR

Humane Plazenta	Pathologien	
Term-Plazentagewebe	normal	n = 3
	diabetisch	n = 3
First-Trimester- Plazenta 8.-10.SSW	normal	n = 3
Zellen	Pathologien	
Term-Trophoblasten	Normal	n = 3
First-Trimester-Trophoblasten 7.,9.,11. SSW	Normal	n = 3
Arterielle Endothelzellen	Normal	n = 3
	Diabetisch	n = 3
Venöse Endothelzellen	Normal	n = 3
	Diabetisch	n = 3
Hofbauer-Zellen	Normal	n = 3

Folgende Reagenzien wurden für die Messung der mRNA verwendet:

- Random Hexamer Primer von Fermentas (Vilnius, Litauen), 0,2µg/ml S1042
- dNTP Mix von Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) 100mM
- 5 x First Strand Buffer von Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien)
- DTT von Invitrogen 0,1M (Carlsbad, Kalifornien)
- SuperScript II RT von Invitrogen 200u/µl (Carlsbad, Kalifornien)
- ADM Hs00969450_g1, Cat. # 4331182 Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Wien, Österreich)
- PPIA, Hs04194521_s1 Cat. # 4331182, Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Wien, Österreich)

Der RNA-Gehalt der Proben war schon bekannt und konnte den entsprechenden Tabellen entnommen werden.

Tabelle 13: RNA-Gehalt der RT-PCR-Proben

Probe	Konzentration ng/µl
Arterielle Endothelzellen gesund	664
Arterielle Endothelzellen gesund	541
Arterielle Endothelzellen gesund	639
Arterielle Endothelzellen diabetisch	428,4
Arterielle Endothelzellen diabetisch	251,8
Arterielle Endothelzellen diabetisch	409,3
Venöse Endothelzellen gesund	371
Venöse Endothelzellen gesund	836
Venöse Endothelzellen gesund	790
Venöse Endothelzellen diabetisch	252,9
Venöse Endothelzellen diabetisch	565,2
Venöse Endothelzellen diabetisch	315,7
Term-Trophoblasten	105,3
Term-Trophoblasten	133
Term-Trophoblasten	82,9
First-Trimester-Trophoblasten 7.SSW	199,3
First-Trimester-Trophoblasten 9. SSW	393,6
First-Trimester-Trophoblasten 11.SSW	166,8
Hofbauer-Zellen	543,3
Hofbauer-Zellen	317,9
Hofbauer-Zellen	326,8
First-Trimester-Plazentagewebe 8. SSW	442,6
First-Trimester-Plazentagewebe 9. SSW	502,2
First-Trimester-Plazentagewebe 10. SSW	568,9
Term-Plazentagewebe gesund	305,2
Term-Plazentagewebe gesund	361,5
Term-Plazentagewebe gesund	230,4
Term-Plazentagewebe diabetisch	163,2
Term-Plazentagewebe diabetisch	252,9
Term-Plazentagewebe diabetisch	200,9

Bei den Zielgenen handelte es sich um Adrenomedullin und das house keeping Gene Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA).

Nach dem Auftauen der Proben wurde 1µg der RNA auf 20µl mit Aqua Dest vermengt. Zu diesen 20µl wurden zusätzlich 2µl Random Primer, 2µl dNTP und 4µl Mastermix dazu pipettiert. Anschließend wurden die Proben bei 65°Celsius für 5 Minuten inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurde zu jeder Probe 14µl Mastermix, bestehend aus 8µl First Strand Buffer, 4µl 0,1m DTT und 2µl RNase Inhibitor, hinzugefügt und erneut für 2 Minuten bei 25°Celsius inkubiert.

Danach erfolgte die Inkubation für 2 Minuten bei 25°Celsius. Anschließend wurde jeder Probe 2µl Super Script II RT hinzugefügt und mit Hilfe einer PCR-Maschine folgendermaßen inkubiert.

- 10 Minuten bei 25°Celsius
- 50 Minuten bei 42° Celsius
- 15 Minuten bei 70° Celsius

Diese Schritte dienten dazu aus der mRNA cDNA herzustellen, weil nur diese in der RT-PCR verwendet werden kann. Der Inkubation folgend wurden die Proben auf Eis gekühlt. Um die RealTime-PCR nun durchführen zu können wurden 2µl cDNA mit 5µl Taqman Universal MM, 2.5µl Aqua Dest und 0.5µl Taqman Gene Expression Assay vermengt. Dieser Vorgang wiederholte sich für jede Probe 3 Mal um eine technische Dreifachbestimmung zu bekommen. Als no template controls (NTC) wurde Aqua Dest verwendet, um eine mögliche Kontamination der Versuchsreihe auszuschließen. Jede Probe wurde anschließend dreimal je 10µl pro well nach vorgefertigtem Pipettierschema in die 96-Well Reaction Plate (Roche, Mannheim) pipettiert, mit Klebefolie versiegelt und nach kurzem Zentrifugieren (850rpm) im Thermocycler AB7900 amplifiziert.

Die CT-Werte wurden automatisch von der Software SDS2.2 ermittelt. Die relative Genexpression wurde mit dem housekeeping gene PPIA als Referenz mittels der Standard $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode ermittelt. Im Anschluss wurden die Fold Change-Werte errechnet. Danach erfolgte die graphische Darstellung der Ergebnisse, wobei gesundes Plazentagewebe als Kontrollwert mit 100% diente und die anderen Proben in Relation gesetzt wurden.

4 Ergebnisse – Resultate

4.1 Mid-regional-ProAdrenomedullin (MR-ProADM)

Bei den Messungen von Mid-regional-ProAdrenomedullin (MR-ProADM) wurden gemischte Nabelschnurblut-Plasmaproben von 28 gesunden Probandinnen und 37 Probandinnen mit diagnostiziertem Gestationsdiabetes verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass keine der Probandinnen an Nierenerkrankungen, koronaren Herzkrankheiten oder Präeklampsie litt. Zur Ermittlung evtl. Einflüsse auf die MR-ProADM-Konzentrationen im Plasma wurden der BMI der Mutter kurz vor der Geburt, die Schwangerschaftsdauer, das Gewicht des Kindes, die Länge des Kindes, der Ponderal Index und das Plazentagewicht erhoben. Ebenfalls wurde überprüft ob die MR-ProADM-Konzentrationen im Nabelschnurblut mit den Geburtsmodi korrelieren. Im Weiteren werden Schwangere ohne Gestationsdiabetes als Kontrollen und Schwangere mit Gestationsdiabetes als GDM bezeichnet. Das M in den Tabellen bezeichnet den Mittelwert, SD die Standardabweichung (standard deviation) und SE für Standardfehler (standard error).

Tabelle 14: Klinische Parameter von Mutter und Kind

Klinische Parameter Mutter						
Parameter	Gruppen	Anzahl Proben	M	SD	SE	p-Wert
BMI bei Geburt	Kontrollen	20	30,6	6	1,4	0,12
	GDM	21	33,6	5,9	1,3	
Schwangerschaftsdauer	Kontrollen	28	274d	7,5d	1,4	0,07
	GDM	36	270d	10,8d	1,8	
Klinische Parameter Fetus						
Geburtsgewicht	Kontrollen	28	3514g	473g	89g	0,17
	GDM	37	3342g	500g	82g	
Länge	Kontrollen	28	51cm	2,3cm	0,4cm	0,37
	GDM	37	50cm	2,6cm	0,4cm	
Ponderal Index kg/m³	Kontrollen	28	26,13	2,14	0,41	0,52
	GDM	37	25,75	2,5	0,41	
Plazentagewicht	Kontrollen	27	638g	141g	27g	0,11
	GDM	31	710g	186g	33g	

Tabelle 15: MR-ProADM-Konzentration im Nabelschnurblut bei Kontrollen und GDM

MR-ProADM-Konzentrationen bei Kontrollen und GDM					
Gruppen	Anzahl Proben	MR-ProADM	SD	SE	p-Wert
Kontrollen	28	1,06 nmol/l	0,25	0,05	0,003
GDM	37	1,25 nmol/l	0,26	0,04	

