

**Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck**

Sektion Medizin

Direktor: Professor Dr. med. Achim Rody

**Plazentare Expression der Endo- β -d-Glucuronidase
Heparanase bei Termingeburten mit physiologischen und
pathologischen Schwangerschaftsverläufen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von

Diana Stephanie Bundschuh

aus Mannheim

Lübeck 2015

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Michael Bohlmann

2. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Henrik Oster

Tag der mündlichen Prüfung: 9.10.2015

**zum Druck genehmigt. Lübeck, den 09.10.2015
-Promotionskommission der Sektion Medizin-**

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Plazentare Heparanase	1
1.2 Pathologische Schwangerschaftsverläufe	2
1.2.1 Gestationsdiabetes	2
1.2.1.1 Definition	2
1.2.1.2 Pathophysiologie	4
1.2.1.3 Epidemiologie	5
1.2.1.4 Folgen für Mutter und Kind	6
1.2.2 Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen	8
1.2.2.1 Definition	8
1.2.2.2 Pathophysiologie der Präeklampsie	13
1.2.2.3 Epidemiologie	17
1.2.2.4 Folgen für Mutter und Kind	18
2. Zielsetzung	20
3. Material und Methoden	21
3.1 Material	21
3.1.1 cDNA-Herstellung	21
3.1.2 Primer für qPCR	21
3.1.3 Oligonukleotide	21
3.1.4 Lösungen und Puffer für Immunhistochemie	22
3.1.5 Antikörper für Immunhistochemie	22
3.1.6 Verbrauchsmaterialien	22
3.1.7 Chemikalien	23
3.1.8 Geräte	23
3.2 Patientinnenauswahl	24
3.3 Asservierung von Gewebe	25
3.4 Dokumentation	25
3.5 Methoden	26
3.5.1 RNA-Isolierung	26
3.5.2 Herstellung von cDNA	27
3.5.3 Quantitative-Realtime-PCR	28
3.5.4 Immunhistochemie	30
3.5.4.1 Vorbereitung der Proben	30

3.5.4.2 Prinzip der Immunhistochemie	30
3.5.4.3 Avidin-Biotin-Methode	31
3.5.4.4 Durchführung der immunhistochemischen Färbung	31
3.6 Statistik	34
3.6.1 Fallzahlkalkulation	34
3.6.2 Auswertung	35
4. Ergebnisse	36
4.1 Auswertung der Patientinnengruppen	36
4.2 Vergleich der mRNA-Expression	40
4.3 Immunhistochemischer Nachweis und Quantifizierung der HPSE	41
5. Diskussion	44
5.1 Einordnung in die Fachliteratur	44
5.2 Auswertung der Patientinnengruppen	52
5.3 mRNA-Expression und immunhistochemischer Nachweis sowie Quantifizierung der HPSE	54
5.4 Ausblick	56
6. Zusammenfassung	59
7. Literaturverzeichnis	61
8. Anhang	75
8.1 Ethikvotum	76
8.2 Patientinnenaufklärung	77
8.3 Abbildungsverzeichnis	83
8.4 Tabellenverzeichnis	84
9. Danksagung	86
10. Lebenslauf	87

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
A ₂₆₀	Absorptionskoeffizient bei 260nm
A ₂₈₀	Absorptionskoeffizient bei 280nm
a. dest.	Aqua destillata
a. e.	am ehesten
AG	Antigen
AK	Antikörper
APGAR	Herzaktion, Atmung, Reflexe, Muskeltonus, Hautfarbe
APS	Antiphospholipid-Syndrom
ASS	Acetylsalicylsäure
BE (engl.)	Base Excess (Basenabweichung)
BMI (engl.)	Body-Mass-Index (Körpermasseindex)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
d	Tag
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DAB	Diaminobenzidin
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DTT	Dithiothreitol
EMBP (engl.)	eosinophile major basic protein (eosinophiles Major Basic Protein)
ET	errechneter Geburtstermin
et al.	und andere
EZM	extrazelluläre Matrix
for (engl.)	forward (vorwärts)
g	Gramm
ggfs.	gegebenenfalls
GDM	Gestationsdiabetes
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
HELLP (engl.)	Hemolysis (hämolytische Anämie), Elevated Liver enzyme levels (erhöhte Leberwerte) Low Platelet count (Thrombozytopenie)
HIT	heparin-induzierte Thrombozytopenie

hPL	humanes Plazentalaktogen
HPRT-1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HPSE	Heparanase
HRP (engl.)	Horseradish-Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
IDGDM (engl.)	insulin-depending gestational diabetes (insulinabhängiger Gestationsdiabetes)
IgG	Immunglobulin G
IGT (engl.)	impaired glucose tolerance (eingeschränkte Glucosetoleranz)
IUGR (engl.)	intrauterine growth restriction (intrauterine Wachstumsrestriktion)
inkl.	inklusive
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Konz.	Konzentration
l	Liter
m	Meter
M	molar
MAP (engl.)	mean arterial pressure (mittlerer arterieller Druck)
mg	Milligramm
mind.	mindestens
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
(m)RNA	(messenger) Ribonukleinsäure
NIDGDM (engl.)	Non-insulin-depending gestational diabetes (nicht-insulinabhängiger Gestationsdiabetes)
nm	Nanometer
NMH	niedermolekulare Heparine
o. g.	oben genannte/r
PAPP-A (engl.)	pregnancy-associated Plasma-Protein-A (schwangerschaftsassoziiertes Plasmaprotein A)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Prostaglandin
pH	pondus hydrogenii
PI (engl.)	Pulsatility Index (Pulsatilitätsindex)
PIGF (engl.)	placental growth factor (Plazenta-Wachstumsfaktor)
qPCR	quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion
RDS (engl.)	Respiratory distress syndrome (Atemnot-Syndrom)
rev (engl.)	reverse (rückwärts)
RI	Resistance
RR	Relatives Risiko

Rt	Raumtemperatur
rT-Minus	RNA-Mischung ohne reverse Transkriptase
SDHA	Succinat-Dehydrogenase
Sekundär-AK	Sekundär-Antikörper
sog.	sogenannte
Streptavidin-HRP	Streptavidin-Hourseradish-Peroxidase
SSW	Schwangerschaftswoche
TF (engl.)	Tissue factor (Gewebefaktor)
Tm	Schmelztemperatur
u. a.	unter anderem/anderen
UFH	unfraktionierte Heparine
UpM	Umdrehungen pro Minute
V. a.	Verdacht auf
v. a.	vor allem/allen
vs.	versus
VEGF (engl.)	vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
z. B.	zum Beispiel
Z. n.	Zustand nach

1. Einleitung

1.1 Plazentare Heparanase

Die Heparanase (HPSE) ist eine Endo- β -D-Glucuronidase, die am Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix (EZM) beteiligt ist [123]. Eine der am stärksten erforschten Funktionen der Heparanase ist die Abspaltung der Heparansulfat-Seitenketten [76], welche, wie die Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG), eine wichtige Funktion bei dem Zusammenhalt von Zellverbänden und deren Verankerung in der Basalmembran haben. Aufgrund dieser Eigenschaften wird angenommen, dass die HSPG die Zellvermehrung und –wachstum beeinflussen [21, 47]. HPSE wird sowohl in menschlichem [40, 57] als auch in tierischem [72] plazentarem Gewebe exprimiert und scheint sowohl im Prozess der Implantation als auch der Plazentation eine Schlüsselrolle zu spielen [55]. Ihre Expression ist jedoch nicht auf plazentares Gewebe beschränkt: Auch in Blutplättchen, Keratinozyten und aktivierten Zellen des Immunsystems konnte unter physiologischen Bedingungen HPSE nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu zeigen sich die meisten normalen Epithelien in der immunhistochemischen Färbung negativ für HPSE [85, 123]. In den letzten Jahren gewann die HPSE aufgrund ihrer nachgewiesenen Überexpression bei inflammatorisch bedingten Erkrankungen, bei Autoimmun-Erkrankungen wie z.B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [128] und vor allem bei verschiedenen Arten von Karzinomerkrankungen [125] zunehmend an Bedeutung. Eine HPSE-Überexpression geht bei Malignomen mit gesteigerter Angiogenese, Invasivität und metastatischem Verhalten einher [125] und ist mit einer verkürzten Überlebenszeit der betroffenen Patienten assoziiert.

Es wurde zudem gezeigt, dass Hyperglykämie die HPSE-Expression in renalen Epithelzellen [70] und die Ausscheidung von HPSE steigert, was mit einem verminderten Gehalt an Heparansulfat in der glomerulären Basalmembran und somit einer erhöhten Permeabilität derselben einhergeht. Diese durch Hyperglykämie induzierten Veränderungen erhöhen das Risiko für Nierenfunktionsstörungen, Proteinurie und diabetische Nephropathie [118].

Bei Patientinnen mit Gestationsdiabetes konnte nachgewiesen werden, dass die plazentare mRNA-Konzentration und Protein-Expression einiger Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren [38], Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) [43] und Glucosetransporter im Vergleich zu normoglykäm Entbindenden verändert sind.

Offen bleibt, ob eine veränderte Expression von HPSE in Plazenten von Patientinnen mit Gestationsdiabetes oder mit einer der wichtigsten hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen, der Präeklampsie, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe vorliegt. Durch die Klärung dieser Frage soll eine Basis für weitere medikamentöse Therapiemöglichkeiten des Gestationsdiabetes und der Präeklampsie sowie ein tiefgreifenderes Verständnis der trotz ihrer steigenden Prävalenz in der Pathophysiologie noch recht unverstandenen Erkrankungen geschaffen werden.

1.2 Pathologische Schwangerschaftsverläufe

1.2.1 Gestationsdiabetes

1.2.1.1 Definition

Gestationsdiabetes (GDM) ist definiert als eine Glukosetoleranzstörung, die erstmals in der Schwangerschaft mit einem 75g oralen Glukosetoleranztest (oGTT) unter standardisierten Bedingungen und über eine qualitätsgesicherte Glukosemessung aus venösem Plasma diagnostiziert wird. Die Diagnose kann bereits mit nur einem erhöhten Glukosewert gestellt werden [64]. Die Stoffwechselstörung entwickelt sich typischerweise erst ab der 20. Schwangerschaftswoche (SSW).

Die aktuellen Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) empfehlen noch im ersten Trimenon der Schwangerschaft die Durchführung einer Risikoanalyse zum Ausschluss eines manifesten Diabetes mellitus (siehe Tabelle 1). Liegt bei der untersuchten Patientin mindestens ein Risikofaktor vor,

folgt die Messung der Gelegenheitsglukose oder der Nüchternglukose. Die Grenzwerte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Die Definition des manifesten Diabetes entspricht der außerhalb einer Schwangerschaft. Damit fallen ein manifester Typ1 oder Typ2 Diabetes mellitus oder andere spezifische Diabetes-Formen, die erstmals während der Schwangerschaft diagnostiziert werden, nicht mehr unter die Diagnoseklasse des GDM [64].

Alter \geq 45 Jahre
BMI 30 kg/m ² präkonzeptionell
körperliche Inaktivität
Verwandte I° mit Diabetes mellitus
Angehörige einer ethnischen Risikopopulation (z.B. Asiatinnen, Lateinamerikaner)
Geburt eines Kindes \geq 4500 g
Gestationsdiabetes in der Vorgeschichte
arterielle Hypertonie oder Einnahme von Medikamenten zur Therapie
Dyslipidämie präkonzeptionell (HDL-Cholesterin $<$ 35 mg/dl und/oder Triglyzeride $>$ 250 mg/dl)
Polyzystisches Ovarsyndrom
Prädiabetes bei früheren Tests
andere klinische Zustände, die mit Insulinresistenz assoziiert sind
bekannte koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit, zerebralarterielle Durchblutungsstörung
Einnahme kontrainsulinärer Medikation (z.B. Glukokortikoide)

Tabelle 1: Risikoanalyse auf manifesten Diabetes mellitus bei Erstvorstellung in der Schwangerschaft nach [64]

	Gelegenheitsglukose	Nüchternglukose	Gelegenheitsglukose	Nüchternglukose
	Erstmessung		Zweitmessung	
Normalbefund	$<$ 200 mg/dl	$<$ 92 mg/dl	-	-
manifester Diabetes	-	-	\geq 200 mg/dl	\geq 126 mg/dl
Gestationsdiabetes	-	-	-	92-125 mg/dl

Tabelle 2: Auswertung des Glukosetests im ersten Trimenon bei erhöhtem Risiko, aus [64]

Liegt bei der Patientin kein Risikofaktor vor, besteht die Möglichkeit zwischen der 24. und 28. SSW den bereits o. g. 75g-oGTT durchzuführen, dessen Grenzwerte in Tabelle 3 nachzulesen sind.

Vor kurzem ist diese Untersuchung ein obligater Bestandteil der Screening-Untersuchungen im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorge geworden [64].

Fällt der oGTT zwischen der 24. und 28. SSW unauffällig aus, so empfiehlt die DGGG eine Wiederholung des Tests zwischen der 32. und 34. SSW. Weicht nur einer der Werte ab, spricht man von einer eingeschränkten Glukosetoleranz (IGT = impaired glucose tolerance).

	nüchtern	nach 60 min	nach 120 min
Normalbefund	<92 mg/dl	<180 mg/dl	<153 mg/dl
Gestationsdiabetes	>92 mg/dl	> 180 mg/dl	>153 mg/dl

Tabelle 3: oGTT (oraler Glukosetoleranztest) zwischen 24. und 28. SSW, aus [64]

1.2.1.2 Pathophysiologie

Neben einer genetischen Prädisposition spielen bei der Entwicklung eines GDM vor allem Übergewicht und die damit oft verbundenen Life-style-Faktoren (mangelnde sportliche Betätigung, hyperkalorische Ernährung) eine große Rolle [64].

In der zweiten Hälfte der Schwangerschaft kommt es physiologischerweise zu einer Insulinresistenz durch antiinsulinär wirkende Schwangerschaftshormone. Bei gleichzeitigem Insulinsekretionsdefekt im Rahmen eines GDM kommt es hierdurch zu einer maternalen und konsekutiv zu einer fetalen Hyperglykämie [64]. Man geht davon aus, dass bei Patientinnen mit GDM bereits präkonzeptionell eine Herabsetzung der Insulinsensitivität besteht, welche durch antiinsulinäre Schwangerschaftshormone wie Prolactin, Progesteron, Estriol, Kortisol, Thyroxin und humanes Plazentalaktogen (hPL) ab der 20. SSW verstärkt wird und durch die endogene Insulinsekretion nur unzureichend kompensiert werden kann [51]. Sowohl für die Insulinresistenz als auch für die Insulinsekretionsstörung stellen eine genetische Disposition und die o. g. Life-style-Faktoren Risikofaktoren dar. Dieselben Risikofaktoren weisen Patienten mit einem Typ2-Diabetes auf [127].

Aufgrund des gemeinsamen Risikoprofils und der auch beim GDM vorhandenen Insulinresistenz wird der GDM häufig als Prä-Typ2-Diabetes gesehen, dem pathophysiologisch eine Insulinresistenz und ein Insulinsekretionsdefekt zugrunde liegen [52].

1.2.1.3 Epidemiologie

Gestationsdiabetes ist eine weltweit zunehmende Erkrankung und eine der häufigsten Schwangerschaftskomplikationen [46].

International schwanken die Angaben zur Prävalenz des GDM von < 1% bis 20%. Die großen Unterschiede erklären sich in erster Linie durch die Häufigkeit des Typ2 Diabetes mellitus in der untersuchten Bevölkerung, das methodische Vorgehen und die unterschiedlichen Bewertungskriterien für den GDM. Auch steigt weltweit die GDM-Prävalenz, die höchste weisen Hispano-Amerikanerinnen und Asiatinnen auf. In der Untersuchung von Baraban war die Prävalenz bei weißen Frauen am niedrigsten (siehe Abbildung 1) [6].

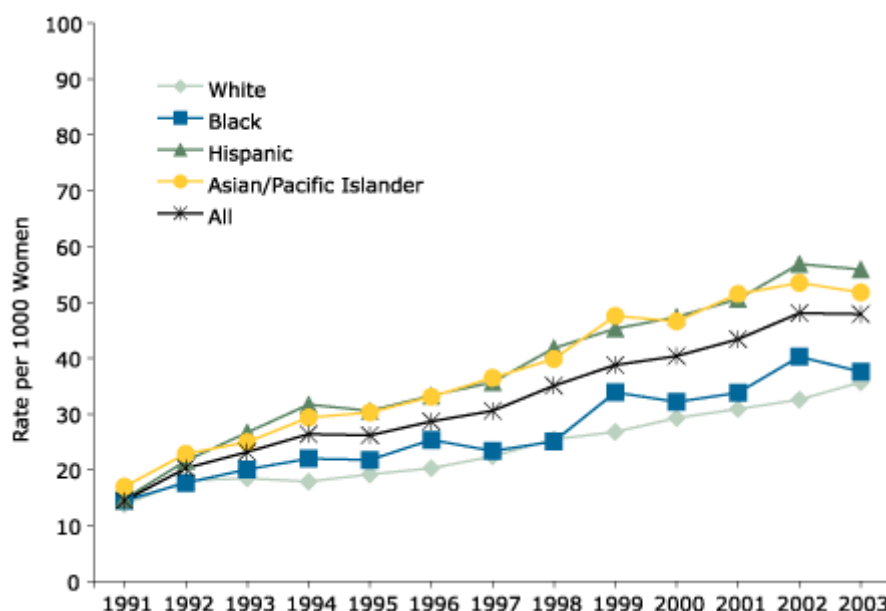


Abbildung 1: Prävalenz von GDM in verschiedenen ethnischen Gruppen, aus [6]

In Ländern ohne generelles Screening wird GDM häufig nicht erkannt und bleibt deswegen oft unbehandelt [114, 131]. Dies zeigen die Perinatalerhebungen aus Deutschland der Jahre 1995–1997 auf der Basis von mehr als zwei Millionen Geburten mit einer Häufigkeit des GDM je nach Bundesland von 0,26% bis 1,44%. Der Bundesdurchschnitt lag bei 0,47%. Eine Häufigkeit des GDM unter 2% ist nicht plausibel unter Berücksichtigung von epidemiologischen Daten zur Häufigkeit von Glukosetoleranzstörungen und Diabetes mellitus im reproduktionsfähigen Alter [54].

1.2.1.4 Folgen für Mutter und Kind

Die Häufigkeit mütterlicher, besonders aber kindlicher Komplikationen, steht in Zusammenhang mit den mütterlichen Blutglukosewerten, wobei kein als unbedenklich einzustufender Schwellenwert existiert. So findet man bereits bei eingeschränkter Glukosetoleranz (IGT) [133] eine dem GDM vergleichbare fetale Morbidität [61, 102, 104].

Patientinnen mit GDM haben während der Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko für Harnwegsinfekte, schwangerschaftsinduzierte Hypertonie und Präeklampsie/Eklampsie [131]. Es steigen die Raten an Sectiones und vaginal-operativen Entbindungen [130].

Das Risiko, in einer Folgeschwangerschaft erneut eine Glukosetoleranzstörung zu entwickeln, liegt bei 50% [68]. Außerdem weisen Patientinnen mit durchgemachtem GDM ein 40-50%iges Risiko auf, innerhalb von zehn Jahren postpartal einen manifesten Diabetes mellitus, in der Regel Typ2, zu entwickeln [83]. Faktoren, die dieses Risiko weiter erhöhen, sind in Tabelle 4 zu finden.

Blutglukose-Nüchternwert > 95 mg/dl kapillär und > 105 mg/dl im venösen Plasma
Insulinpflichtigkeit
Diagnose des GDM vor der 24. SSW
GDM in früherer Schwangerschaft
IGT im postpartal durchgeführten oGTT
Übergewicht

Tabelle 4: Risikofaktoren für die Entwicklung eines manifesten Diabetes mellitus, nach [56, 104]

Durch die Hyperglykämie kommt es beim Feten zu einer gesteigerten Insulinproduktion mit der Folge einer pankreatischen β -Zell-Hypertrophie/-Hyperplasie. Der fetale Hyperinsulinismus und seine Auswirkungen auf den fetalen Organismus sollen für die gehäuft vorkommende Makrosomie mit der Gefahr der Schulterdystokie, für die erhöhten Raten neonataler Hypoglykämie, Hypokalzämie, Polyglobulie, Hyperbilirubinämie und des Atemnotsyndroms verantwortlich sein [130].

Bei unbehandeltem GDM kann es zum intrauterinen Fruchttod kommen. In bis zu 30% der fetalen Todesfälle muss ein unerkannter GDM als Todesursache angenommen werden [101].

Für Neugeborene ist ein maternaler (Gestations-) Diabetes auch unter anderen Aspekten von hoher Bedeutung: Durch eine intrauterine funktionelle und/oder morphologische Schädigung der fetalen β -Zellen im Rahmen des fetalen Hyperinsulinismus wurde eine Disposition für einen Diabetes nachgewiesen [36, 113].

So besteht bei nicht ausreichend behandeltem GDM der Mutter für das Kind ein erhöhtes Risiko, bereits in der Pubertät oder im frühen Erwachsenenalter Übergewicht und/oder eine Glukosetoleranzstörung oder einen Diabetes mellitus zu entwickeln [88, 93, 112].

1.2.2 Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen

1.2.2.1 Definition

Unter den Begriff „Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen“ fallen verschiedene Krankheitsbilder wie die Gestationshypertonie, die Präeklampsie, die schwere Präeklampsie, das HELLP-Syndrom, die chronische Hypertonie und die Pfropfgestose. Im Folgenden werden die einzelnen Krankheitsbilder definiert.

Die Diagnose Gestationshypertonie wird gestellt, wenn nach der abgeschlossenen 20. SSW Blutdruckwerte $\geq 140/90$ mmHg ohne Proteinurie bei einer zuvor normotensiven Schwangeren erhoben werden, welche sich zwölf Wochen nach der Geburt normalisieren [63].

Die Präeklampsie, synonym auch als Gestose bezeichnet, ist definiert als Gestationshypertonie und Proteinurie ≥ 300 mg/24h, die nach der abgeschlossenen 20. SSW aufgetreten sind [63].

Die Diagnose Präeklampsie kann auch gestellt werden, wenn zusätzlich zur Hypertonie bei Fehlen einer Proteinurie alternativ

- eine fetale Wachstumsrestriktion (IUGR (intrauterine growth restriction))
- eine Beteiligung der Leber (Transaminasenanstieg, Oberbauchschmerzen)
- Nierenfunktionsstörungen (Kreatinin $\geq 0,9$ g/l oder Oligurie < 500 ml/24 h)
- neurologische Probleme (schwere Kopfschmerzen, Sehstörungen) oder
- hämatologische Störungen

erstmalig nach der 20. SSW beobachtet werden [18].

Eine Präeklampsie wird dann als schwere Präeklampsie bezeichnet, wenn neben der Gestationshypertonie und Proteinurie mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt wird [2, 18]:

- Nierenfunktionseinschränkung
- Leberbeteiligung
- Lungenödem oder Zyanose
- hämatologische Störungen
- neurologische Symptome
- fetale Wachstumsrestriktion

- Blutdruck \geq 170/110 mmHg
- Proteinurie \geq 5 g/24 h.

Tonisch-klonische Krampfanfälle im Rahmen einer Präeklampsie, welche keiner anderen Ursache zugeordnet werden können, sind als Eklampsie definiert.

Nur in etwa 50% sind die tonisch-klonischen Krampfanfälle mit schwerer Hypertonie assoziiert und selbst bei fehlender Hypertonie oder Proteinurie möglich (14-34% der Fälle) [30, 69].

