

**Aus der Universitätsfrauenklinik Rostock
Direktor Professor Dr. med. habil. B. Gerber**

**DER EINFLUSS DER ORALEN ANTIDIABETIKA METFORMIN UND
THIAZOLIDINDION AUF DIE HORMONEXPRESSION HUMANER
TROPHOBLASTZELLEN**

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock
vorgelegt von**

**Anna Facklam
geboren am 09.01.1986
in Schwerin**

Rostock, 2016

Dekan: Professor Dr. med. univ. E. C. Reisinger
Medizinische Fakultät, Universität Rostock

1. Gutachter: Professor Dr. med. V. Briese
Universitätsfrauenklinik und Poliklinik, Klinikum Südstadt Rostock

2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. B. Hinz
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Rostock

3. Gutachter: Professor Dr. med. E. Schleußner
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Datum der Einreichung: 11. Juni 2016

Datum der Verteidigung: 20. Dezember 2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	9
1. Einleitung	10
1.1 Plazenta.....	10
1.1.1 Aufbau und Entwicklung der Plazenta.....	10
1.1.2 Funktion der Plazenta.....	14
1.1.3 Trophoblastzellen.....	15
1.2 Veränderungen der Plazenta durch Diabetes mellitus in der Schwangerschaft	18
1.3 Gestationsdiabetes und Diabetes mellitus in der Schwangerschaft.....	18
1.3.1 Definition und Epidemiologie.....	18
1.3.2 Riskofaktoren und Pathophysiologie	20
1.3.3 Maternale und fetale Risiken des Gestationsdiabetes	21
1.3.4 Diagnose des Gestationsdiabetes	23
1.3.5 Nichtmedikamentöse Therapie	25
1.3.6 Medikamentöse Therapie	27
1.3.7 Insulin	29
1.3.8 Orale Antidiabetika	30
1.4 Metformin und Thiazolidindion	32
1.4.1 Metformin	32
1.4.2 Thiazolidindione	34
1.5 Plazenta und Hormone (Östrogen und Progesteron)	36
1.5.1 Östrogen	38
1.5.2 Progesteron	39
2. Zielstellung	41
3. Hypothesen	42
4. Material	43
4.1 Plazenta.....	43
4.2 Antibiotika und Antikoagulantien für die Aufbewahrung der Plazenten	43
4.3 Lösungen, Puffer und Chemikalien zur Trophoblastisolierung siehe Anhang 1	43
4.4 Zellkulturmedium	43
4.5 Medikamente	43
4.5.1 Medikamentenverdünnungen.....	44
4.6 Biochemische Assays	44

4.7 Immunhistochemische Assays.....	45
5. Methoden.....	46
5.1 Isolierung der Trophoblastzellen	46
5.2 Zellzählung und Erstellung der Zellkonzentration	49
5.3 Methodischer Ablauf	51
5.4 Charakterisierung der Trophoblastzelle.....	52
5.5 Biochemische Assays	53
5.5.1 LDH-Zytotoxizitätstest	53
5.5.2 CellTiter-Blue® -Zytotoxizitätstest	55
5.5.3 PIgf-Immunoassay.....	56
5.6 Statistik	57
6. Ergebnisse	59
6.1 Charakterisierung der Trophoblastzellen.....	59
6.2 Mikroskopische Vitalitätsprüfung	60
6.3 LDH-Zytotoxizitätstest	70
6.4 CellTiter-Blue® -Zytotoxizitätstest.....	75
6.5 Glukose, Östrogen und Progesteron unter dem Einfluss von Metformin.....	77
6.5.1 Einfluss von Metformin auf die Glukosekonzentration im Überstand	77
6.5.2 Einfluss von Metformin auf die Östrogenkonzentration im Überstand.....	78
6.5.3 Einfluss von Metformin auf die Progesteronkonzentration im Überstand	81
6.6 Glukose, Östrogen und Progesteron unter dem Einfluss von Thiazolidindion	82
6.6.1 Einfluss von Thiazolidindion auf die Glukosekonzentration im Überstand	83
6.6.2 Einfluss von Thiazolidindion auf die Östrogenkonzentration im Medium.....	84
6.6.3 Einfluss von Thiazolidindion auf die Progesteronkonzentration im Überstand	85
6.7 Ergebnisse des PIgf-Immunoassay	86
7. Diskussion	90
7.1 Die zytotoxische Wirkung von Metformin und Thiazolidindion	90
7.2 Der Einfluss von Metformin und Thiazolidindion auf die Glukosekonzentration im Zellkulturmedium	99
7.3 Der Einfluss von Metformin und Thiazolidindion auf die Hormonexpression	100
7.4 Der Einfluss von Metformin und Thiazolidindion auf die PIgf-Expression.....	104
7.5 Orale Antidiabetika in der Therapie des Gestationsdiabetes und Diabetes mellitus in der Schwangerschaft.....	107
7.6 Ausblick: orales Insulin.....	111

7.7 Methodenkritik	112
8. Zusammenfassung	114
9. Thesen	117
10. Literaturverzeichnis.....	119
11. Anhang	135
1. Lösungen, Puffer und Chemikalien zur Trophoblastisolierung.....	135
2. Der Einfluss von Metformin auf die Glukosekonzentration im Überstand – Einzeldarstellung der drei Versuchsansätze	138
3. Der Einfluss von Metformin auf die Östrogenkonzentration im Überstand - Einzeldarstellung der drei Versuchsansätze	140
4. Der Einfluss von Metformin auf die Progesteronkonzentration im Überstand - Einzeldarstellung der drei Versuchsansätze	142
5. Der Einfluss von Thiazolidindion auf die Glukosekonzentration im Überstand - Einzeldarstellung der drei Versuchsansätze	144
6. Der Einfluss von Thiazolidindion auf die Östrogenkonzentration im Überstand - Einzeldarstellung der drei Versuchsansätze	146
7. Der Einfluss von Thiazolidindion auf die Progesteronkonzentration im Überstand - Einzeldarstellung der drei Versuchsansätze	148
Lebenslauf	150
Danksagung	152
Selbständigkeitserklärung	153