Tabelle 16: MR-ProADM-Konzentrationen im Nabelschnurblut bei Sectiones und Spontangeburt

MR-ProADM-Konzentrationen in Bezug zu den Geburtsmodi					
Gruppen	Anzahl	MR-ProADM	SD	SE	p-Wert
Spontan	21	1,08 nmol/l	0,17	0,04	0,076
Sectio	43	1,20 nmol/l	0,3	0,05	

Die Werte von MR-ProADM lagen bei den Kontrollen im Mittel bei 1,06 nmol/L. Der Mittelwert bei den GDM lag bei 1,25 nmol/L. Damit konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen von MR-ProADM im Nabelschnurblut bei Probandinnen mit Schwangerschaftsdiabetes im Mittel höher lagen als bei gesunden Probandinnen. Hier zeigte sich eine statistische Signifikanz ($p = 0,003$). Das Plazentagewicht lag bei den Kontrollen im Mittel bei 638g und bei den GDM bei 710g ($p=0,11$). Die Schwangerschaft dauerte bei den Kontrollen im Mittel 4 Tage länger ($p=0,07$). Das Gewicht der Feten lag bei den Kontrollen im Mittel bei 3514g und bei den GDM bei 3342g. Es konnte gezeigt werden, dass die Feten im Durchschnitt bei den Kontrollen schwerer waren ($p=0,17$). Die Größen der Feten lagen nahe beieinander mit 51cm bei den Kontrollen und 50cm bei den GDM ($p=0,37$). Bei 20 Kontrollen und 21 GDM wurde der BMI kurz vor der Geburt erhoben. Der BMI bei den Kontrollen lag im Mittel bei 30,6 und bei den GDM bei 33,6. Damit konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen vom BMI bei den GDM im Mittel höher lagen als bei den Kontrollen ($p=0,12$). Der Ponderal Index der Feten lag bei den Kontrollen mit 26,13 kg/m³ im Mittel höher als bei den GDM mit 25,75 kg/m³. Eine Korrelation zwischen dem Ponderal Index und dem MR-ProADM war nicht erkennbar (Siehe Abbildung 5). Die MR-ProADM Konzentration lag bezogen auf Spontangeburt im Mittel bei 1,08 nmol/l und bei den Sectiones bei 1,2nmol/l. Der Konzentrationsunterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0,076$).

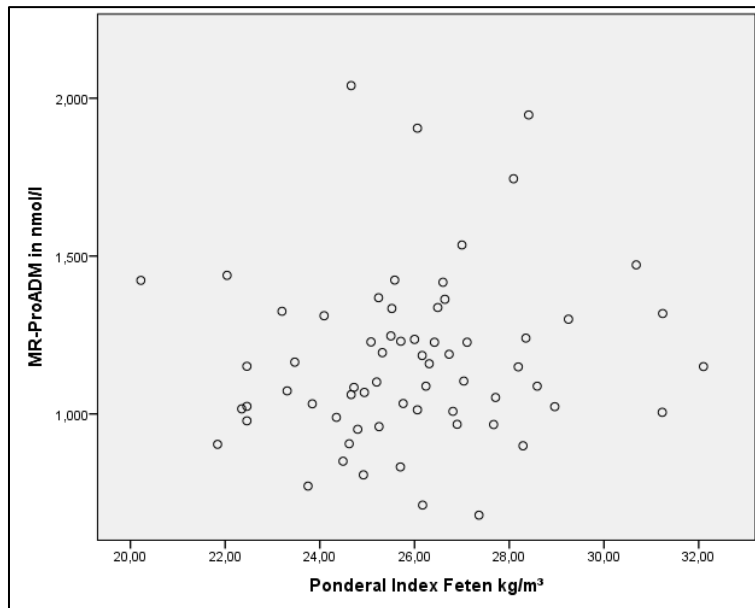


Abbildung 8: Beziehung MR-ProADM zum Ponderal Index kg/m^3

4.2 Ergebnisse Westernblot

Vor der Analyse sind die entsprechenden Ergebnisse zur Veranschaulichung in Form von Bildern und Graphiken dargestellt.

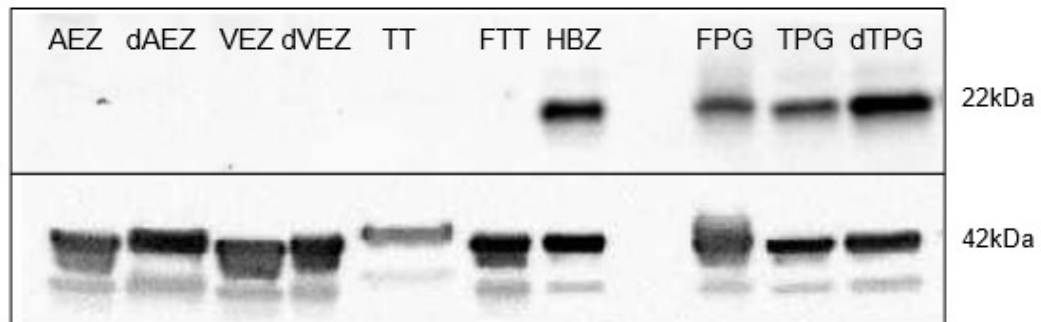


Abbildung 9: Westernblot ADM und β -Actin

AEZ = arterielle Endothel-Zellen, dAEZ = diabetische arterielle Endothel-Zellen, VEZ = venöse Endothel-Zellen, dVEZ = diabetische venöse Endothel-Zellen, TT = Term-Trophoblasten, FTT = First-Trimester-Trophoblasten, HBZ = Hofbauer-Zellen, FPG = First-Trimester Plazenta-Gewebe, TPG = nicht diabetisches Term-Plazenta-Gewebe, dTPG = diabetisches Term-Plazenta-Gewebe

Es wurden zu Beginn der Versuchsreihe drei Westernblots durchgeführt. Bei den verwendeten Proben handelte es sich um Zellen und Gewebe, die von Plazenten entnommen und dann kultiviert wurden. In jedem Westernblot wurden von links nach rechts nicht diabetische arterielle Endothelzellen (AEZ), diabetische arterielle Endothelzellen (dAEZ), nicht diabetische venösen Endothelzellen (VEZ), diabetische venöse Endothelzellen (dVEZ), Term-Trophoblasten (TT), First-Trimester-Trophoblasten (FTT), Hofbauer-Zellen (HBZ), First-Trimester Plazentagewebe (FPG), nicht diabetisches Term-Plazentagewebe (TPG) und diabetisches Term-Plazentagewebe (dTPG) einpipettiert. Zuerst wurden die Proben auf die Expression von ADM untersucht, anschließend zur Normierung auf β -Actin (siehe als Beispiel Abbildung 6). Bei allen drei Westernblots konnte kein ADM in den diabetischen arteriellen Endothelzellen (AEZ), in den diabetischen arteriellen Endothelzellen (dAEZ), in den nicht diabetischen venösen Endothelzellen (VEZ), in den diabetischen venösen Endothelzellen (dVEZ), in den Term-Trophoblasten und in den First-Trimester-Trophoblasten nachgewiesen werden. Bei allen drei Westernblots konnte ADM in den Hofbauerzellen (HBZ), im First-Trimester-Plazentagewebe (FPG), im nicht diabetischen Term-Plazentagewebe (RPG) und in diabetischen Term-Plazentagewebe (dRPG) detektiert werden. Die Detektionswerte wurden anschließend sowohl für ADM als auch β -Actin mit Hilfe der Software Digidoc 100 errechnet und zur Normierung miteinander dividiert (Area Units). Die Ergebnisse der Division der Detektionsstärken eines einzelnen Westernblots sind beispielhaft in Abbildung 8 dargestellt. Abbildung 9 zeigte die Mittelwerte der ersten drei Westernblots als Vergleich.