Das HELLP-Syndrom ist eine Sonderform der Präeklampsie und stellt ein Akronym dar:

Haemolysis (hämolytische Anämie)

Elevated **L**iver enzyme levels (erhöhte Leberwerte (GOT, GPT, GLDH, LDH, AP, GGT, Bilirubin))

Low **P**latelet count (Thrombozytopenie)

In 5% bis 15% der Fälle liegt bei Patientinnen mit einem HELLP-Syndrom keine signifikante Proteinurie und in bis zu 20% der Fälle keine Hypertonie vor, in 15% fehlen gleichzeitig Hypertonie und Proteinurie [94].

Die chronische Hypertonie ist eine präkonzeptionell vorhandene Hypertonie oder eine Hypertonie mit Blutdruckwerten $>140/90$ mmHg in der ersten Schwangerschaftshälfte mit Persistenz über mehr als zwölf Wochen postpartal.

Eine Pfropfgestose ist definiert als eine

- chronische Hypertonie kombiniert mit Gestationsproteinurie oder
- chronische Hypertonie und vor der 20. SSW bestehende Proteinurie und
- zusätzliche, nach der 20. SSW auftretende Entwicklung:
 - eines plötzlichen Anstiegs der Proteinurie oder
 - eines plötzlichen Blutdruckanstiegs oder
 - eines klinischen oder laborchemischen Merkmals der schweren Präeklampsie (s. o.).

Ein aussagekräftiger Test zur sicheren Früherkennung der Präeklampsie steht bislang nicht zur Verfügung [24]. Zur Risikoabschätzung können aber

anamnestische Angaben und Ergebnisse einer im ersten oder zweiten Trimenon durchgeführten Dopplersonographie herangezogen werden.

Die Erhöhung des Relativen Risikos (RR) je nach anamnestisch erhobenen Risikofaktoren ist in Tabelle 5 dargestellt.

Schwangerschaftsassozierte Risiken für eine Präeklampsie sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Anamnestische Risikofaktoren (RR: Relatives Risiko für Präeklampsie)	Relatives Risiko (RR)
Antiphospholipidsyndrom	RR ~ 9
Z.n. Präeklampsie	RR ~ 7
Body Mass Index > 35 kg/m ²	RR ~ 4
Vorbestehender Diabetes mellitus	RR ~ 3,5
Familiäre Belastung	RR ~ 3
Vorbestehende Nierenerkrankung	RR ~ 3
Erstparität	RR ~ 2,5
Alter > 40 Jahre	RR ~ 2
Chronische Hypertonie	Risiko ↑
Sonstige Autoimmunerkrankungen (z.B. systemischer Lupus erythematodes mit Nephritis)	Risiko ↑↑
Maternale hereditäre Thrombophilie	Datenlage unklar
Fetale Thrombophilie	Datenlage unklar

Tabelle 5: Anamnestische Risikoabschätzung, eine Präeklampsie zu entwickeln, aus [26, 63]

Bilaterales Notching/erhöhter Resistance/Pulsatility-Index (RI/PI) der Aa. uterinae, persistierend nach der 24. abgeschlossenen Schwangerschaftswoche
Mehrlingsschwangerschaft
Gestationsdiabetes
Hydrops fetalis, Trisomie, Blasenmole

Tabelle 6: Schwangerschaftsassozierte Risiken, aus [26, 63]

Die Dopplersonographie uteriner Arterien liefert nach gegenwärtigem Wissensstand verlässlichere Informationen zur Vorhersage als die Bestimmung biochemischer Marker [86]. Bei einem zwischen der 22. und 24. SSW erhobenen abnormen Dopplersonogramm, gekennzeichnet durch Notches, persistierende postsystolische Inzisuren in der Dopplerkurve der Aa. uterinae (siehe Abbildung 2), und/oder eine stark reduzierte diastolische Blutströmung, ist im weiteren Schwangerschaftsverlauf in mehr als 60% mit dem Auftreten einer Präeklampsie zu rechnen [23, 63]. Die Sensitivität der Methode wird deutlich verbessert, wenn auch maternale Risikofaktoren (Tabelle 5) berücksichtigt werden [134]. Da jedoch pathologische Doppler-Werte nicht zwingend in einer Präeklampsie münden, ergibt sich für diese Untersuchung ein hoher falsch-positiver Wert [23]. Doppleruntersuchungen zwischen der 11. und 13. SSW haben lediglich eine Aussagekraft bzgl. des Rezidivs einer Präeklampsie, nicht jedoch bzgl. der Erstmanifestation [27]. In aktuellen Untersuchungen wurde bei der Betrachtung von Biomarkern wie dem Pulsatility-Index (PI), mean-arterial-pressure (MAP), pregnancy-associated Plasma-Protein A (PAPP-A) und placental growth factor (PIGF) eine stärkere Abweichung von den Normwerten bei Patientinnen festgestellt, welche frühzeitig eine Präeklampsie entwickelt haben [3].



Abbildung 2: Physiologisches Dopplersignal der A. uterina [Quelle PD Weichert, UKSH Lübeck]

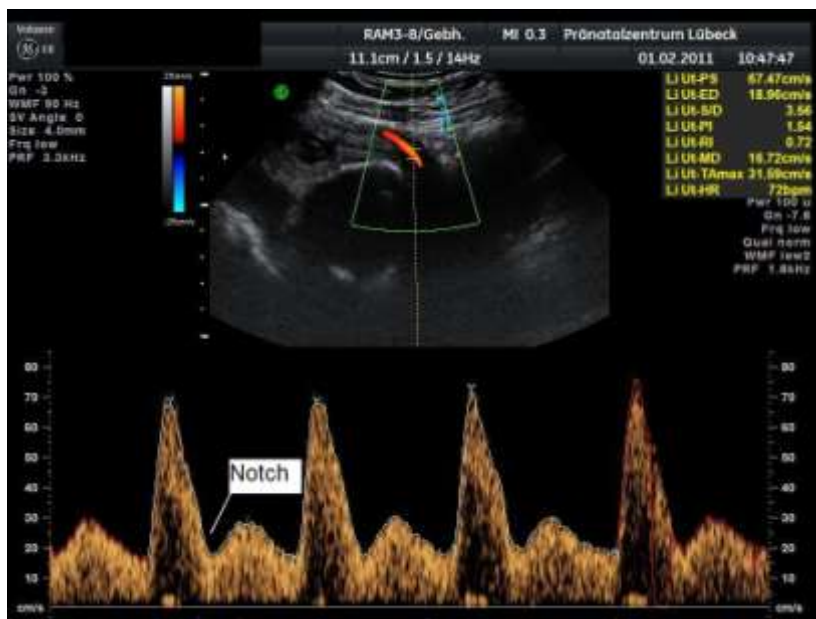


Abbildung 3: Pathologisches Dopplersignal der A. uterina mit Nachweis postsystolischer Inzisuren, sogenannter Notches [Quelle PD Weichert, UKSH Lübeck]

Zur Prävention der Präeklampsie steht derzeit nur die niedrig dosierte Acetylsalicylsäure (ASS)-Einnahme, 75-100 mg pro Tag, ab der Frühschwangerschaft zur Verfügung. Von dieser präventiven Maßnahme profitieren vor allem Frauen mit schwerer Präeklampsie in der Vorgeschichte. In Deutschland hat sich eine ASS-Dosierung von 100 mg pro Tag durchgesetzt. Die Ergebnisse der größten ASS-Studie sagen aus, dass die ASS-Einnahme spätestens mit der 16. SSW begonnen werden sollte [22, 99]. Die Sicherung der Diagnose „Präeklampsie“ erfolgt jedoch aufgrund der o.g. Definitionen erst nach der 20. SSW. Daraus geht hervor, dass die derzeit einzige zugelassene Therapie zur Prävention einer Präeklampsie (ASS) ihre Indikation nur bei denjenigen Patientinnen hat, die in vorherigen Schwangerschaften eine Präeklampsie entwickelt haben, da nur bei diesen Patientinnen ein pathologisches Dopplersonogramm zwischen der 11. und 13. SSW aussagekräftig ist [27].

Unter ASS ist mit einem um 19% verminderten Präeklampsierisiko und einer Reduktion der perinatalen Mortalität um 16% zu rechnen [58].

1.2.2.2 Pathophysiologie der Präeklampsie

Die genauen pathophysiologischen Mechanismen, welche der Präeklampsie zugrunde liegen, sind bisher nicht bekannt. Man geht jedoch davon aus, dass den Gestationshypertonien eine gestörte Plazentation zugrunde liegt [95, 126].

Eine Voraussetzung für die suffiziente Plazentation ist die störungsfreie Implantation der Blastozyste, welche eine physiologische Bedeutung für die Verankerung des Schwangerschaftsproduktes im mütterlichen Organismus, die Induktion der maternalen Immuntoleranz, die Ruhigstellung des Myometriums, den Umbau der uterinen Gefäße für den uteroplazentaren Kreislauf und die endokrine Anpassung des maternalen Organismus hat [103].

Der physiologische Ablauf der Implantation und Plazentation ist in Abbildung 4 dargestellt.

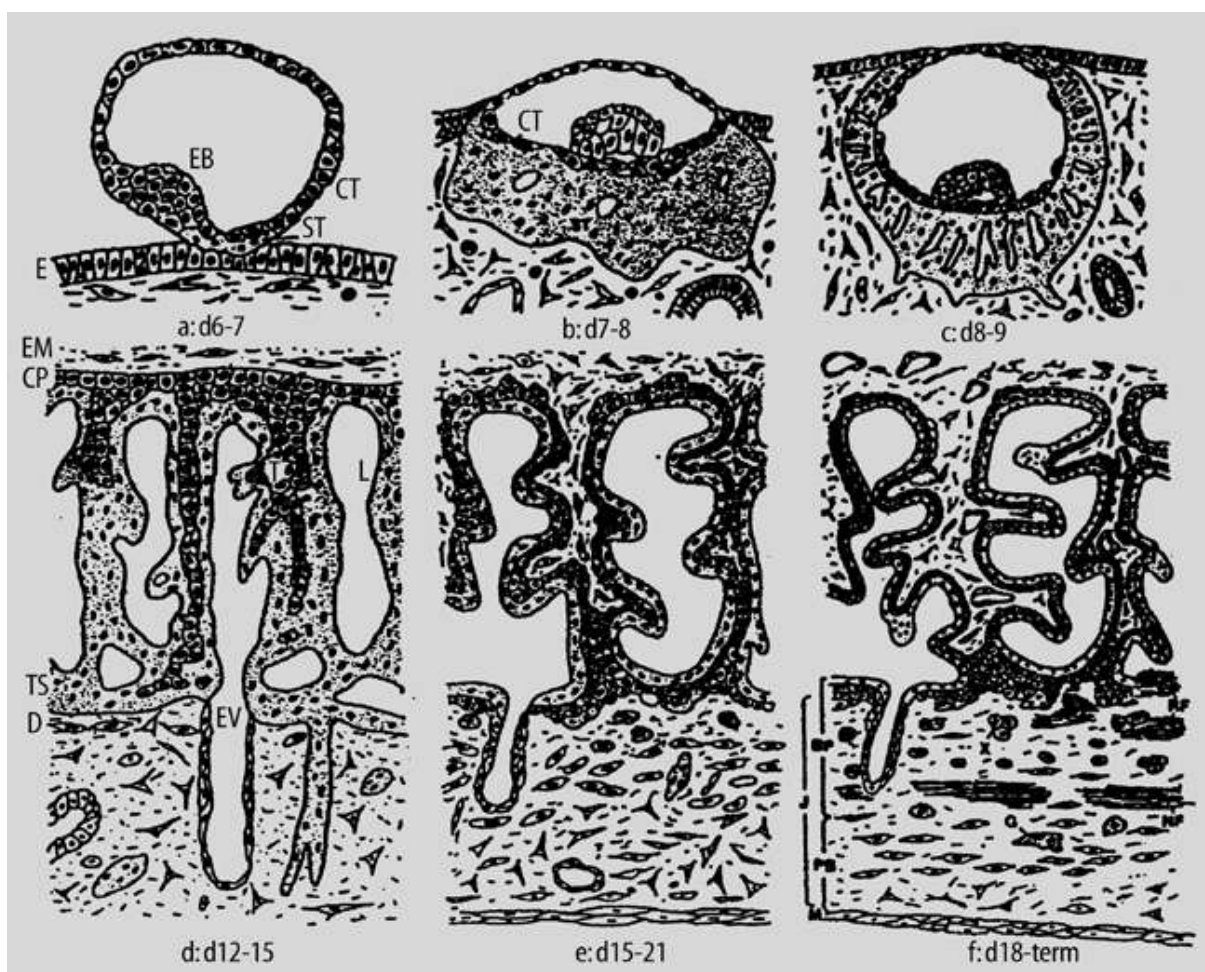


Abbildung 4: Implantation und frühe Entwicklung der Plazenta, Abbildungen und Erläuterungen aus [49]

a: Adhäsion der Blastozyste an die Uteruswand.

b: Die Kontaktzone der Plazenta mit der Dezidua wird von einer kontinuierlichen Schicht von Trophoblasten, dem primitiven Synzytium, gebildet, das aufgrund seiner invasiven Eigenschaften für die Implantation der Blastozyste in die Dezidua sorgt.

c: In der Folge kommt es zu einer massiven Proliferation der Zytotrophoblasten und durch Zellfusion zu einer weiteren Ausdehnung des Synzytiums, in dem Hohlräume, sog. Lakunen, entstehen.

d: Zwischen den Lakunen bilden sich durch vermehrtes Wachstum und Migration von Zytotrophoblasten in das Synzytium die Primärzotten, die ausschließlich aus Trophoblastenzellen bestehen.

e: Die Primärzotten wandeln sich im Verlauf der Schwangerschaft (4. – 5. SSW) durch Einwanderung von mesenchymalen Zellen des extraembryonalen Mesoderms in Sekundärzotten mit bindegewebigem Stroma um.

f: Die Vaskulogenese mit der Neubildung von Blutgefäßen ab der 5. – 6. SSW ist das wesentliche Merkmal der Weiterentwicklung von Sekundär- in Tertiärzotten.

Einzelne der Plazentazotten haften im Bereich der Kontaktzone und stellen die Verankerung in der Uteruswand sicher. Die Lakunen verschmelzen zum intervillösen Raum, der allerdings erst ab der 10. – 11. SSW, nach Abschluss der Organogenese, aus den zuführenden uterinen Spiralarterien mit maternalem Blut, das die frei schwimmenden Zotten umspült, gefüllt wird.

Der villöse und der extravillöse Trophoblast sind für die Ausbildung der wichtigsten funktionellen Bestandteile der Plazenta verantwortlich.

Der villöse Trophoblast sorgt für die Bildung des villösen Synzytiums, dieses wiederum stellt die Hormonsynthese (humanes Choriongonadotropin (hCG) und humanes Plazentalaktogen), den Gasaustausch und Transportvorgänge von Nährstoffen zwischen maternalem und fetalem Blutkreislauf sicher.

An der Haftstelle der Zotten, der uterinen Basalmembran, erfahren die Stammzellen des Trophoblasten einen starken proliferativen Reiz. Die sich rasch vermehrenden extravillösen Trophoblastzellen bilden Zellsäulen, die tief in die Dezidua vordringen. Gleichzeitig wandern villöse Trophoblastzellen in die Arterien und Venen der Dezidua ein und breiten sich intravasal aus. Die Gefäße der Endstrecke der A. uterina erfahren dabei einen vollständigen Umbau ihrer Wandstruktur, da die Endothelzellen durch Trophoblastzellen ersetzt und die muskulären Elemente sowie auch die Tunica elastica interna aufgelöst werden [17, 90, 91, 92].

Durch die strukturelle Veränderung werden aus den englumigen Spiralarterien weite Spiralarterien. Der daraus resultierende verminderte Gefäßwiderstand führt zu einer Steigerung des Zustroms maternalen Blutes in die Plazenta.

Für die Invasion von Trophoblastzellen in die Gefäße sowie in die Dezidua spielen Integrine [25] und auch Proteasen [60] eine entscheidende Rolle. Die zu Beginn der Plazentation physiologische relative Hypoxie wirkt sich ebenfalls fördernd auf die Proliferation des Trophoblasten aus und stellt dadurch eine Voraussetzung für dessen Invasion der Uterusschleimhaut dar [95].

Bei Patientinnen mit Präeklampsie ist die Invasion des Trophoblasten in die Dezidua unter anderem aufgrund fehlender Integrine vermindert [136]. Gleiches gilt auch für die Invasion der uteroplazentaren Gefäße und deren Umbau [50].

Durch den fehlenden Umbau des Endothels werden die Arterien nicht ausreichend dilatiert und der Blutstrom im intervillösen Raum steigt nicht adäquat an. Aufgrund dieser anatomischen Gegebenheiten wird die intrauterine Frucht nicht ausreichend mit Blut, Nährstoffen und Sauerstoff versorgt, was zu einer IUGR führen kann und gegenregulatorisch bei der Schwangeren zu einer „Erfordernis“-Hypertonie führt, um den Widerstand der kontrahierten Gefäße zu überwinden [50].

Außerdem weiß man, dass im Rahmen einer Schwangerschaft das Gerinnungssystem verschiedene Veränderungen durchläuft, welche in Tabelle 7 aufgelistet sind [13, 14]. Diese Veränderungen bezüglich des Gerinnungssystems stehen im Verdacht, bei einer überschießenden Regulation ebenfalls einen negativen Effekt auf die Implantation zu haben [79]. Gerade Thrombophilien, im Besonderen dem Antiphospholipid-Syndrom (APS), sind deswegen bei Patientinnen mit Präeklampsie in der Anamnese besondere Aufmerksamkeit zu schenken [73], und es gilt, diese vor einer erneuten Schwangerschaft abzuklären.

Faktor	I. Trimenon	II. Trimenon	III. Trimenon
Fibrinogen	↑	↑↑	↑↑↑
Faktor VII	↑	↑↑	↑↑↑
Faktor IX	↑	↑↑	↑↑↑
Faktor X	↑	↑↑	↑↑↑
Faktor XII	↑	↑↑	↑↑↑
Faktor VIII	↑	↑	↑
Von-Willebrand-Faktor	↑	↑↑	↑↑↑
Thrombin-Antithrombin-Komplex		↑	↑↑
Protein S	↓	↓	↓
Thrombozytenzahl		↘	↘
Fibrinolyse-Aktivität	↓	↓↓	↓↓
Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1		↑↑	↑↑↑

Tabelle 7: Darstellung der Veränderung ausgewählter Gerinnungsfaktoren während der Schwangerschaft, aus [13, 14]

1.2.2.3 Epidemiologie

Bei jeder sechsten bis achten schwangeren Patientin wird die Diagnose einer hypertensiven Schwangerschaftserkrankung gestellt. Bis zu 25% der perinatalen Todesfälle gehen auf diese Krankheitsentität zurück. Vor allem der Präeklampsie kommt hier eine große Bedeutung zu. Bei vorliegender Präeklampsie steigt die perinatale Morbidität und Mortalität um ein Mehrfaches an, mindestens 50.000 maternalen Todesfällen pro Jahr weltweit liegt die Präeklampsie zugrunde [33, 100, 129].

Die hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen sind insgesamt von steigender Prävalenz. Untersuchungen ergaben, dass dunkelhäutige Patientinnen häufiger von dieser Erkrankung betroffen sind als Weiße, Hispano-Amerikanerinnen und Asiatinnen (siehe Abbildung 5) [6].

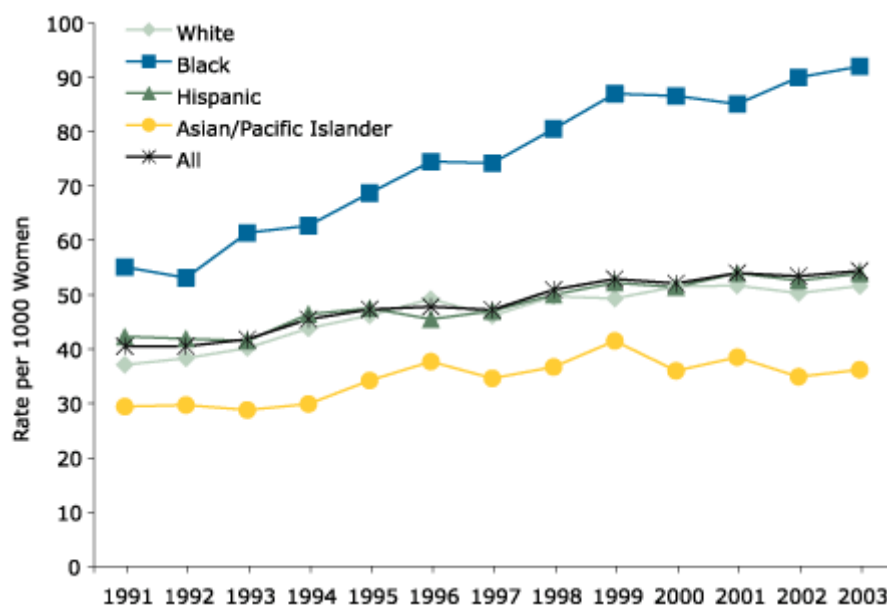


Abbildung 5: Prävalenz hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen, aus [6]

1.2.2.4 Folgen für Mutter und Kind

Die einzige kausale Therapie der Präeklampsie ist die Entbindung. Dies hat oft als Folge eine Unreife des Feten durch iatrogene Frühgeburtlichkeit. Somit ist das Ziel der Erhaltung einer Schwangerschaft vor allem die Vermeidung der Frühgeburt. Die Entbindung ist aus kindlicher Sicht im Allgemeinen nach Vollendung der 37. SSW indiziert [18, 110]. Eine Entbindung nach der 34. SSW und vor Vollendung der 37. SSW sollte bei schwerer Präeklampsie [2], schwerer fetaler Wachstumsrestriktion und gleichzeitig vorhandenen pathologischen fetalen oder fetoplazentaren Blutströmen in der A. umbilicalis [4, 132] herbeigeführt werden. Zwischen der 24. und 34. SSW sollte - sofern aus kindlicher Sicht vertretbar - ein primär konservatives Procedere gewählt werden, da das Risiko der Mutter unter adäquater Überwachung in einem Perinatalzentrum im Vergleich zu den für das Kind zu erwartenden Vorteilen von einem längeren Heranreifen in utero unwesentlich steigt [39, 82, 109].

Auch bei der Sonderform der Präeklampsie, dem HELLP-Syndrom, wird die konservative Vorgehensweise, bei gegebener klinischer Vertretbarkeit, präferiert [1, 63, 121]. Leider gibt es bei dem Vollbild eines HELLP-Syndroms oftmals keinen anderen Ausweg als die sofortige Entbindung, meistens per Sectio caesarea.

Das alleinige Vorliegen einer IUGR stellt beim Fehlen hochpathologischer Dopplerwerte noch keine Indikation zur Entbindung vor der 34. SSW dar [105].

Außerdem kommt neben dem Schwangerschaftsalter auch der Prophylaxe des kindlichen Atemnotsyndroms (= respiratory distress syndroms) eine besondere Bedeutung zu. Indiziert ist die RDS-Prophylaxe bei jeder Schwangeren zwischen der 24. und 34. SSW beim Auftreten von

- vorzeitiger, muttermundswirksamer Wehentätigkeit
- starken Blutungen in der Schwangerschaft
- vorzeitigem Blasensprung
- jeder Situation, die eine elektive vorzeitige Entbindung erfordert (z.B. schwere Plazentainsuffizienz, schwere Gestosen) [29].

Hierzu erfolgen bei der Mutter zwei Gaben von Glukokortikoiden intramuskulär innerhalb von 24 h. Das optimale Zeitfenster für die Entbindung liegt dann zwischen 24 h und 7 Tagen (d) nach kompletierter Verabreichung [63].

In Tabelle 8 sind die Indikationen zur frühzeitigen Entbindung aufgrund maternaler Gefährdung aufgeführt.