Abkürzungsverzeichnis

ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
ADA	American Diabetes Association
AMPK	AMP activated protein kinase
BMI	Body Mass Index
BRCP	breast cancer resistance protein
CRH	Corticotropin Releasing-Hormon
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DDP-4	Dipeptidyl-Peptidase-4
DHEAS	Dihydroepiandrostenediene Sulfat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMA	europäische Arzneimittelbehörde
FDA	Food And Drug Administration
GDM	Gestationsdiabetes mellitus
GLP-1	Glucagon Like Peptide-1
GOD	Glukoseoxidase
hCC	humanes Chorioncorticotropin
hCG	humanes Choriongonadotropin
hCT	humanes Chorionthyreotropin
HDL	High-density lipoprotein
HGH	Human Growth Hormone

hPL	humanes Plazentalaktogen
IADPSG	International Association of the Diabetes in Pregnancy Study Group
ICT	intensivierte konventionelle Insulintherapie
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
KG	Körpergewicht
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDL	Low-density lipoprotein
LD ₅₀	Letale Dosis 50
LHRH	luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon
LGA	Large for Gestational Age
MHC II	Major Histokompatibilitätskomplex II
MRP1	multidrug resistance-associated protein 1
NICE	National Institute for Health and Care Excellence
OCT	organischer Kationen-Transporter
oGTT	oraler Glukosetoleranztest
PCO- Syndrom	Syndrom der polyzystischen Ovarien
PIGF	Placental Growth Factor
PPAR-γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor-γ
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SSW	Schwangerschaftswoche
STH	Somatotropes Hormon
TK-1	Tyrosinkinase 1
TRH	Thyreotropin Releasing - Hormon

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
VLDL	Very low-density lipoprotein
WHO	World Health Organization

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Aufbau der Plazenta	10
Abbildung 2: Schematische Zusammenfassung des Ovarialzyklus, Befruchtung und Entwicklung des Embryos in der ersten Woche nach Befruchtung	12
Abbildung 3: Aufbau der Plazenta (Querschnitt 4. Woche).....	14
Abbildung 4: Modell der Synzytiotrophoblastformation <i>in-vitro</i>	16
Abbildung 5a: Bandenverteilung nach Percoll - Gradienten - Zentrifugation	49
Abbildung 5b: Percoll-Gradient nach Zentrifugation.....	49
Abbildung 6: Zählkammer nach Bürker.....	50
Abbildung 7: Prinzip des LDH-Zytotoxizitätstests	54
Abbildung 8: Identifikation der Synzytiotrophoblastzellen anhand der Rotreaktion des intrazellulären CK7 (IHC).....	60
Abbildung 9 : LDH-Zytotoxizitätstest für Metformin.....	72
Abbildung 10: LDH-Zytotoxizitätstest für Thiazolidindion	74
Abbildung 11: CellTiter-Blue® -Test	76
Abbildung 12: Einfluss von Metformin auf die Glukosekonzentration	78
Abbildung 13: Einfluss von Metformin auf die Östrogenkonzentration	80
Abbildung 14: Einfluss von Metformin auf die Progesteronkonzentration.....	82
Abbildung 15: Einfluss von Thiazolidindion auf die Glukosekonzentration	84
Abbildung 16: Einfluss von Thiazolidindion auf die Östrogenkonzentration.....	85
Abbildung 17: Einfluss von Thiazolidindion auf die Progesteronkonzentration	86
Abbildung 18: PIgf Standardkurve zur Berechnung der PIgf-Konzentrationen der mit Metformin und Thiazolidindion versetzten Zellkulturen.....	87
Abbildung 19: PIgf-Immunoassay für Metformin	88
Abbildung 20: PIgf-Immunoassay für Thiazolidindion.....	89

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: LDH-Zytotoxizitätstest für Metformin: Mittelwerte der Zytotoxizität [%] und Standardabweichung	71
Tabelle 2: LDH-Zytotoxizitätstest für Thiazolidindion: Mittelwerte der Zytotoxizität [%] und Standardabweichung	73

1. Einleitung

1.1 Plazenta

1.1.1 Aufbau und Entwicklung der Plazenta

Die Plazenta besteht aus einer Basalplatte und einer Chorionplatte. Die auf der maternalen Seite der Plazenta liegende Basalplatte ist nach Trennung der Plazenta vom Uterus sichtbar und weist bis zu 40 sogenannte Kotelydone auf, die Furchen zwischen ihnen entsprechen den Plazentasepten. Die auf der fetalen Seite der Plazenta liegende Chorionplatte ist von Amnioneipithel überzogen. Die darin verlaufenden fetalen Gefäße stehen mit den zwei Umbilikalarterien und der Umbilikalvene der häufig exzentrisch in die Chorionplatte inserierenden Nabelschnur in Verbindung. In dem mit mütterlichem Blut gefüllten intervillösen Raum zwischen beiden Platten befinden sich die Zotten, welche die fetalen Blutgefäße enthalten (Ulfing, 2005a).