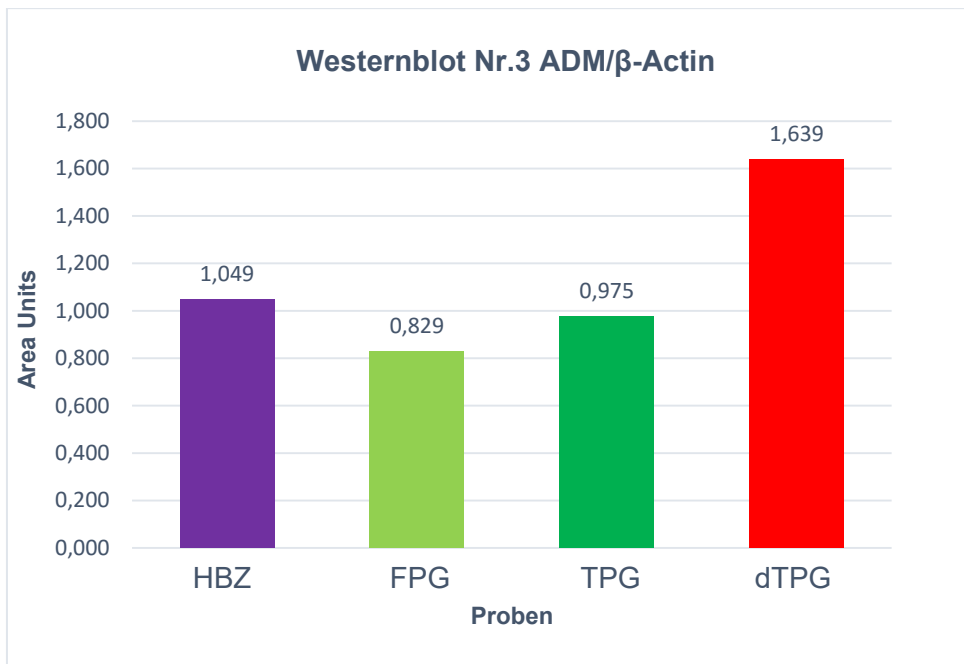


Abbildung 10: Westernblot ADM/β-Actin

HBZ = Hofbauer-Zellen, FPG = First-Trimester Plazentagewebe, TPG = nicht diabetisches Term-Plazenta-Gewebe, dTPG = diabetisches Term-Plazenta-Gewebe

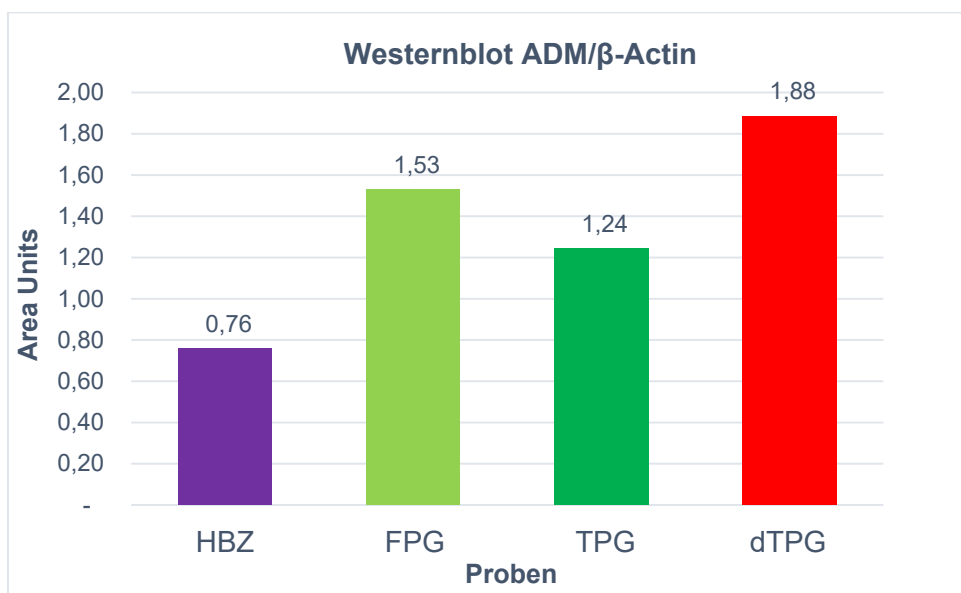


Abbildung 11: Mittelwerte aller Westernblots ADM/β-Actin

HBZ = Hofbauer-Zellen, FPG = First-Trimester Plazentagewebe, TPG = nicht diabetisches Term-Plazenta-Gewebe, dTPG = diabetisches Term-Plazenta-Gewebe

Den niedrigsten Wert im Mittel hatten die Hofbauer-Zellen (HBZ) mit einer errechneten Area Unit von 0,76. Danach folgte das Term-Plazentagewebe (TPG) mit 1,24, dann das First-Trimester Plazentagewebe 1,53 (dTPG). Am meisten wurde ADM von diabetischen Term-Plazentagewebe (dTPG) exprimiert (1,88). Um einen möglichen Unterschied zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Proben zu entdecken, wurde ein weiterer Westernblot angefertigt, der die Clontech-Plazenta zur Normierung, jeweils sechs Proben diabetisches und nicht-diabetisches Term-Plazenta-Gewebe enthielt. Die ermittelten Werte wurden erneut durch das housekeeping Gene β -Actin dividiert. Die Verteilung der Proben sowie die graphische Darstellung können den Abbildungen 10, 11 und 12 entnommen werden.

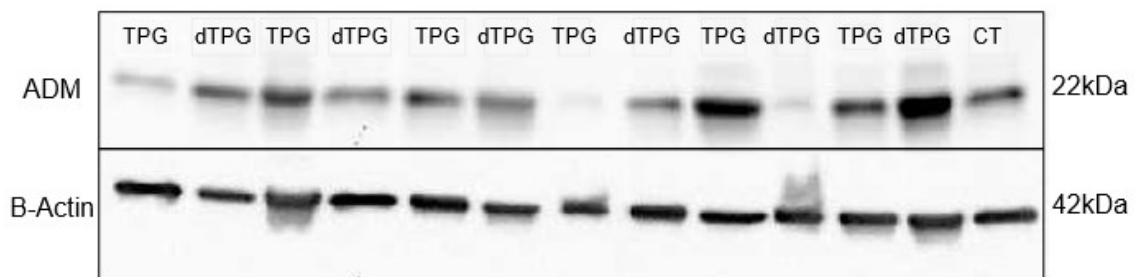


Abbildung 12: Westernblot

TPG = nicht diabetisches Term-Plazentagewebe, dTPG = diabetisches Term-Plazentagewebe, CT=Clontech-Plazentagewebe

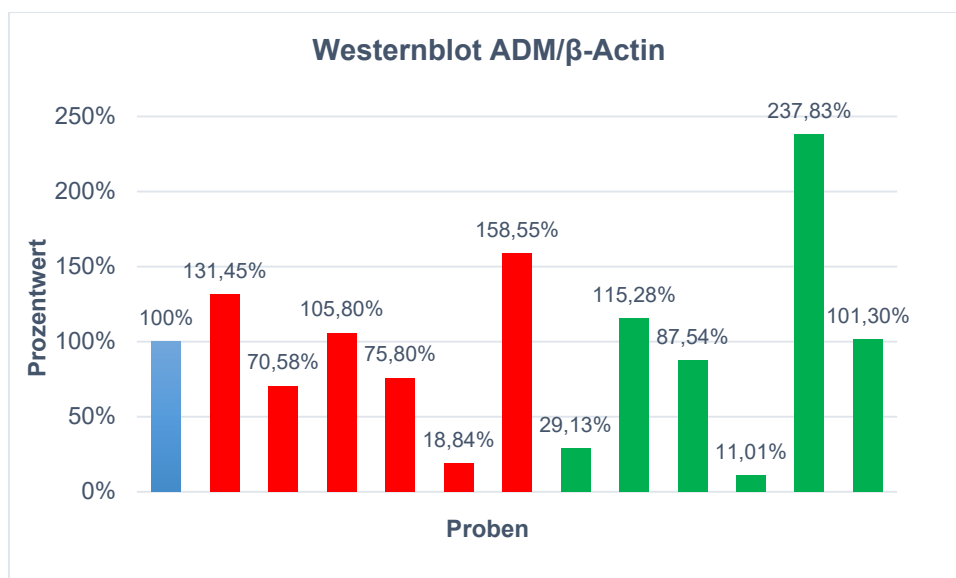


Abbildung 13: Westernblot ADM/ β -Actin auf Clontech-Plazenta normiert

Blau = Clontech Plazenta (Positiv-Kontrolle), rot = diabetisches Term-Plazentagewebe, grün = nicht diabetisches Term-Plazentagewebe

Wie in Abbildung 11 erkennbar zeigten die Proben starke Schwankungen und es war keine Tendenz für eine stärkere Expression erkennbar, weder bei den nicht diabetischen Term-Plazentageweben (grün) noch bei den diabetischen Term-Plazentageweben (rot).