Therapieresistente schwere Hypertonie
Therapieresistente Niereninsuffizienz
Akutes Lungenödem
Disseminierte intravasale Gerinnung (DIC)
Persistierende schwere Oberbauchschmerzen
Neu aufgetretene schwere zentral-nervöse Symptome
Eklampsie
Präeklampsie \leq 24. SSW

Tabelle 8: Gründe für die Indikation der frühzeitigen Entbindung bei Präeklampsie und maternaler Gefährdung, aus [63]

Eine vaginale Entbindung ist bei stabilem maternalem und fetalem Zustand möglich. Bei optimaler Überwachung besteht bei normgewichtigem Fet kein erhöhtes Risiko für das Kind [77].

Es sollte eine intensivierete Überwachung der Mutter bis zu 48 h postpartal erfolgen, da in 7% bis 30% der Fälle ein postpartales HELLP-Syndrom und in 28% der Fälle eine postpartale Eklampsie auftreten können [108, 111].

Patientinnen, die bereits einmal eine hypertensive Schwangerschaftserkrankung hatten, weisen ein signifikant erhöhtes kardiovaskuläres Risiko auf. Mehr als 90% der Patientinnen entwickeln nach 20 bis 25 Jahren eine chronische Hypertonie [106]. Auch besteht für dieses Patientenkollektiv ein Wiederholungsrisiko für eine hypertensive Schwangerschaftserkrankung von 2% bis 19% in einer Folgegravidität [32, 62, 107, 120].

Das frühe HELLP-Syndrom (< 32. SSW) scheint mit einem erhöhten Risiko für ein erneutes frühes HELLP-Syndrom einherzugehen [63, 115]. In diesen Fällen ist eine Untersuchung auf angeborene oder erworbene maternale Thrombophilien gerechtfertigt.

2. Zielsetzung

Trotz der gut erforschten Korrelation zwischen Hyperglykämie und erhöhten HPSE-Konzentrationen bei Nichtschwangeren wurde die Expression der Heparanase in Plazenten von Patientinnen mit Gestationsdiabetes bisher nicht untersucht. Gestationsdiabetes spielt in der Geburtshilfe eine immer größere Rolle und erhöht sowohl die maternale als auch die fetale Morbidität und Mortalität.

Auch hypertensive Schwangerschaftserkrankungen, wie die Präeklampsie, stellen als eine der Hauptursachen materno-fetaler Morbidität und Mortalität einen bedeutsamen Krankheitskomplex dar. Aufgrund des extraplazentar bei Malignomen nachgewiesenen Zusammenhangs zwischen einer vermehrten HPSE-Expression und einer modifizierten zellulären Invasionsfähigkeit einerseits sowie der Evidenz einer gestörten trophoblastären Invasion bei hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen andererseits, ergab sich die Hypothese, dass auch bei Patientinnen mit Präeklampsie eine veränderte HPSE-Expression vorliegt.

Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob eine veränderte Expression von HPSE sowohl in Plazenten von Patientinnen mit Gestationsdiabetes als auch mit Präeklampsie im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe vorliegt.

Mit der Untersuchung der HPSE-Expression soll dabei eine Grundlage für eventuelle medikamentöse Therapiemöglichkeiten der genannten Erkrankungen geschaffen werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 cDNA-Herstellung

Material	Hersteller
Super-Script II	Invitrogen, Karlsruhe
Random-Primer	
5x First Strand Buffer	
M DTT	
dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat)	Fermentas, St. Leon-Rot

Tabelle 9: Puffer und Primer zur cDNA-Herstellung

3.1.2 Primer für qPCR

Material	Hersteller
SYBR-Green Super Mix	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 10: Farbstoff für die qPCR

3.1.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide	Sequenz
Heparanase (HPSE)	
HPSE1-for	TCC TGC GTA CCT GAG GTT TG
HPSE1-rev	CAA CCG TAA CTT CTC CTC CAC
Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)	
HPRT1 449 for	TCA GGC AGT ATA ATC CAA AGA TGG T
HPRT1 532 rev	AGT CTG GCT TAT ATC CAA CAC TTC G
Succinat-Dehydrogenase (SDHA)	
SDHA 114 for	TGG GAA CAA GAG GGC ATC TG
SDHA 119 rev	CCA CCA CTG CAT CAA ATT CAT G

Tabelle 11: Oligonukleotide, Metabion International AG (Martinsried, Deutschland)

3.1.4 Lösungen und Puffer für Immunhistochemie

Material	Hersteller
Antikörperverdünnungslösung	Dako, Glostrup (Dänemark)
Cytomation Stift	
Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Faramount-aqueous-mountin-Medium	Dako, Glostrup (Dänemark)
Hämatoxylin nach Mayer	Waldeck GmbH&Co.KG, Münster
Streptavidin-HRP-Lösung	Vectastain, Burlingame (USA)
Ziegen Serum	Dako, Glostrup (Dänemark)
Zitratpuffer pH 6 (Target Retrieval Solution)	

Tabelle 12: Lösungen und Puffer für die Durchführung einer Immunhistochemie

3.1.5 Antikörper für Immunhistochemie

Material	Hersteller
Heparanase-1 (HPA1) Antikörper, Klon HP3/17, monoklonal, anti-human	Acris Antibodies GmbH, Herford
biotinierter Sekundärantikörper aus der Ziege gegen Maus IgG, HRP (Horseradish Peroxidase)-konjugiert	GE Healthcare, München

Tabelle 13: verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistochemie

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96-well Multiply®-PCR-Plate	Sarstedt AG&Co, Nürnberg
Klebefolie optisch klar	
Kryogefäße 1,5 ml	
Objekträger Superfrost Plus	Menzel, Braunschweig
Pipettenspitzen 10 µl	Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen 100, 1.000 µl	Sarstedt AG&Co, Nürnberg
Reaktionsgefäß 0,5 ml (PCR-Tube: Multiply®)	
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 14: Reaktionsgefäße, Pipetten und andere Verbrauchsmaterialien

3.1.7 Chemikalien

Material	Hersteller
Chloroform	Merck, Darmstadt
Ethanol 90%, 75%, 70%	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
flüssiger Stickstoff	Air liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf
Formylaldehydlösung 4,5%	BÜFA, Hude
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Isopropanol 99%, 96%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraffin	Merck, Darmstadt
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Tris	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Wasser: Ultrapure, DNase- und RNase-frei	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Xylol	Th. Geyer GmbH&Co.KG, Renningen

Tabelle 15: verwendete Chemikalien

3.1.8 Geräte

Flockeneisbereiter Icematic F80C	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Hochleistungsdispersierer Ultra-Turrax T25	IKA-Labortechnik, Staufen
Kühlzentrifuge Sigma 2K15	Sigma, Osterode am Harz
Mikrotom	Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Sharp electronic GmbH, Hamburg
Mikrozentrifuge MC6	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Mikrozentrifuge Rotilabo®	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
MJResearch Thermocycler PTC-200	Biozym, Oldendorf
Nikon Diaphot (Vergrößerung 20fach)	
Opticon Monitor 3.1.32	Biorad, München
Rest-Programms (relative expression software tool V 2.0.13)	Quiagen GmbH, Hilden
UV-Photometer	Helios Unicam, Cambridge (Groß-Britannien)

Tabelle 16: verwendete Geräte

3.2 Patientinnenauswahl

In die Studie wurden 120 konsekutive Patientinnen eingeschlossen, die an der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universität zu Lübeck ihr Kind gebären. Vor Beginn der Studie wurde bei der Universität zu Lübeck ein Ethikvotum eingeholt (Ethikvotum siehe Anhang 8.1). Alle Teilnehmerinnen wurden gemäß der Deklaration von Helsinki über die geplante Studie informiert und gaben nach ärztlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme (Aufklärungsbogen siehe Anhang 8.2). Alle Patientinnen wurden darüber in Kenntnis gesetzt, dass postpartal plazentares Gewebe für molekularbiologische und immunhistochemische Untersuchungen konserviert werden sollte. Bei 90 Patientinnen fand sich ein pathologischer Schwangerschaftsverlauf mit einer leichten Präeklampsie oder einem Gestationsdiabetes. Bei 30 Gebärenden wurden keine Schwangerschaftspathologien festgestellt. Sie dienten als Kontrollgruppe.

Die Einschlusskriterien zur Aufnahme in die vorliegende Studie waren:

- Alter: 18 bis 39 Jahre
- schriftliche Zustimmung zur Teilnahme an der Studie (Einwilligungserklärung nach Aufklärung)
- weniger als drei vorangegangene Fehlgeburten
- prägravidem Body-Mass-Index (BMI): 18,5 bis 30 kg/m²

Die Ausschlusskriterien waren:

- Bedarf einer intakten Plazenta für diagnostische oder therapeutische Zwecke (z.B. zur Deckung kindlicher Bauchwanddefekte)
- Plazenta-Lösungsstörungen mit der Notwendigkeit einer operativen Plazentalösung durch Kürettage
- aktuelle oder im Laufe der Schwangerschaft erfolgte Einnahme gerinnungshemmender Präparate, wie z.B. Acetylsalicylsäure oder Vitamin-K-Antagonisten bzw. die Gabe von Heparin
- anamnestisch thromboembolische Ereignisse

Die verschiedenen Behandlungsgruppen im Rahmen dieser Studie waren:

- definierte Präeklampsie (Patientengruppe)
- insulinpflichtiger und nicht-insulinpflichtiger Gestationsdiabetes (Patientengruppen)
- Kontrollgruppe

3.3 Asservierung von Gewebe

Nach der Geburt wurde aus der Plazenta mit Hilfe eines Skalpells gegenüber dem Nabelschnuransatz Gewebe von ca. 2 x 1 x 1 cm entnommen. Das plazentare Gewebe wurde dann mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) von Blutresten gereinigt und in neun Teile portioniert. Anschließend wurden sechs dieser Teile für molekularbiologische Untersuchungen in zwei 1,5 ml Kryoröhrchen (Sarstedt, Nürnberg) eingelagert und in flüssigem Stickstoff bei -196 °C schockgefroren. Drei weitere Gewebsanteile wurden für immunhistochemische Untersuchungen in 4,5 %iger Formylaldehydlösung (BÜFA, Hude) fixiert und bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

3.4 Dokumentation

Jede Gewebeprobe erhielt eine fortlaufende Nummer (001, 002, etc.) und wurde unter Verwendung der Initialen der Patientin pseudonymisiert.

Weiterhin wurden in Form einer Excel-Datei dokumentiert:

- Geburtsdatum der Patientin
- Geburtsdatum des Kindes sowie der errechnete Geburtstermin (ET)
- SSW bei Geburt des Kindes
- Art der Entbindung (Spontanpartus, Sectio caesarea, Re-Sectio, etc.)
- Graviddität und Parität
- Anzahl der bisherigen Aborte sowie deren Zeitpunkt (SSW): Zeitpunkt des ersten Abortes und maternales Alter zu diesem Zeitpunkt
- Größe sowie prägravidem und peripartalem Gewicht der Mutter und BMI

- Dauer möglicher stationärer Aufenthalte während der Schwangerschaft
- Medikamenteneinnahme
- Nikotinabusus (Anzahl der Zigaretten pro Tag)
- Daten des Kindes (Geschlecht, pH-Wert und Base Excess (BE) des Nabelschnurblutes, Größe, Gewicht, Kopfumfang, APGAR, Verlegung auf die Neugeborenenintensivstation mit Verlegungsgrund)
- sonstige Auffälligkeiten während der Geburt oder die Mutter betreffend

3.5 Methoden

3.5.1 RNA-Isolierung

Das Gewebe, welches bei -196 °C in flüssigem Stickstoff konserviert wurde, wurde in Kryoröhrchen auf Eis aufgetaut. Ca. 300 mg des Gewebes wurde auf zwei 2 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) aufgeteilt und in insgesamt 3 ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) gegeben. Mit dem Hochleistungsdispersierer Ultra-Turrax T25 (IKA-Labortechnik, Staufen) wurde das Gewebe in der Trizol-Lösung homogenisiert. Hieran schloss sich eine Inkubation des Homogenisats für 5 min bei Raumtemperatur (Rt) an. Nach Hinzugabe von 0,6 ml Chloroform (Merck, Darmstadt) wurden die Gefäße für 15 s kräftig geschüttelt und dann wurde das Homogenisat erneut für 3 min bei Rt inkubiert und die Gefäße für 15 min bei 12 000 Umdrehungen pro Minute (UpM) und 4 °C zentrifugiert (Kühlzentrifuge 2K15, Sigma, Osterode am Harz). Es folgte die Entnahme des die RNA enthaltenden Überstandes und die Überführung in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß. Im Anschluss wurde die RNA nach Einmischen von 1,5 ml Isopropanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) abgedeckt bei Rt für 10 min präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 12 000 UpM und 4 °C für 10 min wurden die RNA-haltigen, am Boden der Reaktionsgefäße befindlichen, Pellets mit 2 ml 75%igem Ethanol (Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe) gewaschen und erneut bei 7 500 UpM und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Pellets bei Rt für ca. 10 min getrocknet. Dabei lag ein besonderes Augenmerk darauf, die Trockenphase nicht zu lange zu gestalten, so dass die Lösung der Pellets in 80 µl RNase-freiem Wasser (Ultrapure-Wasser, Invitrogen, Karlsruhe) problemlos möglich war.

Die RNA-Konzentrationsbestimmung wurde im UV-Photometer (Helios, Unicam, Cambridge) durchgeführt. Dazu wurde die RNA in 10mM Tris-EDTA-Puffer (pH 8,0) (Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe) 1:100 verdünnt. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe der A_{260} -Werte mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{RNA-Konzentration} = 44 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Aus der Ratio A_{260}/A_{280} wurde dabei die Reinheit der RNA bestimmt. Ein Verhältnis von 1,8 bis 2,1 wurde in dieser Untersuchung als akzeptabel gewertet. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.5.2 Herstellung von cDNA

Zur Herstellung von cDNA wurde die reverse Transkriptase Super-Script-II (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Durch die Verwendung von Pipetten mit Filterspitzen wurde die Kontamination mit DNasen, RNasen, PCR-Produkten und der Proben untereinander vermieden.

1 μg RNA wurde mit 1 μl Random-Primer (Invitrogen, Karlsruhe), 1 μl dNTP (Fermentas, St. Leon-Rot) und Ultrapure-Wasser bis zu einer Menge von 12 μl in einem DNase- und RNase-freien 0,5 ml Reaktionsgefäß (PCR-Tube: Multiply®- μStrip Pro 4er Kette; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) gemischt.

Das Gemisch wurde bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min in einem PCR-Block (MJResearch Thermocycler PTC-200, Biozym, Oldendorf) inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße im Thermocycler auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Es folgte die Zugabe eines Gemisches aus 4 μl 5x-First Strand Buffer (Invitrogen, Karlsruhe) und 2 μl 0,1 M DTT (Invitrogen, Karlsruhe). Die Reaktionsgefäße wurden erneut im Thermocycler bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 2 min inkubiert, um die Random-Primer an die RNA zu hybridisieren. Dann wurde 1 μl Super-Script-II (Invitrogen, Karlsruhe) durch Auf- und Abpipettieren in die Lösung eingemischt. Im Rahmen einer weiteren Inkubation bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min sollte ein Abschmelzen der Primer verhindert werden, während die Polymerisation startete und die Primer verlängert wurden. Dann wurde die reverse Transkription bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 50 min fortgesetzt. Die Reaktion wurde durch

15-minütiges Erhitzen auf 70 °C gestoppt und die Reaktionsgefäße auf 4 °C abgekühlt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.5.3 Quantitative-Realtime-PCR

Die quantitative-Realtime-PCR (qPCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Quantifizierung spezifischer DNA-Abschnitte ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus in Echtzeit (Realtime) durchgeführt.

Mit dem Online-Programm Primer-3 wurden Primerpaare kreiert, die Intron-übergreifend weniger als 30 Basenpaare lang sind und die für die Gewährleistung der Spezifität des Primers verschiedene aufeinanderfolgende Basenpaare beinhalten.

Für die Amplifikation des HPSE-Gens (GeneBank accession-no. NM_006665) wurden spezifische Primerpaare entworfen. Als Referenzgene dienten HPRT1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1) und SDHA (Succinat-Dehydrogenase). Alle Primer wurden von der Metabion international AG (Martinsried) hergestellt. Tabelle 17 gibt die verwendeten Primer wieder.

Gen	Basenfolge	Länge	Tm	Konz.
HPRT1 449 for	TCA GGC AGT ATA ATC CAA AGA TGG T	25	60	165 µM
HPRT1 532 rev	AGT CTG GCT TAT ATC CAA CAC TTC G	25	61	137 µM
SDHA 114 for	TGG GAA CAA GAG GGC ATC TG	20	59,4	295,3 µM
SDHA 119 rev	CCA CCA CTG CAT CAA ATT CAT G	22	58,4	254,3 µM
HPSE-for	TCC TGC GTA CCT GAG GTT TG	20	60	148,1 µM
HPSE-rev	CAA CCG TAA CTT CTC CTC CAC	21	61	138 µM

Tabelle 17: verwendete Primer-Paare

Die Primer-Paare wurden auf eine Konzentration von 10 μM mit Ultrapure-Wasser verdünnt.

Alle Substanzen und die cDNA wurden auf Eis aufgetaut. Mit Filterpipettenspitzen wurden zunächst 5 μl der 1:7,5 verdünnten cDNA und als Negativkontrolle 5 μl Wasser oder eine rT-Minus-Kontrolle (RNA-Mischung ohne Reverse Transkriptase) in die Wells einer 96-well-PCR-Platte (96-well Multiply®-PCR-Plate; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) vorgelegt und 20 μl des jeweiligen Primer-Master-Mixes dazugegeben. Die Zusammenstellung des Master-Mixes wird in Tabelle 18 wiedergegeben. Es fand jeweils zumindest eine Doppelbestimmung statt.

Material	Menge	Hersteller
Primer-Mischung	1 μl	Metabion international AG, Martinsried
Ultrapure-Wasser	6,5 μl	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR-Green-Super-Mix	12,5 μl	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 18: Zusammenstellung des Master-Mixes

Die Platte wurde mit einer Klebefolie (optisch klar; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) verschlossen und bei 1 000 x g für 1 min zentrifugiert (Zentrifuge Universal 32, Hettich, Tuttlingen), um alle Flüssigkeiten am Boden zu konzentrieren. Die qPCR wurde nach dem Protokoll in Tabelle 19 im DNA Engine Opticon 2 (Biozym, Oldendorf) durchgeführt.

1.	50°C	2 min	Aktivierung der Polymerase
2.	95°C	2 min	Aufschmelzen der cDNA-Überstrukturen
3.	95°C	15 s	Denaturierung
4.	60°C	30 s	Primerhybridisierung
5.	Schritt 3+4	40 Zyklen	Messung des Fluoreszenzsignals
6.	65-95°C in Schritten von 0,3°C		Schmelzkurvenanalyse

Tabelle 19: Protokoll der qPCR

Bei der qPCR erfolgte die Quantifizierung während der exponentiellen Phase der Amplifikation durch Fluoreszenzmessungen (nach 40 Zyklen). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Nur in der exponentiellen

Phase der PCR ist die korrekte Quantifizierung der gewonnenen DNA möglich, da während dieser Phase vergleichbare Reaktionsbedingungen herrschen. Die Fluoreszenzsignale entstehen, wenn der DNA-Farbstoff SYBR-Green an doppelsträngige DNA bindet und dadurch aktiviert wird.

Die Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Opticon Monitor 3.1.32 (BioRad, München). Bei der Auswertung wurde, um eine Vergleichbarkeit der Gruppen zu erreichen, der threshold bei 0,007 (Y-Achse) gesetzt und die Schmelzkurven vor der Auswertung auf Verwertbarkeit überprüft. Die ermittelten Zyklen wurden mit Hilfe des Rest-Programms (relative expression software tool V 2.0.13, Quiagen GmbH, Hilden) ausgewertet.

3.5.4 Immunhistochemie

3.5.4.1 Vorbereitung der Proben

Die Proben, welche wie oben beschrieben verarbeitet und bei 4 °C in Formylaldehydlösung fixiert wurden, wurden dann in Paraffin gegossen. Aus den hergestellten Paraffinblöcken wurden 3 µm dicke Gewebeschnitte mit dem Mikrotom (Leica, Wetzlar) hergestellt und auf Objektträgern Superfrost Plus (Menzel, Braunschweig) fixiert.

3.5.4.2 Prinzip der Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie werden molekulare Strukturen in histologischen Gewebeschnitten dargestellt. Dies wird durch Antikörper (AK) erreicht, die gegen diese Strukturen, die sogenannten Antigene (AG), oder auch Epitope genannt, gerichtet sind. Die Antikörper können entweder direkt mit einem Farbstoff markiert oder an Enzyme gekoppelt sein, die eine zunächst farblose Substrat-Chromogen-Lösung in farbige Produkte aufspalten können. Der AK, der an das AG bindet, wird als Primär-AK bezeichnet. Zur Detektion der AG-AK-Bindungen existieren verschiedene Systeme (Detektorsysteme), wie z.B. die Avidin-Biotin-Methode, die hier zur Anwendung kam.

3.5.4.3 Die Avidin-Biotin-Methode

Diese sogenannte ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex-Methode) ist eines der am häufigsten benutzten Verfahren der Immunhistochemie und basiert auf der hohen Spezifität und Bindungsaffinität von Avidin (Hühnereiweiß) oder Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) für das Vitamin Biotin. Die Verwendung von Biotin bietet den Vorteil, dass fast alle Proteine (AK sowie Enzyme) mit Biotin-Molekülen konjugiert werden können. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt in der hohen Sensitivität. Da Streptavidin kein Glykoprotein ist und deshalb nicht an Kohlenhydratrezeptoren bindet, sind unspezifische Bindungen bei Streptavidin seltener als bei Avidin. Außerdem zeigt Streptavidin aufgrund seines isoelektischen Punktes im neutralen Bereich eine wesentlich stärkere Bindung an Biotin als Avidin [89], sodass in dieser Untersuchung der Streptavidin-HRP(Horseradish-Peroxidase)-Komplex verwendet wurde. Der Ablauf gestaltet sich wie folgt: Zunächst bindet der Primär-AK an das entsprechende AG. Daraufhin wird ein biotinierter Sekundär-AK hinzugegeben, an den wiederum das Peroxidase-konjugierte Streptavidin bindet. Zur Sichtbarmachung erfolgt die Zugabe von Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB). Die oxidierte Form von DAB zeigt eine braune Färbung, deren Tiefe mit der Konzentration des untersuchten AG korreliert. Die Oxidation wird durch HRP katalysiert (Abbildung 6).

3.5.4.4 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Die Gewebeschnitte wurden zunächst mit Xylol entparaffiniert und mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert, um zu verhindern, dass die Schnitte austrocknen. Der Ablauf der Entparaffinierung ist in Tabelle 20 dargestellt.

Schritt	Dauer	Lösung
1	3x5 min	Xylol
2	2x5 min	Isopropylalkohol
3	2x5 min	96% Ethanol
4	2x5 min	70% Ethanol
5	2x5 min	a. dest.
6	2x5 min	PBS-Puffer

Tabelle 20: Ablauf der Entparaffinierung

Um im Paraffin entstandene crosslinks zu lösen, welche zu einer „Maskierung“ des entsprechenden AG führen können, wurden die Schnitte in Zitratpuffer (pH 6,0) (Target Retrieval Solution, Dako, Glostrup, Dänemark) in der Mikrowelle bei 800 Watt für 3 x 5 min erwärmt. Zwischen den Schritten wurde der Behälter mit destilliertem Wasser (a. dest.) aufgefüllt, sofern ein Teil verdampft war, damit die Schnitte dauerhaft von Flüssigkeit bedeckt waren.

Nach 20-30 min Abkühlung der Gewebeschnitte bei Rt wurden die Schnitte für zunächst 5 min mit PBS-Puffer, dann für 5 min mit a. dest. und zuletzt noch 3 x 5 min mit PBS-Puffer gespült.

