

Diplomarbeit

**Korrelation maternaler humaner Milcholigosaccharide
mit metabolischen Faktoren während der
Schwangerschaft**

eingereicht von

Selina Lara Fricke

zur Erlangung des akademischen Grades

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

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

unter der Anleitung von

Ass.-Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ rer.nat Ursula Hiden

Mag.^a pharm. Dr.ⁱⁿ rer.nat. Evelyn Jantscher-Krenn

Graz, 30.10.2017

Eidesstattliche Erklärung

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

Graz, am 30.10.2017

Selina Fricke eh

Danksagungen

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Diplomarbeit unterstützt und motiviert haben.

Ganz besonders gilt mein Dank meinen Betreuern Dr. Evelyn Jantscher-Krenn und Dr. Ursula Hiden, die mich mit meiner Arbeit in den letzten zwei Jahren tatkräftig unterstützt haben. Sie ermöglichten es mir einen umfangreichen Einblick in wissenschaftliches Arbeiten, sowohl in Theorie als auch in Praxis zu werfen. Ich möchte mich vor allem für ihr Engagement und die Geduld mir bei jeglichen Fragen und Problemen beiseite gestanden zu haben bedanken. Die schnellen und ausführlichen Nachrichten habe ich extrem geschätzt, sie haben mich aus so manch aussichtsloser Situation gerettet und zu der Motivation zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen. Besonders viel habe ich durch die Rückmeldungen und Korrekturvorschläge gelernt, die mir auch bei zukünftigen Projekten unglaublich viel helfen werden. Vielen Dank für diese unglaublich lehrreiche Zeit und liebe Betreuung!

Bedanken möchte ich mich auch bei Olivia Nonn, die mir vor allem in der statistischen Analyse hilfreiche Tipps und Tricks gegeben hat und als Ansprechpartner jederzeit zur Verfügung stand! Ein weiterer Dank gilt Klara Teklic, mit der die gemeinsamen Stunden im Labor immer großen Spaß gemacht haben.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium überhaupt erst ermöglicht haben. Ich möchte mich vor allem für die bedingungslose Unterstützung und Bestärkung bedanken, mit der sie mir während der gesamten Studienzeit zur Seite standen.

Daneben bedanke ich mich auch an meinen fünf Mitbewohnern bedanken- mit denen ich zusammen durch dick und dünn gegangen bin. Danke für diese unglaublich tollen fünf gemeinsamen Studienjahre!

Zusammenfassung

Einleitung: Humane Milcholigosaccharide (HMOs) sind wichtige Inhaltsstoffe der Muttermilch mit u.a. immunmodulatorischen Effekten, die bereits während der Schwangerschaft im weiblichen Organismus gebildet werden. Wodurch die Menge und Zusammensetzung von HMOs beeinflusst wird, ist noch nicht im Detail bekannt. Neben genetischen Faktoren wie dem Sekretorstatus könnte auch der metabolische Status der Frau eine Rolle spielen. Die Schwangerschaft stellt einen Zustand maternaler metabolischer Veränderungen mit veränderter Glukosehomöostase und erhöhten Insulinwerten bis hin zur Insulinresistenz dar. Metabolische Faktoren wie Adiponektin, Leptin sowie Follistatin tragen zu dieser veränderten Glukosehomöostase bei, wodurch sie eine wichtige Rolle in der metabolischen Adaptation zur Schwangerschaft spielen.

Hypothese: Wir stellen die Hypothese auf, dass metabolische Faktoren Auswirkungen auf Konzentration und Zusammensetzung der HMOs im maternalen Serum während der Schwangerschaft zeigen.

Material and Methoden: 53 schwangere Frauen wurden zwischen Februar und Oktober 2013 in der Frauenklinik des LKH Univ.-Klinikum Graz rekrutiert. Ausschlusskriterien waren mehrfachen Fehlgeburten, erhöhtes Risiko nach dem Combined Test, fetale Anomalien, Rauchen, mütterliche metabolische Risikofaktoren, bekannter Bluthochdruck sowie Diabetes. Zur Wertebestimmung der HMOs sowie maternaler metabolischer Faktoren wurden den Probandinnen an zwei Zeitpunkten in der Schwangerschaft, V1 (10.-14.SSW) und V2 (20.-24 SSW), Blutproben entnommen. HMOs wurden mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion in den Blutproben bestimmt. Der Wert der Nüchternglukose wurde mittels oGTT in der 24.-28. SSW gemessen. Für direkte Zusammenhänge wurden die V2-Werte der metabolischen Faktoren mit den V2-Werten der HMOs korreliert. Verzögerte Zusammenhänge sollen mit V1-Werten der metabolischen Faktoren und den V2-Werten der HMOs überprüft werden.

Ergebnisse: Etwa 30 der rekrutierten Schwangeren, im Alter von $33,9 \pm 5,3$ Jahren und einem BMI von $22,4 \pm 2,7$ kg/m² vor Schwangerschaftsbeginn, zeigten vollständige Datensets bezüglich eines metabolischen Faktors zu V1 und V2 und den HMOs 2'FL und 3'SL zu V2. Nach Ausschluss von signifikanten Konzentrationsunterschieden der metabolischen Faktoren in Abhängigkeit des Sekretorstatus, zeigte die statistische Analyse einen positiven Zusammenhang zwischen Leptin und dem HMO 3'SL zum Zeitpunkt V2.

Diskussion: Der Zusammenhang zwischen Leptin und 3'SL könnte darauf hindeuten, dass erhöhte Körperfettwerte die HMO-Zusammensetzung beeinflussen. Aufgrund möglicher Störfaktoren wie der BMI, Gewichtszunahme in der Schwangerschaft sowie körperlicher Aktivität, sind die Ergebnisse noch in größeren Kohorten zu verifizieren.

Abstract

Background: Human Milk Oligosaccharides (HMO) are important components of breast milk, which are produced in the female organism already during pregnancy. The mechanisms regulating HMO production and composition are not fully understood. Besides genetic factors such as the secretor status, the maternal metabolic state may play a role. In general, pregnancy is a state of metabolic changes and adaptations, with altered glucose homeostasis and insulin resistance. Metabolic acting factors such as adiponectin, leptin and follistatin contribute to these changes and thus, play an important role in maternal metabolic adaptation to pregnancy.

Hypothesis: We hypothesised that maternal metabolic factors affect concentration and composition of HMOs in maternal blood during pregnancy.

Subjects and Methods: Between February and October 2013, 53 pregnant women were recruited at the Department of Obstetrics and Gynaecology, Medical University of Graz,. Exclusion criteria were multiple miscarriages, increased risk after combined test, foetal anomalies, smoking, maternal metabolic risk factors, hypertension and all types of diabetes. For the analysis of metabolic factors and HMOs, blood was taken at two time points during pregnancy, visit 1 (V1; gestational week 10-14) and visit 2 (V2; gestational week 20-24). HMOs were analysed by HPLC with fluorescence detection. Fasting glucose was measured by oGTT at gestational week 24-28. To determine direct correlations between the metabolic factors and HMOs, V2 values of the factors were correlated with HMO values at V2. To test for potential delayed interactions, V1 values of metabolic factors were correlated to HMO values at V2.

Results: We obtained complete datasets of about 30 women. Their mean age was 33.9 ± 5.3 years and the mean BMI before pregnancy was 22.4 ± 2.7 kg/m². After excluding possible effects of the secretor status on the levels of metabolic factors, a significantly positive correlation between leptin and 3'SL at V2 was identified.

Conclusion: The correlation between leptin and 3'SL may indicate a relation between body fat and HMO-composition. Due to potential confounding factors such as BMI, weight gain during pregnancy as well as physical activity, the results need to be verified in a larger cohort.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract	v
Inhaltsverzeichnis.....	vi
Glossar und Abkürzungen	viii
Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	x
1 Einleitung und Hintergrund.....	1
1.1 Insulinresistenz	1
1.2 Maternale metabolische Adaptation in der Schwangerschaft.....	2
1.2.1 Maternale Adaptation bei Übergewicht	2
1.2.2 Gestationsdiabetes.....	3
1.3 Adipokine als Cytokine des Fettgewebes.....	4
1.4 Adiponektin	5
1.4.1 Aufbau und Eigenschaften	5
1.4.2 Wirkmechanismus	5
1.4.3 Adiponektin und Insulin	6
1.5 Leptin	7
1.5.1 Aufbau und Eigenschaften	7
1.5.2 Wirkmechanismus	7
1.6 Follistatin.....	10
1.6.1 Aufbau und Eigenschaften	10
1.6.2 Wirkmechanismus und Zusammenhang mit Insulin	11
1.7 Humane Milcholigosaccharide	12
1.7.1 Aufbau.....	13
1.7.2 Genetischer Einfluss auf Zusammensetzung und Konzentration der HMOs	18
1.7.3 Funktionen und Effekte.....	20
2 Material und Methoden	25
2.1 Studiendesign	25
2.2 Rekrutierung	25
2.3 Datengewinnung	26
2.3.1 Untersuchungsintervalle	26
2.3.2 HMO-Messung.....	26
2.3.3 Erfassung metabolischer Faktoren.....	26
2.3.4 Weitere Datensammlung über die Patientinnen.....	27
2.4 Datenmanagement.....	27
2.5 Datenanalyse	28
2.5.1 Stichprobenumfang.....	28
2.5.2 Statistische Analyse.....	28
3 Hypothesen und Ziele	29
4 Ergebnisse – Resultate	30
4.1 Studienpopulation	30
4.3 Demographische Grunddaten	31
4.4 Metabolische Faktoren	32
4.4.1 Adiponektin.....	32
4.4.2 Leptin	34
4.4.4 Follistatin.....	36

4.4.6	Nüchtern glukose oGTT	38
4.4.7	Unterschiede durch Sekretorgruppen	39
4.5	Metabolische Faktoren und Humane Milcholigosaccharide	40
4.5.1	Adiponektin in Bezug auf 2'FL und 3'SL.....	40
4.5.2	Leptin in Bezug auf 2'FL und 3'SL	40
4.5.3	Follistatin in Bezug auf 2'FL und 3'SL	41
4.5.4	Nüchtern glukose in Bezug auf 2'FL und 3'SL	42
5	Diskussion	43
6	Literaturverzeichnis	47

Glossar und Abkürzungen

2'FL: 2-Fucosyllaktose

3'SL: 3'-Sialyllactose

AMPK: AMP-aktivierte Proteinkinase

FUT2: Fucosyltransferase 2

FUT3: Fucosyltransferase 3

GDM: Gestationsdiabetes

HMG-CoA-Reduktase: 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase

HMO: Humane Milcholigosaccharide

HPLC: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

LNFP III: Lacto-N-Fucopentaose III

T1D: Diabetes Mellitus Typ 1

T2D: Diabetes Mellitus Typ 2

oGTT: oraler Glukosetoleranztest

hPL: Plazentalaktogen

V1: Visit 1

V2: Visit 2

V3: Visit 3

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Leptin bewirkt eine Sekretionsstimulation von den Anorexigenen alpha-MSH und CART und Sekretionsinhibition von den Orexigenen NPY und AgRP eine im Nucleus arcuatus. Dieser Vorgang führt zur Unterdrückung des Hungergefühls, indem das Sattheitszentrum stimuliert, sowie Hungerzentrum gehemmt wird. Zusätzlich geht man davon aus, dass Leptin auch eine direkte Wirkung auf das Sattheitszentrum zeigt (9).....	9
Abbildung 2. A) Grundbaustein von HMOs mit möglichen Modifizierungen der Laktose B) Verlängerung durch Lakto-N-Biose entspricht einer Typ-1-Kette C) Verlängerung durch N-Acetyllaktosamin entspricht der Typ-2-Kette.....	14
Abbildung 3. A) Bei einem iso-HMO führt eine Modifizierung durch β 1-6 Bindungen zwischen zwei Disaccharideinheiten zur Verzweigung. B) Lineare Strukturen werden als para-HMO bezeichnet und weisen keine Verzweigung auf.....	16
Abbildung 4. Modifizierung der Laktose oder Oligosaccharidkette durch Einbau von Fucose durch α 1-2, α 1-3 oder α 1-4 Bindungen und/oder Sialinsäure durch α 2-3 oder α 2-6.....	17
Abbildung 5. Der Einbau von Fucose in das Rückgrat der HMOs wird zum großen Teil von der mütterlichen Lewis-Blutgruppe und dem Sekretor-Status bestimmt. In Abhängigkeit der Enzymaktivität von Fucosyltransferase 2 (FUT2) und 3 (FUT3) können Frauen in vier Gruppen eingeteilt werden.	19
Abbildung 6. Mögliche Effekte der HMOs auf den gestillten Säugling. A) HMO wirken als prebiotischer Bifidusfaktor, welcher für die Gestaltung einer gesundheitsfördernden Darmflora sorgt. B) HMOs erzielen eine antiadhäsive Wirkung, was zu einer Reduktion intestinaler Infektionen führen kann. C) Durch direkte Interaktionen mit intestinalen Epithelzellen kommt es zur Induktion einer differenzierten Genexpression und zu einem Umprogrammieren des Zellzyklus sowie der Glykosylierung der Zelloberfläche. D) Durch Einwirken auf die Reifung der Lymphozyten kommt es zu einer ausgeglicheneren Th1/Th2-Cytokin-Produktion der T-Zellen und somit zu einer geringeren Immunantwort. E) HMOs bei positiver Lewis-Blutgruppe können Selektin-assoziierte Zell-Zell-Reaktionen beeinflussen und reduzieren, was zu einer Herabsetzung der Migration in den subendothelialen Entzündungsbereich sowie der weiteren Aktivierung der Leukozyten führt. F) HMO stellen einen essentiellen Nährstoff zur Entwicklung von Gehirn und kognitiven Fähigkeiten zur Verfügung (18).....	22
Abbildung 7. Mütterliche Serumadiponektinwerte während der Schwangerschaft (V1-V3). Der Box Plot zeigt die 25. und 75. Perzentile und jeweiligen Median, die oberen und unteren Whiskers die Ausreißer.	33
Abbildung 8. Leptin während der Schwangerschaft (V1-V3). Der Box Plot zeigt die 25. und 75. Perzentile und jeweiligen Median, die oberen und unteren Whiskers die Ausreißer.	35
Abbildung 9. Follistatin während der Schwangerschaft (V1-V3). Der Box Plot zeigt die 25. und 75. Perzentile und jeweiligen Median, die oberen und unteren Whiskers die Ausreißer.	37
Abbildung 10. Nüchtern glukose während der Schwangerschaft. Der Box Plot zeigt die 25. und 75. Perzentile und den Median, die oberen und unteren Whiskers die Ausreißer.	38
Abbildung 11. Korrelation von 3'SL(V2) mit Leptin (V2). Die Korrelation nach Spearman zeigt eine positive Korrelation. (rho=0,419; p-Wert=0,017).....	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Demographische Daten.....	31
Tabelle 2. Serumadiponektinwerte bei V1-V3	32
Tabelle 3. Serumleptinwerte bei V1–V3	34
Tabelle 4. Serumfollistatinwerte bei V1-V3.....	36
Tabelle 5. Nüchternglukosewerte zum Zeitpunkt des oGTT	38
Tabelle 6. Korrelation von HMO zum Zeitpunkt V2 mit Adiponektinwerten zu den Zeitpunkten V1 und V2.	40
Tabelle 7. Korrelation von HMOs zum Zeitpunkt V2 mit Leptinwerten zu den Zeitpunkten V1 und V2.	41
Tabelle 8. Korrelation von HMOs zum Zeitpunkt V2 mit Follistatinwerten zu den Zeitpunkten V1 und V2.	42
Tabelle 9. Korrelation von HMOs zum Zeitpunkt V2 mit Nüchternglukose.....	42

1 Einleitung und Hintergrund

1.1 Insulinresistenz

Insulinresistenz ist eine Hauptursache von Typ 2 Diabetes (T2D). Diese Tatsache wurde erstmals 1930 beschrieben, als entdeckt wurde, dass ein Diabetestyp nicht durch einen Mangel, sondern durch eine Unempfindlichkeit gegenüber Insulin (Insulinresistenz) entsteht: Sir Harold Percival Himsworth fand heraus, dass eine Abnahme des Körpergewichts nicht nur die Symptome von Diabetes verbessert, viel mehr zeigt sich die Wiederherstellung einer fast gesunden Antwort der Glukose-Toleranz (1). Den Zustand, den Himsworth damals beschreibt ist heute als Insulinresistenz bekannt und kennzeichnet einen erhöhten Bedarf an Insulin infolge einer Interaktionsstörung zwischen Insulin und seinem Rezeptor an der Zelloberfläche u./o. Glukoseverwertung in der Zelle (1).