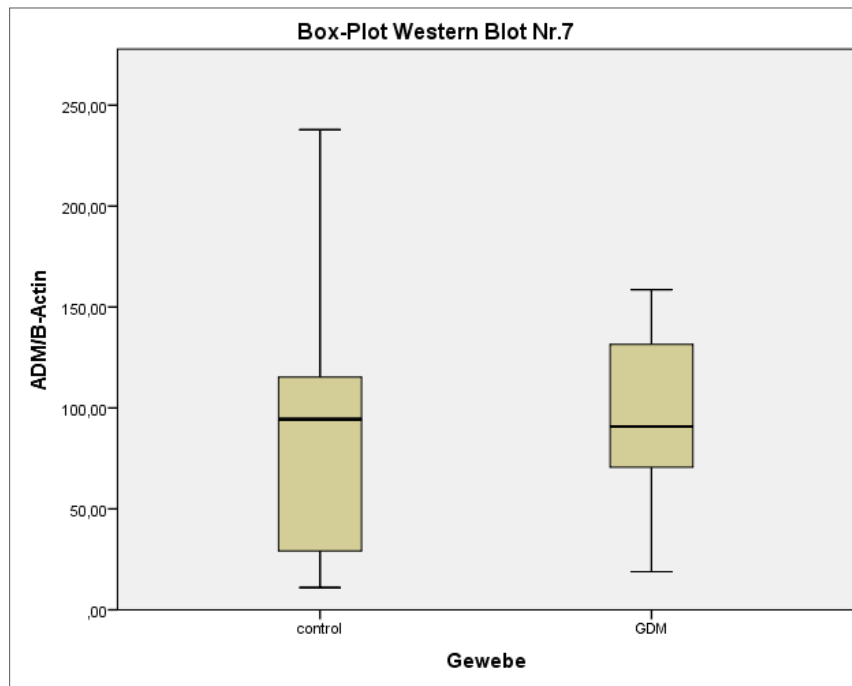


Abbildung 14: Verteilung der Ergebnisse ADM/β-Actin bei GDM vs control

Control = nicht diabetisches Term-Plazentagewebe, GDM = diabetisches Term-Plazentagewebe

Zur visuellen Darstellung der Werteverteilung wurde ein Boxplot mit den Werten des letzten Westernlots erstellt. Im Boxplot erkennbar ist, dass die Verteilung bei den Ergebnissen der Kontrollen breiter ist als bei den GDM. Jedoch liegen die Mediane sehr nahe beieinander, und ein großer Verteilungsunterschied ist nicht erkennbar.

4.3 Ergebnisse PCR

Das unten abgebildete Diagramm zeigt die mRNA Expression von ADM dividiert durch das house keeping Gen PPIA. Bei den verwendeten Proben handelte es sich um kultivierte Zellen und Gewebe aus Plazenten. Verwendet wurden Term-Trophoblasten, First-Trimester-Trophoblasten, nicht diabetisches Term- Plazentagewebe, diabetisches Term-Plazentagewebe, First-Trimester Plazentagewebe, diabetische venöse Endothelzellen, nicht diabetische venöse Endothelzellen, diabetische arterielle Endothelzellen, nicht diabetische arterielle Endothelzellen und Hofbauerzellen. Das nicht diabetische Term-Plazenta-Gewebe wurde zur Darstellung der Verhältnismäßigkeit auf 100% gesetzt. Im Vergleich zu dieser Probe exprimierten die anderen Gewebe mRNA in folgenden Detektionsstärken.

- Term-Trophoblasten: 189%
- First-Trimester-Trophoblasten: 57%
- diabetisches Term-Plazentagewebe: 30%
- First-Trimester Plazentagewebe: 26%
- venöse Endothel-Zellen: 19%
- arterielle Endothel-Zellen: 12%
- diabetische venöse Endothel-Zellen: 6%
- Hofbauer-Zellen: 6%
- Diabetische arterielle Endothelzellen 3%

Im Vergleich zum nicht diabetischen Term-Plazentagewebe, war die mRNA-Konzentration in den Term-Trophoblasten deutlich höher, während bei den anderen Gewebe- und Zelltypen die Menge an mRNA im Vergleich deutlich darunter lag. Die nicht diabetischen arteriellen Endothelzellen exprimierten deutlich mehr mRNA (12%) als die diabetischen (3%). Ebenfalls zeigten die nicht diabetischen venösen Endothelzellen (19%) eine verstärkte mRNA-Expression im Vergleich zu den diabetischen (6%). Das nicht diabetische Term-Plazentagewebe (100%) zeigte eine mRNA-Expression die drei Mal so hoch war wie bei dem diabetischen Term-Plazentagewebe (30%) und vier mal so hoch wie beim First-Trimester-Plazentagewebe. Die Term-Trophoblasten mit 189% hatten im Vergleich mit den First-Trimester-Trophoblasten (57%) einen mRNA-Gehalt der drei Mal höher lag.

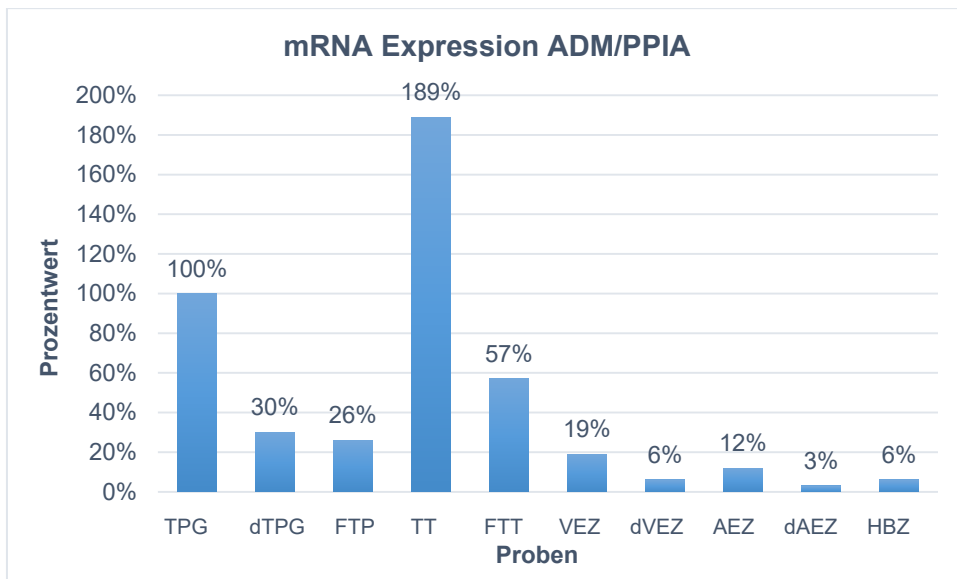


Abbildung 15: mRNA-Expression ADM/PPIA

TPG = nicht diabetisches Term – Plazentagewebe, dTPG = diabetisches Term-Plazentagewebe, FPG = First-Trimester Plazentagewebe, TT = Term-Trophoblasten, FTT = First-Trimester-Trophoblasten, VEZ = venöse Endothel-Zellen, dVEZ = diabetische venöse Endothel-Zellen, AEZ = arterielle Endothel-Zellen, dAEZ = diabetische arterielle Endothel-Zellen, HBZ = Hofbauer-Zellen

5 Diskussion

5.1 Diskussion MR-ProADM

Bei Adrenomedullin handelt es sich um einen potenten Vasodilatator der ubiquitär im Körper produziert wird. Seine Konzentration im Plasma steigt bei verschiedenen Erkrankungen an (1) und spielt möglicherweise eine bedeutende Rolle während der Schwangerschaft. Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen ob sich im gemischten Nabelschnurblutplasma von Feten, deren Mütter an Gestationsdiabetes erkrankten, MR-ProADM in höheren Konzentrationen nachweisen lässt im Vergleich zu nicht diabetischen Kontrollen, und ob MR-ProADM als zukünftiger Biomarker von Gestationsdiabetes etabliert werden kann. Zusätzlich wurde der Protein- und mRNA-Gehalt von ADM in den verschiedenen Zelltypen und Geweben der humanen Plazenta gemessen.