Die Proben wurden unter Verwendung eines Cytomation-Stifts (Dako, Glostrup, Dänemark) umkreist. Danach wurde mit Ziegenserum (Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:80 für 20 min bei Rt zur Reduktion unspezifischer Bindereaktionen blockiert. Die Blockierungslösung wurde verworfen. Die Schnitte wurden dann mit dem monoklonalen Primär-AK mouse-anti-human Heparanase (Acris Antibodies, Herford, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:100 mit Antikörperverdünnungslösung (Dako Cytomation, Carpinterie, USA) für 24 h bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Negativkontrolle wurde nur mit Antikörperverdünnungslösung inkubiert. Die Schnitte wurden erneut 3 x 5 min mit PBS-Puffer gespült. Um die gewebeeigenen Peroxidaseaktivitäten zu blockieren, wurden die Schnitte mit 3 %igem H₂O₂ in PBS-Puffer über 10 min bei Rt in der Feuchtkammer inkubiert. Wiederum wurde 3 x 5 min mit PBS-Puffer gespült und der biotinierte Sekundär-AK goat-anti-mouse Immunglobulin G (IgG) (Vector, Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland) in der Verdünnung 1:200 wurde auf die Proben gegeben und für 30 min bei Rt in einer Feuchtkammer inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte für 3 x 5 min mit PBS-Puffer gespült. Die Proben wurden mit Streptavidin-HRP-Lösung (Vectastain, Burlingame, USA) für 30 min bei Rt in einer Feuchtkammer inkubiert.

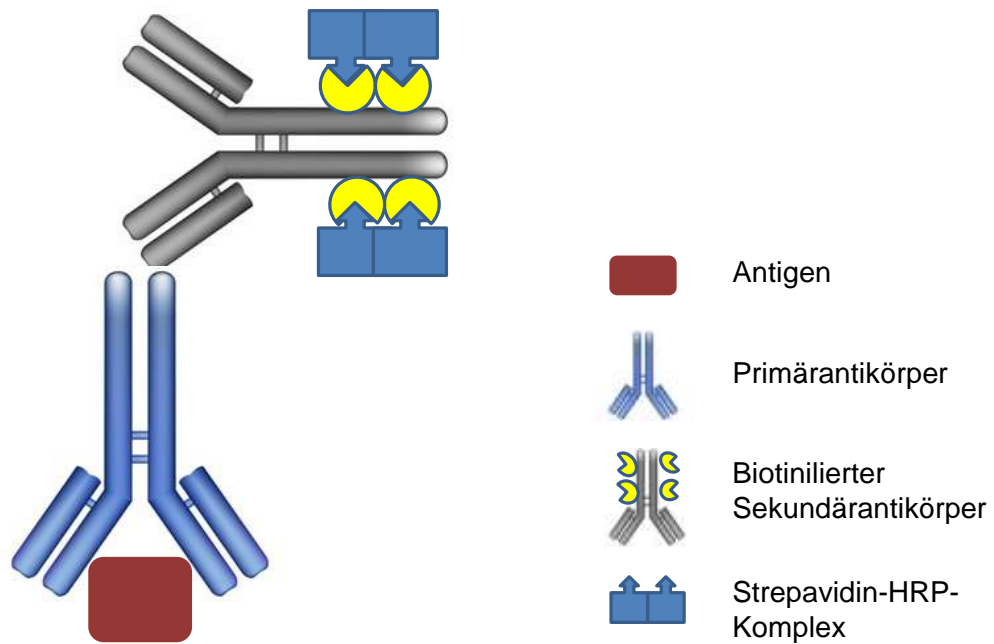


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Streptavidin-Biotin-Methode

Für 3 x 5 min wurden die Schnitte mit PBS-Puffer und einmal für 30 s in PBS-Puffer mit Triton X-100 (Sigma, St. Louis, USA) gespült. Danach wurden die Schnitte bis zur Weiterverarbeitung in PBS-Puffer gelagert. Die Peroxidase wurde mit DAB (ohne Nickel, Vector, Burlingame, USA) für 5-20 min unter Sichtkontrolle im Mikroskop gefärbt. Das DAB wurde unter laufendem a. dest. ab gespült, bevor die Gegenfärbung der Kerne mit Hämatoxylin (nach Mayer; Waldeck GmbH&CoKG, Münster) über 3-5 min durchgeführt wurde. Das Hämatoxylin wurde ebenfalls unter laufendem a. dest. ab gespült und anschließend wurden die Schnitte unter laufendem Leitungswasser für 20 min gebläut.

Abschließend wurden die angefärbten Schnitte mit Faramount-aqueous-mounting-Medium (Dako, Glostrup, Dänemark) eingedeckt. Zeitnah wurden die Schnitte mikroskopiert und Fotoaufnahmen (Nikon, Diaphot 300, Vergrößerung: 20x) angefertigt.

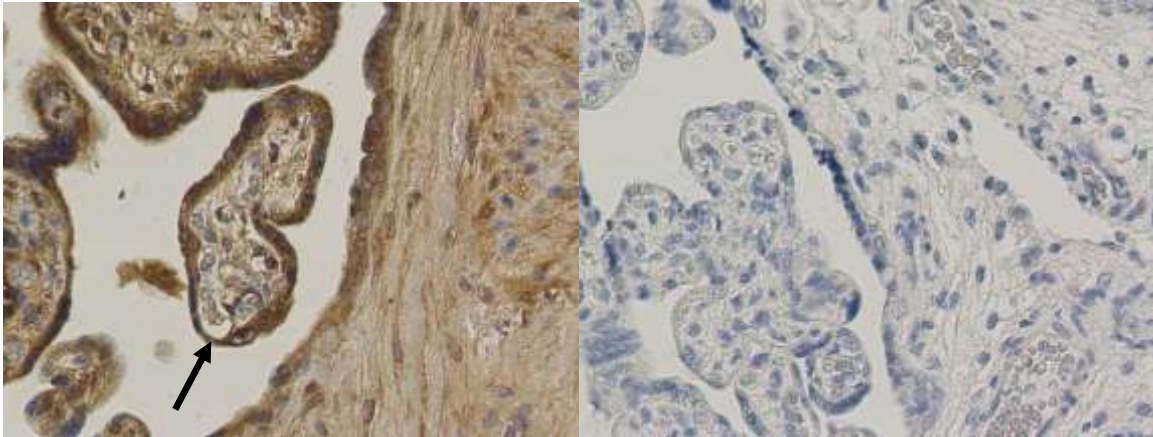


Abbildung7: Färbung mit monoklonalen Primärantikörper mouse-anti-human Heparanase und Negativkontrolle. Die braune Färbung (Pfeil) weist dabei auf die HPSE-Expression hin

Im Rahmen der Auswertung wurde die Intensität der Färbung (0=keine Färbung, 1=gelbliche Färbung, 2=hellbraune Färbung, 3=dunkelbraune Färbung) analysiert. Dabei wurde die Reihenfolge der Proben zufällig gewählt, so dass während der Analyse eine Zuordnung zur jeweiligen Gruppe nicht möglich war.

3.6 Statistik

3.6.1 Fallzahlkalkulation

Die Ausgangshypothese besagt, dass 70% der Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen eine mittelgradige oder starke Expression der plazentaren Heparanasen - gemessen in einem spezifischen immunhistochemischen Score - aufweisen, während dies nur bei 30% der Kontrollen der Fall ist.

Es sollte bei einem α -Wert von 0,05 unter Annahme eines 40%igen Färbeunterschiedes eine 80%ige Power erzielt werden. Gemäß der im Vorfeld erfolgten Power-Analyse (N-Query advisor, Statcon, Witzenhausen) war somit bei

identischer Gruppengröße eine Anzahl von 30 Patientinnen pro Gruppe notwendig.

3.6.2 Auswertung

Die Resultate wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests für nicht-parametrische Daten verglichen und als statistisch signifikant angesehen, wenn sich ein p-Wert $<0,05$ ergab. Diese statistischen Auswertungen erfolgten dabei mit Prism 5.0 für Windows (GraphPad Software, 2003, San Diego, CA, USA).

4. Ergebnisse

4.1 Auswertung der Patientinnengruppen

In Rahmen dieser Arbeit wurden Plazenten von 120 konsekutiven Patientinnen untersucht. Patientinnen mit (nicht insulinpflichtigem) Gestationsdiabetes (NIDGDM), insulinpflichtigem Gestationsdiabetes (IDGDM), Präeklampsie und Kontrollgruppe zeigten für die Parameter maternales Alter, Gravidität, kindliches Geburtsgewicht, APGAR-Werte des Kindes und pH-Wert des Nabelschnurblutes keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 21).

	Kontrolle (n=30)	nicht insulinpflichtiger Gestationsdiabetes (n=30)	p-Wert
Maternales Alter bei Geburt des Kindes (Jahre) [Range]	29,63 ± 5,25 [21-40]	32,23 ± 6,09 [21-49]	0,109
Tragzeit (Tage) [Range]	274,5 ± 8,16 [263-288]	282,5 ± 38,51 [263-292]	0,468
Geburtsgewicht des Kindes (g) [Range]	3379,33 ± 415,83 [2650-4240]	3579,67 ± 517,89 [2490-4885]	0,098
pH-Wert des Nabelschnurblutes [Range]	7,33 ± 0,07 [7,20-7,46]	7,32 ± 0,07 [7,12-7,49]	0,329
APGAR 1´ [Range]	8,76 ± 0,77 [6-10]	8,47 ± 0,76 [7-9]	0,076
APGAR 5´ [Range]	9,79 ± 0,48 [8-10]	9,53 ± 0,67 [8-10]	0,118
APGAR 10´ [Range]	9,93 ± 0,25 [9-10]	9,8 ± 0,48 [8-10]	0,375
Gravidität [Range]	1,9 ± 0,94 [1-4]	2,43 ± 1,76 [1-7]	0,48
Parität [Range]	1,6 ± 0,61 [1-3]	1,83 ± 1,13 [1-5]	0,538
Prägravider maternaler BMI (kg/m ²) [Range]	25,86 ± 5,25 [18,31-39,56]	30,17 ± 9,85 [18,52-63,69]	0,107
Peripartaler maternaler BMI (kg/m ²) [Range]	31,45 ± 5,68 [22,27-42,29]	36,07 ± 10,92 [21,82-75,55]	0,125
Gewichtszunahme in der Schwangerschaft (kg) [Range]	15,27 ± 7,52 [-2-32]	16,46 ± 7,19 [2-33,2]	0,524

Tabelle 21: Charakteristika der Patientinnen mit (nicht insulinpflichtigem) Gestationsdiabetes (NIDGDM) versus Kontrolle. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und Range.

Der BMI der Mütter mit insulinpflichtigem Diabetes war sowohl vor ($p=0,009$), als auch nach ($p=0,003$) der Schwangerschaft signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe (Tabelle 22).

	Kontrolle (n=30)	insulinpflichtiger Gestationsdiabetes (n=30)	p-Wert
Maternales Alter bei Geburt des Kindes (Jahre) [Range]	29,63 ± 5,25 [21-40]	30,66 ± 5,54 [21-42]	0,506
Tragzeit (Tage) [Range]	274,5 ± 8,16 [263-288]	270,07 ± 5,09 [259-279]	0,071
Geburtsgewicht des Kindes (g) [Range]	3379,33 ± 415,83 [2650-4240]	3460,83 ± 537,53 [2650-4780]	0,657
pH-Wert des Nabelschnurblutes [Range]	7,33 ± 0,07 [7,20-7,46]	7,33 ± 0,06 [7,17-7,44]	0,95
APGAR 1´ [Range]	8,76 ± 0,77 [6-10]	8,67 ± 0,54 [8-10]	0,233
APGAR 5´ [Range]	9,79 ± 0,48 [8-10]	9,67 ± 0,54 [8-10]	0,346
APGAR 10´ [Range]	9,93 ± 0,25 [9-10]	9,9 ± 0,3 [9-10]	0,999
Gravidität [Range]	1,9 ± 0,94 [1-4]	2,07 ± 0,77 [1-3]	0,331
Parität [Range]	1,6 ± 0,61 [1-3]	1,6 ± 0,66 [1-3]	0,288
Prägravidier maternaler BMI (kg/m ²) [Range]	25,86 ± 5,25 [18,31-39,56]	31,45 ± 7,58 [20,35-49,61]	0,009*
Peripartaler maternaler BMI (kg/m ²) [Range]	31,45 ± 5,68 [22,27-42,29]	35,77 ± 6,51 [27,03-56,64]	0,003*
Gewichtszunahme in der Schwangerschaft (kg) [Range]	15,27 ± 7,52 [-2-32]	12,26 ± 9,48 [-20-29]	0,404

Tabelle 22: Charakteristika der Patientinnen mit insulinpflichtigem Gestationsdiabetes (IDGDM) versus Kontrolle. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und Range. Sternchen (*) weisen auf statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen hin.

Bei Patientinnen mit Präeklampsie lag der jeweilige p-Wert bei 0,001 vor und bei 0,014 am Ende der Schwangerschaft (Tabelle 23). Bei Patientinnen mit Präeklampsie fiel zudem ein signifikant höherer BMI-Wert der Mütter am Ende der Schwangerschaft auf. Bei der Auswertung der Gewichtszunahme im Laufe der

Schwangerschaft konnte aber kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Tabelle 23).

	Kontrolle (n=30)	Präeklampsie (n=30)	p-Wert
Maternales Alter bei Geburt des Kindes (Jahre) [Range]	29,63 ± 5,25 [21-40]	31,07 ± 4,49 [21-40]	0,222
Tragzeit (Tage) [Range]	274,5 ± 8,16 [263-288]	275 ± 9,22 [259-289]	0,732
Geburtsgewicht des Kindes (g) [Range]	3379,33 ± 415,83 [2650-4240]	3327,17 ± 415,16 [2650-4300]	0,733
pH-Wert des Nabelschnurblutes [Range]	7,33 ± 0,07 [7,20-7,46]	7,31 ± 0,08 [6,99-7,40]	0,18
APGAR 1´ [Range]	8,76 ± 0,77 [6-10]	8,5 ± 1,12 [3-9]	0,198
APGAR 5´ [Range]	9,79 ± 0,48 [8-10]	9,53 ± 0,81 [6-10]	0,121
APGAR 10´ [Range]	9,93 ± 0,25 [9-10]	9,73 ± 0,63 [7-10]	0,227
Gravidität [Range]	1,9 ± 0,94 [1-4]	1,8 ± 1,3 [1-6]	0,303
Parität [Range]	1,6 ± 0,61 [1-3]	1,37 ± 0,6 [1-3]	0,021*
Prägravidier maternaler BMI (kg/m ²) [Range]	25,86 ± 5,25 [18,31-39,56]	32,76 ± 10,51 [19,78-61,88]	0,001*
Peripartaler maternaler BMI (kg/m ²) [Range]	31,45 ± 5,68 [22,27-42,29]	39,19 ± 9,53 [25,31-64,7]	0,014*
Gewichtszunahme in der Schwangerschaft (kg) [Range]	15,27 ± 7,52 [-2-32]	18,08 ± 7,38 [6-37]	0,239

Tabelle 23: Charakteristika der Patientinnen mit Präeklampsie versus Kontrolle. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und Range. Sternchen (*) weisen auf statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen hin.

Bei den Patientinnen mit insulinpflichtigem Gestationsdiabetes zeigte sich ein signifikanter Unterschied des Entbindungsmodus (Sectiones vs. Spontangeburt) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der p-Wert lag bei 0,037. Für die Gruppe mit nicht insulinpflichtigem Gestationsdiabetes ergab sich ein p-Wert von 0,604 und für die Gruppe mit Präeklampsie ein p-Wert von 1,0 und somit keine Signifikanz (prozentuale Verteilung siehe Abbildung 8). Vaginal-operative Eingriffe kamen insgesamt nur selten vor.

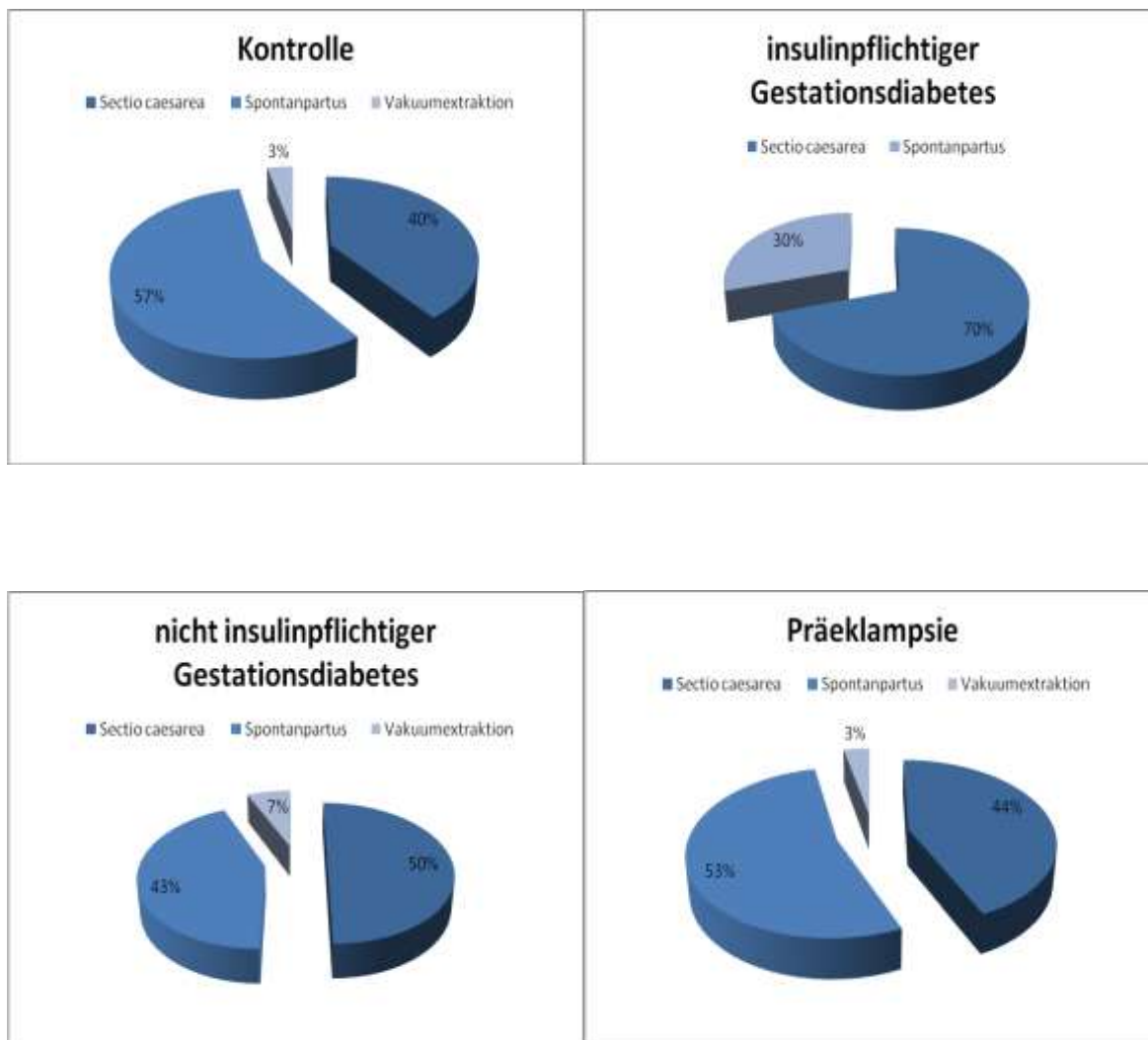


Abbildung 8: Vergleich der unterschiedlichen Entbindungsmodi zwischen der Kontrollgruppe und den verschiedenen Studiengruppen.

Aufgrund der Krankheitsbilder, welche nicht nur Risiken für die Mütter, sondern auch für die Neugeborenen bieten, wurde die Verlegungshäufigkeit der Neugeborenen auf die Neugeborenenintensivstation ausgewertet. In keiner Gruppe wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant mehr oder weniger Neugeborene auf die Intensivstation verlegt (Tabelle 24; $p=1$).

	ja	nein
Kontrolle	2	28
nicht insulinpflichtiger Gestationsdiabetes	3	27
insulinpflichtiger Gestationsdiabetes	2	28
Präeklampsie	2	28

Tabelle 24: Häufigkeit der Verlegung der Neugeborenen auf die Intensivstation

4.2 Vergleich der mRNA-Expression

Die mRNA Expression der plazentaren Heparanase zeigte zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 25-27).