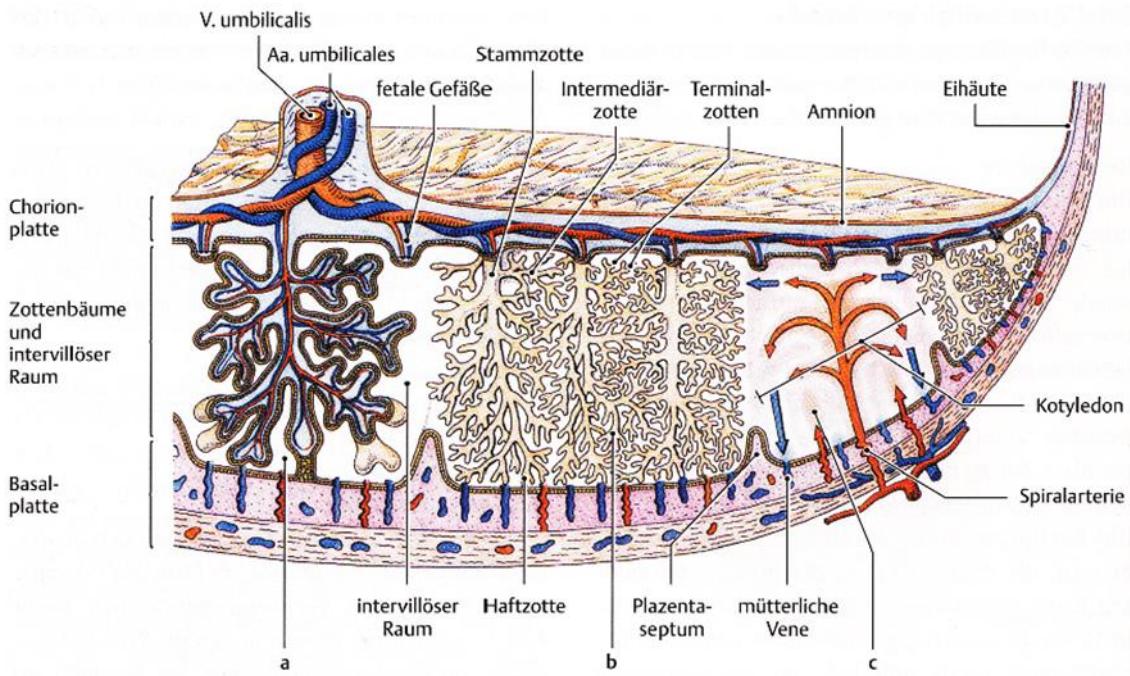


Abbildung 1: Aufbau der Plazenta. (a) junge Plazenta (ca. 4. Woche); (b) reife Plazenta

(ab 4. Monat); (c) Aufbau eines Kotyledon (Ulfing, 2005b)

Während der Präimplantationsphase in den ersten vier Tagen nach der Befruchtung der mütterlichen Eizelle durch ein Spermium wandert die Eizelle entlang der Tuba uterina bis zum Uterus, wobei nach mehrmaliger Zellteilung durch Furchung eine 32- zellige Morula entsteht. Hat sie die Uterushöhle erreicht, findet ein Einstrom von Ionen und Flüssigkeit statt, wodurch sich die Interzellularräume erweitern und sich eine Blastozystenhöhle ausbildet. Die so entstandene Blastozyste gliedert sich in eine an einem Pol der Blastozyste gelegene innere Zellschicht, den Embryoblasten, aus dem der Fetus hervorgeht, und eine äußere Zellschicht, den Trophoblasten, aus der die Plazenta und Teile der Eihäute hervorgehen (Ulfig, 2005a). Am 5.-6. Tag nach der Befruchtung nimmt der dem Embryoblasten anliegende Teil des Trophoblasten mit Hilfe von Mikrovilli Kontakt zum Endometriumepithel des Uterus auf und heftet sich an dieses an (Aplin, 2000). Nun beginnt die Entstehung der Plazenta. Dabei fusionieren mehrere der Zytotrophoblastzellen zu Synzytiotrophoblastzellen, welche infiltrativ in das Endometrium eindringen, bis die gesamte Blastozyste von Endometrium umgeben ist. Dies wird durch Umwandlung der Lamina functionalis zur Dezidua basalis des Endometriums und Einsprossung von kapillaren aus uterinen Spiralarterien möglich. Zwei Wochen nach Befruchtung der Eizelle ist die Implantation abgeschlossen (Ulfig, 2005a).