Das wichtigste Ergebnis meiner Studie war, dass die gemessene Konzentration von MR-ProADM bei der Gruppe mit Gestationsdiabetes signifikant höher als bei den Kontrollen war (1,25nmol/l vs 1,06nmol/l, $p=0,003$). Dieses Ergebnis bestätigt meine aufgestellte Hypothese, dass die Konzentration von MR-ProADM in Neugeborenen deren Mütter an Gestationsdiabetes erkrankten, bei Geburt erhöht ist. ADM und seine Rezeptoren werden in den meisten Geweben des Körpers exprimiert und produziert. Es besitzt neben seinen vasodilatatorischen Eigenschaften auch Einfluss auf verschiedene Stoffe und physiologische Vorgänge im Körper und ist in seiner Komplexität bisher noch nicht vollständig verstanden (1). ADM und seine Vorstufe MR-ProADM mit Bezug auf Gestationsdiabetes ist in der Literatur kaum beschrieben. Um den Anstieg von MR-ProADM interpretieren zu können, ist es notwendig auch die Literatur miteinzubeziehen, die den Zusammenhang zwischen ADM und Diabetes Mellitus Typ-2 untersucht hat, da Diabetes Mellitus Typ-2 und Gestationsdiabetes ähnliche pathophysiologische Merkmale teilen (1). In mehreren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass der Plasmaspiegel von ADM bei Diabetes mellitus Typ-2 im Vergleich zu gesunden Kontrollen ansteigt, was mit den meinen eigenen Ergebnissen in Bezug auf MR-ProADM übereinstimmt (54,55). Da ADM vasoprotektive und vasodilatative Eigenschaften besitzt und bei Typ-2-DiabetikerInnen möglicherweise vor Atherosklerose schützt (55), kann man unter diesen Aspekt zunächst darauf schließen, dass ADM als potenter Vasodilatator (1) ausgeschüttet wird um mögliche Durchblutungsstörungen im fetoplazentaren Kreislauf zu kompensieren. Eine weitere mögliche Ursache für die vermehrte MR-ProADM-Produktion ist die mit Gestationsdiabetes verbundene Hyperglykämie im fetalen Kreislauf. Es wurde in der Literatur mehrfach nachgewiesen, dass der Plasma-ADM-Spiegel mit dem Glukose-Spiegel bei Typ-2-DiabetikerInnen korreliert (55). In Bezug auf den Gestationsdiabetes

könnte dies bedeuten, dass der gesteigerte Anstieg von Glukose und die nachfolgende Hyperglykämie im fetalen Kreislauf zu einem Anstieg von MR-ProADM führen, bzw. damit korrelieren.

Zusätzlich führen Störungen des Glukosestoffwechsels zu vermehrten Entzündungsvorgängen wie Endothelitis und oxidativen Stress und damit zu einer gesteigerten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie TNF- α und IL-1 β . Diese proinflammatorischen Zytokine führen ebenfalls zu einer gesteigerten Ausschüttung von ADM (55) und könnten auch eine mögliche Ursache für die vermehrte Produktion von MR-ProADM im fetalen Kreislauf bei Gestationsdiabetes sein.

Sugulle et al. untersuchten die MR-ProADM Konzentrationen in mütterlichem Plasma von gesunden Kontrollen und Probandinnen mit Gestationsdiabetes. Die errechneten Mittelwerte lagen bei 1,15nmol/L und 1,34nmol/L (56). Die Mittelwerte dieser Untersuchung im peripheren Blut der Mutter und den gemessenen Konzentrationen im Neugeborenen sind vergleichbar, sodass möglicherweise die Konzentrationen von MR-ProADM in mütterlichem Plasma und Nabelschnurblut-Plasma des Feten korrelieren. Dies könnte bedeuten, dass die MR-ProADM-Konzentration nicht nur mit den pathophysiologischen Vorgängen im fetalen Kreislauf und der Plazenta, sondern auch mit denen der Mutter zusammenhängen. Diese Korrelation wäre bei Verwendung als Biomarker vorteilhaft, da periphere Blutabnahmen bei der Mutter weniger invasiv sind, als die Punktion von Nabelschnurblut während der Schwangerschaft, und man durch periphere Blutabnahmen Rückschlüsse auf die MR-ProADM- und damit ADM-Konzentrationen im fetalen Kreislauf schließen könnte.

Im Rahmen der eigenen Untersuchung wurden weitere klinische Parameter mit MR-ProADM-Konzentrationen in Zusammenhang gebracht um die möglichen Auswirkungen auf Plazenta und fetales Wachstums zu verstehen. Der erste Parameter war die Schwangerschaftsdauer. Der Unterschied bei der Schwangerschaftsdauer betrug im Mittel jedoch nur vier Tage und kann damit als bedeutender Einfluss ausgeschlossen werden. Bei dem Geburtsgewicht zeigte sich in den Gruppen kein signifikanter Unterschied. Im Regelfall ist das Gewicht der Kinder bei Schwangeren mit Gestationsdiabetes höher als bei Schwangeren ohne Gestationsdiabetes (8). Jedoch muss dies bei einer guten metabolischen Einstellung des Gestationsdiabetes nicht sein. Die Plazenta war bei den Schwangeren mit Gestationsdiabetes im Durchschnitt schwerer, jedoch stellte sich dieser Unterschied nicht als signifikant heraus. Dennoch ist ein vermehrter Einfluss auf die Produktion von MR-ProADM durch die größere Plazenta nicht auszuschließen und müsste mit größeren Fallzahlen noch einmal kontrolliert werden.

Die Gruppe mit Gestationsdiabetes war in dieser untersuchten Kohorte übergewichtig mit einem BMI von 33,6 kg/m². Auch dieser Unterschied zwischen GDM und Kontrollen war nicht signifikant, dennoch kann ein möglicher Einfluss derzeit nicht ausgeschlossen werden. Um zu untersuchen ob MR-ProADM-Konzentration mit dem Schweregrad des Gestationsdiabetes ansteigt, wäre es von Interesse Schwangere zu untersuchen bei denen der Gestationsdiabetes unterschiedlich stark ausgeprägt ist, mit einer verpflichteten Insulintherapie bzw. wo der Gestationsdiabetes trotz Behandlung keine optimale Besserung zeigt.