Gen	Typ	Effizienz	Expression	Standard-abweichung	95% Konfidenzintervall	p-Wert
HPRT	Referenzgen	1	1,094			
SDHA	Referenzgen	0,9	0,914			
HPSE	Zielgen	0,9	0,713	0,192 - 2,405	0,039 - 6,351	0,173

Tabelle 25: Ergebnis der qPCR-Auswertung der Gruppe der Patientinnen mit nicht insulinpflichtigem Gestationsdiabetes (NIDGDM) im Vergleich zur Kontrollgruppe

Gen	Typ	Effizienz	Expression	Standard-abweichung	95% Konfidenzintervall	p-Wert
HPRT	Referenzgen	1	1,14			
SDHA	Referenzgen	0,9	0,878			
HPSE	Zielgen	0,9	0,681	0,169 - 2,819	0,032 - 7,749	0,15

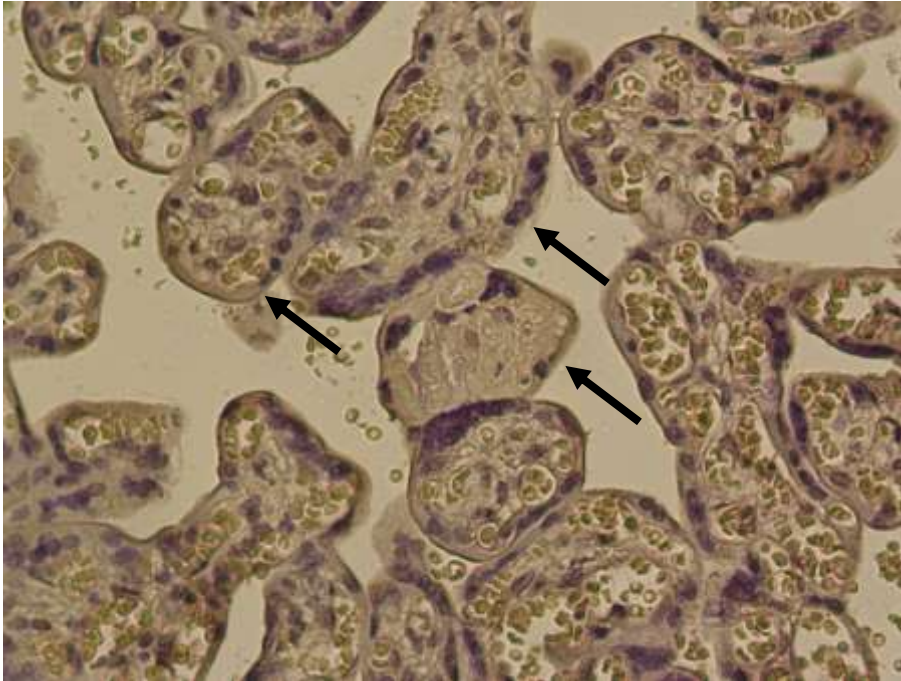
Tabelle 26: Ergebnis der qPCR-Auswertung der Gruppe der Patientinnen mit insulinpflichtigem Gestationsdiabetes (IDGDM) im Vergleich zur Kontrollgruppe

Gen	Typ	Effizienz	Expression	Standard-abweichung	95% Konfidenzintervall	p-Wert
HPRT	Referenzgen	1	1,055			
SDHA	Referenzgen	0,9	0,948			
HPSE	Zielgen	0,9	0,903	0,305 - 2,690	0,123 - 11,325	0,604

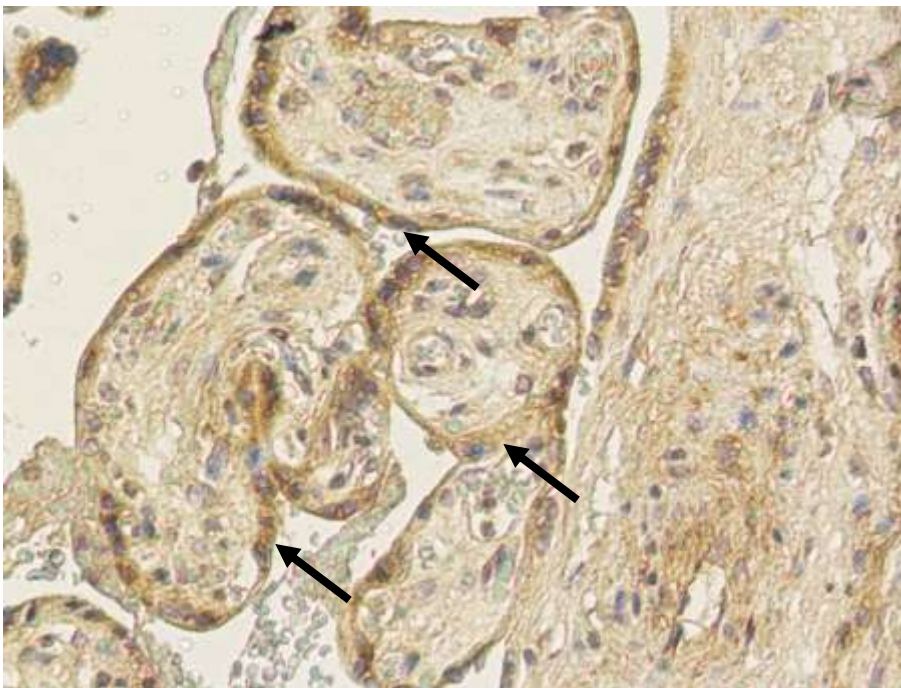
Tabelle 27: Ergebnis der qPCR-Auswertung der Gruppe der Patientinnen mit Präeklampsie im Vergleich zur Kontrollgruppe

4.3 Immunhistochemischer Nachweis und Quantifizierung der HPSE

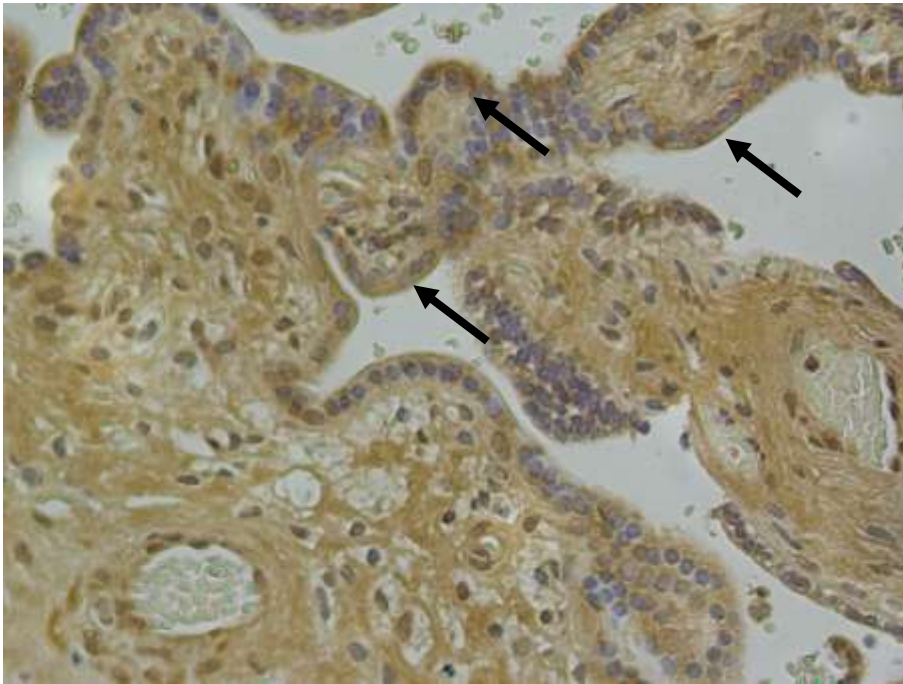
Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch verschiedene Färbeintensitäten der Heparanase in villösen Zytotrophoblasten und extravillösen Trophoblasten.



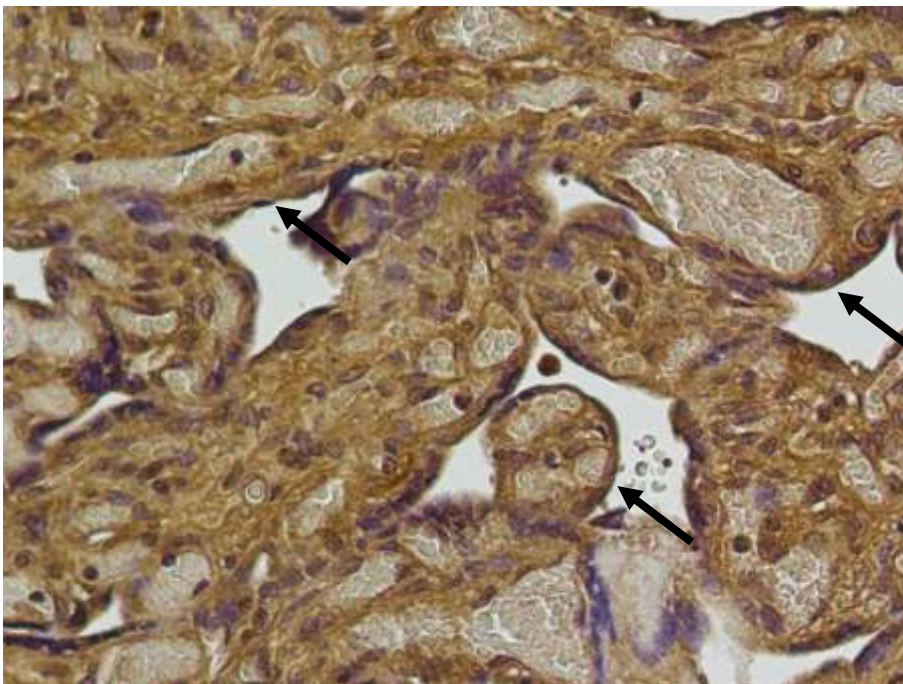
A



B



C



D

Abbildung 9: Einteilung der Färbintensität, Vergrößerung 20-fach (Aufnahme mit Nikon, Diaphot 300), (lange schwarze Pfeile: Markierung der villösen Zytotrophoblasten und extravillösen Trophoblasten).

- A: Intensität 0 = keine Färbung
- B: Intensität 1 = gelbliche Färbung
- C: Intensität 2 = hellbraune Färbung
- D: Intensität 3 = dunkelbraune Färbung

In den folgenden Tabellen sind die Mittelwerte der Färbeintensitäten der verschiedenen Gruppen dargestellt. Es zeigte sich bei allen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe kein statistisch signifikanter Unterschied der Heparanase-Expression.

	Kontrolle	nicht insulinpflichtiger Gestationsdiabetes	p-Wert
Färbeintensität	2,4 ± 0,611 Range 1-3	2,33 ± 0,6 Range 1-3	0,6481

Tabelle 28: Mittelwert, Standardabweichung und Range der Färbeintensität bei der Gruppe der Patientinnen mit nicht insulinpflichtigem Gestationsdiabetes (NIDGDM) im Vergleich zur Kontrolle.

	Kontrolle	insulinpflichtiger Gestationsdiabetes	p-Wert
Färbeintensität	2,4 ± 0,611 Range 1-3	2,33 ± 0,6 Range 1-3	0,6481

Tabelle 29: Mittelwert, Standardabweichung und Range der Färbeintensität der Gruppe der Patientinnen mit insulinpflichtigem Gestationsdiabetes (IDGDM) im Vergleich zur Kontrolle.

	Kontrolle	Präeklampsie	p-Wert
Färbeintensität	2,4 ± 0,611 Range 1-3	2,66 ± 0,47 Range 2-3	0,0903

Tabelle 30: Mittelwert, Standardabweichung und Range der Färbeintensität der Gruppe der Patientinnen mit Präeklampsie im Vergleich zur Kontrolle.

5. Diskussion

5.1 Einordnung in die Fachliteratur

Sowohl Gestationsdiabetes als auch die dem Formenkreis der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen zugehörige Präeklampsie stellen eine Gefährdung für die werdende Mutter sowie das ungeborene Kind dar. Aufgrund der Häufigkeit und des komplikationsreichen Verlaufs, bis hin zur erhöhten perinatalen Mortalität, nehmen der Gestationsdiabetes und die Präeklampsie eine wichtige Rolle in der Schwangerschaftsvorsorge und Geburtshilfe ein.

Seit 2002 wird eine zunehmende Prävalenz des Gestationsdiabetes [64] beschrieben. Die Prävalenz schwankte, laut Literaturangaben, in den letzten 20 Jahren zwischen 0,6% und 22% [54, 74]. Je häufiger nach einem Gestationsdiabetes „gesucht“ wird, je höher die Diabetesrisiken allgemein sind und je niedriger die diagnostischen Grenzen liegen, umso häufiger wird ein Gestationsdiabetes diagnostiziert [64].

Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen treten in 6% bis 8% der Schwangerschaften auf [63]. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind vor allem bezüglich der Präeklampsie sowohl die Präventionsmöglichkeiten als auch die Früherkennungsmethoden deutlich eingeschränkt. Durch Studien von Ferrazzani et al. [35] und Rey et al. [98] liegen Hinweise vor, dass die Gabe von Heparinen als Sekundärprophylaxe bei plazentaassoziierten Erkrankungen, wie der Präeklampsie, wirksam sein könnte. Allerdings ist der genaue schwangerschaftsprotective Wirkmechanismus der Heparine, wie bereits von Bohlmann et al. [14] diskutiert, noch nicht suffizient erforscht.

Nachdem die Expression der Heparanase in menschlichem Plazentagewebe erstmalig durch Goshen et al. [37] nachgewiesen wurde, erfolgten weitergehende Untersuchungen zu ihrer Expression sowohl in der Plazenta [28, 40, 42, 76] als auch in trophoblastären Zellkultur-Modellen [15].

Im Jahr 2000 erfolgte durch Dempsey et al. [28] der immunhistochemische Nachweis in extravillösen Trophoblasten der humanen Plazenta, in Endothelzellen von Xenografts, welche eine akute Abstoßungsreaktion durchliefen, sowie in Arterienwänden normaler Gewebe. Des Weiteren wurde die HPSE im uterinen Epithel, der Dezidua und dem Trophoblasten der Maus sowie im humanen

Trophoblasten lokalisiert [55]. Haimov-Kochman et al. [40] wiesen die Heparanase in villösen Zytotrophoblasten, Synzytiotrophoblasten und in intermediären trophoblastären Zelllinien im ersten Trimenon normal verlaufender Schwangerschaften sowie in molaren und ektopen Schwangerschaften nach. Außerdem wurde das Heparanase-Protein v. a. im Endothel fetaler Kapillaren und in geringerer Konzentration auch in den großen fetalen Gefäßen nachgewiesen.

Auch der die Dezidua und die mütterlichen Gefäße invadierende extravillöse Trophoblast zeigte sich HPSE-positiv. Im zweiten und dritten Trimenon war der villöse Zytotrophoblast und der die plazentare Implantationsseite invadierende extravillöse Trophoblast weiterhin HPSE-positiv, während hingegen der Synzytiotrophoblast im zweiten und dritten Trimenon eine variable HPSE-Expression zeigte. Diese Ergebnisse gelten sowohl für Patientinnen mit normal verlaufenden Schwangerschaften, als auch für Patientinnen, welche an einer Plazenta accreta oder auch an einer Präeklampsie leiden. Die Ergebnisse des ersten und zweiten Trimenon resultieren aus zwanzig Gewebeproben normaler intrauteriner Schwangerschaften zwischen der 6. und 20. SSW und aus jeweils vier kompletten und partiellen Molen im Gestationsalter zwischen der 6. und 14. SSW. Die Stichproben wurden jeweils nach elektiver Abruption gewonnen. Weiterhin wurden fünf nicht rupturierte ektipe Schwangerschaften in der 6. bis 9. SSW chirurgisch reseziert. Die Ergebnisse des dritten Trimenon resultieren aus zehn Plazenten unkompliziert verlaufender und gesunder Schwangerschaften nach spontaner Entbindung oder Sectio caesarea und aus zehn Plazenten von Präeklampsie-Patientinnen, ebenfalls nach normaler Entbindung oder Sectio caesarea [40].

Die bisherige Datenlage bzgl. der plazentaren HPSE-Expression ist somit aufgrund des weit gefächerten Gestationsalters mit potentiellen Störeinflüssen durch eine zeitlich divergierende, schwangerschaftswochenspezifische Expression ausgewählter Proteine [9] als suboptimal zu bezeichnen. Bisher fand keine systematische Auswertung der HPSE-Konzentration bei den verschiedenen pathologischen Schwangerschaftsverläufen im Vergleich zu Kontrollen statt. Diese Lücke wird durch die vorliegende Arbeit nun für Termingerburten geschlossen.

Da eine differierende Expression plazentarer Proteine bei GDM im Vergleich zu Kontrollen nicht ungewöhnlich ist [66, 87, 117] und zudem an anderen Organen

veränderte HPSE-Expressionen bei Diabetes nachgewiesen wurden, erschien die plazentare Analyse bei Frauen mit Gestationsdiabetes sinnvoll.

Die Heparanase konnte bisher sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen werden [81]. In mehreren Studien [55, 78, 81, 122, 124] wurde die aktive Form der Heparanase (50-Kilodalton(kDa)-Form) nur im Zellkern nachgewiesen. Sie wird im Golgi-Apparat im Zytoplasma gebildet, in die Lysosomen transferiert und dort durch proteolytische Prozesse in die aktive Form überführt. Danach gelangt sie durch Translokation in den Zellkern und beeinflusst dort die Zelldifferenzierung [71].

Als Fortführung der in der vorliegenden Arbeit aufgegriffenen Thematik könnte eine Differenzierung zwischen der aktiven und der inaktiven Form im Rahmen der quantitativen Bestimmung der Heparanase untersucht werden. Ebenso wäre es denkbar, dass die exakte zelluläre Lokalisation der plazentaren Heparanase bei normal bzw. pathologisch verlaufenden Schwangerschaften differiert. Diese Fragestellung konnte durch die für die vorliegende Arbeit verwendete Untersuchungsmethode der qPCR aufgrund der Homogenisierung der Plazentaprobe nicht beantwortet werden. Eine über den quantitativen Aspekt hinausgehende immunhistochemische Untersuchung wäre hier als Option denkbar.

Es besteht eine Korrelation zwischen der Expression der Heparanase und der Progredienz verschiedener Malignome [78, 80, 122]. 2009 zeigten Zheng et al. [135], dass die Heparanase sowohl die Invasivität, die Angiogenese als auch die Metastasierung von Malignomen, wie dem Ösophaguskarzinom, dem Pankreaskarzinom, dem malignen Melanom, dem Urothelkarzinom der Harnblase und dem Prostatakarzinom fördert, allerdings nicht die Proliferation humaner Magenkarzinom-Zellen. Nachdem somit bereits nachgewiesen wurde, dass die Heparanase differierende Effekte bei verschiedenen Malignomen aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass auch Unterschiede in der HPSE-Expression bei anderen pathologischen Schwangerschaftsverläufen bestehen könnten. Somit ist die Weiterführung der Untersuchungen z.B. mit anderen Krankheitsgruppen, wie IUGR oder vorzeitige Plazentalösung, denkbar.

Da sowohl die Metastasierung von Karzinomen als auch die Implantation und Plazentation im Rahmen der Schwangerschaft ein hohes Invasions- und Vaskularisationspotential voraussetzen und Heparin die HPSE-Expression extraplazentar beeinflussen kann, stellt sich die Frage, ob die Gabe von Heparinen zur Prophylaxe der Präeklampsie ebenfalls zur Hemmung der Heparanase führen und dadurch die Implantation und Plazentation behindern würde, was eine Kontraindikation für Heparine in frühen Schwangerschaftswochen darstellen würde. Diese Hypothese würde im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen über die Anwendung von Heparinen in der (Früh-) Gravidität stehen [10].

Dem gegenüber steht die Wirkung von Heparin auf das Gerinnungssystem, dessen quantitative und qualitative Zusammensetzung während der Schwangerschaft signifikante physiologische Veränderungen durchläuft. Verschiedene Gerinnungsfaktoren, u. a. der Faktor X, nehmen mit der Dauer der Schwangerschaft in Ihrer Aktivität zu, während die Thrombozytenaktivität reduziert ist [14]. Diese in der Schwangerschaft veränderte Aktivität der Gerinnungsfaktoren kann sich bei einer überschießenden Fehlregulation negativ auf die Implantation der Blastozyste auswirken [79]. So ist v. a. die auf einer gestörten plasmatischen Gerinnung, jedoch auch die auf hereditären oder erworbenen Thrombozytenfunktionsstörungen beruhende maternale Hyperkoagulabilität mit diversen Schwangerschaftskomplikationen, wie rezidivierenden frühen und späten Aborten, intrauterinem Fruchttod, intrauteriner Wachstumsretardierung, vorzeitiger Plazentalösung und der Präeklampsie assoziiert [13, 14, 59, 97].

Bereits seit der Arbeit von Goshen et al. aus dem Jahre 1996 [37] ist bekannt, dass Heparine zur Hemmung der Heparanase fähig sind. Im Rahmen von in-vitro-Untersuchungen ergab sich, dass SST0001, ein Heparanase-Inhibitor aus der Familie der Heparine, die Fähigkeit hat, sowohl die Konzentration als auch die Freisetzung verschiedener Angiogenese-Faktoren in Sarkomzellen zu minimieren und zudem den pro-invasiven Effekt Heparin-bindender Faktoren, wie VEGF, signifikant zu hemmen. Cassinelli [19] zeigte eine 64-95%-ige Wachstumshemmung der Zellkulturen bei pädiatrischen Malignommodellen durch den Heparanase-Inhibitor.

In den Jahren 2007 und 2008 wurde bereits beschrieben, dass Heparin die Aktivität der Heparanase in Tumorzellen herabsetzt und damit die Metastasierungsrate minimiert [16, 20, 80]. Die Hemmung der metastatischen Eigenschaft von Tumoren [45, 53] durch Heparine wird zum einen über die Inhibition der Heparanase und zum anderen über den Einfluss auf Wachstumsfaktoren, wie den fibroblast growth factor-2 (FGF-2) und VEGF [20], erklärt. Eine Hemmung der Metastasierung mit Heparanase-spezifisch wirkenden Heparinen kann dabei nur bei Heparanase-produzierenden Tumoren erzielt werden [45].

Diese experimentellen Ergebnisse führten zu Untersuchungen bei onkologischen Patienten:

Van Doormaal et al. [119] stellten im Rahmen einer 2011 durchgeführten randomisierten Studie bei Patienten mit fortgeschrittenen Prostata-, Lungen- oder Pankreaskarzinomen fest, dass durch die Gabe des niedermolekularen Heparins Nadroparin zusätzlich zur Standard-Therapie kein Überlebensvorteil im Vergleich zu nicht mit Nadroparin behandelten Patienten bestand. Unklar bei dieser Untersuchung bleibt jedoch, ob es sich um heparanaseproduzierende Malignome handelte.

Bekanntermaßen besteht die Wirkung von Heparin auf die Gerinnungskaskade zum einen in der Verstärkung der Antithrombinwirkung [11] und zum anderen auch in der Inaktivierung von Gerinnungsfaktoren im Rahmen der plasmatischen Gerinnung. Durch die Beeinflussung u. a. des Faktors Xa können Heparine Veränderungen in der maternalen Gerinnungskaskade entgegenwirken, welche Schwangerschaftskomplikationen triggern könnten [14, 79].

Eine Kombinationstherapie mit Heparin und ASS wird bereits bei Patientinnen mit rezidivierenden Aborten im Rahmen eines Antiphospholipidsyndroms durchgeführt [13]. Das Antiphospholipidsyndrom stellt eine erworbene Thrombophilie dar und steht in engem Zusammenhang mit der Präeklampsie und Eklampsie [13], sodass ein positiver Effekt von Heparinen auf die Implantation und Plazentation in Betracht zu ziehen und genauer zu untersuchen ist.

Die Besonderheit einer medikamentösen Therapie im Rahmen einer Schwangerschaft besteht darin, dass es nicht nur gilt, die Wirkung des Medikaments auf den maternalen Organismus sondern auch auf den fetalen Organismus zu berücksichtigen. Bezüglich einer Therapie mit unfraktioniertem Heparin (UFH) oder

niedermolekularem Heparin (NMH) müssen keine teratogenen Effekte befürchtet werden, da beide Produkte die Plazentaschranke nicht passieren können [8].

In vielen an der Implantation und Plazentation beteiligten Zellen und Geweben, wie Synzytiotrophoblast, villösem und extravillösem Zytotrophoblast und Dezidua, sind in der extrazellulären Matrix sowie auf der Zelloberfläche zahlreiche Heparansulfat-Proteoglykane lokalisiert, welche mithilfe von Heparansulfaten unter anderem Wachstumsfaktoren, wie den VEGF, gebunden halten [31, 42, 55, 78]. Damit der (extravillöse) Trophoblast die Dezidua infiltrieren kann, muss zuvor die EZM degradiert werden. Dies geschieht unter anderem mithilfe der von Trophoblasten und später von der Plazenta exprimierten Heparanase, welche Heparansulfate spaltet und so für die Freisetzung von VEGF und konsekutiv für deren Aktivierung sorgen [31, 42, 78].

VEGFs sind wichtige proangiogenetische Faktoren [5, 7]. Die Proliferation humaner extravillöser Trophoblastzellen wird im ersten Trimenon durch VEGF konzentrationsabhängig stimuliert, wobei VEGFs auch in der Dezidua exprimiert werden [5] und somit als wichtige Bestandteile der embryo-maternalen Wechselwirkung gelten. Ein Zusammenhang mit der Präeklampsie konnte mittlerweile hergestellt werden. Endothelzellen, welche in Kontakt mit Plasma von Präeklampsie-Patientinnen kamen, zeigten eine gesteigerte Permeabilität und eine reduzierte Vasodilatation [55]. Diese Reaktion scheint spezifisch für eine VEGF-Isoform, das VEGF_{165b}, zu sein und kann durch einen entsprechenden neutralisierenden Antikörper blockiert werden. Diese Isoform, eine von mehreren Unterformen, scheint bei der Präeklampsie eine zentrale Rolle zu spielen. Aufgrund dessen widmete sich unsere Arbeitsgruppe [15] im gleichen Kontext dem Einfluss von Heparin und VEGF auf die Proliferation und Expression der Endo- β -D-glucuronidase Heparanase in humanen Chorionkarzinomzellen. Die zentrale Frage dieser Arbeit war der Zusammenhang zwischen im Trophoblasten exprimierter Heparanase und dem Einfluss von Heparin und VEGF₁₆₅ auf deren Expression und auf das Zellwachstum. Als Ergebnis scheint Heparin in niedrigen Konzentrationen signifikant die Proliferation der Chorionkarzinomzellen, welche als Modell für den Trophoblasten dienen, zu fördern. Ein Einfluss von Standardheparin auf die HPSE-Expression zeigte sich nicht. Somit erscheint eine Vermittlung der durch Heparin

nachzuweisenden Proliferationssteigerung über die Heparanase unwahrscheinlich. VEGF₁₆₅ hemmt mit steigender Konzentration z. T. deutlich signifikant das Wachstum der Chorionkarzinomzellen. Die Heparanase selbst zeigt sich jedoch kaum vermindert exprimiert, womit ein Zusammenhang zwischen der VEGF-Konzentration und der Heparanase-Expression in diesem trophoblastären Modell nicht bestätigt werden konnte [15].