Insulinresistenz wird besonders mit Fettleibigkeit assoziiert und ist der ausschlaggebende Faktor in der Pathogenese von T2D. Diesen Zusammenhang beweisen Querschnittsstudien, die ein konstantes Vorkommen von Insulinresistenz bei Patienten mit T2D zeigen; prospektive Studien verdeutlichen außerdem, dass die Insulinresistenz ein wichtiger Risikofaktor für das Entstehen eines Diabetes ist (1).

Die Insulinresistenz ist jedoch nicht der einzige Faktor, mit welchem sich Diabetes prognostizieren lässt. Die Insulinresistenz wird normalerweise mit einer Hyperinsulinämie ausgeglichen, die durch eine Kombination aus erhöhter Insulinsekretion und verminderter Insulin Clearance entsteht. Der Grad dieser Kompensation wird bemessen durch den „Dispositionindex“, ein Produkt aus Insulinsensitivität und Insulinsekretion durch die β -Zellen. Dieser Index misst die Fähigkeit der β -Zellen eine Insulinresistenz mit einer Insulinämie auszugleichen und ist der wichtigste Faktor für die Prädiktion von Diabetes (1).

1.2 Maternale metabolische Adaptation in der Schwangerschaft

Grundsätzlich stellt die Schwangerschaft eine anabole, dynamische Stoffwechselsituation dar. Insulinresistenz während der Schwangerschaft ist eine physiologische Reaktion auf die gestationsbedingten hormonellen und metabolischen Anpassungen der Schwangeren. Diese hormonelle und metabolische Anpassung sorgt vor allem in der zweiten Schwangerschaftshälfte für das Wachstum und die Entwicklung des Fetus, indem Nährstoffe länger in der mütterlichen Zirkulation verbleiben und somit für den Fetus verfügbar sind (2).

Die erniedrigte Insulinempfindlichkeit wird im Normalfall durch eine erhöhte Insulinproduktion ausgeglichen. Im dritten Trimenon der Schwangerschaft erhöht sich außerdem die endogene hepatische Glukoseproduktion im mütterlichen Organismus um 16-30 %. Dieser Effekt soll zusätzlich den erhöhten Glukosebedarf des Fetus kompensieren (3).

Physiologisch lassen sich schon bereits kurz nach der Einnistung der Eizelle in die Gebärmutter Schleimhaut verschiedene Veränderungen feststellen: Es kommt zur Hyperplasie und Hypertrophie der β -Zellen in den Langerhans-Inseln, welche der Stimulation durch Progesteron und Östrogenen zuzuschreiben sind (4). Während die basale Insulinsekretion annähernd normal bleibt, finden sich erhöhte postprandiale Insulinspiegel. Diese sind auf eine Zunahme der Insulinsynthese und Sekretion zurückzuführen (4).

Die Insulinresistenz entsteht in der zweiten Schwangerschaftshälfte. Sie wird mit der Erhöhung einiger Hormone wie zum Beispiel dem Humanen Plazentalaktogen (hPL), Progesteron und den Glukokortikoiden, aber auch mit erhöhten freien Fettsäuren und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) in Zusammenhang gebracht. Im Gegensatz zu nicht schwangeren Frauen folgt bei Frauen in der späten Schwangerschaft grundsätzlich ein anhaltend erhöhter Glukose- und Insulinspiegel der Nahrungsaufnahme. Außerdem ist die Freisetzung von Glucagon stärker unterdrückt (4).

1.2.1 Maternale Adaptation bei Übergewicht

Die übliche Zunahme der Insulinresistenz, die in der späten Schwangerschaft beobachtet wird, tritt bei fettleibigen Müttern verstärkt auf. Als Folge kommt es zur deutlichen postprandialen Zunahme von Glukose, Lipiden und Aminosäuren und somit zu einer

übermäßigen fötalen Exposition gegenüber Brennstoffquellen, was wiederum die Fetalgröße, Fettvorräte und das Risiko für Krankheiten nach der Geburt erhöht (1,2).

Eine beeinträchtigte Glukosetoleranz, Gestationsdiabetes und Hyperlipidämie werden somit häufiger bei übergewichtigen Schwangeren beobachtet. Bisher wurden Diäten während der Schwangerschaft, die besonders diesen Problemen vorbeugen sollen, wenig Bedeutung beigemessen. Studien jedoch zeigen, dass Diäten bei Frauen mit beeinträchtigter Glukosetoleranz durch einen Ersatz von raffinierten Kohlenhydraten und gesättigten Fettsäuren mit komplexen niedrig-glykämischen Kohlenhydraten und ungesättigten Fettsäuren zu einem verbesserten metabolischen Gleichgewicht und Schwangerschaftsergebnis führen (2).

1.2.2 Gestationsdiabetes

Kann die erhöhte postprandiale Hyperglykämie nicht ausreichend durch eine Hyperinsulinämie kompensiert werden, entsteht daraus der Gestationsdiabetes (GDM) (4). Die nicht ausreichende glykämische Kontrolle führt zusätzlich zu erhöhtem Auftreten von Neuralrohrdefekten und anderen entwicklungsbedingten Anomalien. Außerdem werden Komplikationen wie Präeklampsie häufiger bei übergewichtigen Schwangeren beobachtet, was auf den subklinischen Entzündungsstatus zurückzuführen ist und eine frühe Plazentation und die Blutversorgung der Plazenta beeinträchtigt (1).

Die Prävalenz von GDM liegt in Österreich bei ca. 5% (2), womit GDM zu den häufigsten Schwangerschaftspathologien gehört. Wie unter 0 erwähnt, kann die oben beschriebene Anpassung des mütterlichen Metabolismus an die Schwangerschaft die Entstehung von GDM begünstigen (3).

Wird GDM nicht erkannt oder entsprechend behandelt, können folgende Komplikationen vermehrt auftreten:

- Präeklampsie/Eklampsie
- Makrosomie mit erhöhter Gefahr eines Geburtstraumas
- Hydramnion mit erhöhter Gefahr einer Frühgeburt
- Erhöhte fetale Fehlbildungsanamnese
- Hypoglykämien perinatal mit Gefahr einer neuropsychomotorischen Entwicklungsverzögerung

Zusätzlich besteht ein erhöhtes Risiko, dass das Kind im späteren Leben auch an T1D oder T2D erkrankt (3).

1.3 Adipokine als Cytokine des Fettgewebes

Dem weißen Fettgewebe liegen zwei Aufgaben zu Grunde: Zum einen wirkt es als Energiespeicher, zum anderen als endokrines Organ, welches Steroidhormone und fettspezifische Cytokine, die sogenannten Adipokine ausschüttet.

Ein erhöhter Anteil von weißem Fettgewebe bei Fettleibigkeit erhöht die Sekretion dieser Adipokine. Dies bedeutet, dass die para-, auto- und endokrine Wirkung von Adipokinen durch Fettegewebsdystrophie bzw. -hypertrophie beeinflusst wird und zur Entwicklung von metabolischen Krankheiten beiträgt (1).

1.4 Adiponektin

1.4.1 Aufbau und Eigenschaften

Adiponektin ist ein Peptidhormon, das zusammengesetzt aus 224 Aminosäuren vor allem in Fettzellen gebildet und sezerniert wird. Es macht die Organe empfänglich für die Wirkung von Insulin, beugt Arteriosklerose vor und hemmt Entzündungsreaktionen (5). Die Serumkonzentration von Adiponektin ist indirekt proportional zum BMI. Für eine Minderproduktion des Adiponektins werden die Fettgewebszytokine TNF- α (Tumor necrosis factor alpha) und IL-6 (Interleukin-6) verantwortlich gemacht (6). Folglich zeigt sich eine negative Korrelation der Serumkonzentration des Adiponektins zu Insulinresistenz, der Sekretion inflammatorischer Adipokine und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen (7).

1.4.2 Wirkmechanismus

Physiologisch lassen sich die schützenden Eigenschaften des Adiponektins durch folgende Mechanismen erklären: Adiponektin wirkt durch seinen Plasmamembranrezeptor, der die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) phosphoryliert und aktiviert. In aktivierter Form phosphoryliert AMPK Proteine, die für Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel wichtig sind, was sich wiederum nachhaltig auf den Stoffwechsel auswirkt. Außerdem befinden sich auch im Gehirn Adiponektinrezeptoren, die durch eine Aktivierung der AMPK im Hypothalamus zur Nahrungsaufnahme anregen und den Energieverbrauch senken (5).

Acetyl-CoA-Carboxylase ist eines der AMPK-regulierten Enzyme und befindet sich in Leber und weißem Fettgewebe. Dieses Enzym generiert Malonyl-CoA, das erste erforderliche Zwischenprodukt der Fettsäuresynthese. Malonyl-CoA hemmt als Inhibitor des Enzyms Carnitin-Acyltransferase-1 den Prozess der β -Oxidation, womit der Fettsäuretransport in die Mitochondrien verhindert wird. Durch Phosphorylierung und Inaktivierung von Acetyl-CoA-Carboxylase kommt es also über AMPK zu einer eingeschränkten Fettsäuresynthese sowie abgeschwächten Hemmung der β -Oxidation (5).

AMPK phosphoryliert und inaktiviert außerdem die Enzyme HMG-CoA-Reduktase, Fettsäuresynthase und Acyltransferase. Während es durch die eingeschränkte Wirkung der

HMG-CoA-Reduktase zur Inhibition der Cholesterinsynthese kommt, führt eine Inaktivierung von Fettsäuresynthase und Acyltransferase zur effektiven Hemmung der Triacylglycerinsynthese (5).

1.4.3 Adiponektin und Insulin

Mäuse mit einem Gendefekt der Adiponektinrezeptoren reagieren weniger sensitiv auf Insulin und weisen folglich eine geringere Glukosetoleranz auf. Die durch Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate führen zu einem länger anhaltenden erhöhten Blutglukosespiegel im Vergleich zu Mäusen mit normalen Adiponektinwerten (5). Die beobachteten Stoffwechseldefekte ähneln denen von Patienten mit T2D. Bei T2D wird eine ähnliche Insulinsensitivität beobachtet, die Glukose wird ebenfalls nur langsam aus dem Blut eliminiert. In der Tat zeigen Patienten, die an Adipositas oder T2D leiden einen niedrigeren Adiponektinspiegel im Blut als Personen ohne DM2 (5).

In einer weiteren Studie hat die Gabe von Adiponektin zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität, einer Verminderung des Glukosespiegels durch Aktivierung von AMPK, sowie zu einer antiinflammatorischen Wirkung geführt.

Diese Tatsache machen sich antidiabetogene Medikamente wie Insulin-Sensitizer und Thiazolidindione wie Rosiglitazone und Pioglitazone zu Nutze. Sie führen bei Versuchstieren unter anderem durch gesteigerte Expression von Adiponektin-mRNA in Fettgewebe zu einer erhöhten Adiponektinkonzentration und einer Aktivierung der AMPK (5).

Es scheint also, dass Adiponektin ein wichtiges Bindeglied zwischen T2D und Fettleibigkeit darstellt (5,6).

1.5 Leptin

1.5.1 Aufbau und Eigenschaften

Dieses Adipokin besteht aus 67 Aminosäuren, wird von Adipozyten produziert und ins Blut abgegeben. Auch hier zeigt sich, dass die Plasmaleptinkonzentration mit der Gesamtfettmasse korreliert. Allerdings liegt hier ein positiver Zusammenhang mit dem BMI vor (8).

Gemeinsam mit Insulin und zum Teil auch Adiponektin ist Leptin für die Langzeitregulation der Energiehomöostase durch Kontrolle der Gesamtfettmasse zuständig (5,9).

Die Funktion von Leptin wurde erstmals in einer Studie an Mäusen untersucht, in der das Leptin-codierende Gen die Abkürzung OB erhielt, was für obese, also fettleibig, steht. Es stellte sich heraus, dass sich bei Mäusen mit zwei defekten Allelen des OB-Gens ein bleibender Hungerzustand einstellt. Dieser ist gekennzeichnet durch einen Anstieg der Kortisolkonzentration im Blut, mangelnde Produktion von Körperwärme, abnormes Wachstum, fehlende Fortpflanzung, ungezügelter Appetit, sowie Stoffwechselstörungen wie Insulinresistenz (5).

Außerdem ist noch ein weiteres Gen für die Appetitregulation wichtig, das sogenannte Diabetes/DB-Gen. Das DB-Gen codiert den Leptinrezeptor und ist somit für die Signalfunktion von Leptin verantwortlich. Deswegen leiden Mäuse mit zwei defekten DB-Allelen an Adipositas und Diabetes.

Leptinrezeptoren finden sich vor allem in Gehirnregionen wieder, die das Essverhalten steuern. Hierzu zählt der Nucleus arcuatus des Hypothalamus. Durch Leptin wird dem Körper signalisiert, dass die Fettreserven ausreichen und somit die Brennstoffzufuhr gebremst und der Energieverbrauch gesteigert werden kann. So kommt es ergänzend zu einer Stimulation des Sympathikus mit Anstieg von Blutdruck, Herzfrequenz und Thermogenese (5).

1.5.2 Wirkmechanismus

Um den Wirkmechanismus von Leptin verstehen zu können, müssen zwei Gruppen von Neuronen, die sich im Nucleus arcuatus befinden, beschrieben werden. Diese Neuronen

haben jeweils einen unterschiedlichen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und den Stoffwechsel, die für die Energiebilanz eine wichtige Rolle spielen (5,9).

Die orexigenen Neuronen, auch NPY/AgRP- Neurone genannt, stimulieren die Energiezufuhr durch Produktion und Sekretion von Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-related Peptid (AgRP), welche das Signal zur Nahrungsaufnahme an das Gehirn weiterleiten. Das Hungerzentrum wird stimuliert, das Sättigungszentrum gehemmt. (5)(9) In Mäusen kommt es sowohl während Hungerphasen als auch bei defekten Allelen der OB- und DM-Gene zu einer erhöhten NPY-Konzentration. Man geht davon aus, dass diese hohe Konzentration von NPY die Fettleibigkeit dieser Mäuse auslöst, da ständig das Signal zur Nahrungsaufnahme geliefert wird (5).

Von den anorexigenen Neuronen werden die gegenteilig wirkenden Transmitter alpha-Melanocortin (α -MSH) und Cocain- and amphetamine-regulated transcript-Peptid (CART-Peptid) ausgeschüttet. Diese Sekretion bewirkt über ein nachgeschaltetes Neuron die Vermittlung von Appetit-unterdrückenden Informationen an das Gehirn. Hier wird also das Hungerzentrum gehemmt und das Sättigungszentrum stimuliert. α -MSH entsteht durch Abspaltung aus dem Vorläuferprotein Proopiomelanocortin (POMC), daher wird diese Gruppe von Neuronen POMC/CART-Neuronen genannt (5,9). Beide neurosekretorischen Nervenzellen hemmen die Hormonproduktion der jeweils anderen. Das bedeutet, dass jeder Reiz, der anorexigene Zellen aktiviert, orexigene Zellen inaktiviert. Dadurch kommt es zu einer Verstärkung des stimulierenden Signals (5,9).