In einer Vergleichsstudie versuchten Smith et al. MR-ProADM-Konzentrationsunterschiede zwischen Schwangeren mit Gestationsdiabetes und Schwangeren mit Typ 1 oder Typ 2 Diabetes zu finden. In dieser Studie wurden Plasma-Proben aus venösem Nabelschnurblut entnommen. Die Schwangeren hatten alle nach der 36 Schwangerschaftswoche entbunden. Im Vergleich zu unserer Studie, beinhaltete die Studie jedoch keine gesunde Kontrollgruppe (57). Insgesamt, gab es in dieser Vergleichsstudie 63 Probandinnen, davon 35 mit Gestationsdiabetes diagnostiziert. Die restlichen 23 Frauen hatten bereits vor der Schwangerschaft diagnostizierten Typ-1- oder Typ-2-Diabetes. Der Mittelwert für MR-ProADM lag in dieser Studie bei Schwangeren mit Gestationsdiabetes bei 1,01nmol/L und damit deutlich unter unserem gemessenen Mittelwert. Wegen der fehlenden Kontrollgruppen konnte kein Unterschied zwischen Schwangeren mit Gestationsdiabetes und Kontrollen gemessen werden. In Bezug auf die Geburtsmodi kam die Studie allerdings zu dem Ergebnis, dass die MR-ProADM-Konzentrationen bei vaginaler Geburt höher lagen, als bei Sectiones. Die These von Smith et al. lautet, dass die Werte den perinatalen Stress reflektieren. Obwohl die Streubreite der MR-ProADM-Konzentrationen in der eigenen Untersuchung bezogen auf den Geburtsmodus bei den Sectiones höher war, konnte bei unseren Ergebnissen ein signifikanter Unterschied nicht bestätigt werden. Sowohl Smith als auch Sugulle (56,57) versuchten einen Unterschied zwischen Schwangerschaftsdiabetes und Schwangeren mit vorher existierenden Typ 2-Diabetes zu ermitteln. Beide genannten Studien konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Diabetes-Typen während der Schwangerschaft feststellen. Sollte sich dies in weiteren Untersuchungen bestätigen lassen, dann wären die Ergebnisse zu MR-ProADM nicht nur repräsentativ für Schwangere mit Gestationsdiabetes, sondern auch für schwangere Typ-2-Diabetikerinnen und möglicherweise auch für Schwangere mit Typ-1-Diabetes. Gestationsdiabetes und Diabetes Mellitus Typ-2 teilen viele Risikofaktoren, pathophysiologische Vorgänge, ähnliche inflammatorische Reaktionen, endotheliale Dysfunktionen und/oder hämodynamische Alterationen, daher wären korrelierende MR-ProADM-Spiegel

plausibel. Es gibt weitere mögliche Parameter von denen es interessant wäre diese bei weiteren Studien zu untersuchen. Zunächst könnte man Schwangeren mit Gestationsdiabetes nach der Behandlungsart einteilen und prüfen ob die diätische Behandlungsart, die Applikation von Metformin (39) oder die Gabe von Insulin einen möglichen Einfluss auf die MR-ProADM-Konzentration haben, da man inzwischen weiß, dass zumindest Insulin und ADM negativ miteinander korrelieren (55). Des Weiteren gibt es viele Parameter wie Stress, Fieber, Hypertonie und diverse Erkrankungen, die einen möglichen Einfluss auf die Produktion von MR-ProADM haben und im Rahmen dieser Untersuchung nicht miterfasst werden konnten, die aber bei weiteren Untersuchungen von großem Interesse sein könnten.

5.2 Diskussion Westernblot

Im Westernblot wurden verschiedene Zelltypen und Plazentagewebe gegenüber gestellt und es wurde ADM-Protein in diesen Proben detektiert. Damit sollte festgestellt werden ob die höheren MR-ProADM-Werte im Nabelschnurblutplasma auf eine plazentare Produktion rückzuführen sind. Ebenfalls war es von Interesse herauszufinden, welche Zellen für vermehrte ADM-Produktion zuständig sind. Es zeigte sich, dass die Hofbauerzellen, das First-Trimester-Plazentagewebe (Gestationsdiabetes und Kontrolle) ADM am höchsten exprimieren. Das diabetische Term-Plazentagewebe zeigte auch eine sehr hohe ADM-Proteinexpression. Auch wenn dieses Ergebnis nicht signifikant war, weist dies darauf hin, dass die Plazenta ADM und seine Vorstufe MR-ProADM in die Nabelschnur sezerniert, und dies bei Gestationsdiabetes in vermehrtem Ausmaß geschieht. Bei dem zusätzlich durchgeführten Westernblot zeigten die diabetischen und nicht diabetischen Plazentaprobe starke Schwankungen in der ADM-Produktion, sodass derzeit kein genereller Rückschluss gezogen werden kann. Da es sich beim Westernblot um eine semiquantitative Methode handelt und ADM-Protein nicht direkt, sondern über Antikörper gemessen wird, kann es sein, dass die vorliegende Methode nicht sensitiv genug ist, um das ADM-Protein quantitativ im Gewebe messen zu können. Ein weiterer möglicher Einfluss könnte das relativ instabile ADM-Protein selber sein. Dieses reife Peptid besitzt eine HWZ von ungefähr 20 Minuten (18) und ist damit im Vergleich zu seiner Vorstufe MR-ProADM (HWZ 72 Stunden) weniger stabil. Ergänzend zu den eigenen Untersuchungen könnte man weitere Studien mit anderen Untersuchungsmethoden durchführen. Eine Möglichkeit wäre die Durchführung der Westernblots und, anstatt das reife ADM, die stabilere Vorstufe MR-ProADM zu bestimmen, um indirekt nachzuweisen ob ADM vermehrt in der Plazenta bei Schwangeren mit Gestationsdiabetes produziert wird.

Es gibt derzeit nicht viele Studien die versucht haben ADM in verschiedenen Geweben der Plazenta zu detektieren. Kanenishi und Co. versuchten mittels Immunhistochemie ADM auf Zytotrophoblast-Zellen nachzuweisen, was jedoch nicht möglich war (17). Dies würde mit den eigenen Ergebnissen übereinstimmen in denen weder Term-Trophoblasten noch First-Trimester-Trophoblasten ADM exprimierten. In derselben Studie konnte ADM in ortständigen Makrophagen der Plazenta nachgewiesen werden (17). Da die Hofbauer-Zellen (plazentare Makrophagen) nachgewiesen mit Immunoblots ebenfalls ADM exprimierten, wäre dies eine weitere Übereinstimmung. Di Lorio und Co. konnten jedoch sowohl in frühen als auch späten Trophoblastzellen ADM mittels Immunhistochemie detektieren (15). Dieses Ergebnis ist in Bezug auf die eigene Proteinbestimmung gegenläufig, würde jedoch mit dem hohen ADM-mRNA-Gehalt in den Trophoblastzellen (siehe 4.3) übereinstimmen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Proben mehrfach aufgetaut wurden und ADM nur eine kurze HWZ hat.

Nach eigenem Kenntnisstand gibt es derzeit keine Studien, die diabetisches und nicht diabetisches Term-Plazentagewebe auf ADM im Vergleich untersucht haben. In dem Review von Hinson und Co. wird beschrieben, dass ADM mittels Immunhistochemie oder Radioimmunoassay in Endothel-Zellen, Trophoblastzellen und Makrophagen des Endometriums nachgewiesen werden konnte (18). Dass ADM in Endothelzellen in anderen Studien detektiert werden konnte, kann nun verschiedene Bedeutungen haben. Zum einen wäre es möglich, dass ADM nicht durch Westernblot in Endothelzellen der Plazenta detektiert werden kann, zum andere produzieren kultivierte Endothelzellen der Plazenta möglicherweise kein ADM. Jedoch scheint letzteres nicht der Fall zu sein, denn nach Durchführung der eigenen RT-PCR konnte sehr wohl ADM-mRNA nachgewiesen und eine gewisse Ableseaktivität bestätigt werden. Es wäre daher von großem Interesse kultivierte Endothelzellen der Plazenta erneut mit anderen Methoden zu untersuchen.

5.3 Diskussion RT-PCR Ergebnisse

Die mRNA-Bestimmung ergab, dass die Term-Trophoblasten, am meisten ADM-mRNA enthielten. In Kombination mit den Ergebnissen der MR-ProADM-Bestimmung im Nabelschnurblut könnte diese bedeuten, dass die Term-Trophoblasten für die erhöhte ADM-Produktion mitverantwortlich sind. Trophoblasten spielen im Rahmen der Frühschwangerschaft eine wichtige Rolle, weil sie dafür sorgen, dass die uterinen Arterien weitgestellt werden, um den plazentaren Blutfluss sicher zu stellen (29). Möglicherweise bedienen sie sich dabei des ADM und sichern in der späteren Schwangerschaft ebenfalls die plazentare Durchblutung. Obwohl im Vergleich mit den anderen Proben erhöhte ADM-mRNA mit der RT-PCR gemessen werden konnte, und

dies ein Hinweis auf eine hohe Ableseaktivität ist, ließ sich im Westernblot kein ADM in den Term-Trophoblasten nachweisen. Eine mögliche Erklärung dafür wären veränderte posttranslatorische Aktivitäten, die unterschiedliche Proteinexpressionen bewirken. Ein anderer Grund liegt möglicherweise darin, dass die RT-PCR mRNA zuverlässig detektieren kann, während der Westernblot als Detektionsmöglichkeit für ADM nicht zuverlässig genug ist, möglicherweise aufgrund von Unspezifität der verwendeten Antikörper. Übereinstimmend mit den Ergebnissen vom Westernblot exprimierten das nicht diabetische Term-Plazentagewebe, das diabetische Term-Plazentagewebe und die Hofbauerzellen auch mRNA.