1999 untersuchten Parish et al. [84] die Wirkung von PI-88, einem Heparanase-Inhibitor, im Rahmen von Tierversuchen. Nach Injektion von hochinvasiven Adenokarzinom-Zellen in Ratten zeigte sich unter PI-88 eine deutliche Reduktion der hämatologischen Metastasierung (>90%), des primären Tumorwachstums (ca. 50%), der lymphogenen Metastasierung (ca. 40%) und der Tumolvaskularisation (ca.30%). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Auswirkung der Heparanase auf Wachstum, Invasivität und Vaskularisation von Tumorzellen.

Im Blastozystenstadium bzw. der Morula der Maus wurde die Heparanase ebenfalls nachgewiesen und durch Zufuhr von exogener Heparanase ein etwa zweifacher Anstieg der Embryoimplantationsrate in der Maus erzielt [96]. Auch D'Souza et al. [31] wiesen eine gesteigerte Embryoimplantationsrate nach exogener HPSE-Zufuhr nach. Außerdem konnte diese Arbeitsgruppe einen dramatischen Anstieg der uterinen Heparanase-Expression und eine etwa vierzigfache Aktivitätssteigerung der Heparanase in der Frühschwangerschaft der Maus nachweisen. Die Gabe des HPSE-Inhibitors PI-88 führte zu einer Hemmung der embryonalen Implantation der Maus in vivo. Auch die HPSE-abhängige Freisetzung der vaskularisationsfördernden und Heparin-gebundenen Wachstumsfaktoren der EZM während der Embryoimplantation wurden von D'Souza et al. [31] beschrieben. Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren zeigte sich abhängig von der Heparanase-Expression, da die Heparanase die u. a. in der EZM der Plazenta [40] reichlich vorhandenen HSPG [78] spaltet. Durch die spezifische Spaltung der HSPG kann die Plazentation und Trophoblast-Invasion gefördert werden [40].

Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Harris et al. [42]. Diese Arbeitsgruppe stellte fest, dass während des ersten Trimenon isolierte humane Trophoblasten zwar einen hohen Gehalt an Heparanase zeigen, ein funktionshemmender Antikörper bei Normoxie jedoch nicht die Invasion primärer Zytotrophoblasten oder extravillöser

Trophoblasten hemmt. In einer Folgekultur unter Hypoxie (3 % Sauerstoff) war die Heparanase-Expression nicht erhöht und die Trophoblasteninvasion durch den blockierenden Antikörper nicht verlangsamt.

Allerdings existieren zwei natürliche Inhibitoren der Heparanase, das Eosinophile Major Basic Protein (EMBP) und HIP/RPL29. Kirn-Safran et al. [55] stellten die Expression der mRNA des EMBP in der humanen Plazenta fest und wiesen die akkumulierende Expression von HIP/RPL29 in der Dezidua der Maus in einem komplementären Muster zu HSPG nach.

Diese natürlichen Heparanase-Inhibitoren wurden von Harris et al. [42] 2008 in ihren Untersuchungen, deren Ergebnisse den Schluss zulassen würden, dass die Heparanase keinen direkten Einfluss auf die trophoblastäre Invasion hat und auch eine Hypoxie hier keinen Einfluss ausübt, nicht berücksichtigt. Da die bereits beschriebene hohe Expression des HPSE-Gens in für die Plazentation und Implantation verantwortlichen Zellen und Geweben weiterhin für eine wichtige Rolle der Heparanase spricht, lässt sich aufgrund der bisherigen Datenlage keine definitive Aussage bezüglich des Einflusses der Heparanase auf die Prozesse der Plazentation, Implantation oder der Invasion treffen.

Aus ethischen Gründen ist eine in vivo Untersuchung der Implantation und Plazentation des Embryos nur an Tiermodellen möglich. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen sind aber nicht ohne Einschränkung auf den menschlichen Organismus übertragbar, sodass sich bei Nachweis der Heparanase in humanem plazentarem und trophoblastärem Gewebe weiter die Frage nach einem Effekt der Heparanase auf die Implantation, Plazentation und Vaskularisation stellt.

HPSE ist neben der Zellinvasion, Tumorangiogenese und Metastasierung auch an der Regulation des Hämostasesystems beteiligt. HPSE stimuliert die Expression des Tissue factors (TF) [75], welcher die extrinsische Gerinnungskaskade durch Bindung des aktivierten Proconvertin (Faktor VIIa) katalysiert. Des Weiteren wird der tissue factor pathway inhibitor (TFPI), ein essentieller Regulator der Blutgerinnung, durch die Heparanase beeinflusst.

Nadir et al. [76] untersuchten 2010 die Rolle der Heparanase in der Plazenta und konzentrierten sich hierbei vor allem auf die Auswirkungen auf den TF und den TFPI 1 und 2 sowie VEGF. Im Rahmen der Studie wurde plazentares Gewebe von

Fehlgeburten der 6. bis 10. SSW untersucht. Retrospektiv zeigte sich, dass dabei in zehn Fällen eine Thrombophilie der Mutter mit konsekutiven rezidivierenden Aborten vorlag. Es fand sich eine gesteigerte HPSE-, VEGF- und TFPI-2-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche aus Proben von Patientinnen mit elektiven Abruptiones eines vergleichbaren Zeitraumes bestand. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Heparanase einen Effekt auf TFPI und TFPI-2 hat. Man geht davon aus, dass diese Faktoren an Komplikationen in der Frühschwangerschaft und auch an Fehlgeburten beteiligt sind [40]. Die Arbeitsgruppe zog den Vergleich zwischen pathologischen Schwangerschaftsverläufen und daraus resultierenden Aborten und elektiven Abruptiones jeweils im ersten Trimenon, sodass bezüglich der Ausprägung o. g. Faktoren kein Unterschied aufgrund eines differierenden Schwangerschaftsalters bestand. Bei Nachweis einer maternalen Thrombophilie wäre dabei eine matched pair Analyse mit der Kontrollgruppe wünschenswert gewesen.

Auch wenn diese Veränderungen der Gewebe und Zellen in der Frühschwangerschaft festgestellt wurden, kann dies nicht automatisch auf die Pathogenese von Komplikationen des zweiten und dritten Trimenon, wie z. B. auf den nicht insulinpflichtigen Gestationsdiabetes, insulinpflichtigen Gestationsdiabetes oder die Präeklampsie, übertragen werden. Die hohe Expression der Heparanase und TFPI-2 bei normalen Schwangerschaften [37, 40] kann ein Zeichen für die fundamentale Rolle beider in der Entwicklung und Hämostaseologie der Plazenta sein. Auch aufgrund dieser Gegebenheit befassten wir uns in dieser Arbeit mit der Frage nach einer veränderten Heparanase-Expression bei vorhandener Präeklampsie.

5.2 Auswertung der Patientinnengruppen

Es ist nachgewiesen, dass Patientinnen mit schlecht eingestelltem Gestationsdiabetes ein größeres Risiko für Frühgeburten [12] und andere ernstzunehmende Komplikationen wie fetale Makrosomie mit postpartalen Störungen des Glukosestoffwechsels haben [44]. Es wurde bereits gezeigt, dass durch Hyperglykämien die HPSE-Expression in renalen Epithelzellen [70] und die renale

HPSE-Ausscheidung bei Diabetespatienten gesteigert wird [48, 65], was mit einem geringeren Gehalt an Heparansulfaten und somit einer erhöhten Permeabilität der glomerulären Basalmembran einhergeht. Diese Veränderungen bringen ein erhöhtes Risiko für Nierenfunktionsstörungen, Proteinurie und diabetische Nephropathie [118] mit sich. Diese Ausprägungen sind, wenn sie in Kombination vorliegen, in einem gewissen Maße mit dem renalen Krankheitsbild der Präeklampsie vergleichbar.

Beide Krankheitsbilder, Gestationsdiabetes (insulinpflichtig und nicht-insulinpflichtig) sowie die Präeklampsie, sind Grundlage dieser Arbeit. Ein Teil der in dieser Arbeit verwendeten Daten in Bezug auf gestationsdiabetische Plazenten wurde im Vorfeld bereits veröffentlicht [67]. Damals ergab sich kein signifikanter Unterschied in den untersuchten Gruppen (GDM vs. Kontrolle). Ein möglicher Grund hierfür war, aus damaliger Sicht, die fehlende Einteilung in die Untergruppen des insulin- und des nicht-insulinpflichtigen Diabetes mellitus. Diese Unterteilung wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgeholt, da aufgrund der bekannten Interaktion der Heparanase und einem Diabetes mellitus eine weitergehende Subgruppenanalyse sinnvoll erschien.

In der Auswertung der verschiedenen Patientengruppen fand sich bezüglich des Alters der Gebärenden, der Dauer der Schwangerschaft und auch der kindlichen Befunde (pH-Wert, APGAR, Gewicht) kein signifikanter Unterschied. Das Fehlen eines signifikanten Unterschiedes, gerade in Bezug auf die Dauer der Schwangerschaft, lässt sich a. e. dadurch erklären, dass nur Plazentagewebe von Schwangerschaften nach Vollendung der 37. SSW eingeschlossen wurde. Aus dieser Situation ergibt sich auch der fehlende Unterschied bezüglich des Outcomes der Kinder (pH und APGAR) und auch der als nicht signifikant zu wertende Unterschied bzgl. des Geburtsgewichts der Kinder. Sicher würde sich hier ein sehr signifikanter Unterschied ergeben, würde man Patientinnen einschließen, die aufgrund einer ausgeprägten Präeklampsie mit eventueller Entwicklung einer Eklampsie schon weit vor der 37. SSW entbunden werden müssten. Eine so frühzeitige Entbindung würde deutlich erniedrigte Geburtsgewichte erwarten lassen und konsekutiv zu schlechteren neonatalen Befunden bei den Kindern führen.

Der signifikante Unterschied in Bezug auf den prägraviden und präpartalen BMI der Mütter war hingegen aufgrund der gewählten Krankheitsbilder zu erwarten, da

sowohl Präeklampsie als auch (Gestations-) Diabetes signifikant häufiger bei übergewichtigen bzw. adipösen Patientinnen auftreten.

5.3 mRNA-Expression und immunhistochemischer Nachweis sowie Quantifizierung der HPSE

In dieser Studie wurde zum ersten Mal die plazentare HPSE-Expression bei Patientinnen mit insulinpflichtigem und nicht insulinpflichtigem Gestationsdiabetes sowie einer Präeklampsie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe in Terminnähe untersucht.

Sowohl im Rahmen der durchgeführten qPCR als auch der immunhistochemischen Quantifizierung der Heparanase ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen (insulinpflichtiger Gestationsdiabetes, nicht insulinpflichtiger Gestationsdiabetes und Präeklampsie) und der Kontrollgruppe.

Wie oben bereits erwähnt, wurden im Rahmen dieser Studie ausschließlich Plazenten von Patientinnen mit mehr als 37 vollendeten SSW untersucht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die plazentare Expression der Heparanase bei Patientinnen mit schlecht eingestelltem Gestationsdiabetes, Frühgeburten oder anderen Komplikationen während der Schwangerschaft im Vergleich zu gesunden Kontrollen differiert. Ein Bias kann bei dieser Untersuchung dadurch auftreten, dass nur Frauen eingeschlossen wurden, die einen gut eingestellten Gestationsdiabetes hatten und somit die Schwangerschaft in Terminnähe vollenden konnten.

Zwar konnten typische krankheitsspezifische Unterschiede (maternaler BMI, Geburtsgewicht des Kindes) zwischen den untersuchten Gruppen nachgewiesen werden; signifikante Unterschiede der plazentaren HPSE-Expression fanden sich jedoch in keiner der beiden Untersuchungsmethoden.

Es gibt verschiedene Erklärungen für dieses Ergebnis:

Zum einen ist es möglich, dass es in unserer Untersuchung keinen Unterschied gab, da sich die HPSE-Expression in unserem Versuchsansatz in der Tat nicht relevant unterscheidet.

Eine weitere Erklärung wäre, dass die Anzahl der Proben zu gering gewählt wurde und eine Signifikanz erst bei einer höheren Fallzahl nachzuweisen wäre. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da vor Durchführung der Untersuchung eine Fallzahlanalyse durchgeführt wurde und in anderen Studien bereits mit einer solchen Fallzahl gearbeitet wurde.

Als nächste Erklärung bliebe noch ein präanalytischer Fehler. Dieser könnte beispielsweise durch eine zu lange Liegezeit der Proben vor oder durch ihre weitere postpartale Verarbeitung bzw. Konservierung bedingt sein. Allerdings sollten diese Fehler durch die gegebene rasche Weiterverarbeitung sowie die Wahl zweier Untersuchungsmethoden aufgehoben werden. Sowohl die PCR-Diagnostik als auch die Immunhistochemie zeigten keinen signifikanten Unterschied. Auch erscheint es unwahrscheinlich, dass unbeabsichtigt nur Plazenten einer Gruppe (Studien- oder Kontrollgruppe) einem präanalytischen Fehler unterlegen waren und hierdurch sekundär eine Ergebnis-Nivellierung erzielt wurde.

Als letzte Erklärung besteht die Möglichkeit, dass zum Zeitpunkt der Untersuchung, also nach Vollendung der 37. SSW, kein signifikanter Unterschied mehr besteht, eine Veränderung aber durchaus zu einem früheren Schwangerschaftszeitpunkt vorläge. Eine solche Annahme über differierende HPSE-Expressionen im ersten oder zweiten Trimenon bleibt spekulativ und müsste durch weitere Untersuchungen fundiert werden. Für unsere Fragestellungen ist dies jedoch unrealistisch: So sind vergleichende plazentare Analysen aus Geweben des ersten Trimenon nicht möglich, da zwar (Kontroll-) Plazenten im Rahmen von Abruptiones gewonnen werden könnten, sich die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Pathologien wie Gestationsdiabetes oder Präeklampsie zu diesem Schwangerschaftszeitpunkt aber noch nicht manifestiert haben. Zudem existieren bis dato keine suffizient sicheren prognostischen Marker für das Eintreten dieser Pathologien zu einem späteren Schwangerschaftszeitpunkt. Somit ist eine Differenzierung zwischen Kontroll- und Studiengruppe zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Eine Gewinnung plazentaren Gewebes bei intendierter Fortführung der Schwangerschaft - und dann möglicher postpartaler Auswertung, ob eine Schwangerschaftskomplikation aufgetreten war - birgt hingegen das ethisch nicht akzeptable Risiko einer Fehlgeburt.

Vergleichende plazentare Analysen bei geborenen Kindern des zweiten und frühen dritten Trimenon weisen das Problem auf, dass zwar die hier untersuchten Schwangerschaftspathologien durchaus bereits manifest sein können, es aber kein Gewebe einer unauffälligen Kontrollgruppe gibt. Frühgeborene Kinder des zweiten und frühen dritten Trimenon sind per se – aufgrund ihrer Frühgeburtlichkeit – nicht als unauffällige Kontrollgruppe zu werten.

5.4 Ausblick

Nach Durchführung dieser Arbeit gibt es noch einige Ansätze, welche einer wissenschaftlichen Untersuchung bedürfen.

Zum einen wäre die weitere Differenzierung in Bezug auf die Gruppe der Gestationsdiabetikerinnen (insulinpflichtig oder nicht-insulinpflichtig) in Erwägung zu ziehen. Denn die Expression der Heparanase wird, wie bereits beschrieben, durch Hyperglykämien gesteigert [70], genauso wie die renale HPSE-Ausscheidung gesteigert werden kann [48, 65]. Im Rahmen dieser Studie erfolgte allerdings keine genaue Auswertung der Blutzuckerwerte oder des HbA1c-Wertes der Schwangeren, sodass die HPSE-Konzentrationsunterschiede zwischen gut eingestellten Gestationsdiabetikerinnen und Gestationsdiabetikerinnen mit häufigen hyperglykämien Entgleisungen von wissenschaftlichem Interesse sein könnten.

Das verwendete Gewebe im Rahmen dieser Studie war homogenisiertes Plazentagewebe. Sowohl im Rahmen der PCR-Diagnostik als auch im Rahmen der immunhistochemischen Färbung erfolgte keine exakte zelluläre Lokalisation der plazentaren Heparanase. Auch erfolgte, gerade im Rahmen der HPSE-Quantifizierung mittels Immunhistochemie, keine Unterscheidung bezüglich des Färbeverhaltens im Zellkern und des Färbeverhaltens im Zytoplasma. Allerdings weiß man, dass die Heparanase zwar im Zellkern und im Zytoplasma vorhanden ist [81], jedoch nur im Zellkern die aktive Form der Heparanase nachgewiesen werden konnte [55, 78, 81, 122, 124]. Aufgrund dieser Tatsache wäre eine genauere Differenzierung der Färbeintensität im Bereich der Zellkerne bei verschiedenen Krankheitsbildern ebenso sinnvoll wie eine Bestimmung der HPSE-Aktivität.

Des Weiteren ist, wie oben bereits beleuchtet, die Untersuchung bezüglich anderer Schwangerschaftspathologien ein interessanter Aspekt. Bei weiteren Erkrankungen, die ebenfalls durch Implantationsstörungen mit bedingt werden, könnte aufgrund der Pathophysiologie und der extraplazentaren Effekte der Heparanase eine Analyse der HPSE-Expression ebenfalls sinnvoll sein: So sollten Erkrankungen wie die intrauterine Wachstumsrestriktion oder auch die vorzeitige Plazentalösung aufgrund ihrer Auswirkungen auf die Entwicklung des Kindes und die deutlich erhöhte Mortalität und Morbidität für Mutter und Kind weiter wissenschaftlich analysiert werden.

Bei den bekannten Auswirkungen der Heparanase auf die Implantation und Plazentation lag die Annahme nahe, dass auch gerade bei hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen eine Veränderung der HPSE-Expression vorliegen könnte. Aufgrund der bekannten (extraplazentaren) Interaktion zwischen Heparin(en) und der Heparanase einerseits, sowie der klinisch teilweise erfolgreichen Therapieansätze mittels Heparin in der (Sekundär-) Prophylaxe plazentarer Komplikationen andererseits, war es ein Ziel dieser Arbeit, mögliche Assoziationen zwischen der plazentaren HPSE-Expression und dem Auftreten von Schwangerschaftserkrankungen in exakt definierten Gruppen zu ermitteln. Daher wurden Patientinnen mit einer laufenden antikoagulatorischen Therapie mit ASS, Heparinen oder Vitamin-K-Antagonisten für die vorliegende Arbeit nicht berücksichtigt.

Da bei Patientinnen mit Nachweis eines Antiphospholipid-Syndroms eine Kombinationsbehandlung mit ASS und Heparin zur Sekundärprophylaxe in einer Gravidität durchgeführt wird, wäre es überlegenswert, auch Plazenten solcher Hochrisiko-Patientinnen in Hinblick auf die HPSE-Expression zu evaluieren.

Die bisherigen Untersuchungen der Heparinwirkung auf Schwangerschaftsgewebe erfolgte *in vitro*, da eine Passage der Plazentaschranke nicht gegeben ist [10]. Hierbei zeigt sich eine immunmodulatorische Wirkung von spezifischen Heparinen, wie z. B. Enoxaparin, über eine Antagonisierung APS-induzierter spezifischer Interleukine [41]. Dies könnte für den schwangerschaftsprotektiven Effekt im Rahmen eines APS verantwortlich sein [116]. Daneben zeigten sich weitere Effekte der Heparine auf Trophoblasten, die extrazelluläre Matrix und Signalkaskaden der

Dezidua. Es finden sich unterschiedliche Auswirkungen der verschiedenen Heparine auf Selektine und die hCG-Sekretionen [14]. Außerdem scheint die Heparindosis für die Proliferations- und Invasionsfähigkeit der Trophoblasten relevant zu sein. Während niedrige Heparinkonzentrationen diese fördern, scheinen hohe sie zu hemmen [15].

Gerade diese Gegebenheit lässt die Frage offen, ob eine Therapie mit Heparinen die Implantation und Plazentation im Sinne der Wirkung der Heparanase fördert und somit einen positiven Einfluss auf z.B. hypertensive Schwangerschaftserkrankungen hat. Würde man die bereits nachgewiesene Auswirkung einer niedrigdosierten Heparintherapie auf die Invasionsfähigkeit von Trophoblasten übertragen, könnte man erwarten, dass eine solche Therapie zu einer geringeren Ausprägung der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen führt.

6. Zusammenfassung

Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen, wie z.B. die Präeklampsie, sowie der Gestationsdiabetes gehen mit einer deutlich erhöhten Morbidität und auch Mortalität der Mutter und des ungeborenen Kindes einher.

Pathophysiologisch liegt dem Erkrankungsbild der Präeklampsie eine gestörte Plazentation zugrunde. Diabetische Erkrankungen gehen mit extrauterinen Veränderungen der HPSE-Expression, sowie im Falle des Gestationsdiabetes mit einer geänderten placentaren Protein-Expression einher.

Aus der Literatur ist eine stimulierende Wirkung der Heparanase auf die Zellproliferation sowie Metastasierung verschiedener maligner Erkrankungen bekannt. Auch der Progress maligner Erkrankungen geht, wie die Plazentation und Implantation, mit einer gesteigerten Invasion und einer gesteigerten Vaskularisation von Geweben einher. Aus diesem Grund lag die Annahme nahe, dass die Heparanase auch im Rahmen der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen eine wichtige Rolle spielen kann. Wie bereits in vitro nachgewiesen, zeigt Heparin eine positive Auswirkung auf die Proliferation des Trophoblasten, sodass ein fördernder Effekt auf die Implantation und Plazentation durchaus als möglich erscheint. Die Interaktion zwischen Heparin und der HPSE-Expression in extraplacentarem Gewebe sowie die klinischen Effekte einer Heparin-Behandlung bei hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen ließen einen placentaren Zusammenhang vermuten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die HPSE-Expression in placentarem Gewebe bei Patientinnen mit Gestationsdiabetes bzw. einer Präeklampsie im Vergleich zu gesunden Schwangeren untersucht. Die Expression der Heparanase-mRNA wurde mit der qPCR verifiziert sowie mit immunhistochemischen Färbungen analysiert.

Es wurden Plazenten nach Vollendung der 37. SSW untersucht. Unter diesen Bedingungen konnte kein Unterschied der placentaren HPSE-Expression nachgewiesen werden. Allerdings ist es überlegenswert, ob ein Unterschied in früheren Schwangerschaftswochen besteht. Des Weiteren wurde nicht zwischen der HPSE-Expression in verschiedenen Anteilen der Plazenta (Gefäße, Trophoblast etc.) differenziert, da v. a. im Rahmen der qPCR mit einem Homogenisat gearbeitet wurde.