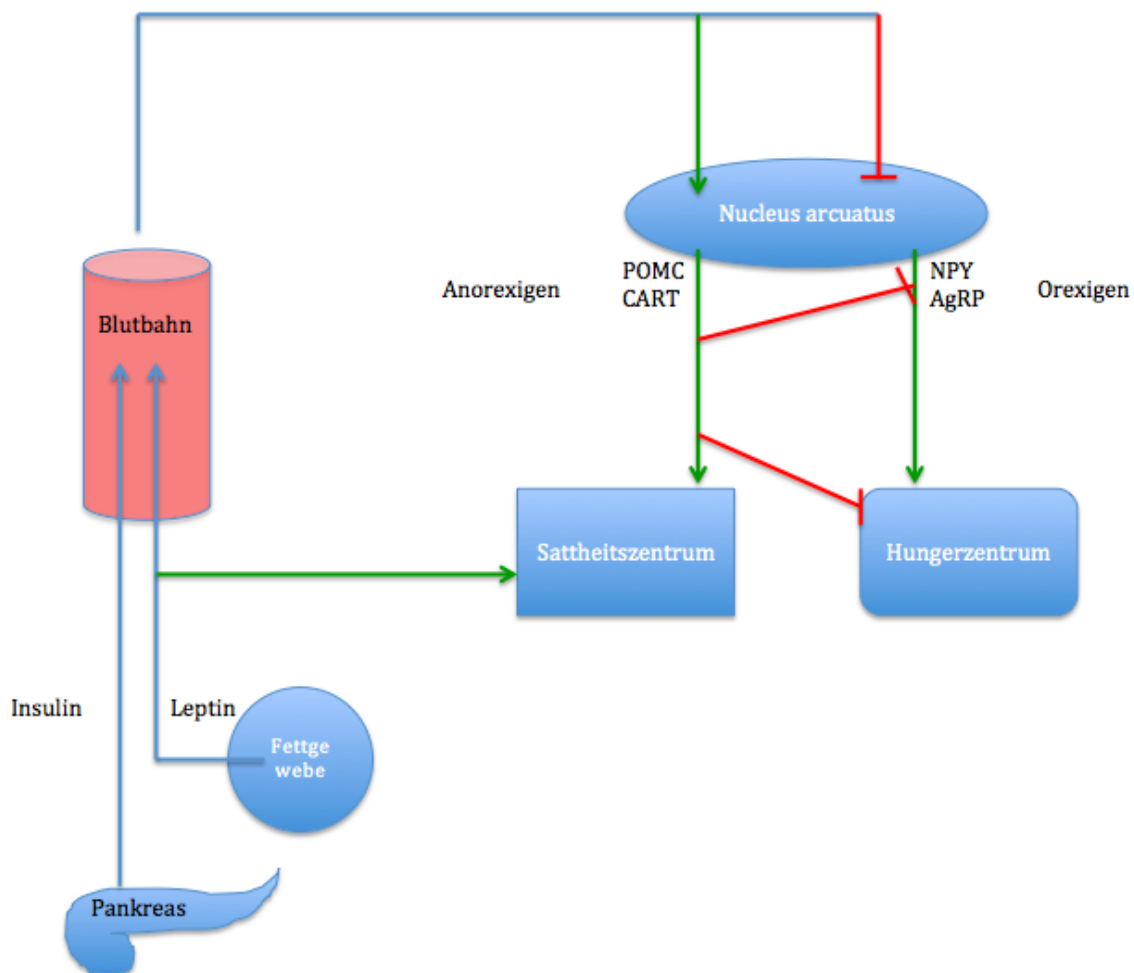


Abbildung 1. Leptin bewirkt eine Sekretionsstimulation von den Anorexigenen alpha-MSH und CART und Sekretionsinhibition von den Orexigenen NPY und AgRP im Nucleus arcuatus. Dieser Vorgang führt zur Unterdrückung des Hungergefühls, indem das Sättigungszentrum stimuliert, sowie Hungerzentrum gehemmt wird. Zusätzlich geht man davon aus, dass Leptin auch eine direkte Wirkung auf das Sättigungszentrum zeigt (9).

Beide Neuronentypen bilden Leptin-Rezeptoren und Insulin-Rezeptoren und können so Informationen über den Ernährungszustand des Körpers erhalten (5,9).

Der Leptinrezeptor gehört zur Gruppe der tyrosinkinaseassoziierten Rezeptoren. Bindet Leptin am Rezeptor, öffnen sich die ATP-empfindlichen K⁺-Kanäle und es kommt zu einer Hyperpolarisation bestimmter NPY/AgRP-Neurone, wodurch deren Aktivität herabgesetzt wird. Durch eine gleichzeitig ablaufende Aktivierung der Janus-Kinase in

NPY/AgRP- und POMC/CART-Neuronen wird der Transkriptionsfaktor STAT3 phosphoryliert und somit aktiviert. Dadurch kommt es zu einer Expressionsänderung leptinsensitiver Gene (5,9).

Leptin bewirkt also eine Inhibierung der Sekretion der orexigenen Faktoren NPY und AgRP sowie eine Stimulation der Sekretion der anorexigenen Faktoren α -MSH und CART im Nucleus arcuatus. Man geht aber auch davon aus, dass Leptin auch eine direkte Wirkung auf das Sattheitszentrum besitzt (9). Zusätzlich führt Leptin zu einem Anstieg der renalen Natriumausscheidung, Lipolyse, Gonadotropinausschüttung, aktiviert den Knochenabbau und neben einer erhöhten T₃,T₄-Sekretion wird das zellvermittelte Immunsystem und die Phagozytenaktivität stimuliert (9).

1.6 Follistatin

1.6.1 Aufbau und Eigenschaften

Follistatin ist ein monomeres glykosyliertes Protein und wurde zunächst in gonadaler Flüssigkeit gefunden. Während des Menstruationszyklus finden sich gleichbleibende Konzentrationen, die aber während der Schwangerschaft einen Anstieg zeigen. Folglich wird neben der Bildung in Hypophyse und Granulosazellen des Ovarialfollikels eine zusätzliche Follistatinproduktion der Plazenta angenommen (10,11).

Follistatin funktioniert als Inhibitor multifunktionaler Komponenten von TGF- β (transforming growth factor beta). Eine wichtige Rolle spielt hier das Activin-Follistatin-System, welches vor allem Einfluss auf den Glukose- und Lipidstoffwechsel hat und somit eine wichtige Rolle bei GDM spielen könnte (12).

Neben den im folgenden Abschnitt erklärten Zusammenhängen und der Tatsache, dass eine positive Korrelation zwischen Follistatin und dem „Homeostasis Model Assessment“ (HOMA-Index), ein Test zur Bestimmung einer Insulinresistenz, besteht, lässt sich vermuten, dass Serumfollistatin auch eine Funktion im Kohlenhydratstoffwechsel während der Schwangerschaft spielt (12).

1.6.2 Wirkmechanismus und Zusammenhang mit Insulin

Die durch Follistatin beeinträchtigte Insulinsensitivität wird vor allem durch seine hemmende Wirkung auf die Komponenten Activin A und Myostatin des TGF- β verursacht (13). Erhöhte Follistatinwerte werden bei T2D beobachtet und in Zusammenhang mit Hyperglykämie und Hyperinsulinämie gebracht (14).

1.6.2.1 Activin A

Activin A steuert als pleiotropes Enzym verschiedene zelluläre Abläufe. Dazu gehören unter anderem die Regulierung der Glukosehomöostase durch Steigerung der Insulinausschüttung und β -Zellproliferation, wodurch bei erhöhten Activinwerten eine Verbesserung der Insulinsensitivität zu beobachten ist (12).

Zusätzlich wirkt es durch eine Steigerung der Proliferation mit gleichzeitiger Inhibition der Adipozytendifferenzierung von humanen Präadipozyten auf die Lipidhomöostase ein. Ein vermehrtes Auftreten von Lebersteatosen konnte bei erhöhten Activinwerten in Rattenversuchen beobachtet werden (13,14).

Versuche mit Follistatin-Knockout-Mäusen konnten beweisen, dass die Abwesenheit von Follistatin und somit entfallener Inhibition von Activin A zu metabolischen Veränderungen, die einen reduzierten Anteil an viszeraler Fettmasse, eine pankreatische β -Zellhyperplasie wie auch eine verbesserte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität einschließen, kommt (15).

1.6.2.2 Myostatin

Der Wachstumsfaktor Myostatin ist für die Muskelentwicklung und Glukosehomöostase von Bedeutung. Während im Skelettmuskel hohe Myostatin Spiegel zu finden sind, weisen andere Gewebe wie Fettgewebe und Herz geringere Konzentrationen auf (16). Interessanterweise zeigt sich in Studien mit Mäusen, dass vor allem ein reduzierter Anteil an Myostatin zu reduzierter Körperfettmasse und -anreicherung sowie erhöhter Glukosetoleranz führt. Aus diesen Erkenntnissen schließt man, dass höhere Konzentrationen an Myostatin zu einer Insulinresistenz führen könnten (13).

Mäuse mit inaktiviertem Myostatin-Gen zeigen sogar niedrigere Konzentrationen an Serumleptin (17). Welche Rolle Myostatin bezüglich der Körperfettregulation spielt, ist jedoch noch nicht ganz verstanden (17).

1.7 Humane Milcholigosaccharide

Humane Milcholigosaccharide (HMOs) sind unkonjugierte Glykane in der humanen Milch, die sich aus verschiedenen Zuckern zusammensetzen. Bisher wurden mehr als 100 verschiedene HMOs identifiziert, wobei Menge und Zusammensetzung einzelner HMOs vom Zeitpunkt der Laktationsperiode abhängt und zwischen einzelnen Frauen variiert (18,19). Das Kolostrum, die erste Milch kurz vor und nach der Entbindung enthält ca. 20-25g/L HMOs, mit Fortschreiten der Milchproduktion sinkt die Konzentration auf 5-20 g/L HMOs ab. Allerdings übersteigt die Menge der HMOs immer noch die Konzentration der gesamten Milchproteine. Untersuchungen zeigen, dass Milch von Frauen, die ihr Baby zu früh auf die Welt gebracht haben, höhere Konzentration an HMOs aufweist als Milch von Frauen mit Termingeburten (18). Humane Milcholigosaccharide werden wahrscheinlich in der Brustdrüse produziert und können in der Frühschwangerschaft im maternalen Serum nachgewiesen werden. In neuesten noch nicht publizierten Studien konnte man HMOs bereits im fetalen Nabelschnurrblut nachweisen. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse könnte man davon ausgehen, dass HMOs nicht nur während der Laktation eine wichtige Rolle spielen, sondern bereits vor der Geburt Auswirkungen auf maternalen und fetalen Organismus zeigen könnte (18).

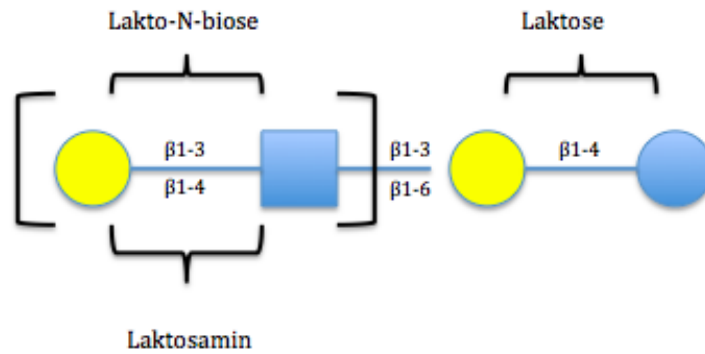
1.7.1 Aufbau

Das Grundgerüst der HMOs bildet sich aus den fünf Monosacchariden:

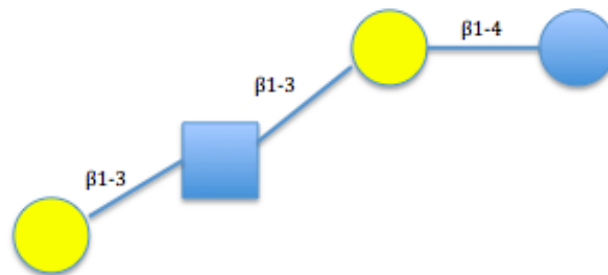
- Galactose (Gal)
- Glukose (Glc)
- N-Acetylglukosamin (GlcNAc)
- Fucose (Fuc)
- Sialinsäure (Sia), meist vorliegend als N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac)

Die Zusammensetzung der HMOs folgt scheinbar einem Grundmuster, demnach alle HMOs Laktose (Gal β 1-4Glc) am reduzierten Ende tragen. Dieses kann durch zwei verschiedene Disaccharide Lakto-N-Biose (Gal β 1-3GlcNAc- Typ-1-Kette) oder N-Acetyllaktosamin (Gal β 1-4GlcNAc-, Typ-2-Kette) über β 1-3 oder β 1-6 Bindungen verlängert werden (siehe Abbildung 2) (18–20).

A) Grundbaustein eines humanen Milcholigosaccharids



B) Lakto-N-Tetraose (Typ-1-Kette)



C) Lakto-N-Neotetraose (Typ-2-Kette)

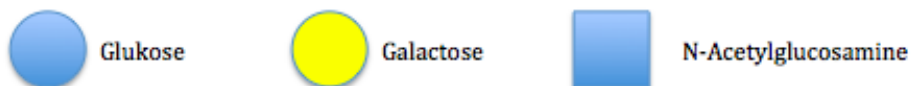
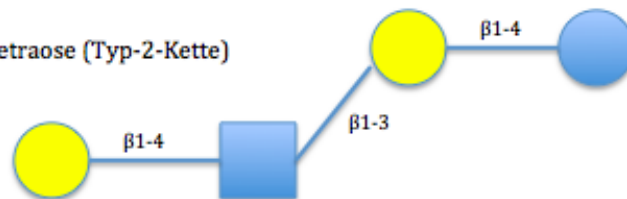


Abbildung 2. A) Grundbaustein von HMOs mit möglichen Modifizierungen der Laktose B) Verlängerung durch Lakto-N-Biose entspricht einer Typ-1-Kette C) Verlängerung durch N-Acetyllaktosamin entspricht der Typ-2-Kette.

Eine Verlängerung durch Lakto-N-biose scheint die Modifizierung der Kette abzuschließen, wobei der Anbau von N-Acetyllaktosamin eine erneute Verlängerung durch die zwei genannten Disaccharide ermöglicht (18). β 1-6 Bindungen zwischen zwei Disacchariden führen zur Verzweigung. Während diese verzweigten Ketten den Namen iso-HMOs erhalten, werden lineare Ketten als para-HMOs bezeichnet (siehe Abbildung 3) (18).