Bisher gibt es nicht viele Studien, die ADM-mRNA in den unterschiedlichen Zell- und Gewebetypen der Plazenta nachgewiesen haben und als Vergleich für die eigenen Ergebnisse herangezogen werden können. Kanenishi und Co waren in der Lage ADM-mRNA in Plazentagewebe im ersten und dritten Trimenon zu detektieren (17). Dies würde mit den eigenen Untersuchungen übereinstimmen. Jedoch wurde das Plazentagewebe nicht im Vergleich mit diabetischen Plazentagewebe untersucht. Das Review von Hinson und Co. zeigte, dass ADM-mRNA in Endothelzellen nachgewiesen werden konnte (18). Auch diese Studie bestätigt meine eigenen Untersuchungen. Obwohl ADM-mRNA in zahlreichen Geweben nachgewiesen werden konnte, finden sich derzeit keine Studien, die den Unterschied zwischen diabetischen und nicht diabetischen Plazenta-Proben erforscht haben. Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen notwendig. Die Ergebnisse der RT-PCR bestätigen eine hohe Ableseaktivität innerhalb der Plazenta für ADM. Dies spricht für die These, dass die vermehrte Produktion von MR-ProADM im Nabelschnurblut auf die Plazenta rückführbar ist. Weitere Untersuchungen auf die MR-ProADM-mRNA wären von Interesse um einen genauen Einblick zu bekommen.

Die Stärke dieser Arbeit liegt in der Verwendung der stabileren Vorstufe von Adrenomedullin MR-ProADM, welches mit seiner längeren HWZ zuverlässigere Messergebnisse liefert. In dieser Arbeit konnten ein signifikanter Unterschied bei der MR-ProADM-Konzentration ($p=0,003$) in gemischtem Nabelschnurblutplasma von Neugeborenen, deren Mütter an Gestationsdiabetes erkrankten, und Neugeborenen gesünder Mütter gezeigt werden, jedoch ist eine Aussage aufgrund der geringen Probenanzahl derzeit nicht oder nur bedingt möglich. Von daher ist es sinnvoll weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen in den einzelnen Gruppen durchzuführen. Es handelt sich bei dieser Studie um eine Pilot-Studie. Jedoch war der Nachweis, dass es einen signifikanten Unterschied von MR-ProADM-Konzentration zwischen GDM und Kontrollen gibt, möglicherweise ein wichtiger erster Hinweis, dass sich MR-ProADM als

Marker bei Gestationsdiabetes etablieren lassen kann. Es wäre weiterhin von großem Interesse zu überprüfen ob dieser Marker mit dem Schweregrad von Gestationsdiabetes und anderen metabolischen Erkrankungen wie Übergewicht korreliert, und ob eine Korrelation mit dem peripher venösen Blut der Mutter vorhanden ist. Sollte sich MR-ProADM in Zukunft als Biomarker etablieren lassen, wäre es somit ein Laborparameter der zuverlässig und einfach zu bestimmen wäre und ein Vorteil für die Behandlung und Überwachung von Gestationsdiabetes sein könnte.

6 Literaturverzeichnis

- (1) BELTWOSKI J., JAMROZ A.;
Adrenomedullin – What do we know 10 years since its Discovery;
Polish Journal of Pharmacology, 2004, 56, Seite: 5-27
- (2) CHEUNG B.M.Y., TANG F.;
Adrenomedullin: Exciting New Horizons;
Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery,
2012; 6, Seite: 4-17
- (3) HINSON J.P., KAPAS S., SMITH D.M.;
Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptide;
Endocrine Reviews, 2000; 21(2), Seite: 138-167
- (4) CHEUNG B., LEUNG R.;
Elevated plasma levels of human adrenomedullin in cardiovascular, respiratory,
hepatic and renal disorders;
Clinical Science, 1997, 92, Seite: 59-62;
- (5) POYNER D.R., SEXTON P.M., MARSHALL I. ET AL.;
International Union of Pharmacology. XXXII. The Mammalian Calcitonin Gene-
Related Peptides, Adrenomedullin, Amylin, and Calcitonin Receptors;
Pharmacological Reviews, 2002; Vol54 No.2, Seite: 233-246
- (6) KITAMURA K., KATO J., KAWAMOTO M. ET AL.;
The Intermediate Form of Glycine-Extended Adrenomedullin is the Major
Circulating Molecular Form in Human Plasma;
Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998; Vol244 No. 2,
Seite: 551-555
- (7) PIO R., MARTINEZ A., UNSWORTH E.J. ET AL.;
Complement Factor H Is a Serum-binding Protein for Adrenomedullin, and the
Resulting Complex Modulates the Bioactivities of Both Partners;
The Journal of Biological Chemistry, 2001; Vol 276 No. 15, Seite: 12292-12300
- (8) CHUN T.H., ITOH H., TAKATOSHI S. ET AL.;
Oxidative stress augments secretion of endothelium-derived relaxing peptides,
C-type natriuretic peptide and adrenomedullin;
Journal of Hypertension, 2000; Vol18 No 5, Seite: 575-580

- (9) SUGO S., MINAMINO N., SHOJI H. ET AL.;
INTERLEUKIN-1, TUMOR NECROSIS FACTOR AND LIPOPOLYSACCHARIDE
ADDITIVELY STIMULATE PRODUCTION OF ADRENOMEDULLIN IN VASCULAR
SMOOTH MUSCLE CELLS;
Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995; Vol.207 No 1,
Seite: 25-32
- (10) SHIMEKAKE Y., NAGATA K., OHTA S. ET AL.,;
Adrenomedullin Stimulates Two Signal Transduction Pathways, cAMP
Accumulation and Ca²⁺ Mobilization, in Bovine Aortic Endothelial Cells;
The Journal of Biological Chemistry, 1995; Vol 270 No.9, Issue of March3,
Seite: 4412-4417
- (11) NICHOLLS M.G.;
Hemodynamic and hormonal actions of adrenomedullin;
Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2004; 37, Seite: 1247-
1253
- (12) SONE M., TAKAHASHI K., SATOH F. ET AL.;
Specific Adrenomedullin Binding Sites in the Human Brain;
Peptides, 1997; Vol 18 No.8, Seite: 1125-1129
- (13) ALLAKER R.P., KAPAS S.;
Adrenomedullin and mucosal defence: interaction between host and
microorganism; Regulatory Peptides, 2003; 112, Seite: 147-152
- (14) KAPAS S., PAHAL K., CRUCHLEY A.T. ET AL.;
Expression of Adrenomedullin and its Receptors in Human Salivary Tissue;
J Dent Res, 2004; 83 (4), Seite: 333-337
- (15) DI LORIO R., MARINONI E., LETIZIA C. ET AL.;
Adrenomedullin in perinatal medicine;
Regulatory Peptides 112, 2003 ; Seite : 103-113
- (16) IVAZZO C., TASSIS K., GOURGIOTIS D. ET AL.;
Adrenomedullin Concentration in Second Trimester Amniotic Fluid Cannot Be
Used as a Predictor of Preterm Delivery;
In vivo, 2009; 23, Seite: 1021-1026