Zum Nachweis eines Heparanase-assoziierten Effektes auf plazentare Faktoren gilt es, weitere Untersuchungen an humanem Plazentagewebe anzustreben. Eine Untersuchung weiterer Formen hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen bei Patientinnen mit und ohne Heparintherapie sowie die Verifizierung der Lokalisation der Heparanase wären dabei besonders ins Auge zu fassen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Abramovici D, Friedman SA, Mercer BM, Audibert F, Kao L, Sibai BM (1999) Neonatal out-come in severe preeclampsia at 24 to 36 weeks` gestation: Does the HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count) syndrome matter? *Am J Obstet Gynecol* 180:221-225
- [2] ACOG Practice Bulletin No. 33 (2002) Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 99:159-167
- [3] Akolekar R, Syngelaki A, Poon L, Wright D, Nicolaides KH (2013) Competing risks model in early screening for preeclampsia by biophysical and biochemical markers. *Fetal Diagn Ther* 33:8-15
- [4] Alfirevic Z, Neilson JP (1995) Doppler ultrasonography in high-risk pregnancies: Systematic review with meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 172:1379-1387
- [5] Athanassiades A, Hamilton GS, Lala PK (1998) Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol Reprod* 59:643-654
- [6] Baraban E, McCoy L, Simon P (2008) Increasing prevalence of gestational diabetes and pregnancy-related hypertension in Los Angeles County, California, 1991–2003. *Prev Chronic Dis* 5(3):A77
- [7] Bates DO (2011) An unexpected tail of VEGF and PlGF in pre-eclampsia. *Biochem Soc Trans* 39:1576-1582
- [8] Bates SM, Greer IA, Pabinger I, Sofaer S, Hirsh J (2008) Venous thromboembolism, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy. *Chest* 133:844-886
- [9] Baumann M, Körner M, Huang X, Wenger F, Surbek D, Albrecht C (2013) Placental ABCA1 and ABCG1 expression in gestational disease: Pre-eclampsia affects ABCA1 levels in syncytiotrophoblasts. *Placenta* 34:1079-1086
- [10] Bauersachs RM, Dudenhausen J, Faridi A, Fischer T, Fung S, Geisen U, Harenberg J, Herchenhan E, Keller F, Kemkes-Matthes B, Schinzel H, Spannagl M, Thaler CJ (2007) Risk stratification and heparin prophylaxis to

- prevent venous thromboembolism in pregnant women. *Thromb Haemost* 98:1237-1245
- [11] Bick RL, Frenkel EP, Walenga J, Fareed J, Hoppensteadt DA (2005) Unfractionated heparin, low molecular weight heparins, and pentasaccharide: basic mechanism of actions, pharmacology, and clinical use. *Hematol Oncol Clin North Am* 19:1-51
- [12] Bloomgarden ZT (2010) Gestational diabetes mellitus and obesity. *Diabetes Care* 33:e60-5
- [13] Bohlmann MK (2010) Thrombophilie und Antikoagulation in der Schwangerschaft. *Gynakol Geburtsmed Gynakol Endokrinol* 6:30-42
- [14] Bohlmann MK (2011) Effects and effectiveness of heparin in assisted reproduction. *J Reprod Immunol* 90:82-90
- [15] Bohlmann MK, Hoerster JC, Bundschuh D, Boemicke P, Luedders DW, Köster F (2014) Growth-modulatory effects of heparin and VEGF165 on the choriocarcinoma cell-line JEG-3 and its expression of heparanase. *Anticancer Res* 34:7071-7076
- [16] Borsig L (2007) Antimetastatic activities of modified heparins: selectin inhibition by heparin attenuates metastasis. *Semin Thromb Hemost* 33: 540-546
- [17] Brosens I, Robertson WB, Dixon HG (1967) The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J Path Bact* 93:569-579
- [18] Brown MA, Hague WM, Higgins J, Lowe S, McCowan L, Oats J, Peek MJ, Rowan JA, Walters BNJ (2000) The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: Full consensus statement. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 40:139-155
- [19] Cassinelli G, Lanzi C, Tortoreto M, Cominetti D, Petrangolini G, Favini E, Zaffaroni N, Pisano C, Penco S, Vlodaysky I, Zunino F (2013) Antitumor efficacy of the heparanase inhibitor SST0001 alone and in combination with antiangiogenic agents in the treatment of human pediatric sarcoma models. *Biochem Pharmacol* 85:1424-1432
- [20] Casu B, Vlodaysky I, Sanderson RD (2008) Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb* 36:195-203

- [21] Chiarugi VP, Vanucchi S, Cella C, Fibbi G, Delrosso M, Carpeletti R (1978) Intercellular glycosaminoglycans in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 38:4717-4725
- [22] CLASP (1994) a randomised trial of low-dose aspirin for the prevention and treatment of preeclampsia among 9364 pregnant women. CLASP (Collaborative Low dose Aspirin Study in Pregnancy) Collaborative Study. *Lancet* 343:619-629
- [23] Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BW, van der Post JA, Coomarasamy A, Zwinderman AH, Robson SC, Bindels PJ, Kleijnen J, Khan KS (2008) Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ* 178:701-711
- [24] Conde-Agudelo A, Villar J, Lindheimer M (2004) World Health Organisation systematic review of screening tests for preeclampsia. *Obstet Gynecol* 104:1367-1391
- [25] Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ (1994) Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 120:3657-3666
- [26] Dekker G, Sibai B (2001) Primary and tertiary prevention of preeclampsia. *Lancet* 357:209-215
- [27] Demers S, Bujold E, Arenas E, Castro A, Nicolaides KH (2014) Prediction of recurrent preeclampsia using first-trimester uterine artery doppler. *Am J Perinatol* 31(2):99-104
- [28] Dempsey LA, Plummer TB, Coombes SL, Platt JL (2000) Heparanase expression in invasive trophoblasts and acute vascular damage. *Glycobiology* 10:467-475
- [29] Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), Deutsche Gesellschaft für Perinatale Medizin (DGPM) (07/2009). Antenatale Kortikosteroide zur Lungenreifung (ACS) [http://www.dggg.de/leitlinienstellungnahmen/archivierte-leitlinien/federfuehrende-leitlinien-der-dggg/?tx_damfrontend_pi1\[catEquals\]=99&tx_damfrontend_pi1\[treeID\]=3076&tx_damfrontend_pi1\[id\]=573&tx_damfrontend_pi1\[sort_title\]=DESC](http://www.dggg.de/leitlinienstellungnahmen/archivierte-leitlinien/federfuehrende-leitlinien-der-dggg/?tx_damfrontend_pi1[catEquals]=99&tx_damfrontend_pi1[treeID]=3076&tx_damfrontend_pi1[id]=573&tx_damfrontend_pi1[sort_title]=DESC) (letzter Zugriff: 09.04.2015)

- [30] Douglas KA, Redman CWG (1994) Eclampsia in the United Kingdom. *BMJ* 309:1395-1400
- [31] D'Souza SS, Daikoku T, Farach-Carson MC, Carson DD (2007) Heparanase expression and function during early pregnancy in mice. *Biol Reprod* 77:433-441
- [32] Dukler D, Porath A, Bashiri A, Erez O, Mazor M (2001) Remote prognosis of primiparous women with preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 96:69-74
- [33] Duley L (1992) Maternal mortality associated with hypertensive disorders of pregnancy in Africa, Latin America and the Caribbean. *Br J Obstet Gynaecol* 99:547-553
- [34] Ferrara N (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25:581-611
- [35] Ferrazzani S, D'Alessio MC, Fatigante G, Soreca G, De Carolis S, Paradisi G, Caruso A (2006) Prophylaxis of recurrent preeclampsia: low-molecular-weight heparin plus low-dose aspirin versus low-dose aspirin alone. *Hypertens Pregnancy* 25:115-127
- [36] Freinkel N (1980) Banting Lecture of pregnancy and progeny. *Diabetes* 29:1023-1035
- [37] Goshen R, Hochberg AA, Korner G, Levy E, Ishai-Michaeli R, Elkin M, de Groot N, Vlodaysky I (1996) Purification and characterization of placental heparanase and its expression by cultured cytotrophoblasts. *Mol Hum Reprod* 2:679-684
- [38] Grissa O, Yessoufou A, Mrisak I, Hichami A, Amoussou-Guenou D, Grissa A, Djrolo F, Moutairou K, Miled A, Khairi H, Zaouali M, Bougmiza I, Zbidi A, Tabka Z, Khan NA (2010) Growth factor concentrations and their placental mRNA expression are modulated in gestational diabetes mellitus: possible interactions with macrosomia. *BMC Pregnancy Childbirth* 10:7
- [39] Haddad B, Deis S, Goffinet F, Paniel BJ, Cabrol D, Sibai BM (2004) Maternal and perinatal outcomes during expectant management of 239 severe preeclamptic women between 24 and 33 weeks` gestation. *Am J Obstet Gynecol* 190:1590-1597

- [40] Haimov-Kochman R, Friedmann Y, Prus D, Goldman-Wohl DS, Greenfield C, Anteby EY, Aviv A, Vlodaysky I, Yagel S (2002) Localization of heparanase in normal and pathological human placenta. *Mol Hum Reprod* 8:566-573
- [41] Han AR, Ahn H, Vu P, Park JC, Gilman-Sachs A, Beaman K, Kwak-Kim J (2012) Obstetrical outcome of anti-inflammatory and anticoagulation therapy in women with recurrent pregnancy loss or unexplained infertility. *Am J Reprod Immunol* 68:418-427
- [42] Harris LK, Baker PN, Brenchley PE, Aplin JD (2008) Trophoblast-derived heparanase is not required for invasion. *Placenta* 29:332-337
- [43] Holdsworth-Carson SJ, Lim R, Mitton A, Whitehead C, Rice GE, Permezel M, Lappas M (2010) Peroxisome proliferator-activated receptors are altered in pathologies of the human placenta: gestational diabetes mellitus, intrauterine growth restriction and preeclampsia. *Placenta* 31:222-229
- [44] Horvath K, Koch K, Jeitler K, Matyas E, Bender R, Bastian H, Lange S, Siebenhofer A (2010) Effects of treatment in women with gestational diabetes mellitus: systematic review and metaanalysis. *BMJ* 340:c1395
- [45] Hostettler N, Naggi A, Torri G, Ishai-Michaeli R, Casu B, Vlodaysky I, Borsig L (2007) P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. *FASEB J* 21:3562-3572
- [46] Hunt KJ, Schuller KL (2007) The increasing prevalence of diabetes in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 34:173-199
- [47] Iozzo RV (1985) Biology of disease. Proteoglycane structure, function and role in neoplasia. *Lab Invest* 53:337-396
- [48] Katz A, Van-Dijk DJ, Aingorn H, Erman A, Davies M, Darmon D, Hurvitz H, Vlodaysky I (2002) Involvement of human heparanase in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Isr Med Assoc J* 4:996-1002
- [49] Kaufmann P, Kingdom J (1999) Frühe Entwicklung der Plazenta. In: Schneider H, Husslein PW, Schneider K-TM (Hrsg.): *Die Geburtshilfe*, 3. Auflage: S. 6-7, Springer
- [50] Kaufmann P, Black S, Huppertz B (2003) Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia. *Biol Reprod* 69:1-7

- [51] Kautzky-Willer A, Prager R, Thomaseth K, Pacini G, Strelci C, Waldhäusl W, Wagner O, Ludvik B (1997) Pronounced insulin resistance and inadequate beta-cell insulin secretion characterize lean gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20:1717-23
- [52] Kim C, Newton K, Knopp R (2002) Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 25:1862-1868
- [53] Kim SY, Ryu HM, Yang JH, Kim MY, Ahn HK, Lim HJ, Shin JS, Woo HJ, Park SY, Kim YM, Kim JW, Cho EH (2004) Maternal serum levels of VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in preeclampsia. *J Korean Med Sci* 19:688-692
- [54] King H (1998) Epidemiology of Glucose Intolerance and Gestational Diabetes in Women of Childbearing Age. *Diabetes Care* 21 (Suppl 2):B9-13
- [55] Kirn-Safran CB, D'Souza SS, Carson DD (2008) Heparan sulfate proteoglycans and their binding proteins in embryo implantation and placentation. *Semin Cell Dev Biol* 19:187-193
- [56] Kjos S, Peters R, Xiang A, Henry O, Montoro M, Buchanan T (1995) Predicting future diabetes in Latino women with gestational diabetes. *Diabetes* 44:586-591
- [57] Klein U, Von Figura K (1976) Partial purification and characterization of heparan sulfate specific endoglucuronidase. *Biochem Biophys Res Commun* 73:569-576
- [58] Knight M, Duley L, Henderson G, Smart GJ, King JF (2000) Antiplatelet agents for preventing and treating preeclampsia. *Cochrane Database Syst Rev* 2:CD000492
- [59] Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Mani A, Bar-Am A, Jaffa A, Leitman G, Lessing JB (1999) Increased frequency of the genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 340:9-13
- [60] Lala PK und Chakroborty C (2003) Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to preeclampsia and fetal injury. *Placenta* 24:575-587
- [61] Langer O, Brustman L, Anyaegbuman A (1995) The significance of one abnormal glucose test value on adverse outcome in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 175:758-763

- [62] Leeners B, Neumaier-Wagner PM, Kuse S, Mütze S, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Rath W (2011) Recurrence risk of hypertensive disease in pregnancy after HELLP syndrome. *J Perinat Med* 39:673-678
- [63] Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft Schwangerschaftshochdruck/Gestose der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (DGGG) (12/2013) Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen
http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/015-018l_S1_Diagnostik_Therapie_hypertensiver_Schwangerschaftserkrankungen_2014-01.pdf
(letzter Zugriff: 09.04.2015)
- [64] Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V. (DGGG) (08/2011) Diagnostik, Therapie und Nachsorge von Gestationsdiabetes mellitus
http://www.dggg.de/fileadmin/public_docs/Dokumente/Leitlinien/3-3-3-Gestationsdiabetes-2011.pdf (letzter Zugriff: 09.04.2015)
- [65] Lewis EJ, Xu X (2008) Abnormal glomerular permeability characteristics in diabetic nephropathy: implications for the therapeutic use of low-molecular weight heparin. *Diabetes Care* 31:202-207
- [66] Lucariello A, Perna A, Sellitto C, Baldi A, Iannaccone A, Cobellis L, De Luca A, De Falco M (2014) Modulation of wolframin expression in human placenta during pregnancy: comparison among physiological and pathological states. *Biomed Res Int* Art.ID: 985478
- [67] Luedders DW, Bundschuh D, Hornemann A, Hoerster JC, Boemicke P, Köster F, Bohlmann MK (2011) Heparanase expression in term placentas of diabetic patients and healthy controls *Arch Gynecol Obstet* 284:287-292
- [68] Major C, DeVeciana M, Weeks J, Morhan M (1998) Recurrence of gestational diabetes: Who is at risk? *Am J Obstet Gynecol* 179:1038-1042
- [69] Mattar F, Sibai BM (2000) Eclampsia. VIII. Risk factors for maternal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 182:307-312
- [70] Maxhimer JB, Somenek M, Rao G, Pesce CE, Baldwin D Jr, Gattuso P, Schwartz MM, Lewis EJ, Prinz RA, Xu X (2005) Heparanase-1 gene expression and regulation by high glucose in renal epithelial cells: a

- potential role in the pathogenesis of proteinuria in diabetic patients. *Diabetes* 54:2172-2178
- [71] McKenzie E, Young K, Hircock M, Bennett J, Bhaman M, Felix R, Turner P, Stamps A, McMillan D, Saville G, Ng S, Mason S, Snell D, Schofield D, Gong H, Townsend R, Gallagher J, Page M, Parekh R, Stubberfield C (2003) Biochemical characterization of the active heterodimer form of human heparanase (Hpa1) protein expressed in insect cells. *Biochem J* 373:423-435
- [72] Miles JR, Vallet JL, Freking BA, Nonneman DJ (2009) Molecular cloning and characterisation of heparanase mRNA in the porcine placenta throughout gestation. *Reprod Fertil Dev* 21:757-772
- [73] Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA (2006) International consensus statement on an update of the classification criteria for definite Antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 4:295-306
- [74] Murgia C, Berria R, Minerba L, Mallocci B, Daniele C, Zedda P, Ciccotto G, Sulis S, Murenu M, Tiddia F, Manai M, Melis G (2006) Gestational Diabetes Mellitus in Sardinia: Results from an early, universal screening procedure *Diabetes Care* 29:1713-1714
- [75] Nadir Y, Brenner B, Zetser A, Ilan N, Shafat I, Zcharia E, Goldshmidt O, Vlodaysky I (2006) Heparanase induces tissue factor expression in vascular endothelial and cancer cells. *J Thromb Haemost* 4:2443-2451
- [76] Nadir Y, Henig I, Naroditzky I, Paz B, Vlodaysky I, Brenner B (2010) Involvement of heparanase in early pregnancy losses. *Thromb Res* 125:e251-257
- [77] Nassar AH, Adra AM, Chakhtoura N, Gomez-Marin O, Beydoun S (1998) Severe preeclampsia remote from term: Labor induction or elective cesarean delivery? *Am J Obstet Gynecol* 179:1210-1213
- [78] Nasser NJ (2008): Heparanase involvement in physiology and disease *Cell Mol Life Sci* 65:1706-1715
- [79] Nelson SM, Greer IA (2008) The potential role of heparin in assisted conception. *Hum Reprod Update* 14:623-645

- [80] Niers TM, Klerk CP, DiNisio M, Van Noorden CJ, Büller HR, Reitsma PH, Richel DJ (2007) Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. *Crit Rev Oncol Hematol* 61:195-207
- [81] Nobuhisa T, Naomoto Y, Okawa T, Takaoka M, Gunduz M, Motoki T, Nagatsuka H, Tsujigiwa H, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Haisa M, Matsuoka J, Kurebayashi J, Nakajima M, Taniguchi S, Sagara J, Dong J, Tanaka N (2007) Translocation of heparanase into nucleus results in cell differentiation. *Cancer Sci* 98:535-540
- [82] Odendaal HJ, Pattinson RC, Bam R, Grove D, Kotze TJW (1990) Aggressive or expectant management for patients with severe preeclampsia between 28-34 weeks` gestation: A randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 76:1070-1075
- [83] O'Sullivan J (1989) The Boston Gestational Diabetes Studies: Review and Perspectives. In: Sutherland H, Stowers J, Pearson D (Hrsg.): *Carbohydrate Metabolism in Pregnancy and the Newborn*. 4. Auflage: S. 287-294, Springer, London
- [84] Parish CR, Freeman C, Brown KJ, Francis DJ, Cowden WB (1999): Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity. *Cancer Res* 59:3433-3441
- [85] Parish CR, Freeman C, Hulett MD (2001) Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. *Biochim Biophys Acta* 1471:M99-108
- [86] Parra M, Rodrigo R, Barja P, Bosco C, Fernandez V, Munoz H, Soto-Chacon E (2005) Screening test for preeclampsia through assessment of uteroplacental blood flow and biochemical markers of oxidative stress and endothelial dysfunction. *Am J Obstet Gynecol* 193:1486-1491
- [87] Peiris HN, Lappas M, Georgiou HM, Vaswani K, Salomon C, Rice GE, Mitchell MD (2015): Myostatin in the placentae of pregnancies complicated with gestational diabetes mellitus. *Placenta* 36:1-6
- [88] Pettit D, Knowler W (1998) Long-Term Effects of the Intrauterine Environment, Birth Weight, and Breast Feeding in Pima Indians. *Diabetes Care* 21 (Suppl 2):B138-141

- [89] Petersen K und Pedersen HC (2013) In: Taylor CR, Rudbeck L, Sjørup AH (Hrsg). *Immunohistochemical Staining Methods*. 6. Auflage, 79-80. Dako, Denmark
- [90] Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I (1980) Trophoblastic invasion of human decidua from 8–18 weeks of pregnancy. *Placenta* 1:3-19
- [91] Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Dixon G, Brosens I (1981) The pattern of interstitial invasion of the myometrium in early human pregnancy. *Placenta* 2:303-316
- [92] Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I (1983) Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 4:397-413
- [93] Plagemann A, Harder T, Kohlhoff R, Rohde W, Dorner G (1997) Glucose tolerance and insulin secretion in children of mothers with pregestational IDDM or gestational diabetes. *Diabetologia* 40:1094-1100
- [94] Rath W (1994) Das HELLP-Syndrom. *Zentralbl Gynäkol* 116:195-201
- [95] Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ (2004) Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 114:744-754
- [96] Revel A, Helman A, Koler M, Shushan A, Goldshmidt O, Zcharia E, Aingorn H, Vlodayky I (2005): Heparanase improves mouse embryo implantation. *Fertil Steril* 83:580-586
- [97] Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I (2003): Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 361:901-908
- [98] Rey E, Garneau P, David M, Gauthier R, Leduc L, Michon N, Morin F, Demers C, Kahn SR, Magee LA, Rodger M (2009) Dalteparin for the prevention of recurrence of placental-mediated complications of pregnancy in women without thrombophilia: a pilot randomized controlled trial. *J Thromb Haemost* 7:58-64
- [99] Roberge S, Nicolaides KH, Demers S, Villa P, Bujold E (2013) Prevention of perinatal death and adverse perinatal outcome using low-dose aspirin: a meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 41:491-499

- [100] Roberts JM (1998) Pregnancy related hypertension. In: Creasy RK, Resnik R (Hrsg). *Maternal Fetal Medicine*. 4. Auflage: S. 833-72, W.B. Saunders, Philadelphia
- [101] Salzberger M, Liban E (1975) Diabetes and antenatal fetal death. *Isr J Med Sci* 11:623-628
- [102] Schäfer U, Dupak J, Vogel M, Dudenhausen JW, Kjos SL, Buchanan TA, Vetter K (1998) Hyperinsulinism, neonatal adiposity, and placental immaturity in infants born to women with one abnormal glucose tolerance test value. *J Perinatal Med* 26:27-36
- [103] Schneider H, Raio L, Knöfler M (2006) Präimplantation, Implantation und Plazentation: Bedeutung für den Schwangerschaftsverlauf. In: Schneider H, Husslein P, Schneider KT (Hrsg.): *Die Geburtshilfe*, 3. Auflage: S. 4-14, Springer-Verlag, Heidelberg
- [104] Sermer M, Naylor D, Gare DJ, Kenshole AB, Ritchie JW, Farine D, Cohen HR, McArthur K, Holzappel S, Biringier A (1995) Impact of increasing carbohydrate intolerance on maternal-fetal outcomes in 3637 women without diabetes. The Toronto Tri-Hospital Gestational Diabetes Project. *Am J Obstet Gynecol* 175:146-156
- [105] Shear RM, Rinfret D, Leduc L (2005) Should we offer expectant management in cases of severe preterm preeclampsia with fetal growth restriction? *Am J Obstet Gynecol* 192:1119-1125
- [106] Sibai BM, El-Nazer A, Gonzalez-Ruiz A (1986) Severe preeclampsia-eclampsia in young primigravid women: Subsequent pregnancy outcome and remote prognosis. *Am J Obstet Gynecol* 155:1011-1016
- [107] Sibai BM, Mercer B, Sarinoglu C (1991) Severe preeclampsia in the second trimester: recurrence risk and longterm prognosis. *Am J Obstet Gynecol* 165:1408-1412
- [108] Sibai BM, Ramadan MK, Usta I, Salama M, Mercer BM, Friedman SA (1993) Maternal morbidity and mortality in pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome). *Am J Obstet Gynecol* 169:1000-1006

- [109] Sibai BM, Mercer BM, Schiff E, Friedman SA (1994) Aggressive versus expectant management of severe preeclampsia at 28 to 32 weeks` gestation: A randomized controlled trial. *Am J Obstet Gynecol* 171:818-822
- [110] Sibai BM (2003) Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 102:181-192
- [111] Sibai BM (2005) Diagnosis, prevention, and management of eclampsia. *Obstet Gynecol* 105:402-410
- [112] Silverman B, Landsberg L, Metzger B (1993) Fetal hyperinsulinism in offspring of diabetic mothers: association with the subsequent development of childhood obesity. *Ann N Y Acad Sci* 699:36-45
- [113] Silverman B, Metzger B, Cho N, Loeb C (1995) Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers: relationship to fetal hyperinsulinism. *Diabetes Care* 18:611-617
- [114] Statistisches Bundesamt (Hrsg.) (1999) Gesundheitsbericht für Deutschland. Metzler, Stuttgart S. 237-242
- [115] Sullivan CA, Magann EF, Perry KG Jr, Roberts WE, Blake PG, Martin JN Jr.(1994) The recurrence risk of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP) in subsequent gestations. *Am J Obstet Gynecol* 171:940-943
- [116] Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, Scholz C, Würfel W, Thaler CJ (2010) Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *J Reprod Immunol* 85:25-32
- [117] Unverdorben L, Hüttenbrenner R, Knabl J, Jeschke U, Hutter S (2015):. Galectin-13/PP-13 expression in term placentas of gestational diabetes mellitus pregnancies. *Placenta*; 36:191-198
- [118] van den Hoven MJ, Rops AL, Vlodaysky I, Levidiotis V, Berden JH, van der Vlag J (2007) Heparanase in glomerular diseases. *Kidney Int* 72:543-548
- [119] Van Doormaal FF, Di Nisio M, Otten HM, Richel DJ, Prins M, Buller HR (2011) Randomized trial of the effect of the low molecular weight heparin nadroparin on survival in patients with cancer. *J Clin Oncol* 29:2071-2076
- [120] van Rijn BB, Hoeks LB, Bots ML, Franx A, Bruinse HW (2006) Outcomes of subsequent pregnancy after first pregnancy with early-onset preeclampsia *Am J Obstet Gynecol* 195:723-728