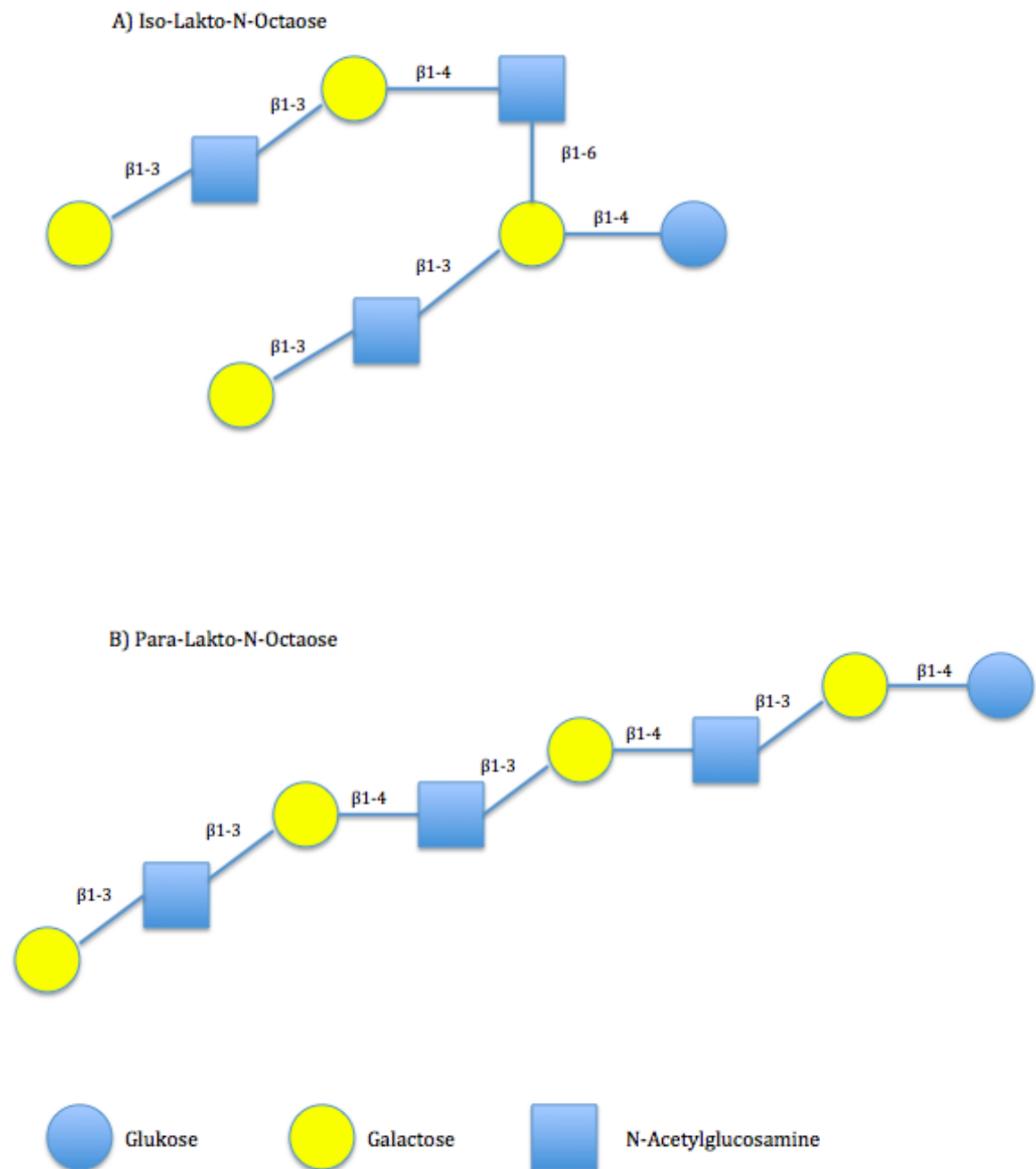
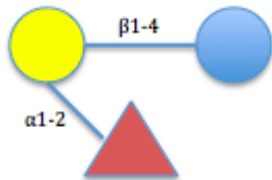


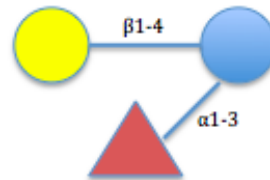
Abbildung 3. A) Bei einem iso-HMO führt eine Modifizierung durch β 1-6 Bindungen zwischen zwei Disaccharideinheiten zur Verzweigung. B) Lineare Strukturen werden als para-HMO bezeichnet und weisen keine Verzweigung auf.

Bei mehr als 15 Disacchariden kommt es zur Ausbildung eines komplex strukturierten Rückgrates. Dieses, aber auch die Laktose kann wiederum durch den Einbau von Fucose durch α 1-2, α 1-3 oder α 1-4 Bindungen und/oder Sialinsäure durch α 2-3 oder α 2-6 Bindungen modifiziert werden (siehe Abbildung 4) (19).

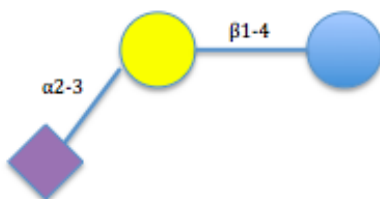
2'-Fucosyllaktose (2'FL)



3-Fucosyllaktose (3FL)



3'-Sialyllaktose (3'SL)



6'-Sialyllaktose (6'SL)

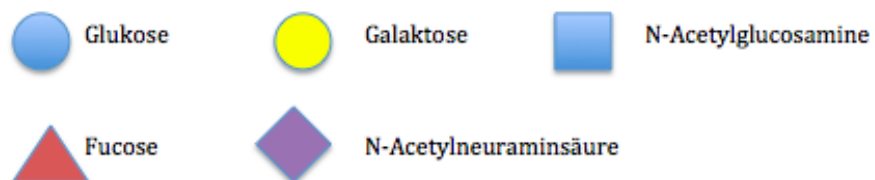
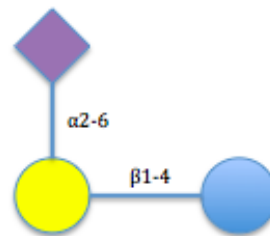


Abbildung 4. Modifizierung der Laktose oder Oligosaccharidkette durch Einbau von Fucose durch α 1-2, α 1-3 oder α 1-4 Bindungen und/oder Sialinsäure durch α 2-3 oder α 2-6.

Die einfachsten HMOs sind Trisaccharide, sie bestehen aus Lactose und sind durch Fucose und/ oder Sialinsäure modifiziert. Das so entstandene Grundgerüst kann durch

Disaccharide erweitert und wiederum durch Fucose und/oder Sialinsäure ergänzt werden (18).

1.7.2 Genetischer Einfluss auf Zusammensetzung und Konzentration der HMOs

Fucose kann nun über verschiedene Bindungen in das Grundgerüst von HMOs eingefügt werden. Ob und wie der Einbau erfolgt, hängt vom Sekretor- sowie Lewis-Status der Frau ab. Eine besondere Bedeutung kommt dem Enzym Fucosyltransferase 2 (FUT2) zu. Dieses katalysiert das Verknüpfen von Fucose über eine α 1-2-Bindung an Epitope der Lewis-Blutgruppe sowie an HMOs (20).

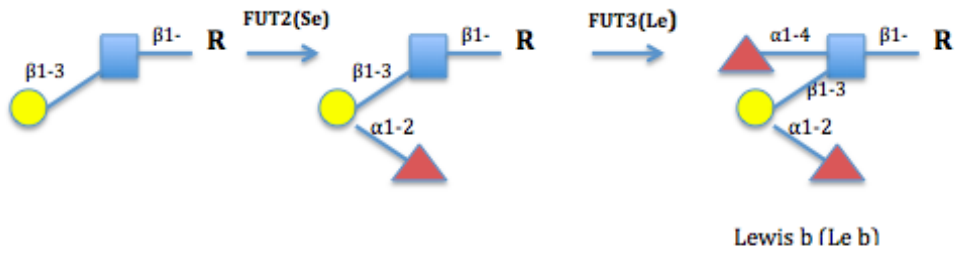
Die meisten Frauen, mehr als 70%, bilden dieses Enzym und weisen große Mengen an α 1-2-fucosylierten HMOs in der Muttermilch auf. Neben diesen, als Sekretor positiv bezeichneten Frauen, weisen Sekretor negative Frauen eine fehlende Expression der FUT2 auf. Demnach fehlen α 1-2-fucosylierte HMOs in der Muttermilch (19).

Unabhängig davon gibt es das Enzym Fucosyltransferase 3 (FUT3). Dieses Enzym kommt nur bei Frauen mit positiver Lewis-Blutgruppe vor und katalysiert den Fucoseeinbau über eine α 1-3/4-Bindung. Der Muttermilch von Frauen mit negativer Lewis-Blutgruppe fehlen α 1-3/4-fucosylierten HMOs, da dieses Enzym nicht aktiv ist (18).

Anhand der Aktivität von FUT2 und FUT3 lassen sich Frauen in vier Gruppen einteilen:

- Sekretor positiv, Lewis positiv: FUT2 und FUT3 aktiv
- Sekretor positiv, Lewis negativ: FUT2 aktiv, FUT3 inaktiv
- Sekretor negativ, Lewis positiv: FUT2 inaktiv, FUT3 aktiv
- Sekretor negativ, Lewis negativ: FUT2 und FUT3 inaktiv

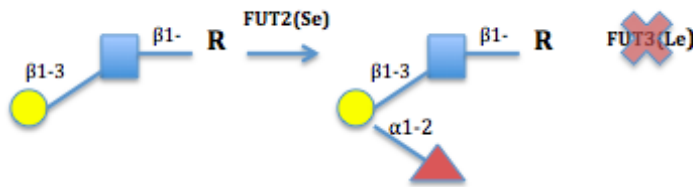
Lewis positiver Sekretor: Se+Le+



Lewis positiver Nicht-Sekretor Se-Le+



Lewis negativer Sekretor: Se+Le-



Lewis negativer Nicht-Sekretor: Se-Le-

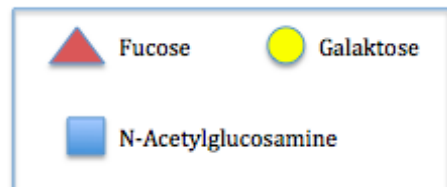
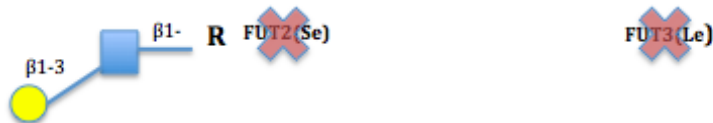


Abbildung 5. Der Einbau von Fucose in das Rückgrat der HMOs wird zum großen Teil von der mütterlichen Lewis-Blutgruppe und dem Sekretor-Status bestimmt. In Abhängigkeit der Enzymaktivität von Fucosyltransferase 2 (FUT2) und 3 (FUT3) können Frauen in vier Gruppen eingeteilt werden.

Anhand dieser Gruppeneinteilung ist ersichtlich, dass auch eine genetische Determinante Einfluss auf die Zusammensetzung der HMOs hat. Ob weitere Faktoren wie Metabolismus, Alter, allgemeiner Gesundheitszustand, Dauermedikation und andere Umweltfaktoren Auswirkungen auf die Zusammensetzungen haben, ist noch ungewiss (18,19).

1.7.3 Funktionen und Effekte

Bislang gibt es keine Informationen darüber, welche Rolle HMOs für die Mutter und in der Schwangerschaft spielen. Studien in Muttermilch zeigen lokale und systemische Effekte auf das gestillte Neugeborene (18). Auf Grundlage dieses Wissens könnte man davon ausgehen, dass HMOs auch im mütterlichen Organismus wirken.

1.7.3.1 Effekte auf das Neugeborene

1.7.3.1.1 Präbiotische, antiadhäsive und antimikrobielle Eigenschaften

Seit längerem ist der Einfluss von HMOs auf die Mikroflora des Darms bekannt, wobei sie hier zum einen als prebiotischer Bifidusfaktor für die Entwicklung einer gesundheitsfördernden Darmflora sorgen, und zum anderen zusätzlich eine Reduktion intestinaler Infektionen durch antiadhäsive Wirkung erzielen (siehe Abbildung 6A,B) (19). Da die HMOs nicht nur die Oberfläche des Darms, sondern auch die nasopharyngealen Regionen und zeitweise auch die oberen respiratorischen Atemwege vor Anheften von Bakterien, Viren und Protozoen schützen, weisen mit Muttermilch gestillte Säuglinge ein erniedrigtes Risiko auf, an Mittelohrentzündung oder Infektionen mit dem Respiratorischen-Syncytial-Virus (RSV) zu erkranken.

Da HMOs im Darm absorbiert und im Urin ausgeschieden werden, vermutet man, dass HMOs auch bei urogenitalen Infektionen eine protektive Rolle spielen könnten (18). Neben präbiotischen und antiadhäsiven Eigenschaften verfügen HMOs auch über eine direkte antimikrobielle Wirkung auf einige Pathogene. So wurde z.B. beobachtet, dass HMOs die Proliferation des Bakteriums *Streptococcus agalaticae* unterdrücken und es zu einer eingeschränkten Interaktion zwischen Wirt und fungalen Krankheitserregern wie *Candida albicans* kommt (19).

1.7.3.1.2 Einfluss auf Zellen des Darms und Immunsystems

In vitro Studien zeigen, dass es auch zu direkten Interaktionen zwischen HMOs und intestinalen Epithelzellen kommt. Hierbei wirken HMOs direkt auf die intestinalen Epithelzellen ein, indem sie die Genexpression, den Zellzyklus sowie die Glykosylierung der Zelloberfläche beeinflussen (siehe Abbildung 6C) (18).

In-vitro Untersuchungen legen nahe, dass HMOs auch direkten Einfluss auf das Immunsystem nehmen (18). Dies geschieht durch eine lokale Wirkung auf Zellen des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes sowie eine systemische Wirkungsweise der HMOs im Blutkreislauf (21–23). Außerdem scheint es, dass sialylierte HMOs auf die Reifung von Lymphozyten wirken und zu einer ausgeglicheneren Th1/Th2-Cytokin-Produktion der T-Zellen und somit zu einer reduzierten Immunantwort führen (siehe Abbildung 6D) (18). Durch eine herabgesetzte Produktion von IL-4 (Interleukin-4) dürfte die Gegenwart bestimmter sialylierter HMOs zur Prävention von Allergien führen (24).

Eine Besonderheit zeigen die HMOs bei positiver Lewis-Blutgruppe. Sie können Selektin-assoziierte Zell-Zell-Reaktionen beeinflussen und reduzieren, was zur Verminderung der Migration in den subendothelialen Entzündungsbereich, sowie der weiteren Aktivierung der Leukozyten führt (siehe Abbildung 6E) (25,26).

Ob diese Effekte nun wirklich vorteilhafte Auswirkungen auf die Gesundheit der Säuglinge zeigen, bleibt unklar. Allerdings besteht in den ersten Phasen von Erkrankungen wie der nekrotisierenden Enterocolitis eine erhöhte Mukosainfiltration durch Leukozyten und deren Aktivierung. Bemerkenswert ist, dass das Erkrankungsrisiko bei gestillten Säuglingen um das 10-fache niedriger ist, als bei Kindern, die mit Fläschchenmilch ernährt wurden (27,28). Ein direkter Zusammenhang zwischen Erkrankungsrisiko und HMOs konnte bisher nur im Rattenmodell nachgewiesen werden (29).

1.7.3.1.3 Förderung der Hirnentwicklung

Vergleiche von zu frühgeborenen Kindern, die mit Muttermilch bzw. Fläschchenmilch ernährt worden sind, zeigen bei gestillten Säuglingen bessere Hirnentwicklungswerte im Alter von 18 Monaten sowie einen höheren Intelligenzquotienten im Alter von sieben Jahren (30,31). Die Hirnentwicklung sowie kognitive Fähigkeit sind von Gangliosiden und Glykoproteinen abhängig, die Sialinsäure enthalten. Um den hohen Verbrauch an Sialinsäure für die Entwicklung zu gewährleisten, schließt man aus tierischen Versuchen,

dass dieser essentielle Nährstoff durch die HMOs in der Muttermilch bereitgestellt wird (siehe Abbildung 6F) (32,33). So zeigen postmortale Analysen des Hirns von gestillten Säuglingen deutlich höhere Konzentrationen an mit Sialinsäure angereicherten Gangliosiden und Glykoproteinen als jene die mit Fläschchenmilch ernährt wurden (34). Sialylierte HMOs könnten diese Sialinsäure liefern. Ob HMOs allerdings zur Hauptquelle der Sialinsäure zählen, ist noch ungewiss (18).