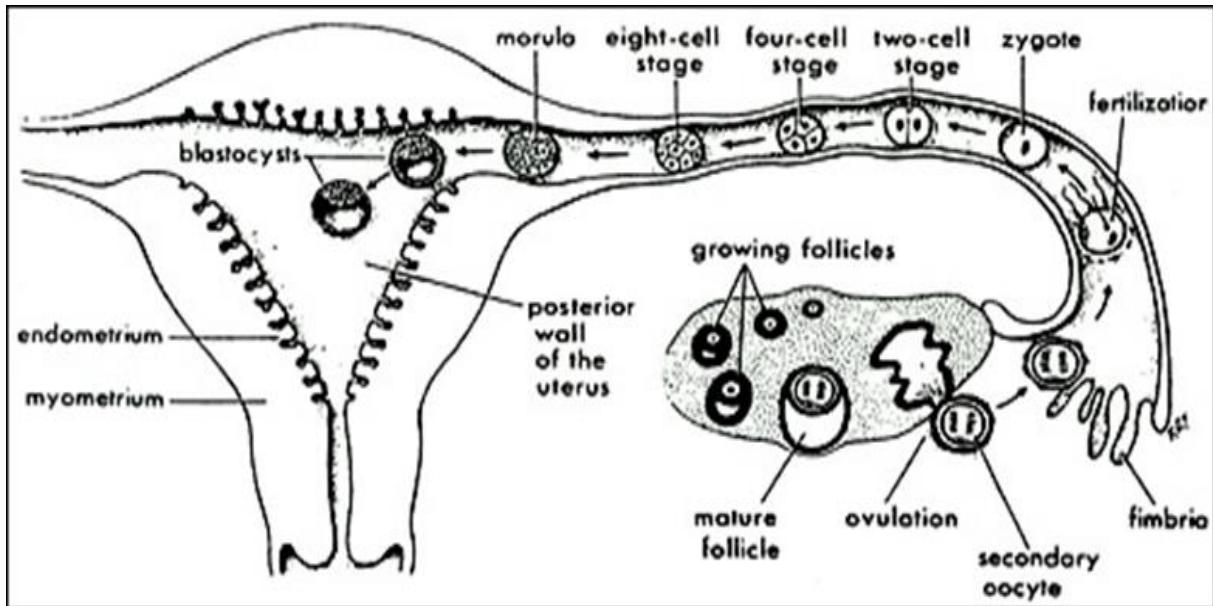


Abbildung 2: Schematische Zusammenfassung des Ovarialzyklus, Befruchtung und Entwicklung des Embryos in der ersten Woche nach Befruchtung (Saioa et al. 2012)

Der Trophoblast bildet nun sowohl Zytotrophoblastzellen, welche proliferieren, als auch eine äußere Schicht von mehrkernigen Syncytiotrophoblasten. Im weiteren Verlauf eröffnen die ständig durch Fusion von Trophoblastzellen nachgebildeten Syncytiotrophoblasten mütterliche Blutgefäße des Endometriums, wodurch sich mütterliches Blut in Lakunen innerhalb dieser fusionierten Zellen ergießt. Dabei formieren sich die Syncytiotrophoblasten zu Trabekeln, welche die Lakunen begrenzen. In diese Trabekel wandern dann Zytotrophoblastzellen ein und bilden so zu Beginn der dritten Woche die primären Zotten. Der von mütterlichem Blut durchströmte Raum wird jetzt als intervillöser Raum bezeichnet. Aus den Primärzotten entwickeln sich durch Einwanderung von extraembryonalen Mesenchymzellen die Sekundär-, und durch Bildung von Kapillaren und Blutzellen aus diesem Mesenchym schließlich die Tertiärzotten. Da diese Zottenkapillaren mit Gefäßen in der Chorionplatte und damit mit den im Haftstiel befindlichen zwei Umbilikalarterien und einer Umbilikalvene in Verbindung stehen, ist jetzt ein feto-plazentarer Kreislauf hergestellt (Ulfig, 2005d).

Durch Überdeckung des Haftstiels mit Amnioektoderm und dem aus primärem Mesoderm gebildeten Bindegewebe entsteht die Nabelschnur (Ulfig, 2005a).

Ein geringer Teil der Zytotrophoblastzellen dringt gleichzeitig in die Dezidua, welche während der Implantation aus dem Endometrium entsteht, ein und fusioniert seitlich miteinander, wodurch die sogenannte materno-fetale Durchdringungszone entsteht. Diese bildet zusammen mit der mütterlichen Dezidua und den Synzytiotrophoblasten die Basalplatte. Durch in den intervillösen Raum hineinragende Septen, die von der Basalplatte gebildet werden, entstehen bis zu 40 becherförmige Areale, die Kotyledone.

Fetalwärts wird der intervillöse Raum von der Chorionplatte begrenzt, von deren einer Seite die Zotten abgehen und deren andere Seite an die Amnionhöhle grenzt. Diese besteht aus den Zytotrophoblast- und Synzytiotrophoblastzellen, welche die Zotten bilden, dem Chorion-Bindegewebe, und einem Überzug aus einschichtigem Amnioneipithel.

Die Zotten des intervillösen Raums verzweigen sich und bilden so Stamm-, Intermediär- und Terminalzotten, in denen der Stoff- und Gasaustausch stattfindet. Eine Sonderform der Zotten sind Haftzotten, welche mit der Dezidua verwachsen und damit die Verbindung zwischen Basalplatte und Chorionplatte herstellen. Die Kapillaren der Zotten münden in größere Gefäße des Chorion-Bindegewebes und diese schließlich in die Nabelschnurgefäße. Durch Verzweigung der bestehenden Zotten findet während der Schwangerschaft ein Wachstum der Plazenta statt (Ulfig, 2005a).