- [121] Visser W, Wallenburg HCS (1995) Temporising management of severe pre-eclampsia with and without the HELLP-syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 102:111-117
- [122] Vlodaysky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I (1999): Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med* 5:793-802
- [123] Vlodaysky I, Friedmann Y (2001) Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J Clin Invest* 108:341-347
- [124] Vlodaysky I, Elkin M, Abboud-Jarrous G, Levi-Adam F, Fuks L, Shafat I, Ilan N (2008): Heparanase: one molecule with multiple functions in cancer progression. *Connect Tissue Res.* 49:207-210
- [125] Vreys V, David G (2007) Mammalian heparanase: what is the message? *J Cell Mol Med* 11:427-452
- [126] Wang K, Ahmad S, Cai M, Rennie J, Fujisawa T, Crispi F, Baily J, Miller MR, Cudmore M, Hadoke PW, Wang R, Gratacós E, Buhimschi IA, Buhimschi CS, Ahmed A (2013) Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine γ -lyase contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia. *Circulation* 127:2514-2522
- [127] Watanabe R, Allayee H, Xiang A, Trigo E, Hartiala J, Lawrence J, Buchanan T (2007) Transcription factor 7- like 2 (TCF7L2) is associated with gestational diabetes mellitus and interacts with adiposity to alter insulin secretion in Mexican Americans. *Diabetes* 56:1481-1485
- [128] Waterman M, Ben-Izhak O, Eliakim R, Groisman G, Vlodaysky I, Ilan N (2007) Heparanase upregulation by colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Mod Pathol* 20:8-14
- [129] Waterstone M, Bewley S, Wolfe C (2001) Incidence and predictors of severe obstetric morbidity. Casecontrol study. *BMJ* 322:1089-1094
- [130] Weiss P Diabetes in pregnancy: Lessons from the fetus. In: Dornhorst A, Hadden D (Hrsg.) (1996). *Diabetes and Pregnancy: An international*

- Approach to Diagnosis and Management. 1. Auflage: S. 221-240, Wiley, Chichester
- [131] Weiss P, Walcher W, Scholz H (1999) Der vernachlässigte Gestationsdiabetes: Risiken und Folgen. *Geburtsh Frauenheilk* 59:535-544
- [132] Westergaard HB, LanghoffGRoos J, Lingman G, Marsal K, Kreiner S (2001) A critical appraisal of the use of umbilical artery Doppler ultrasound in high-risk pregnancies: use of metaanalyses in evidence-based obstetrics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 17:466-476
- [133] WHO Study Group (1994) Prevention of Diabetes mellitus. WHO Technical Report Series 844, Genf (http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_844.pdf, Tag des Zugriffs: 07.03.2015)
- [134] Yu CKH, Smith GCS, Papageorghiou AT, Cacho AM, Nicolaides KH (2005) An integrated model for the prediction of preeclampsia using maternal factors and uterine artery Doppler velocimetry in unselected lowGrisk women. *Am J Obstet Gynecol* 193:429-436
- [135] Zheng LD, Jiang GS, Pu JR, Mei H, Dong JH, Hou XH, Tong QS (2009) Stable knockdown of heparanase expression in gastric cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol.* 15:5442-5448
- [136] Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ (1993) Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest* 91:950-960

8. Anhang

8.1 Ethikvotum

Positives Votum der Ethikkommission (beiliegend)

8.2 Patientenaufklärung

Formular zur Patientenaufklärung (beiliegend)



Im Focus das Leben
Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe

Universität zu Lübeck

Stellv. Vorsitzende:

Frau Prof. Dr. med. M. Schrader

Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann

Tel.: +49 451 500 4639

Fax: +49 451 500 3026

janine.erdmann@medizin.uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 09-093

Datum: 13. Juli 2009

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Frau
Dr. med. Lüdders
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

im Hause

nachrichtlich:

Herrn Prof. Diedrich

Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Sitzung der Ethik-Kommission am 30. Juni 2009

Antragsteller: Frau Dr. Lüdders / Herr Prof. Diedrich

Titel: Placentare Heparanasen bei pathologischen Schwangerschaftsverläufen

Sehr geehrte Frau Lüdders,
der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat nach der Berücksichtigung folgender **Hinweise** keine Bedenken: Eine Rekrutierung der Patientin-nen „im Kreissaal“ ist zu vermeiden, der Zeitpunkt der Rekrutierung sollte vorverlegt werden, um Überforderungs-situationen auszuschließen. Die Patienteninformatio n ist laienverständlicher zu formulieren. Der Abschnitt „Zweck der Studie“ ist stark zu kürzen und weniger bedrohlich zu gestalten. Auf der Seite 3 der Aufklärung im unteren Absatz ist das Wort „Entnahmeeinrichtung“ durch ein passenderes Wort zu ersetzen.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß bin ich
Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Vorsitzender



Campus Lübeck

Telefon:	0451 / 500-	2134 / 6374	
			Telefon
Pforte:	0451 / 500-	2155 od. 2156	Fax
Oberarztsekretariat:		2141	2430
Poliklinik:		2158	2170
Brustsprechstunde:		5275	5276
Chemotherapie-Pavillon:		5075	4613
Geburtshilfliche Ambulanz und Kreißsaal:		2148	2367
Pränatale Medizin:		2149	2430
Sterilitäts- und Hormon- sprechstunde:		4418	5764
Andrologische interdisziplinäre Sprechstunde:		4418	5764
Privatambulanz:		6374	2139
E-Mail:	michael.bohlmann@uk-sh.de		

PATIENTENAUFKLÄRUNG

Titel der Studie: „Placentare Heparanasen bei pathologischen Schwangerschaftsverläufen“

Sehr geehrte Patientin,

wir laden Sie ein, an einer Studie teilzunehmen. Bevor Sie Ihre Entscheidung zur Teilnahme treffen sollten Sie wissen, warum die Studie durchgeführt wird und was mit einer Studienteilnahme verbunden ist. Bitte nehmen Sie sich die Zeit, die folgenden Hinweise aufmerksam durchzulesen, und zögern Sie bitte nicht, sich an den informierenden Arzt/Ärztin zu wenden, wenn Unklarheiten bestehen oder Sie ergänzende Informationen benötigen.

Welchem Zweck dient die Studie?

Wir möchten Gewebe des Mutterkuchens („Placenta“) nach der Geburt untersuchen und dabei Vergleiche zwischen Placenten von Frauen mit einem unauffälligen Schwangerschaftsverlauf und solchen mit Schwangerschaftskomplikationen anstellen.

Schwangerschaftserkrankungen sind Erkrankungen, die spezifisch während einer Schwangerschaft auftreten. Mengenmäßig spielen bei Erkrankungen in der Schwangerschaft neben dem Auftreten eines Schwangerschaftszuckers („Gestationsdiabetes“) hochdruckbedingte („Hypertonie“/ „Hypertension“) Erkrankungen eine besondere Rolle.

Der Ursprung der zu den hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen zählende Präeklampsie (PE) liegt in Veränderungen des Mutterkuchens bzw. des Zusammenspiels zwischen Gebärmutter und Mutterkuchens (sog. „utero-

placentare Einheit“). Es kommt hier zu einer verminderten Durchblutung des Mutterkuchens. Als Folge hiervon können neben einer Erhöhung des mütterlichen Blutdrucks Komplikationen wie einer Wachstumsverzögerung des Kindes (IUGR), ein so genanntes HELLP-Syndrom sowie eine vorzeitige Ablösung des Mutterkuchens auftreten.

Es bestehen Hinweise, dass bei Frauen mit angeborenen oder erworbenen Gerinnungsstörungen ein erhöhtes Risiko für das Auftreten hochdruckbedingter Erkrankungen in einer Schwangerschaft vorliegt. Möglicherweise liegt diesen auffälligen Schwangerschaftsverläufen auch ein veränderter körpereigener Abbau bzw. Verbrauch gerinnungshemmender Substanzen (Heparinen) zugrunde.

Im Rahmen dieser Studie soll untersucht werden, ob im Placentagewebe von Patientinnen mit pathologischen Schwangerschaftsverläufen quantitative Veränderungen bestimmter Heparin-abbauender Enzyme – sog. Heparinasen – bestehen, die ursächlich für die benannten pathologischen Schwangerschaftsverläufe sein können.

Da Frauen mit stattgehabter Präeklampsie, IUGR, einem HELLP-Syndrom sowie einer vorzeitigen Ablösung des Mutterkuchens ein erhöhtes Risiko von Komplikationen in einer Folgeschwangerschaft (Frühgeburtlichkeit, kindliche Wachstumsverzögerung, vorzeitige Placentalösung, etc) aufweisen, kommt der Prävention solcher Komplikationen eine hohe Bedeutung zu. Auch stellt ein Gestationsdiabetes einen Risikofaktor für das Auftreten von Komplikationen in einer Folgeschwangerschaft dar.

Durch die Kenntnis möglicher Veränderungen placentarer Enzymen bei pathologischen Schwangerschaftsverläufen könnten sich Vorteile ergeben:

- Erkenntnis einer neuen pathologischen Physiologie bei Patientinnen mit pathologischen Schwangerschaftsverläufen
- mögliche Entwicklung neuer Therapieansätze in der Praxis, besonders bei betroffenen Patientinnen in einer möglichen Folgeschwangerschaft
- neue Präventionsansätze zur Verringerung erneuter Komplikationen

Für die aktuelle Schwangerschaft haben diese Erkenntnisse keine Bedeutung, da diese schon beendet ist – der Mutterkuchen wird erst nach Geburt untersucht.

Wie ändert sich bei mir durch Teilnahme an der Studie?

Bei Studienteilnahme wird **nach** Geburt des Kindes und der Nachgeburt Placentagewebe zur Untersuchung auf mögliche Veränderungen der Heparinasen gewonnen. Der Mutterkuchen wird normalerweise nach der Geburt verworfen. Durch Ihre Teilnahme an der Studie ändert sich in Ihrer Betreuung nichts.

Worin bestehen die möglichen Nachteile und Risiken einer Teilnahme?

Bei Teilnahme an der Studie bestehen kein Nachteil und kein Risiko für Sie und Ihr Kind, da wir erst nach abgeschlossener Geburt Placentagewebe gewinnen.

Warum gehöre ich zu den Kandidatinnen für eine Teilnahme?

Ihr Arzt schlägt Ihnen die Teilnahme an dieser Studie vor, weil

_____ bei Ihnen eine der vorbezeichneten Schwangerschaftskomplikation aufgetreten ist

_____ Ihre Schwangerschaft ohne Komplikationen abgelaufen ist und Sie die somit die Auswahlkriterien für eine Teilnahme als Kontrollpatientin erfüllen.

Können die Studienergebnisse anderen Frauen nützen?

Die Frauenklinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, möchte eine medizinische Versorgung auf hohem Niveau bieten und diese konsequent verbessern. Der mögliche Nachweis einer Überexpression von placentare Heparanasen bei pathologischen Schwangerschaftsverläufen kann nicht nur für Sie in einer Folgeschwangerschaft, sondern auch für die Entwicklung neuer Therapieansätze und Präventionsmaßnahmen für die Allgemeinheit von Vorteil sein.

Durch Ihre Bereitschaft, an der Studie „Placentare Heparanasen bei pathologischen Schwangerschaftsverläufen“ zu wissenschaftlichen Zwecken teilzunehmen, können Sie einen wichtigen Beitrag dazu leisten, mögliche neue Therapieansätze und Präventionsmaßnahmen weiter und neu zu entwickeln.

Werden zusätzliche Untersuchungen durchgeführt?

Es werden keine weiteren Untersuchungen notwendig sein.

Bleibt meine Teilnahme an der Studie vertraulich?

Ihre Behandlungsdaten werden vor Auswertung pseudonymisiert, das bedeutet die Daten werden so verschlüsselt, dass die Identität der Person nur über einen Entschlüsselungscode ermittelbar ist. Die pseudonymisierten Daten werden nach 5 Jahren vernichtet. Weitere Angaben: s. „zusätzliche Hinweise“.

Pseudonymisierung und datenschutzrechtliche Informationen

Alle im Zuge dieser Studie erhobenen personenbezogenen Angaben (Name, Vorname, Geburtsdatum, Schwangerschaftsverlauf) werden pseudonymisiert. Bei der Pseudonymisierung werden die persönlichen Daten durch einen mehrstelligen Zahlencode ersetzt. Die persönlichen Daten benötigen wir für den Nachweis Ihres schriftlichen Einverständnisses zur Studienteilnahme. Diese Einverständniserklärung verbleibt bei dem für die Untersuchung verantwortlichen Mediziner in der Klinik und wird dort in archiviert. Das medizinische Fachpersonal in der Klinik unterliegt der Schweigepflicht. **Die persönlichen Daten sind vor fremden Zugriff geschützt.** Der Einsatz eines mehrstelligen Zahlencodes ist notwendig, um die Identifizierung der Studienteilnehmerin auszuschließen und um eine Verwechslung der Placenten verschiedener Patientinnen vollständig auszuschließen.

Wenn Sie bereit sind, unentgeltlich den Mutterkuchen zum wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn zur Verfügung zu stellen, füllen Sie bitte die beiliegende Einverständniserklärung aus.

Wir bedanken uns herzlich für Ihre Unterstützung, mit der Sie uns bei der Untersuchung auf mögliche Ursachen einer Schwangerschaftskomplikation behilflich sind.

Sollten Sie Fragen zum Verfahren haben oder etwas nicht verstehen, wenden Sie sich bitte an den diensthabenden Arzt im Kreißaal oder an Oberarzt Dr. med. M. Bohlmann, Tel: 0451/500 4418, der Frauenklinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck.

Tritt im Rahmen der Studiendurchführung ein Schaden auf, der den Studienteilnehmern durch das schuldhafte Verhalten eines Beschäftigten des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UK SH) zugefügt wurde, haftet die gesetzliche Haftpflicht des UK SH.

Zusätzliche Hinweise

Datenschutz

Untersuchungsergebnisse und weitere krankheitsrelevante Daten sowie Behandlungsverläufe werden dokumentiert und diese Daten mit Hilfe der EDV sowie unter Berücksichtigung des §4 Abs. 3 des Landesdatenschutzgesetzes gespeichert und ausgewertet. Die Patienten- und Krankheitsdaten werden entsprechend den Bestimmungen des Bundesdatenschutzgesetzes streng vertraulich behandelt. Sollte es im Rahmen dieses Projektes notwendig werden, Teile von Untersuchungen an anderen Einrichtungen durchführen zu lassen oder krankheitsrelevante Daten zu vergleichen, erfolgt die Weitergabe in pseudonymisierter Form.

Entscheidungsfreiheit

Die Einwilligung zur Teilnahme an der Studie „**Placentare Heparanasen bei pathologischen Schwangerschaftsverläufen**“ zu den beschriebenen wissenschaftlichen Zwecken erfolgt freiwillig.

Sie können jederzeit eine gegebene Einwilligung ohne Angabe von Gründen widerrufen, ohne dass dies nachteilige Folgen für Ihre weitere medizinische Betreuung hat.



UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein
Klinik für Frauenheilkunde Ratzeburger Allee 160 23538 Lübeck

UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein



Campus Lübeck

Telefon:	0451 / 500-	2134 / 6374	
			Telefon
Pforte:	0451 / 500-	2155 od. 2156	Fax
Oberarztsekretariat:		2141	2430
Poliklinik:		2158	2170
Brustsprechstunde:		5275	5276
Chemotherapie-Pavillon:		5075	4613
Geburtshilfliche Ambulanz und Kreißsaal:		2148	2367
Pränatale Medizin:		2149	2430
Sterilitäts- und Hormon- sprechstunde:		4418	5764
Andrologische interdisziplinäre Sprechstunde:		4418	5764
Privatambulanz:		6374	2139
E-Mail:	klaus.diedrich@uk-sh.de		

PATIENTENEINWILLIGUNG

Titel der Studie: „Plazentare Heparanasen bei pathologischen Schwangerschaftsverläufen“

Bitte entscheiden Sie sich in der nachfolgenden Erklärung, ob Sie an der Studie „**Plazentare Heparanasen bei pathologischen Schwangerschaftsverläufen**“ teilnehmen möchten.

Erklärung der Patientin nach dem Aufklärungsgespräch mit dem Arzt

Herr / Frau Dr. med. _____ hat mir anhand der Hinweise im Merkblatt den Zweck und die Vorgehensweise der o.g. Studie im Rahmen eines wissenschaftlichen Projektes der Frauenklinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck dargelegt.

Ich habe die „Aufklärung zur Studie“ gelesen und verstanden. Ich hatte ausreichend Gelegenheit, Fragen zu stellen. Diese wurden zufriedenstellend und vollständig beantwortet. Ich habe keine weiteren Fragen.

Mir ist bekannt, dass ich das Recht habe, meine Einwilligung zur Studie ohne Angabe von Gründen jederzeit zurückzunehmen. Gewonnenes Gewebe wird dann vernichtet und nicht weiter ausgewertet.

Einwilligungserklärung

Bankverbindungen:
Sparkasse Kiel, Kto.-Nr. 100206, BLZ 21050170
Dresdner Bank Lübeck, Kto.-Nr. 300041200,
BLZ 23080040

Ich willige hiermit in die Teilnahme an der Studie „**Plazentare Heparanasen bei pathologischen Schwangerschaftsverläufen**“ ein.

Lübeck,

Datum

Unterschrift der Patientin

Datum

Unterschrift Ärztin/ Arzt

8.3 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Prävalenz von GDM in verschiedenen ethnischen Gruppen
- Abbildung 2: Physiologisches Dopplersignal der A. uterina
- Abbildung 3: Pathologisches Dopplersignal der A. uterina mit Nachweis postsystolischer Inzisuren, sog. Notches
- Abbildung 4: Implantation und frühe Entwicklung der Plazenta
- Abbildung 5: Prävalenz hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen
- Abbildung 6: Schematische Darstellung der Streptavidin-Biotin-Methode
- Abbildung 7: Färbung mit monoklonalen Primärantikörper mouse-anti-human Heparanase und Negativkontrolle
- Abbildung 8: Vergleich der unterschiedlichen Entbindungsmodi zwischen der Kontrollgruppe und den verschiedenen Studiengruppen
- Abbildung 9 A-D: Einteilung der Färbeintensität, Vergrößerung 20-fach

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Risikoanalyse auf manifesten Diabetes mellitus bei Erstvorstellung in der Schwangerschaft
Tabelle 2:	Auswertung des Glukosetests im ersten Trimenon bei erhöhtem Risiko
Tabelle 3:	oGTT (oraler Glukosetoleranztest) zwischen 24. und 28.SSW
Tabelle 4:	Risikofaktoren für die Entwicklung eines manifesten Diabetes mellitus
Tabelle 5:	Anamnestische Risikoabschätzung, eine Präeklampsie zu entwickeln
Tabelle 6:	Schwangerschaftsassozierte Risiken
Tabelle 7:	Darstellung der Veränderung ausgewählter Gerinnungsfaktoren während der Schwangerschaft
Tabelle 8:	Gründe für die Indikation der frühzeitigen Entbindung bei Präeklampsie und maternaler Gefährdung
Tabelle 9:	Puffer und Primer zur cDNA-Herstellung
Tabelle 10:	Farbstoff für die qPCR
Tabelle 11:	Oligonukleotide
Tabelle 12:	Lösungen und Puffer für die Durchführung einer Immunhistochemie
Tabelle 13:	verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistochemie
Tabelle 14:	Reaktionsgefäße, Pipetten und andere Verbrauchsmaterialien
Tabelle 15:	verwendete Chemikalien
Tabelle 16:	verwendete Geräte
Tabelle 17:	verwendete Primer-Paare
Tabelle 18:	Zusammenstellung des Master-Mixes
Tabelle 19:	Protokoll der q-PCR
Tabelle 20:	Ablauf der Entparaffinierung
Tabelle 21:	Charakteristika der Patientinnen mit (nicht insulinpflichtigem) Gestationsdiabetes (NIDGDM) versus Kontrolle

- Tabelle 22: Charakteristika der Patientinnen mit insulinpflichtigem Gestationsdiabetes versus Kontrolle
- Tabelle 23: Charakteristika der Patientinnen mit Präeklampsie versus Kontrolle
- Tabelle 24: Häufigkeit der Verlegung der Neugeborenen auf die Intensivstation
- Tabelle 25: Ergebnis der qPCR-Auswertung der Gruppe der Patientinnen mit nicht insulinpflichtigem Gestationsdiabetes (NIDGDM) im Vergleich zur Kontrollgruppe
- Tabelle 26: Ergebnis der qPCR-Auswertung der Gruppe der Patientinnen mit insulinpflichtigem Gestationsdiabetes (IDGDM) im Vergleich zur Kontrollgruppe
- Tabelle 27: Ergebnis der qPCR-Auswertung der Gruppe der Patientinnen mit Präeklampsie im Vergleich zur Kontrollgruppe
- Tabelle 28: Mittelwert, Standardabweichung und Range der Färbeintensität bei der Gruppe der Patientinnen mit nicht insulinpflichtigem Gestationsdiabetes (NIDGDM) im Vergleich zur Kontrolle
- Tabelle 29: Mittelwert, Standardabweichung und Range der Färbeintensität der Gruppe der Patientinnen mit insulinpflichtigem Gestationsdiabetes (IDGDM) im Vergleich zur Kontrolle
- Tabelle 30: Mittelwert, Standardabweichung und Range der Färbeintensität der Gruppe der Patientinnen mit Präeklampsie im Vergleich zur Kontrolle

9. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Achim Rody für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Klinik anzufertigen.

Herrn PD Dr. med. Michael Bohlmann danke ich für die Überlassung des Themas, die exzellente Betreuung zu jeder Zeit, die Motivation, die mir die letzten Schritte erleichterte, die Förderung wissenschaftlicher Beiträge bei Kongressen, die Unterstützung und nicht zuletzt für den Glauben daran, dass dieses Werk, auch neben meinem Job, zur Vollendung gebracht wird.

Herrn PD Dr. rer. nat. Frank Köster danke ich für die Unterstützung in sämtlichen wissenschaftlichen Fragen, außerdem Herrn Stephan Polack, Frau Gabi Marschner und auch allen anderen Kollegen, die mir mit Rat und Tat im Labor zur Seite standen.

Den ärztlichen MitarbeiterInnen der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe danke ich für ihre Unterstützung in der Gewinnung der Proben - hier im Speziellen ihrem nächtlichen Engagement.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern dafür, dass sie immer an meiner Seite standen und stehen, mich motivieren und ich mir stets ihrer Liebe sicher sein kann. Ich danke meinem Bruder und seiner Frau für die Möglichkeiten des Austauschs über das wissenschaftliche Arbeiten - meinem Bruder im Besonderen für das geduldige und aufmerksame Lesen, sowie die vielen klugen und hilfreichen Kommentare. Weiterhin danke ich Melanie Wenzel und Nina Wittgruber für ihre Unterstützung beim „letzten Schliff“.