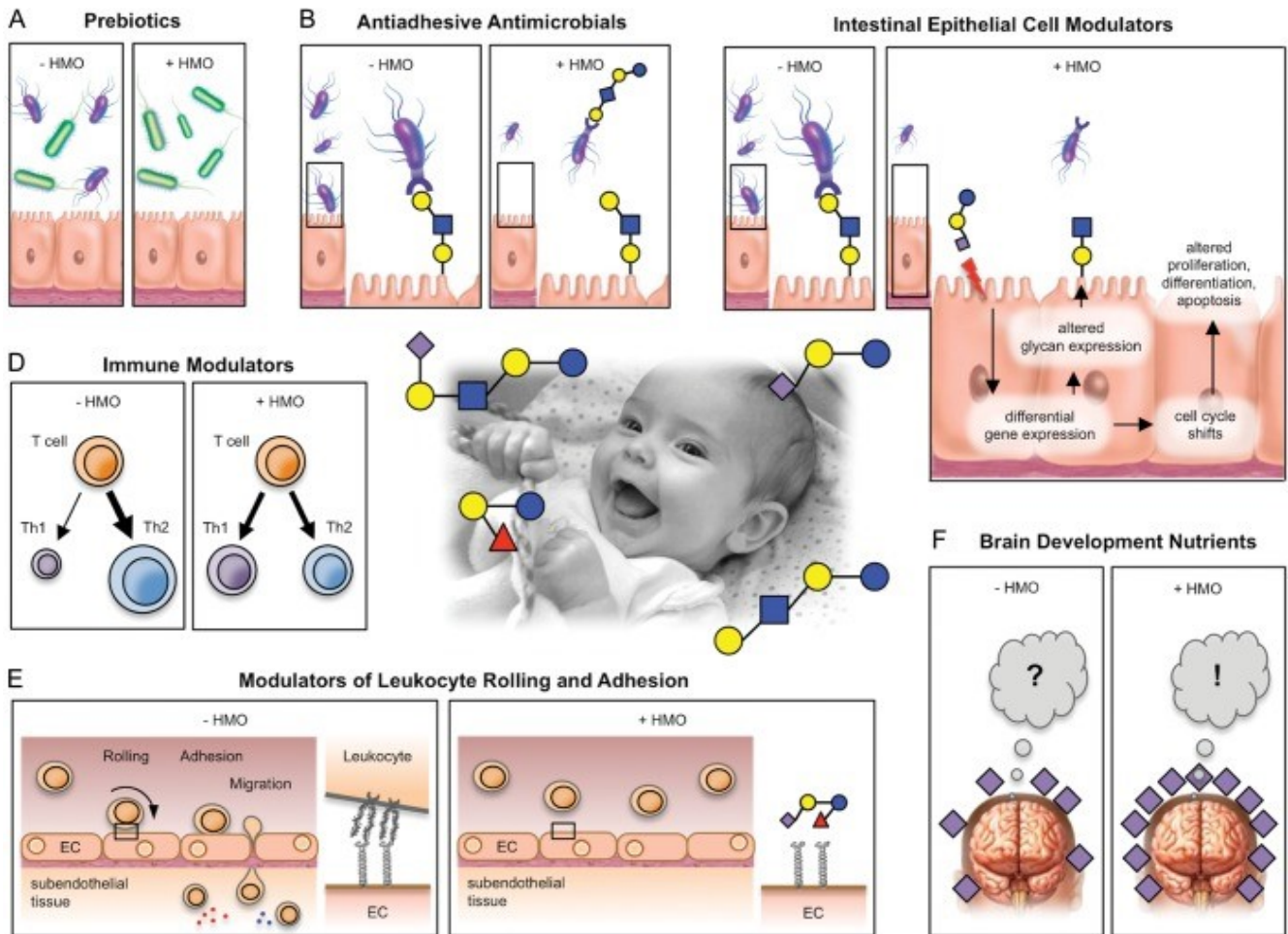


Abbildung 6. Mögliche Effekte der HMOs auf den gestillten Säugling. A) HMO wirken als prebiotischer Bifidusfaktor, welcher für die Gestaltung einer gesundheitsfördernden Darmflora sorgt. B) HMOs erzielen eine antiadhäsive Wirkung, was zu einer Reduktion intestinaler Infektionen führen kann. C) Durch direkte Interaktionen mit intestinalen Epithelzellen kommt es zur Induktion einer differenzierten Genexpression und zu einem Umprogrammieren des Zellzyklus sowie der Glykosylierung der Zelloberfläche. D) Durch Einwirken auf die Reifung der Lymphozyten kommt es zu einer ausgeglicheneren Th1/Th2-Cytokin-Produktion der T-Zellen und somit zu einer geringeren Immunantwort. E) HMOs bei positiver Lewis-Blutgruppe können Selektin-assoziierte Zell-Zell-Reaktionen beeinflussen und reduzieren, was zu einer Herabsetzung der Migration in den subendothelialen Entzündungsbereich sowie der weiteren Aktivierung der Leukozyten führt. F) HMO stellen einen essentiellen Nährstoff zur Entwicklung von Gehirn und kognitiven Fähigkeiten zur Verfügung (18).

1.7.3.2 Präbiotische Funktionen der HMOs im maternalen Organismus

Präbiotische Eigenschaften könnten sich möglicherweise auf das Mikrobiom der Milchdrüse und der Plazenta auswirken. Wegen des Vorhandenseins von HMOs im Urin von Schwangeren und stillenden Frauen könnte auch das Mikrobiom im Urogenitaltrakt von der Wirkung der HMOs betroffen sein. Darüber hinaus sind auch systemische Effekte im maternalen Körper vorstellbar (18).

1.7.3.3 Wechselwirkung zwischen HMOs und Insulin

In einer Studie an fettleibigen Mäusen konnte gezeigt werden, dass das HMO Lacto-N-Fucopentaose III (LNFPIII) die Glukosetoleranz und Insulinsensitivität erhöhen kann. Die Autoren erklären diesen Effekt durch eine erhöhte Produktion von Interleukin-10: LNFPIII aktiviert Makrophagen und dendritische Zellen, die dadurch vermehrt Interleukin-10 ausschütten. Interleukin-10 reduziert den chronischen Entzündungszustand des weißen Fettgewebes und sensibilisiert die Insulinantwort von Adipozyten (35).

Da der chronische Entzündungszustand vor allem für die Entwicklung der mit metabolischen Syndrom assoziierten Krankheiten wie reduzierte Insulinsensitivität, T2D, Arteriosklerose und nichtalkoholische Fettleber hauptverantwortlich ist, können positive Effekte auch auf weitere Folgeerkrankungen vermutet werden. Hierzu zählt z.B. die Unterdrückung der Lipogenese in der Leber, welche der Hepatosteatose entgegenwirkt (35).

Interessanterweise ist der Gesamtanteil an HMOs bei Frauen mit einem BMI zwischen 14 und 18 niedriger als mit einem BMI zwischen 24 und 28. Ob aber Mangelernährung oder bestimmte Nahrungsdefizite Einfluss auf Zusammensetzung und Menge der HMOs hat, ist noch ungewiss (20).

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

In dieser longitudinalen prospektiven Beobachtungsstudie wurden 53 gesunde schwangere Frauen rekrutiert. Über den Zeitraum der Schwangerschaft bis zur Geburt wurden die Frauen vier Mal zu Studienbesuchen ins Krankenhaus für Blutabnahmen und weitere Untersuchungen gebeten (Jeweils ein Krankenhausbesuch pro Trimester sowie zum Zeitpunkt der Geburt).

2.2 Rekrutierung

Zwischen Februar und Oktober 2013 wurden Frauen im frühestmöglichen Schwangerschaftsstadium von der Ambulanz für Geburtshilfe der Medizinischen Universität Graz rekrutiert. Um an der Studie teilnehmen zu können, unterschrieben die Patientinnen eine Einverständniserklärung.

Einschlusskriterien:

1. Bestehende Schwangerschaft in der 10.-14. Schwangerschaftswoche
2. Unterschriebene Einverständniserklärung

Ausschlusskriterien:

1. Bestehende Schwangerschaft überschreitet die 14. Schwangerschaftswoche
2. Patientin lehnt Geburt im Universitätskrankenhaus ab
3. Mehrlingsschwangerschaft
4. Drei oder mehr aufeinander folgende Fehlgeburten
5. Ein erhöhtes Risiko von $>1:1000$ für Chromosomenstörungen nach einem Combined Test und Nichtdurchführen des Nicht-invasiven Pränataltests (NIPT) oder weiterer invasiver Tests zum Ausschluss von Chromosomenanomalien
6. Fetale Anomalien, welche sich mit möglichen Wachstums- oder Genetikanomalien assoziieren lassen
7. Rauchen, bekannter T1D oder T2D
8. GDM
9. Maternale metabolische Risikofaktoren wie ein erhöhtes Risiko an thrombembolischen Ereignissen zu erkranken, welche eine antikoagulative Therapie erfordern.
10. Bekannter Hypertonus vor der Schwangerschaft

2.3 Datengewinnung

2.3.1 Untersuchungsintervalle

Insgesamt wurden die Patientinnen für diese Studie zu vier Zeitpunkten untersucht.

1. Visit 1 (V1): Erstes Trimester (10.-14. SSW)
2. Visit 2 (V2): Zweites Trimester (20.-24 SSW)
3. Visit 3 (V3): Drittes Trimester (32.-36. SSW)
4. Zeitpunkt der Geburt

2.3.2 HMO-Messung

2.3.2.1 Material

Zu jedem der vier Zeitpunkte wurden Blutproben abgenommen (jeweils 20ml, Serum und EDTA Vacuette System). HMOs wurden durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aus den Blutproben bestimmt.

2.3.2.2 HMO Analyse

Die Serumproben wurden wie folgt aufbereitet: Zu 25µl mütterlichen venösen Blutserum wurde Raffinose als interner Standard hinzugefügt, anschließend einer Chloroform-/Methanolextraktion unterzogen, mithilfe von C18 deproteinisiert, und mit porösen Graphitkohlenstoff entsalzt. In Verwendung des Hochdurchsatz-Screenings wurden isolierte HMOs in Mikrotiterplatten eluiert, getrocknet und mit der fluoreszierenden Markierungskomponente 2-Aminoenzamid versehen.

Anschließend wurde die HPLC mit einer Amide-80 Säule durchgeführt und die HMOs mittels Fluoreszenzdetektion erfasst. Diese Analyse wurde im Forschungslabor für Gynäkologie und Geburtshilfe der Medizinischen Universität Graz sowie im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMF) der Medizinischen Universität Graz durchgeführt.

2.3.3 Erfassung metabolischer Faktoren

2.3.3.1 Material

Werte zu Adiponektin, Follistatin und Leptin wurden aus den Blutproben der vier Blutentnahmen bestimmt, während Nüchtern glukose bei einem zusätzlichen Untersuchungstermin in der 24.-28. SSW durch einen oralen Glukosetoleranztest (oGTT) gemessen wurde.

2.3.3.2 Methode zur Erfassung von Glukose, Adiponektin, Leptin und Follistatin

Die Serumproben wurden durch konventionelle Methoden der klinischen Chemie für Glukose, Adiponektin, Leptin und Follistatin untersucht. Die Multiplex-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie der Medizinischen Universität Graz durchgeführt.

2.3.4 Weitere Datensammlung über die Patientinnen

Demographische Daten wie Alter, Ethnizität, Familienstand, Parität, maternale Körpergröße, Körpergewicht und Gewichtszunahme während der Schwangerschaft wurden zusätzlich erhoben.

2.4 Datenmanagement

Die Studie setzt sich aus einem klinischen und einem analytischen Teil zusammen. Mit Anmeldung zur Studie wurde den Studienteilnehmerinnen eine willkürliche Studienidentifikationsnummer, elektronisch generiert, zugeordnet. Die während der Studie erfassten Informationen wurden ausschließlich unter der zugeordneten anonymisierten Studien-ID registriert, Daten zu Identität der Teilnehmerinnen waren nicht einsehbar. Um die Organisation und Erfassung der Daten der einzelnen Patientinnen zu ermöglichen, waren Informationen über Name, Geburtsdatum und Kontaktdaten mit der Studien-ID verbunden und konnten passwortgeschützt vom klinischen Studienleiter sowie den medizinischen Studienassistentinnen eingesehen werden. Der klinische Studienteil wurde vom klinischen Studienleiter und den Studienassistentinnen durchgeführt. Sie waren für die Rekrutierung sowie Einholen der unterschriebenen Einverständniserklärung der Teilnehmerinnen und der Probenentnahme verantwortlich.

Der analytische Teil der Studie mit Bearbeiten und Analysieren der Blutproben fand im Labor statt. Für Labor und statistische Auswertung standen dem Laborteam nur die anonymisierten Daten und Proben der Studienteilnehmer zur Verfügung. Technische Ressourcen des Landeskrankenhauses LKH Graz wurden für Datensicherung und -aufbewahrung genutzt.

Alle an der Studie teilnehmenden Personen unterschrieben eine Geheimhaltungserklärung.

2.5 Datenanalyse

2.5.1 Stichprobenumfang

Da diese Studie als Pilotstudie geplant war, wurde keine exakte Stichprobengröße berechnet. Mit ca. 60 rekrutierten Teilnehmerinnen sollte eine Übersicht zur Durchführbarkeit dieser Studie erhalten werden.

2.5.2 Statistische Analyse

Das Datenmaterial wurde anhand von Excel und IBM SPSS Statistics 23 analysiert. Die Verarbeitung der Daten wurde mit der Hilfe von deskriptiver Statistik sowie ausgewählten Tests durchgeführt. Für die auszuwertenden Variablen wurden Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Maximum, Median und Quartile mit Ausreißern ermittelt. Mit SPSS wurde die deskriptive und explorative Statistik mittels Shapiro-Wilk-Test, t-Test und Whitney U-Test sowie linearen Regressionsmodellen erfasst. Ein Signifikanzniveau von 95% wurde gewählt und ein p-Wert <0.05 als signifikant betrachtet. Die Ergebnisse wurden durch Box Plots mit Median, 1. und 3. Quartil sowie Minimum und Maximum grafisch dargestellt. Anschließend wurden zur Beurteilung möglicher bivariater Korrelationen der parametrischen bzw. nicht-parametrischen Daten der Korrelationskoeffizient nach Pearson bzw. Spearman und der p-Wert berechnet. Signifikante Korrelationen wurden als Streudiagramm mit Regressionsmodellen graphisch dargestellt. Um direkte Zusammenhänge zwischen den metabolischen Faktoren und den HMOs zu ermitteln, wurden die V2-Werte analysiert. Um verzögerte Zusammenhänge zu erkennen wurden die V1-Werte der metabolischen Faktoren mit den V2-Werten der HMOs analysiert.

3 Hypothesen und Ziele

Adiponektin, Leptin sowie Follistatin beeinflussen die Glukosehomöostase.

Die zweite Hälfte der Schwangerschaft ist durch Insulinresistenz der Mutter gekennzeichnet. Deshalb könnten die genannten metabolischen Faktoren eine wichtige Rolle für den Glukosehaushalt des weiblichen Metabolismus während der Schwangerschaft spielen.

Daher stellen wir die Hypothese auf, dass metabolische Faktoren Auswirkungen auf Konzentration und Zusammensetzung der HMOs im maternalen Serum zeigen.

Mögliche Zusammenhänge zwischen Konzentrationen von Adiponektin, Leptin, Follistatin und Nüchternglukose werden zum Zeitpunkt V1 und V2, und Konzentrationen der HMOs 3'SL und 2'FL zum Zeitpunkt V2 analysiert. Diese Zeitpunkte wurden ausgewählt um direkte (V2-Werte der metabolischen Faktoren und V2-Werte der HMOs) und verzögerte Zusammenhänge (V1-Werte der metabolischen Faktoren und V2-Werte der HMOs) feststellen zu können.

Da die Produktion des humanen Oligosaccharids 2'FL vom Sekretorstatus der Frau abhängt, wurden Unterschiede bezüglich der Konzentrationen der metabolischen Faktoren zusätzlich in Abhängigkeit der Sekretorgruppe getestet.

4 Ergebnisse – Resultate

4.1 Studienpopulation

Insgesamt wurden 53 Frauen in der Frauenklinik des Landeskrankenhauses Graz zwischen Februar und Oktober 2013 rekrutiert.

Von 450 in diesem Zeitraum durchgeführten Combined Tests, erfüllten 160 Frauen die Einschlusskriterien der Studie, 53 unterschrieben letztendlich die Einverständniserklärung.