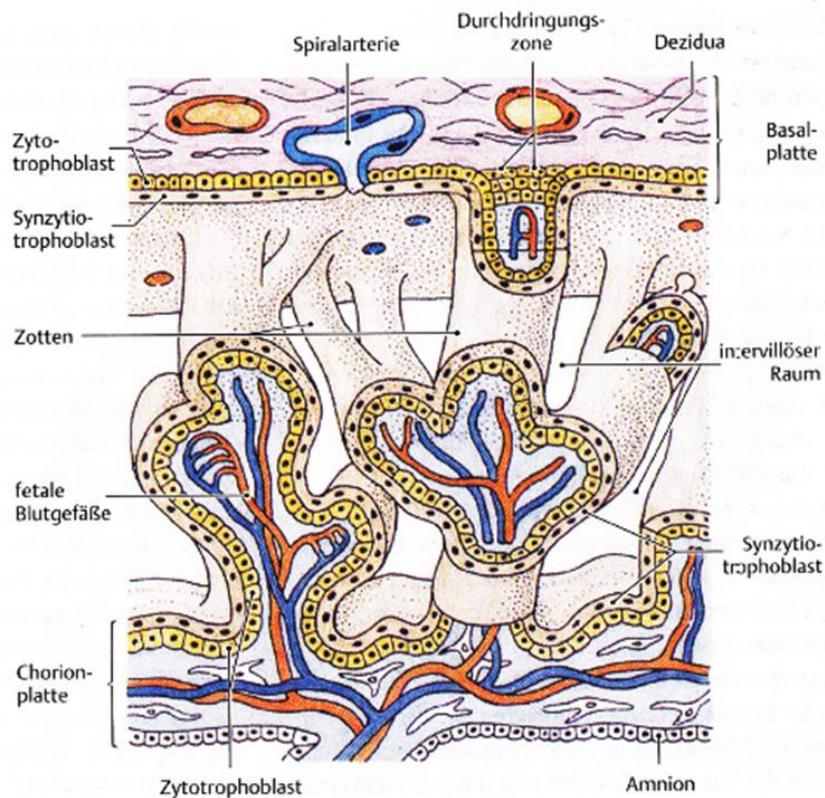


Abbildung 3: Aufbau der Plazenta (Querschnitt 4. Woche) (Ulfig, 2005d)

1.1.2 Funktion der Plazenta

Die Plazenta stellt eine Scheidewand zwischen dem mütterlichen und fetalen Kreislauf dar und dient neben dem Gas- und Stoffaustausch zwischen beiden Kreisläufen auch der Hormonproduktion während einer Schwangerschaft. Zu den von der Plazenta synthetisierten Hormonen zählen die Steroidhormone Progesteron und Östrogen, aber auch Releasingfaktoren endokriner Regelkreise wie das TRH (Thyreotropin Releasing- Hormon), LHRH (luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon) und CRH (Corticotropin Releasing-Hormon). Außerdem werden von der Plazenta die Proteohormone hPL (humane Plazentalaktogen), hCT (humane Chorionthyreotropin), hCG (humane Choriongonadotropin) und hCC (humane Chorioncorticotropin) synthetisiert (Dudenhausen, 2003). Eine weitere Funktion der Plazenta besteht darin, eine Abstoßung des Feten, welcher zur Hälfte väterliche Antigene aufweist und damit ein Ziel immunologischer Reaktionen ist,

zu verhindern. Hierzu exprimieren die Zytotrophoblastzellen, die sich zwischen mütterlichem und fetalem Gewebe ausbilden nicht, wie viele andere menschliche Zellen, die MHC II (Major Histokompatibilitätskomplex II) (Redman, 1983).

Der wechselseitige Transport von Gas, Nährstoffen und Stoffwechselprodukten erfolgt über die Plazentaschranke der Terminalzotten. Diese besteht in der reifen Plazenta aus Synzytiotrophoblastzellen mit Mikovilli, einer Basalmembran, die aus einer Verschmelzung von Endothel und Trophoblastzellen hervorgegangen ist, und dem Endothel der fetalen Kapillaren. Der Transport erfolgt über verschiedene Transportmechanismen, wie Diffusion, Transzytose und aktiver Transport. Neben den Gasen Sauerstoff und Kohlendioxid werden auch Wasser, Nährstoffe, Vitamine und Mineralstoffe, Stoffwechselprodukte wie Harnstoff, aber auch Immunglobuline, Krankheitserreger und Medikamente über die Plazentaschranke transportiert.

Die Hormonproduktion der Plazenta findet überwiegend im Synzytiotrophoblasten statt (Ulfig, 2005a).

1.1.3 Trophoblastzellen

Bei den Trophoblastzellen werden die villösen von extravillösen unterschieden. Villöse Trophoblastzellen verbleiben in der Plazenta, proliferieren und fusionieren zu Synzytiotrophoblasten und bilden schließlich die Oberfläche der Plazentazotten, während die extravillösen Trophoblastzellen aus der Plazenta in das Endometrium migrieren (Huppertz, 2008), (Huppertz & Borges, 2008).

.