- (17) KANENISHI K., KUWABARA H., UENO M. ET AL.;
Change of Adrenomedullin Concentrations in Plasma and amniotic fluid, and human placental Adrenomedullin Expression with Advancing Gestation;
Placenta, 2001, 22, Seite 244-250
- (18) WILSON C. ET AL.;
Adrenomedullin: Multiple functions in human pregnancy;
Angiogenesis 7, 2004; Seite 203-212
- (19) KOHNO M., YOKOKAWA K., KANO H. ET AL.;
Adrenomedullin Is a Potent Inhibitor of Angiotensin II-Induced Migration of Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells;
Hypertension, 1997 Jun; 29(6), Seite: 1309-1313
- (20) SHIMOSAWA T., FUJITA T.;
Adrenomedullin and its Related Peptide;
Endocrine Journal 2005; 52, Seite: 1-10
- (21) VIJAY P., SZEKELY L., AUFIERO T.X., SHARP T.G.;
Coronary sinus adrenomedullin rises in response to myocardial injury;
Clinical Science, 1999; 96, Seite: 415-420
- (22) SIMON G., RUSTERHOLZ C., ZANETTI-DÄLLENBACH R. ET AL. ;
Potential markers of preeclampsia – a review;
Reproductive Biology and Endocrinology, 2009; 7:70 doi:10.1186/1477-7827-7-70
- (23) FIGUEIRA L., ISRAEL A.;
Role of cerebellar adrenomedullin in blood pressure regulation;
Neuropeptides, 2015; 54, Seite: 59-66
- (24) ROBERTSON C.L., MINAMINO N., RUPPEL R.A. ET AL.;
Increased Adrenomedullin in Cerebrospinal Fluid after Traumatic Brain Injury in Infants and Children;
Journal of Neurotrauma, 2001; Vol18 No. 9, Seite: 861-868
- (25) WEYERSTAHL T., STAUBER M. (HRSG.)
Gynäkologie und Geburtshilfe 4. Auflage, Georg Thieme Verlag KG;
Stuttgart; 2013

- (26) KELLERER M., MATTHAEI S. (HRSG.);
Gestationsdiabetes mellitus (GDM)
Evidenzbasierte Leitlinie zu Diagnostik, Therapie u. Nachsorge der Deutschen
Diabetes-Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie
und Geburtshilfe (DGGG)
2011
- (27) MOTTOLA F.M., ARTAL R. ET AL.;
Fetal and maternal metabolic responses to exercise during pregnancy;
Early Human Development, 2016; 94, Seite: 33-41
- (28) GRIEBLER R., GEIBLER W., WINKLER P. (HRSG.);
Zivilisationskrankheit Diabetes: Ausprägungen-Lösungsansätze-
Herausforderungen. Österreichischer Diabetesbericht 2013.
Wien – Bundesministerium für Gesundheit
- (29) PETRU E. ET AL.;
Geburtshilfe 7. Auflage, Servicebetrieb ÖH-Uni Graz GmbH, Graz; 2013
- (30) KAMANA K.K., SUMISTI S., HUA Z.;
Gestational Diabetes Mellitus and Macrosomia: A Literature Review;
Annals of Nutrition & Metabolism, 2015; 66, Seite: 14-20
- (31) DITTAKARN B., RUNGNAPA W.;
Emergency caesarean section rate between woman with gestation diabetes and
normal pregnant woman;
Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology, 2016; 55, Seite 64-67
- (32) HARPER L.M., TITA A., BIGGIO R.J.;
The Institute of Medicine Guidelines for Gestational Weight Gain after a
Diagnosis of Gestational Diabetes and Pregnancy Outcomes;
AM J Perinatol 2015; 32, Seite: 239-246
- (33) NOCTOR E., DUNNE F.P.;
Type 2 diabetes after gestational diabetes: The Influence of changing
diagnostic criteria;
World J Diabetes,, 2015; 6, Seite: 234-244
- (34) WELSCH U., KUMMER W. (HRSG.);
Lehrbuch Histologie 4. Auflage;
Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag;
München; 2014

- (35) MEINERT B., KAUFMANN M., PFLEIDERER A. (HRSG.);
Gynäkologie und Geburtshilfe 5. Auflage;
Georg Thieme Verlag KG;
Stuttgart; 2008
- (36) POOLSUP N., SUKSOMBOON N., AMIN M.;
Effect of Treatment on Gestational Diabetes Mellitus: A Systematic Review and
Meta-Analysis;
PLoS ONE 9(3): e92485. Doi:10.1371/journal.pone.0092485
- (37) TRAILL Z., SQUIER M., ANSLOW P.;
Brain imaging in neonatal hypoglycaemia;
Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 1998; 79, Seite: 145-147
- (38) ALKALAY A.L., SARNAT H.B., FLORES-SARNAT L., SIMMONS C.F.;
Neurologic Aspects of Neonatal Hypoglycemia;
IMAJ 2005; 7, Seite: 188-192
- (39) ASHOUSH S., EL-SAID M., FATHI H., ABDELNABY M.;
Identification of metformin poor responders, requiring supplemental insulin,
during randomization of metformin versus insulin for the control of gestational
diabetes mellitus;
The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2016;
doi:10.1111/jog.12950
- (40) SCHULZE S. (HRSG.)
Mediscript Kurzlehrbuch Embryologie; 2. Auflage;
Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag;
München; 2013
- (41) MOORE K.L., PERSAUD T.V.N., TORCHIA M.G. (HRSG.);
Embryologie – Entwicklungsstadien Frühentwicklung Organogenese Klinik
6.Auflage; Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag;
München; 2013
- (42) <https://commons.wikimedia.org> File: Placenta - By J.L..jpg, 06.02.2016
- (43) <https://commons.wikimedia.org> File: Lotus_Birth_Placenta.png, 06.02.2016
- (44) [HTTPS://COMMONS.WIKIMEDIA.ORG/WIKI/FILE:2910 THE PLACENTA-02.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:2910_THE_PLACENTA-02.JPG)
(06.04.2016)

- (45) BUTTE N.F.;
Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus;
Am Journal of Clinical Nutrition, 2000; 71, Seite: 1256-61
- (46) DESOYE G., GAUSTER M., WADSACK C.;
Placental transport in pregnancy pathologies;
The American Journal of Clinical Nutrition, 2011; 94, Seite: 1896-902
- (47) STEFULJ J., PANZENBOECK U., BECKER T. ET AL.;
Human Endothelial Cells of the Placental Barrier Efficiently Deliver Cholesterol to the Fetal Circulation via ABCA1 and ABCG1;
Circulation Research, 2009; DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.185066
- (48) WADSACK C., HAMMER A., LEVAK-FRANK S. ET AL.;
Selective Cholesteryl Ester Uptake from High Density Lipoprotein by Human First Trimester and Term Villous Trophoblast Cells;
Placenta, 2003; 24, Seite: 131-143
- (49) KRIEGER D.T.;
Placenta as a Source of Brain and Pituitary Hormones;
Biology of Reproduction, 1982; 26, Seite: 55-71
- (50) STAUN-RAM E., SHALEV E.;
Human trophoblast function during the implantation process;
Reproductive Biology and Endocrinology, 2005; doi:10.1186/1477-7827-3-56
- (51) FERRETTI C., BRUNI L., DANGLES-MARIE V. ET AL.;
Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts;
Human Reproduction Update, 2007; Vol13, No2, Seite: 121-141,
doi:10.1093/humupd/dml048
- (52) <http://www.kryptor.net> (26.05.2016)
- (53) <https://www.youtube.com/watch?v=6ybgd5WIIfo> (26.05.2016)

- (54) LIM S.C., MORGENTHALER N.G., SUBRAMANIAM T. ET AL.;
The Relationship Between Adrenomedullin, Metabolic Factors, and Vascular
Function in Individuals With Type 2 Diabetes;
Diabetes Care, 2007; 30, Seite: 1513-1519
- (55) WONG H.K., TANG F., CHEUNG T.T., CHEUNG B.M.Y.;
Adrenomedullin and diabetes;
World J Diabetes, Juni 2015; 5(3), Seite: 364-37
- (56) SMITH J., HALSE K.G., DAMM P. ET AL.;
Copeptin and MR-proADM in umbilical cord plasma reflect perinatal stress in
neonates born to mothers with diabetes and MR-proANP reflects maternal
diabetes;
Biomarkers Med.; 2013; 7, Seite: 139-146
- (57) SUGULLE M., HERSE F. SEILER M. ET AL.;
Cardiovascular risk markers in pregnancies complicated by diabetes mellitus or
preeclampsia;
Pregnancy Hypertension: An International Journal of Woman's Cardiovascular
Health 2, 2012; Seite: 403-410