Zwei dieser Patientinnen wurden anschließend aus gesundheitlichen Gründen und weitere 10 Patientinnen durch fehlende Anwesenheit zu den Untersuchungszeitpunkten ausgeschlossen. Die Daten der 41 verbleibenden Frauen konnten größtenteils zur Veranschaulichung der einzelnen metabolischen Faktoren herangezogen werden.

Zur Untersuchung unserer Hypothesen haben wir Frauen mit inkompletten Datensätzen aus der Studie exkludiert. Die Anzahl der tatsächlichen Studienpopulation beträgt abhängig vom zu betrachtenden metabolischen Faktor $n=26-32$. Es wurden nur Frauen mit einbezogen, bei denen die Werte zu V1 und V2 bezüglich eines metabolischen Faktors vollständig waren.

4.3 Demographische Grunddaten

Die demographischen Daten wurden mittels Fragebogen zu Beginn der Studie erhoben.

Tabelle 1. Demographische Daten

	Min.	Max.	Mittelwert	Standardabweichung
Alter (Jahre)	22	44	33,9	5,3
Größe (cm)	156	182	167,7	6,0
Gewicht (kg)				
V1	50,3	95,0	64,6	9,04
V2	53,7	101	69,1	9,87
V3	60,0	101,0	75,8	9,29
Geburt	60,0	112,0	78,5	10,2
Gewichtszunahme	2,0	32,0	15,4	5,5
BMI				
Vor Geburt	18,00	28,70	22,44	2,70
Geburt	21,31	35,35	27,84	3,12
Änderung des	0,73	11,39	5,51	1,95
BMI				
Gravida	1	6	2,00	1,13
Para	0	3	0,55	0,76

4.4 Metabolische Faktoren

Für die Faktoren Adiponektin, Leptin, Follistatin sowie Nüchtern glukose wurde zunächst eine deskriptive statistische Analyse durchgeführt. Um herauszufinden, welcher Test zur weiteren Auswertung der Parameter verwendet werden soll, wurde zur Prüfung auf Normalverteilung der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Anschließend wurden zur nachfolgenden Beurteilung der Daten parametrische bzw. nicht-parametrische Tests angewandt. Aufgrund des kleinen Stichprobenumfanges wurde die Regressionsanalyse nicht als geeignet angesehen, weshalb die Daten einer explorativen Datenanalyse unterzogen werden.

4.4.1 Adiponektin

Bei einem Stichprobenumfang von 36 Frauen liegen die Mittelwerte für Adiponektin bei $2930,2 \pm 1301,3$ $\mu\text{g/ml}$ bei V1, bei $2842,0 \pm 1356,7$ $\mu\text{g/ml}$ bei V2 und $2214,5 \pm 1231,5$ $\mu\text{g/ml}$ bei V3.

Tabelle 2. Serumadiponektinwerte bei V1-V3

	Min.	Max.	Mittelwert	SA
Adiponektin $\mu\text{g/ml}$ Visit 1	270,4	5427,44	2930,2	1301,3
Adiponektin $\mu\text{g/ml}$ Visit 2	897,5	6269,88	2842,0	1356,7
Adiponektin $\mu\text{g/ml}$ Visit 3	129,2	5555,48	2214,5	1231,5

Min.: Minimum; Max.: Maximum; SA: Standardabweichung

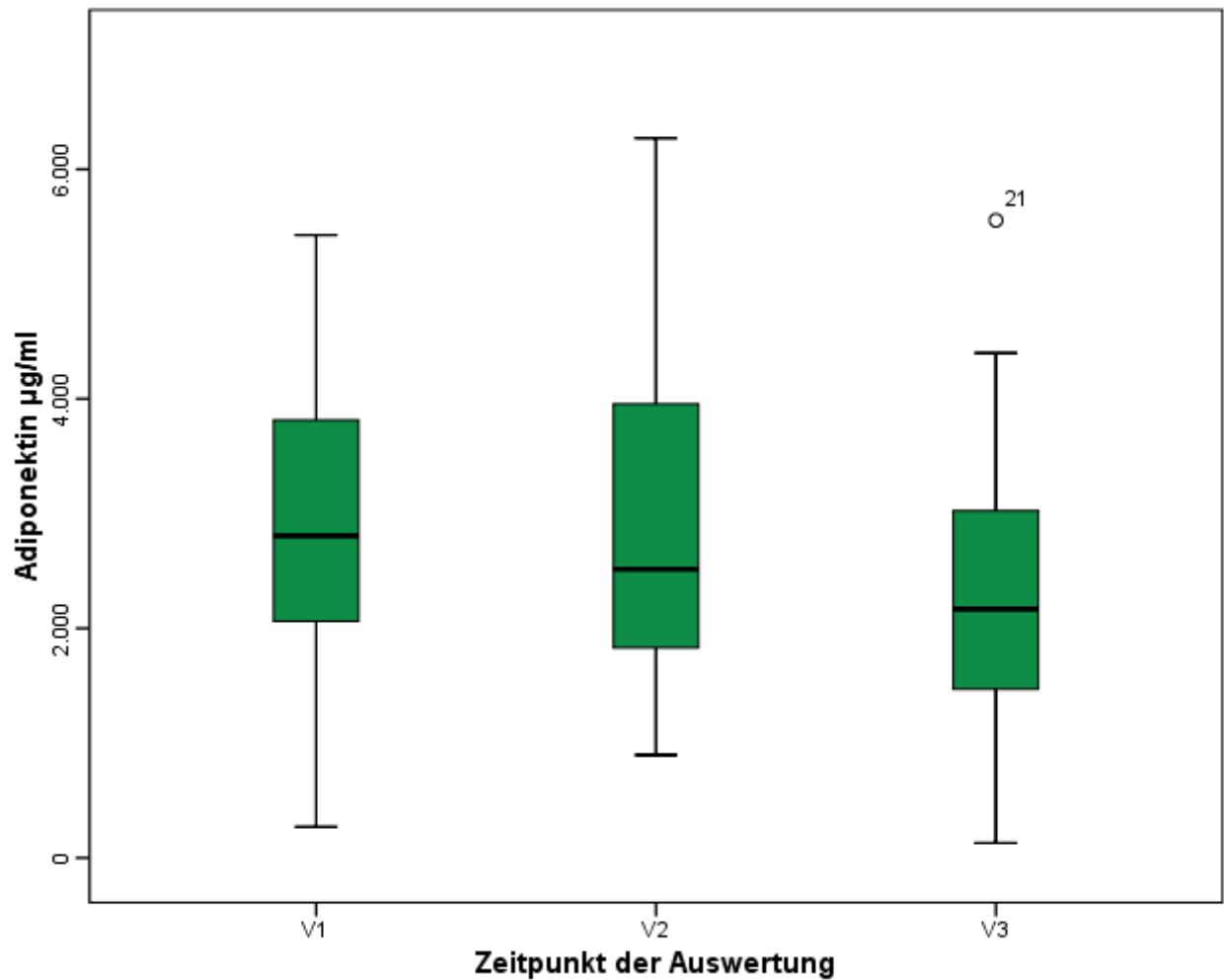


Abbildung 7. Mütterliche Serumadiponektinwerte während der Schwangerschaft (V1-V3). Der Box Plot zeigt die 25. und 75. Perzentile und jeweiligen Median, die oberen und unteren Whiskers die Ausreißer.

4.4.2 Leptin

Bei einem Stichprobenumfang von 39 Frauen liegen die Mittelwerte bei $2292,6 \pm 1486,4$ $\mu\text{g/ml}$ bei V1 und $3035,6 \pm 2001,0$ $\mu\text{g/ml}$ bei V2 und $3281,1 \pm 1895,3$ $\mu\text{g/ml}$ bei V3.

Tabelle 3. Serumleptinwerte bei V1–V3

	Min.	Max.	Mittelwert	SA
Leptin $\mu\text{g/ml}$ Visit 1	94,4	7900,4	2292,6	1486,4
Leptin $\mu\text{g/ml}$ Visit 2	164,4	9985,7	3035,6	1773,2
Leptin $\mu\text{g/ml}$ Visit 3	0,0	8971,5	3281,1	1895,3

Min.: Minimum; Max.: Maximum; SA: Standardabweichung

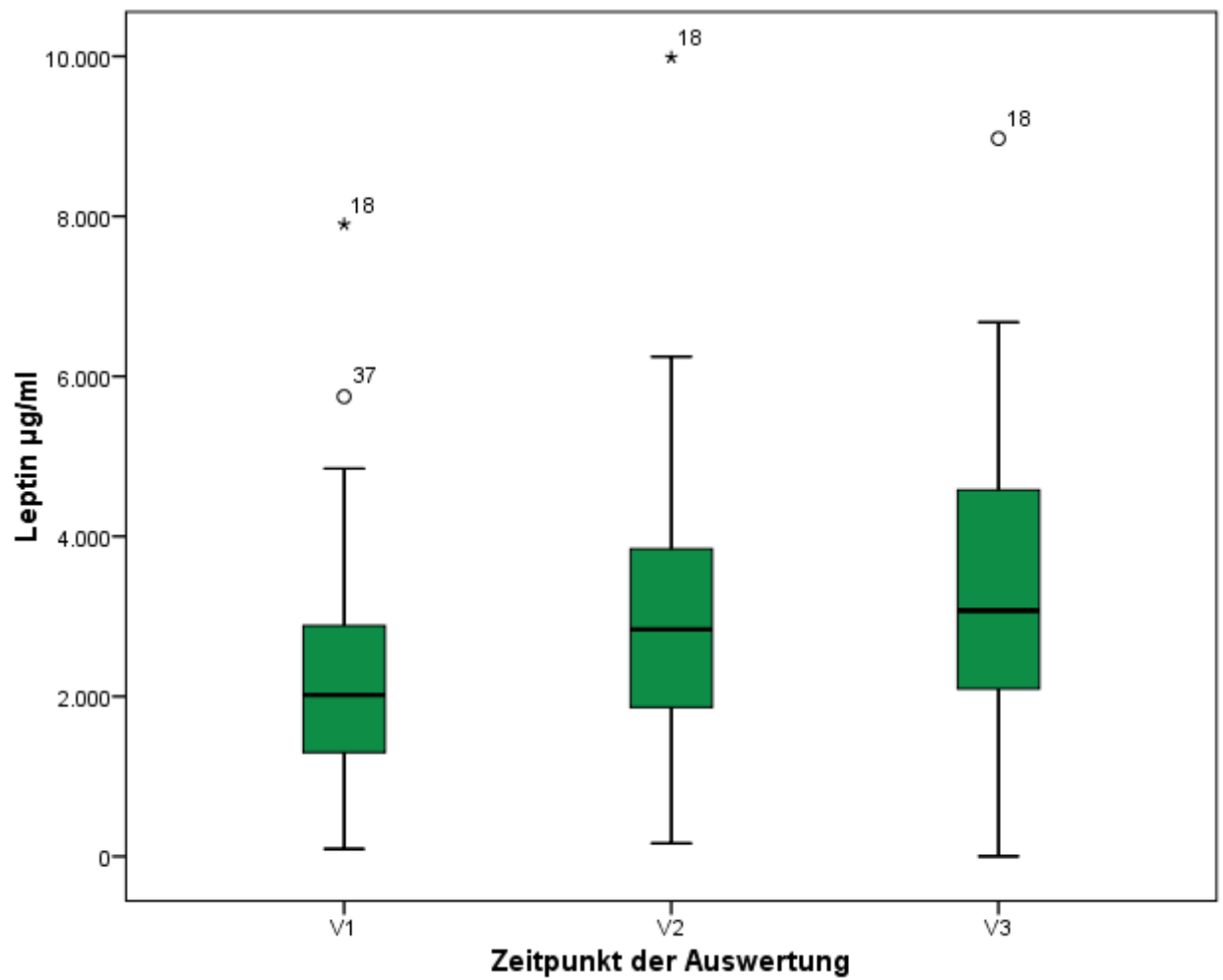


Abbildung 8. Leptin während der Schwangerschaft (V1-V3). Der Box Plot zeigt die 25. und 75. Perzentile und jeweiligen Median, die oberen und unteren Whiskers die Ausreißer.

4.4.4 Follistatin

Bei einem Stichprobenumfang von 32 Frauen, liegen die Mittelwerte bei $64,9 \pm 5,7$ µg/ml bei V1, $68,78 \pm 5,9$ µg/ml bei V2 und $83,8 \pm 21,2$ bei V3.

Tabelle 4. Serumfollistatinwerte bei V1-V3

	Min.	Max.	Mittelwert	SA
Follistatin µg/ml Visit 1	57,6	81,1	64,9	5,79
Follistatin µg/ml Visit 2	60,6	84,1	68,8	5,97
Follistatin µg/ml Visit 3	64,3	116,3	86,5	15,15

Min.: Minimum; Max.: Maximum; SA: Standardabweichung

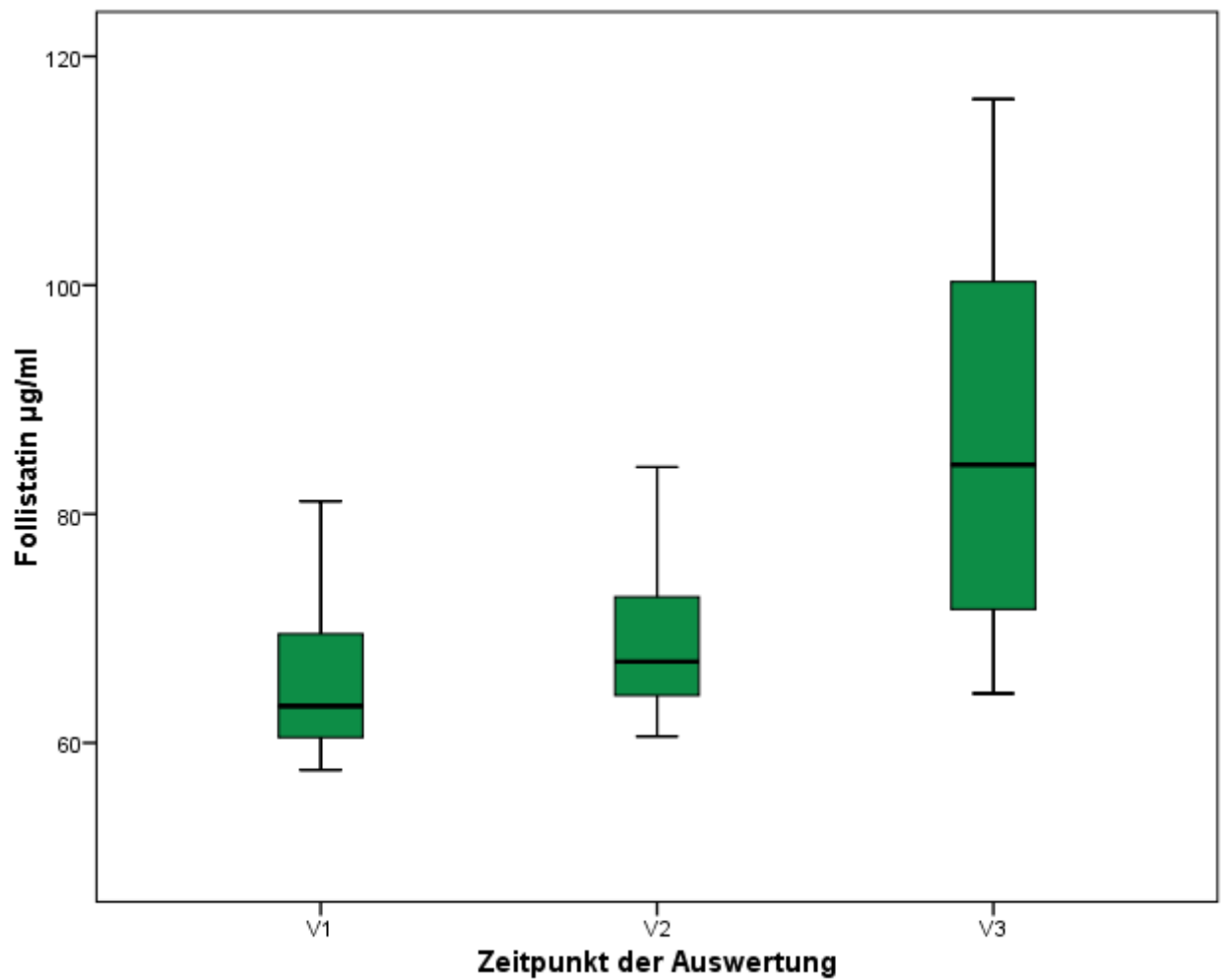


Abbildung 9. Follistatin während der Schwangerschaft (V1-V3). Der Box Plot zeigt die 25. und 75. Perzentile und jeweiligen Median, die oberen und unteren Whiskers die Ausreißer.