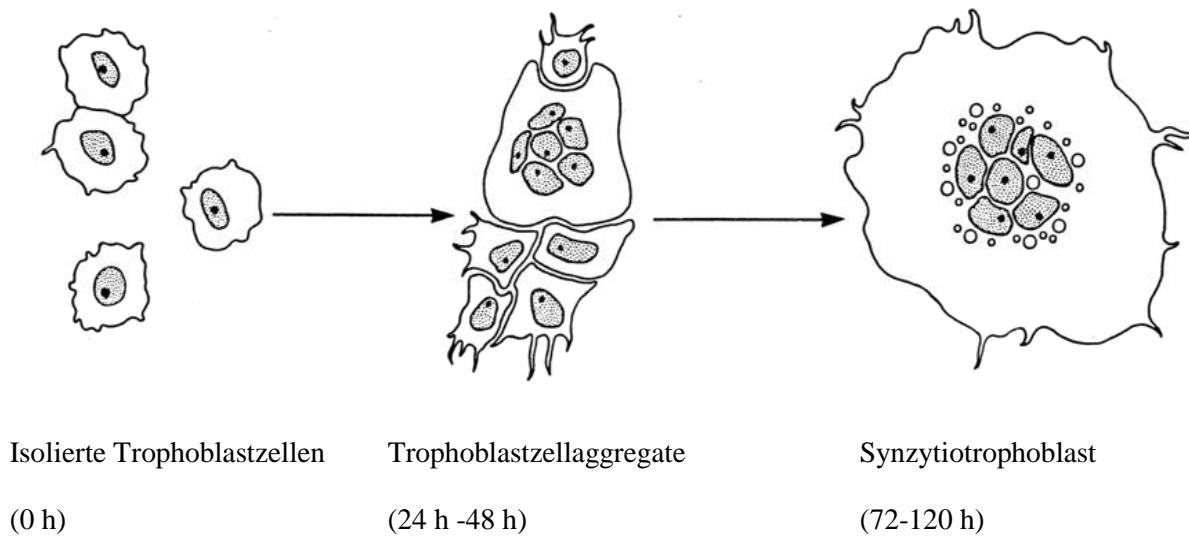


Abbildung 4: Modell der Synzytiotrophoblastformation *in-vitro*

Entwicklung einzelner Trophoblastzellen über Zellaggregate zu Synzytiotrophoblasten (modifiziert nach Kliman et al., 1986).

Der villöse Trophoblast besteht somit aus einer Schicht einkerniger Zytotrophoblastzellen und einer darüber liegenden Schicht mehrkerniger Synzytiotrophoblastzellen, welche durch ihre Position auf der Oberfläche der Plazentazotten mit dem mütterlichen Blut Kontakt haben und somit in hohem Maße an Stoff- und Gasaustausch beteiligt sind, aber auch immunologische Funktionen besitzen und Hormone synthetisieren.

Die extravillösen Trophoblastzellen entwickeln sich aus proliferierenden Zellen des Synzytiotrophoblasten und differenzieren sich in einen mehrschichtigen Zellverband (Gude et al., 2004). Sie bilden dabei zwei Subpopulationen, von denen eine die Hüllstruktur bildet, während die andere sich von diesem Zellverband löst, sich zu interstitiellen und endovaskulären Zellen differenziert und invasiv in die mütterliche Dezidua, das Myometrium und die uterinen Gefäße einwandert und so am Ende des ersten Trimesters den materno-fetalen Kreislauf formt (Genbacev et al., 2003). Mütterliche Endothelzellen werden dabei durch Trophoblastzellen ersetzt. Diese steuern außerdem die Apoptose glatter Muskelzellen

der Gefäßwand und führen dadurch zur Ausbildung großlumiger Gefäße, welche verminderte Kontraktilität und niedrigeren Blutdruck aufweisen. Dies garantiert einen konstanten Blutfluss zur Versorgung des Feten mit Sauerstoff und Nährstoffen (Burton et al., 2007).

Die Migration und Invasion der extravillösen Trophoblastzellen wird unter anderem durch IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) beeinflusst. Ist dieser Vorgang der Invasion gestört, resultieren Schwangerschaftskomplikationen, wie z.B. Abort, schwangerschaftsassoziierte Hypertonie und fetale Wachstumsretardierung. Extravillöse Trophoblastzellen sezernieren IGF-1 und exprimieren gleichzeitig die Rezeptoren, über welche das IGF-1 die Zellfunktion steuert (IGF-1-Rezeptor, Insulin-Rezeptor und IGF-1/Insulin Hybrid Rezeptor) (Lacey et al., 2002). Liegen wie beim Gestationsdiabetes hohe Seruminsulinspiegel vor, führt dies zu einer Internalisation der Insulinrezeptoren und somit zu einer Desensitivierung der extravillösen Trophoblastzellen gegenüber Insulin. Mayama et al. konnten zeigen, dass die Konzentration des IGF-1/Insulin Hybrid-Rezeptors (ein Heterodimer aus Insulin- und IGF-1-Rezeptor), welcher eine hohe Affinität für IGF-1, jedoch nicht für Insulin besitzt, unter diesen Bedingungen ebenfalls abnimmt. Hieraus kann beim Gestationsdiabetes eine Plazentafehlfunktion resultieren.

Mayama et al. postulieren, dass Pioglitazon (als PPAR-γ-Agonisten) die PPAR-γ-Expression, aber auch die Expression der Insulinrezeptoren auf der Zelloberfläche der extravillösen Trophoblastzellen stimuliert. Da die IGF-1/Insulin-Hybrid-Rezeptor Expression dadurch ebenfalls zunimmt, kann eine Therapie mit Pioglitazon zu einer Verbesserung der IGF-1 Signalkaskade führen und somit eine intakte Plazentafunktion aufrechterhalten. Die Studie konnte zeigen, dass Pioglitazon die IGF-1-gesteuerte Trophoblastzellmigration wiederherstellen kann und dadurch zu einer normalen Entwicklung der Plazenta sowie Aufrechterhaltung der Schwangerschaft beiträgt (Mayama et al., 2012).

1.2 Veränderungen der Plazenta durch Diabetes mellitus in der Schwangerschaft

Heorman et al untersuchten Plazenten von Schwangeren mit Diabetes mellitus und zeigten verschiedene histopathologische Veränderungen im Vergleich zu Plazenten gesunder Frauen. Hierzu gehört eine Unreife der Villi mit multiplen Zellpopulationen im Stroma, Verminderung der Trophoblastzellschicht und Ersatz dieser Zellen durch Fibrinoid. Während in einer gesunden Plazenta eine Ausdünnung der Synzytiotrophoblastzellschicht zu einem erleichterten feto-maternalen Stoffaustausch beiträgt, bleibt in Plazenten von an Diabetes mellitus erkrankten Frauen eine Zweischichtigkeit der Synzytiotrophoblasten erhalten. Des Weiteren weisen diese Plazenten ein villöses Ödem auf, eine Anreicherung von Flüssigkeit im Interstitium, wodurch die normale intravillöse Zellarchitektur zerstört wird und welche in einer fetalen Ischämie resultiert. Außerdem zeigt sich die Basalmembran der am Stoffaustausch wesentlich beteiligten Synzytiotrophoblasten verbreitert (Heorman et al., 2012). Diese Veränderungen scheinen umso ausgeprägter zu sein, je schlechter ein Diabetes mellitus in der Schwangerschaft eingestellt ist (al-Okail & al-Attas, 1994).