4.4.6 Nüchtern glukose oGTT

Bei einem Stichprobenumfang von 41 Frauen, liegt der Mittelwert bei $78,9 \pm 6,9$ mg/dl. Die Daten waren nicht normalverteilt.

Tabelle 5. Nüchtern glukosewerte zum Zeitpunkt des oGTT

	Min.	Max.	Mittelwert	SA
Nüchtern glukose [mg/dl]	69	100	78,85	6,88

Min.: Minimum; Max.: Maximum; SA: Standardabweichung

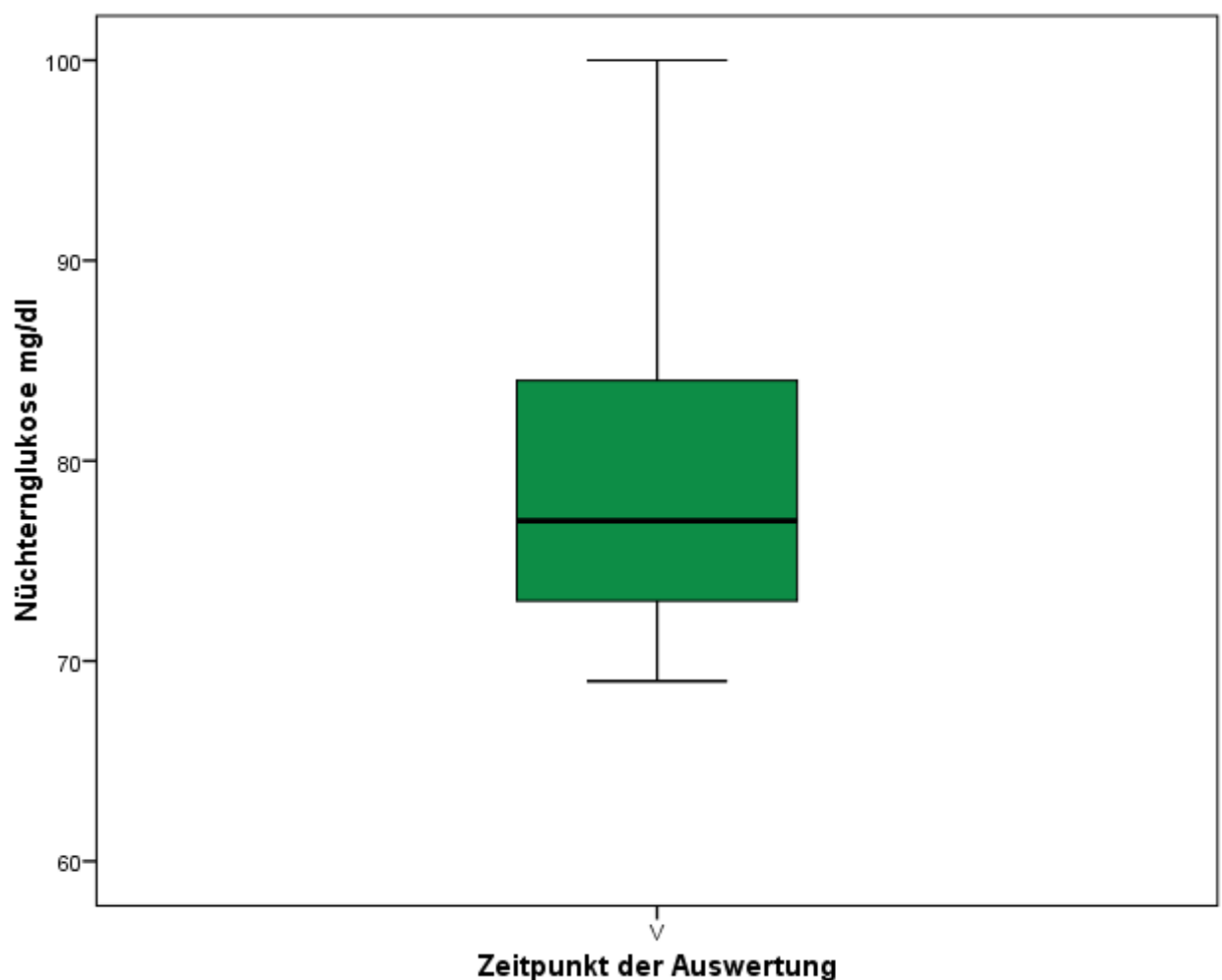


Abbildung 10. Nüchtern glukose während der Schwangerschaft. Der Box Plot zeigt die 25. und 75. Perzentile und den Median, die oberen und unteren Whiskers die Ausreißer.

4.4.7 Unterschiede durch Sekretorgruppen

Die Produktion des humanen Oligosaccharids 2-Fucosyllaktose (2'FL) ist vom Sekretor-Status der Schwangeren abhängig, da nur Sekretor positive Frauen das FUT2 produzieren und somit 2'FL bilden können.

Ob sich Unterschiede bezüglich der Konzentrationen der metabolischen Faktoren in Abhängigkeit der Sekretorgruppen zeigen, wird im Folgenden getestet.

Da es sich bei den Adiponektinkonzentrationen um normalverteilte Werte handelt, wurde der t-Test zur Auswertung verwendet. Die weiteren Faktoren Leptin, Follistatin und Nüchtern glukose wurden mittels Mann-Whitney U Test getestet.

4.4.7.1 Adiponektin

Da die Werte der Adiponektinkonzentrationen bei allen der drei Visits normalverteilt waren, wurde der t-Test zur weiteren Auswertung verwendet. Es zeigte sich aber kein signifikant unterschiedliches Ergebnis bei Sekretor positiven vs. negativen Frauen.

4.4.7.2 Leptin

Bei Anwendung des Mann-Whitney-U Tests zeigten sich unveränderte Leptinwerte im Serum zwischen V1 und V2, bei V3 waren die Leptinwerte zwischen Sekretor positiven vs. Sekretor negativen Frauen signifikant unterschiedlich ($p=0,009$).

4.4.7.3 Follistatin

Die Verteilung von Follistatin bei V1-V3 ist zwischen Sekretor positiven und Sekretor negativen Frauen unverändert.

4.4.7.4 Nüchtern glukose

Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Sekretor-Status gefunden werden ($p=0,610$).

4.5 Metabolische Faktoren und Humane Milcholigosaccharide

Da sich bei V1 und V2 kein signifikanter Unterschied zwischen Sekretor positiven vs. Sekretor negativen Frauen ergeben hat und keine signifikanten Konzentrationsunterschiede der untersuchten metabolischen Faktoren zu V1 und V2 in Abhängigkeit des Sekretor-Status gezeigt haben, wurden weitere Analysen ohne dieses Kriterium durchgeführt.

Um eine Korrelation der metabolischen Faktoren Adiponektin, Leptin, Follistatin sowie Nüchtern glukose gegenüber humanen Oligosacchariden analysieren zu können, wird der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit Signifikanzniveau von 5% berechnet.

Wie unter Punkt 3 bereits erwähnt, wurden mögliche Zusammenhänge der ersten zwei Messungszeitpunkte V1 und V2 der metabolischen Faktoren gegenüber dem zweiten Zeitpunkt V2 der Messungen der HMOs analysiert, um eventuell verspätete Zusammenhänge erkennen zu können.

4.5.1 Adiponektin in Bezug auf 2'FL und 3'SL

Die Analyse eines möglichen Zusammenhangs zwischen den Adiponektinwerten und den HMOs 2'FL und 3'SL zeigt keine signifikanten Korrelationen.

Tabelle 6. Korrelation von HMO zum Zeitpunkt V2 mit Adiponektinwerten zu den Zeitpunkten V1 und V2.

	Adiponektin V1		Adiponektin V2		n
	Rho	p-Wert	Rho	p-Wert	
2'FL Visit 2	0,232	0,216	0,201	0,286	30
3'SL Visit 2	-0,122	0,514	-0,138	0,461	31

4.5.2 Leptin in Bezug auf 2'FL und 3'SL

Leptinwerte korrelieren positiv mit 3'SL, wobei eine mittlere signifikante Korrelation nur für Konzentrationen von Leptin und 3'SL zum Zeitpunkt V2 berechnet werden konnte.

Tabelle 7. Korrelation von HMOs zum Zeitpunkt V2 mit Leptinwerten zu den Zeitpunkten V1 und V2.

	Leptin Visit 1		Leptin Visit2		n
	Rho	p-Wert	Rho	p-Wert	
2'FL Visit 2	-0,097	0,603	-0,015	0,937	31
3'SL Visit 2	0,243	0,179	0,419	0,017	32

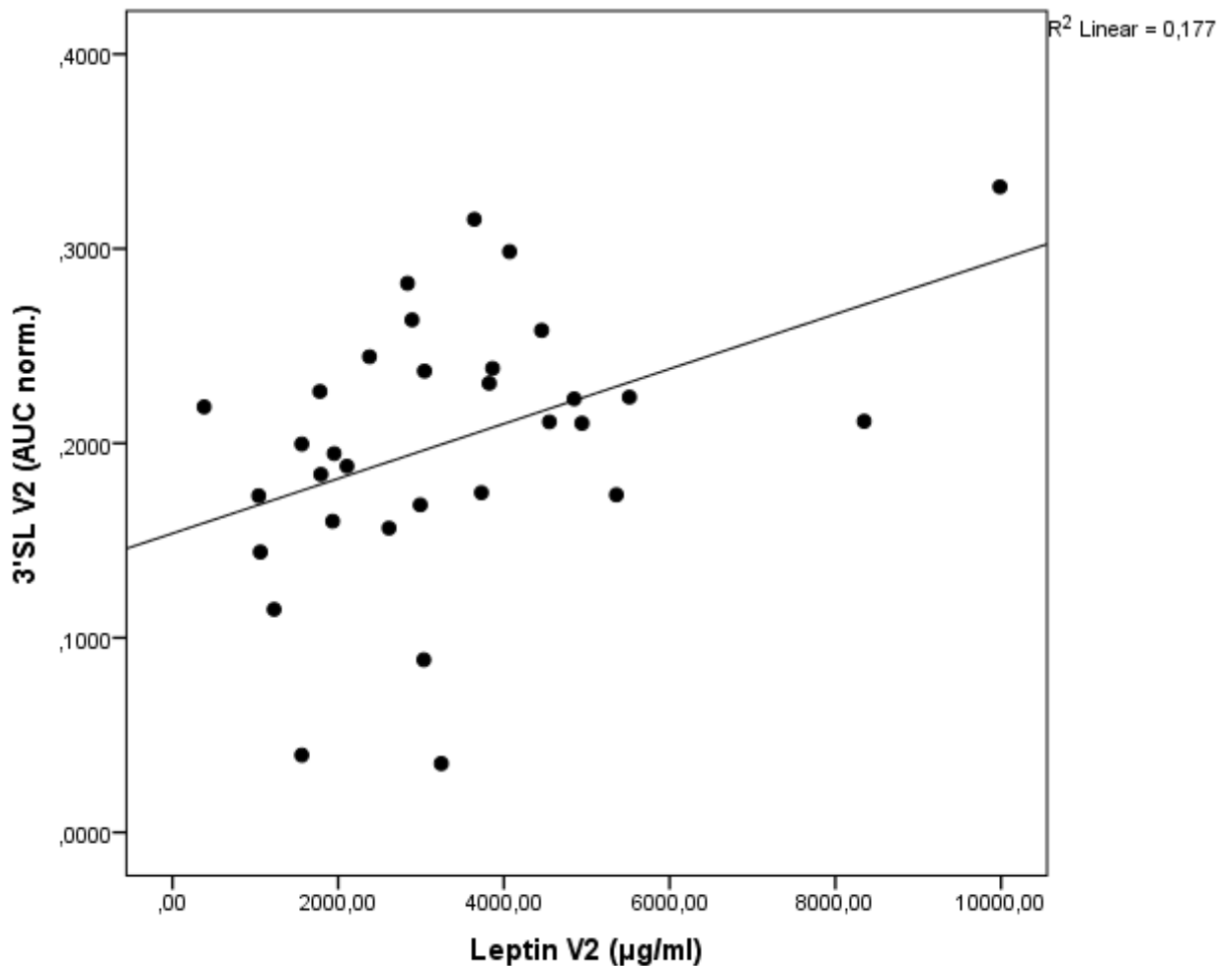


Abbildung 11. Korrelation von 3'SL(V2) mit Leptin (V2). Die Korrelation nach Spearman zeigt eine positive Korrelation. (rho=0,419; p-Wert=0,017)

4.5.3 Follistatin in Bezug auf 2'FL und 3'SL

Es konnten keine signifikanten Zusammenhänge nachgewiesen werden.

Tabelle 8. Korrelation von HMOs zum Zeitpunkt V2 mit Follistatinwerten zu den Zeitpunkten V1 und V2.

	Follistatin V1		Follistatin V2		n
	Rho	p-Wert	Rho	p-Wert	
2'FL Visit 2	0,152	0,449	0,198	0,322	27
3'SL Visit 2	0,218	0,265	0,222	0,256	28

4.5.4 Nüchtern glukose in Bezug auf 2'FL und 3'SL

Es liegt kein signifikanter Zusammenhang zwischen Nüchtern glukose und HMOs vor.

Tabelle 9. Korrelation von HMOs zum Zeitpunkt V2 mit Nüchtern glukose.

	oGTT 0h (mg/dl)		
	Rho	p-Wert	n
2'FL Visit 2	-0,366	0,072	25
3'SL Visit 2	-0,005	0,981	26

5 Diskussion

In dieser Diplomarbeit wurde geprüft, ob direkte oder verzögerte Zusammenhänge zwischen der Serumkonzentration der metabolischen Faktoren Adiponektin, Leptin, Follistatin und Nüchtern glukose mit den Serumkonzentrationen der HMOs 2'FL und 3'SL während der Schwangerschaft vorliegen.

Die Blutproben wurden an zwei Zeitpunkten in der Schwangerschaft, Visit 1 (V1; 10.-14.SSW) und Visit 2 (V2; 20.-24. SSW) von etwa 30 Probandinnen entnommen und die Parameter analysiert. Um direkte Zusammenhänge zu analysieren, wurden die V2-Werte der metabolischen Faktoren mit den V2-Werten der HMOs verglichen, um verzögerte Zusammenhänge zu analysieren, wurden die V1-Werte der metabolischen Faktoren mit den V2-Werten der HMOs analysiert. Es wurde eine positive Korrelation zwischen der Serumkonzentration von Leptin und dem HMO 3'SL zum Zeitpunkt V2 gefunden.

Diese Studie lief als erste Pilotstudie über mögliche Zusammenhänge zwischen metabolischen Faktoren und den HMOs 2'FL und 3'SL während der Schwangerschaft. Als longitudinale prospektive Beobachtungsstudie geführt, konnten sowohl zeitliche Veränderungen der Konzentrationen als auch mögliche gleichzeitige und verzögerte Zusammenhänge der metabolischen Faktoren mit HMOs zu verschiedenen Zeitpunkten während der Schwangerschaft erkannt werden.