1.3 Gestationsdiabetes und Diabetes mellitus in der Schwangerschaft

1.3.1 Definition und Epidemiologie

Beim Diabetes mellitus handelt es sich um eine Stoffwechselerkrankung mit dem Vorliegen einer chronischen Hyperglykämie aufgrund eines absoluten oder relativen Mangels an Insulin. Entsprechend ihrer Ätiologie werden durch die DDG (Deutsche Diabetes Gesellschaft), ADA (American Diabetes Association) und WHO (World Health Organization) verschiedene Formen des Diabetes mellitus unterschieden.

Beim Typ-1-Diabetes, der etwa 5 % aller Diabeteserkrankungen ausmacht, führt die meist antikörperbedingte Destruktion der β -Zellen des Pankreas zu einem absoluten Insulinmangel.

Beim Typ-2-Diabetes, welcher bei 90% der an Diabetes mellitus erkrankten Patienten

vorliegt, handelt es sich hingegen um eine gestörte postprandiale Insulinsekretion sowie eine herabgesetzte Insulinwirkung aufgrund einer Insulinresistenz der Zellen. Die Ursache hierfür liegt häufig in einem metabolischen Syndrom, dem Zusammentreffen der Risikofaktoren abdominelle Adipositas, Dyslipoproteinämie, essentielle Hypertonie, sowie gestörte Glukosetoleranz.

Darüber hinaus werden Diabetesformen anderer Ätiologien und der Gestationsdiabetes von den oben genannten unterschieden.

Unter einem Gestationsdiabetes wird jede erstmals während einer Schwangerschaft aufgetretene und diagnostizierte Glukosetoleranzstörung verstanden. Laut Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (Kleinwechter et al., 2011) wird der bereits präkonzeptionell vorliegende, manifeste aber bisher unbekannte Diabetes mellitus von dem Gestationsdiabetes mit einer unterhalb der Grenzwerte des Diabetes mellitus liegenden Hyperglykämie unterschieden. Da eine im 1. Trimenon neu aufgetretene Glukosetoleranzstörung das Vorliegen einer bereits präkonzeptionell vorliegenden, bisher nicht manifesten oder diagnostizierten Glukosetoleranzstörung wahrscheinlich macht, wird die Erstmanifestation eines Diabetes mellitus Typ 1 oder 2 in der Schwangerschaft nicht dem Gestationsdiabetes zugeordnet.

Etwa 2-6 % der Schwangeren entwickeln einen Gestationsdiabetes, damit ist es eine der häufigsten Komplikationen während der Schwangerschaft (Haag & Hanhart, 2010), (Buckley et al., 2012). Bei 1% der Schwangeren besteht ein bereits präkonzeptionell bekannter Diabetes mellitus, davon entfallen rund 20 % auf den Diabetes mellitus Typ 2 (Kleinwechter et al., 2014).

1.3.2 Riskofaktoren und Pathophysiologie

Riskofaktoren und Pathophysiologie des Gestationsdiabetes sind denen des Typ-2-Diabetes ähnlich.

Riskofaktoren für das Auftreten eines Gestationsdiabetes sind Adipositas mit einem BMI $>30 \text{ kg/m}^2$, positive Familienanamnese für Diabetes mellitus, mütterliches Alter > 25 Jahre zum Zeitpunkt der Schwangerschaft, sowie positive Anamnese von Gestationsdiabetes oder Geburt eines makrosomem Kindes in einer vorangegangenen Schwangerschaft. Dabei ist das Risiko an einem Gestationsdiabetes zu erkranken bei positiver Eigenanamnese eines GDM fast 24 mal, bei Geburt eines makrosomem Kindes in einer vorangegangenen Schwangerschaft ca. 6 mal, bei einem Alter >25 Jahre ca. 3,4 mal, bei einem $\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$ sowie positiver Familienanamnese für Diabetes mellitus 2,7 mal so hoch wie bei Frauen, bei denen diese Riskofaktoren nicht vorhanden sind (Ostlund & Hanson, 2003).

Während des 1. Trimenons wird in der Plazenta vor allem das insulinanalog wirkende β -HCG produziert, welches bei einem zeitgleichen Absinken des Progesteronspiegels zu einer verbesserten Insulinsensitivität und verminderter Insulinbedarf führt (Hepp et al., 2003), (Jovanovic et al., 2001).

Im Verlauf einer Schwangerschaft kommt es physiologisch zu einem Anstieg kontrainsulinärer Hormone, insbesondere von Kortisol, Progesteron, Östrogen, humanem Plazentalaktogen (HPL), Prolaktin, Thyroxin und Wachstumshormonen (STH), welche sowohl aus dem mütterlichen Stoffwechsel, als auch aus der Plazenta als einem endokrin aktiven Organ stammen (Leipold, 2002), (Ryan & Enns, 1988). Dies führt ab dem 2. Trimenon zu einer Verminderung der Insulinsensitivität (Schäfer-Graf, 1999). Der dadurch steigende Insulinbedarf wird durch transplazentare Glukoseabgabe an den Feten und gesteigerte endogene Insulinproduktion kompensiert.