Für die Pilotstudie wurde eine kleine Kohorte von 30 Probandinnen, die aus Graz und Umgebung kamen, ausgewählt. Das Verhältnis von Sekretor positiven und Sekretor negativen Frauen, die sich im Vorhandensein des für die Produktion des HMO 2'FL notwendigen Enzyms FUT2 unterscheiden, variiert in unterschiedlichen Ethnizitäten (19). Demnach kann es in Bezug auf Zusammensetzung und Konzentration der HMOs zu regionalen Unterschieden kommen (36), weshalb eine multizentrische Studie mit größerer Kohorte die Zusammenhänge zwischen metabolischen Faktoren und HMOs besser repräsentieren würde. Andererseits könnte die gewählte Subpopulation auch einen Vorteil darstellen, da die Untersuchung unabhängig regionaler Unterschiede stattfand.

Mittels Fragebögen und vier Untersuchungszeitpunkten während der Schwangerschaft und zur Geburt wurde eine umfassende Datenbank mit demographischen und biologischen Informationen erhoben, welche weitere Untersuchungen zum Thema HMOs ermöglicht. Aufgrund mangelnder Termineinhaltung der vorgesehenen Untersuchungen der Patientinnen sind die Datensets teilweise unvollständig und können für die Datenanalyse

nicht verwendet werden. Letztendlich konnten nur etwa 30 von ursprünglich 53 Probandinnen in die Studie inkludiert werden. Da die Studie ursprünglich als Pilotstudie zur Prüfung der Umsetzbarkeit der Methodik geplant war, wurde keine Stichprobengröße im vornherein berechnet.

Für diese Diplomarbeit wurden von den untersuchten Parametern nur Zusammenhänge der Werte von V1 und V2 der metabolischen Faktoren sowie Werte von V2 der HMOs analysiert. Zusätzlich wurden nur die Frauen inkludiert, deren Daten zu V1 und V2 bezüglich eines metabolischen Faktors vollständig waren. Ob es zu direkten Zusammenhängen zwischen den Visits 1 bzw. 3, oder neben den untersuchten verzögerten Zusammenhängen zwischen V1 und V2 auch zu weiteren verzögerten Reaktionen in V3 kommt, kann somit nicht beurteilt werden.

Hinzu kommt die große Variabilität des Gestationsalters zu den Untersuchungszeitpunkten. Die Spannweite betrug zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung 21 Tage mit einem minimalen Gestationsalter von 76 und einem maximalen Gestationsalter von 97 Tagen (Mittelwert $85,7 \pm 4,7$). Dies entspricht dem Bereich der 10.-13. Schwangerschaftswoche. Zum zweiten Untersuchungstermin betrug die Spannweite des Gestationsalters schon 56 Tage mit einem Minimum von 124 und einem Maximum von 180 Tagen, entsprechend der 17.-25. Schwangerschaftswoche, während hier der Zeitraum der Untersuchung zwischen 20. und 24. Schwangerschaftswoche angesetzt war. Für weitere Studien wären entweder engmaschigere Kontrollen oder genauer festgelegte Zeiträume der Untersuchungstermine von Vorteil.

Um direkte bzw. verzögerte Zusammenhänge erkennen zu können, wurde eine bivariate Datenanalyse durchgeführt. Störfaktoren wie Alter der Probandinnen, BMI und Gewichtszunahme während der Schwangerschaft wurden nicht beachtet.

Während besonders Umweltfaktoren wie der BMI Auswirkungen auf die Konzentration der HMOs aber auch auf die maternale Anpassung des metabolischen Systems während der Schwangerschaft zeigt, sollten diese Faktoren in weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden (2,20). Die Ausgangswerte des BMIs dieser Studie variierten zwischen $18,0$ und $28,7 \text{ kg/m}^2$. Nissan et al. konnten nachweisen, dass BMI-Werte zwischen 14 und 18 zu einer reduzierten Konzentration von HMOs in der Muttermilch führen: Die Muttermilch zeigte acht Wochen postpartum bei BMI-Werten von 14-18 einen zu 42.4% geringeren Gesamtgehalt an HMOs als bei BMI-Werten von 24-28 (n=16,

$P < 0.001$) (36). Da in unseren Untersuchungen der Wertebereich zwischen 18,0 und 28,7 lag, könnte es im Rahmen der gewählten Subpopulation zu geringeren Auswirkungen auf die Konzentration der HMOs als in der beschriebenen Studie von Nissan et al. kommen.

Neben dem Einfluss auf HMOs zeigen unterschiedliche BMI-Werte wiederum Auswirkungen auf maternale metabolische Veränderungen während der Schwangerschaft. So treten bei übergewichtigen Schwangeren aufgrund der zusätzlich reduzierten Insulinsensitivität durch die Schwangerschaft vermehrt metabolische Störungen auf, welche sich wiederum auf die metabolischen Faktoren auswirken könnten.(37) Übergewichtige Patientinnen ($BMI \geq 25$) haben geringere Adiponektinserumwerte als normalgewichtige Patientinnen, Adiponektin korreliert negativ mit BMI, und es gibt einen negativen Zusammenhang zwischen Insulinsensitivität und anti-inflammatorischer Aktivität bei übergewichtigen Patientinnen. (38–40) Eine Studie von Kang et al. bewies eine negative Korrelation von Serumadiponektin mit BMI-Werten und HOMA-IR sowie einen positiven Zusammenhang zwischen dem Leptinspiegel mit BMI und HOMA-IR.(41) Mit steigenden BMI-Werten ist außerdem von einem chronischen Entzündungsstatus auszugehen, der wiederum zu Insulinresistenz beiträgt und damit zu veränderten Werten der untersuchten metabolischen Faktoren führen könnte.(35) Um einen monokausalen Zusammenhang zwischen diesen Faktoren und den HMOs zu überprüfen, sollten Frauen mit etwa gleichen BMI ausgewählt werden.

In unserer Studie könnten die variablen BMI-Werte vor und während der Schwangerschaft die Konzentration der metabolischen Faktoren als auch der HMOs beeinträchtigen, sodass der Aussagewert einer bivariaten Korrelationsüberprüfung unabhängig der variablen BMIs unsicher ist.

Ein weiterer Faktor, welcher durch einen erhöhten BMI vermehrt auftritt und Auswirkungen auf die metabolischen Werte zeigt, ist das Auftreten von GDM. Eine Studie von Liu et al. zeigte erhöhte Leptinwerte bei schwangeren Frauen mit GDM ($14.9 \pm 4.3 \mu\text{g/l}$) im Vergleich zu gesunden Schwangeren ($10.0 \pm 1.8 \mu\text{g/l}$). Außerdem fand sich bei Frauen mit GDM eine signifikante Korrelation zwischen Leptin und Nüchterninsulin, sowie zwischen Leptin und Plasmaglukose, gemessen eine Stunde nach Gabe von 50g Glukose ($P < 0.001$). (42) Lacroix et al. erkannte in einer Studie, dass Frauen, die GDM entwickeln, im ersten Trimenon niedrigere Adiponektinwerte aufweisen als Frauen mit normaler Glukosetoleranz (9.67 ± 3.84 vs. $11.92 \pm 4.59 \mu\text{g/ml}$).

Ein weiterer Störfaktor stellt der Sekretorstatus der Frau dar, welcher Einfluss auf die Konzentration und eventuelle Korrelation mit den metabolischen Faktoren zeigen könnte. Zwar konnten in unserer Untersuchung keine Unterschiede in Konzentrationen der metabolischen Faktoren in Bezug auf den Sekretorstatus festgestellt werden, allerdings könnte die Kohorte zu klein sein, um einen möglichen Unterschied festzustellen.

Diese Resultate zeigen, dass die Ergebnisse der untersuchten monokausalen Zusammenhänge schwierig zu beurteilen sind. Es gibt zu viele Faktoren, die Daten beeinflussen und so die Studie verzerren könnten. Allerdings verhält sich Serumleptin direkt proportional zum BMI, welche mit der Gewichtszunahme während der Schwangerschaft einen möglichen Zusammenhang mit den HMOs erklären könnte. Um diese Korrelation weiter überprüfen zu können, sollten die Werte V1-V3 von Leptin als auch 3'SL untersucht werden. Für weitere Untersuchungen sollten aber vor allem die genannten Störfaktoren berücksichtigt und eine größere Kohorte ausgewählt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Bray GA, editor. Handbook of obesity. 1: Epidemiology, etiology, and physiopathology. 3. ed. Boca Raton: CRC Press; 2011. 695 p.
2. King JC. Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:271–91.
3. Lehnert H, Anlauf M, editors. Rationelle Diagnostik und Therapie in Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel. 4., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2015. 705 p.
4. DeFronzo RA, editor. International textbook of diabetes mellitus. Vol. 2: [...]. 4. ed. 577 p.
5. Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL, Häcker B. Lehninger Biochemie: mit 131 Tabellen. 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Übersetzung der 5. amerikanischen Auflage, korrigierter Nachdruck. Berlin Heidelberg: Springer; 2011. 1667 p. (Springer-Lehrbuch).
6. Häring H-U, Artunc FH, editors. Diabetologie in Klinik und Praxis: 195 Tabellen. 6., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2011. 712 p.
7. Schwandt P, Parhofer KG, Assmann G, editors. Handbuch der Fettstoffwechselstörungen: Dyslipoproteinämien und Atherosklerose: Diagnostik, Therapie und Prävention ; mit 193 Tabellen. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2007. 1175 p.
8. Al Maskari MY, Alnaqdy AA. Correlation between Serum Leptin Levels, Body Mass Index and Obesity in Omanis. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2006 Dec;6(2):27–31.
9. Brenner B. Physiologie. 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, Klinker R, Gay R, Rothenburger A, editors. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2014. 1024 p.
10. Siegenthaler W, Amann-Vesti BR, editors. Klinische Pathophysiologie: 239 Tabellen. 9., völlig neu bearb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2006. 1178 p.
11. Ein Hormon stellt sich vor: Follistatin - 11983.pdf [Internet]. [cited 2017 Mar 25]. Available from: <http://www.kup.at/kup/pdf/11983.pdf>
12. Näf S, Escote X, Ballesteros M, Yañez RE, Simón-Muela I, Gil P, et al. Serum activin A and follistatin levels in gestational diabetes and the association of the Activin A-Follistatin system with anthropometric parameters in offspring. *PLoS ONE.* 2014;9(4):e92175.
13. Jameson JL. *Endocrinology: adult & pediatric.* 2016.
14. Hansen J, Rinnov A, Krogh-Madsen R, Fischer CP, Andreasen AS, Berg RMG, et al. Plasma follistatin is elevated in patients with type 2 diabetes: relationship to hyperglycemia, hyperinsulinemia, and systemic low-grade inflammation. *Diabetes Metab Res Rev.* 2013 Sep 1;29(6):463–72.
15. Mukherjee A, Sidis Y, Mahan A, Raheer MJ, Xia Y, Rosen ED, et al. FSTL3 deletion reveals roles for TGF- β family ligands in glucose and fat homeostasis in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 23;104(4):1348–53.
16. Zhang C, McFarlane C, Lokireddy S, Bonala S, Ge X, Masuda S, et al. Myostatin-deficient mice exhibit reduced insulin resistance through activating the AMP-activated protein kinase signalling pathway. *Diabetologia.* 2011 Jun 1;54(6):1491–501.
17. Zhang C, McFarlane C, Lokireddy S, Masuda S, Ge X, Gluckman PD, et al. Inhibition of myostatin protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid

- oxidation and promoting a brown adipose phenotype in mice. *Diabetologia*. 2012 Jan;55(1):183–93.
18. Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*. 2012 Sep;22(9):1147–62.
 19. Bode L. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum Dev*. 2015 Nov;91(11):619–22.
 20. Bode L, Jantscher-Krenn E. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Adv Nutr*. 2012 May 1;3(3):383S–91S.
 21. Rudloff S, Pohlentz G, Borsch C, Lentze MJ, Kunz C. Urinary excretion of in vivo ¹³C-labelled milk oligosaccharides in breastfed infants. *Br J Nutr*. 2012 Apr;107(7):957–63.
 22. Rudloff S, Pohlentz G, Diekmann L, Egge H, Kunz C. Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula. *Acta Paediatr*. 1996 May;85(5):598–603.
 23. Gnoth MJ, Rudloff S, Kunz C, Kinne RK. Investigations of the in vitro transport of human milk oligosaccharides by a Caco-2 monolayer using a novel high performance liquid chromatography-mass spectrometry technique. *J Biol Chem*. 2001 Sep 14;276(37):34363–70.
 24. Eiwegger T, Stahl B, Haidl P, Schmitt J, Boehm G, Dehlink E, et al. Prebiotic oligosaccharides: in vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010 Dec;21(8):1179–88.
 25. Bode L, Rudloff S, Kunz C, Strobel S, Klein N. Human milk oligosaccharides reduce platelet-neutrophil complex formation leading to a decrease in neutrophil beta 2 integrin expression. *J Leukoc Biol*. 2004 Oct;76(4):820–6.
 26. Bode L, Kunz C, Muhly-Reinholz M, Mayer K, Seeger W, Rudloff S. Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. *Thromb Haemost*. 2004 Dec;92(6):1402–10.
 27. Sisk PM, Lovelady CA, Dillard RG, Gruber KJ, O’Shea TM. Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Perinatol*. 2007 Jul;27(7):428–33.
 28. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet*. 1990 Dec 22;336(8730):1519–23.
 29. Jantscher-Krenn E, Zherebtsov M, Nissan C, Goth K, Guner YS, Naidu N, et al. The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats. *Gut*. 2012 Oct;61(10):1417–25.
 30. Lucas A, Morley R, Cole TJ, Lister G, Leeson-Payne C. Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. *Lancet*. 1992 Feb 1;339(8788):261–4.
 31. Lucas A, Morley R, Cole TJ, Gore SM, Lucas PJ, Crowle P, et al. Early diet in preterm babies and developmental status at 18 months. *Lancet*. 1990 Jun 23;335(8704):1477–81.
 32. Wang B, Yu B, Karim M, Hu H, Sun Y, McGreevy P, et al. Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets. *Am J Clin Nutr*. 2007 Feb;85(2):561–9.
 33. Carlson SE, House SG. Oral and intraperitoneal administration of N-acetylneuraminic acid: effect on rat cerebral and cerebellar N-acetylneuraminic acid. *J Nutr*. 1986 May;116(5):881–6.
 34. Wang B, McVeagh P, Petocz P, Brand-Miller J. Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants. *Am J Clin Nutr*. 2003 Nov;78(5):1024–9.

35. Bhargava P, Li C, Stanya KJ, Jacobi D, Dai L, Liu S, et al. Immunomodulatory glycan LNFPIII alleviates hepatosteatosis and insulin resistance through direct and indirect control of metabolic pathways. *Nat Med*. 2012 Nov;18(11):1665–72.
36. Erney RM, Malone WT, Skelding MB, Marcon AA, Kleman-Leyer KM, O’Ryan ML, et al. Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000 Feb;30(2):181–92.
37. Iva SK, Iva SK. Metabolic Adaptations in Pregnancy in Lean and Obese Women – A Literature Review. *Research in Obstetrics and Gynecology*. 2013;2(4):37–47.
38. Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm*. 2013 Dec 22;2013:139239.
39. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Jun;20(6):1595–9.
40. Liu Z, Liu P, Ding Y, Wang A, Zhang J, Zhao X. [Maternal plasma leptin levels and their relationship to insulin and glucose in pregnant women with gestational diabetes mellitus and gestational impaired glucose tolerance]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2003 May;38(5):261–3.
41. Kang YE, Kim JM, Joung KH, Lee JH, You BR, Choi MJ, et al. The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction. *PLoS One* [Internet]. 2016 Apr 21 [cited 2017 Oct 19];11(4). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4839620/>
42. Powe CE. Early Pregnancy Biochemical Predictors of Gestational Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reports* [Internet]. 2017 Feb [cited 2017 Feb 24];17(2). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11892-017-0834-y>