Dem Gestationsdiabetes liegt eine bis zu 40 % geringere maternale Insulinsensitivität gegenüber gesunden Schwangeren (Ryan et al., 1985) und erhöhte Insulinresistenz zugrunde, welche eine gesteigerte Lipolyse, gesteigerten Aminosäurenmetabolismus, sowie eine verminderte Glukoseaufnahme in Skelettmuskel- und Fettzellen bei gleichzeitig erhöhter endogener hepatischer Glukoneogenese zur Folge hat (Catalano et al., 2003). Während gesunde Frauen dies mit einer gesteigerten Insulinproduktion kompensieren können, zeigen Gestationsdiabetikerinnen aufgrund eines β -Zell Defektes eine um bis zu 67 % reduzierte Insulinsekretionsrate (Xiang et al., 1999). Daraus resultiert eine ungenügende Kompensation der Insulinresistenz in der Spätschwangerschaft, es entsteht eine maternale Hyperglykämie (Homko et al., 2001). Diese β -Zell-Dysfunktion kann lange vor der Schwangerschaft beginnen und sich erst durch die prodiabetogene Stoffwechsellage in der Schwangerschaft manifestieren (Kahn, 2001). Für die Pathogenese des Gestationsdiabetes spielen wahrscheinlich noch weitere multiple metabolische Defekte, wie z.B. Störungen des Fettsäuremetabolismus eine Rolle, welche eine β -Zell- Dysfunktion mit verursachen (Kousta et al., 2003). Nur bei 1-2 % der erkrankten Frauen sind Inselzellantikörper nachweisbar, so dass eine autoimmune Genese der Gestationsdiabetes selten ist (Catalano et al., 2003).

1.3.3 Maternale und fetale Risiken des Gestationsdiabetes

Eine Hyperglykämie während der Schwangerschaft geht mit dem erhöhten maternalen Risiko der Entwicklung einer Eklampsie und Präeklampsie einher (Suhonen, 1993), (Fadl et al., 2010). Des Weiteren leiden Gestationsdiabetikerinnen auch häufiger als gesunde Schwangere an einem arteriellen Hypertonus und gehäuften Infektionen, insbesondere Harnwegsinfekten oder aszendierenden vaginalen Infekten, welche das Frühgeburtlichkeitsrisiko erhöhen (Schaefer-Graf et al., 2002).

Das Wiederholungsrisiko bei Erkrankten in einer weiteren Schwangerschaft erneut an Gestationsdiabetes zu erkranken beträgt 50 % (Major et al., 1998). Außerdem geht ein

Gestationsdiabetes mit dem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes einher. Die 15-Jahresprävalenz für die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes bei Frauen mit einem Gestationsdiabetes in der Anamnese beträgt ca. 60 % für adipöse, sowie 30 % für normalgewichtige Frauen (O'Sullivan, 1982), auch wenn bei der Mehrzahl der Patientinnen der Diabetes post partum sistiert. Damit haben Frauen mit Gestationsdiabetes im Vergleich zu gesunden Frauen ein 7-fach erhöhtes Risiko an einem Typ-2-Diabetes zu erkranken (Bellamy et al., 2009). Das Risiko für betroffene Frauen, nach 5-10 Jahren an einem Typ-1-Diabetes zu erkranken liegt bei ca. 10 % (Lobner, 2006).

Zu den fatalen Risiken der chronischen Hyperglykämie während der Schwangerschaft zählen während des 1. Trimenons, vor allem bei vorbestehendem, schlecht eingestelltem Diabetes mellitus der Mutter, die in ca. 10 % der Fälle auftretende diabetische Embryopathie, welche multiple Fehlbildungen umfasst (Miller et al., 1981). Ab einem Nüchternblutzucker von >120 mg/dl findet sich eine um 2,9 % erhöhte Fehlbildungsrate (Schaefer et al., 1997). Da sich ein Gestationsdiabetes in der Regel erst in der Spätschwangerschaft, also nach Abschluss der Organogenese manifestiert, ist hier die Fehlbildungsrate kaum erhöht. Bei präkonzeptionell vorbestehendem, schlecht eingestelltem Diabetes mellitus Typ 1 oder 2 besteht ein 4-fach höheres Risiko für Fehlbildungen im Vergleich zu gesunden Schwangeren (Kleinwechter et al., 2014).

Dagegen ist als typische Komplikationen eines Gestationsdiabetes in der Spätschwangerschaft die diabetische Fetopathie mit einem Geburtsgewicht von über 4000 g zu nennen. Das mütterliche Insulin kann die Plazentaschranke nicht passieren (Kautzky-Willer & Handisurya, 2009). Die durch die bei maternaler Hyperglykämie in der 2. Schwangerschaftshälfte erhöhte transplazentare Glukosezufuhr verursachte fetale Hyperglykämie bedingt eine physiologische β -Zell-Hypertrophie mit der Folge eines fetal Hyperinsulinismus. Dies führt zu einer Steigerung der Glykogeneinlagerung in die Leber sowie erhöhter Triglyceridsynthese der

Fettzellen. Die Folge sind Makrosomie, sowie Organunreife von Lunge, Leber und Niere aufgrund plazentarer Funktionsstörungen und Hyperinsulinismus (Haag & Hanhart, 2010), (Kainer, 2001). Makrosome Kinder von an Gestationsdiabetes erkrankten Müttern haben wiederum ein deutlich erhöhtes Risiko selbst an Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas zu erkranken (Catalano et al., 2003). Des Weiteren bestehen erhöhte Risiken einer Plazentainsuffizienz, eines Polyhydramnions mit der Gefahr der Frühgeburtlichkeit (Ju et al., 2008), sowie eines postnatalen Atemnotsyndroms durch Lungenunreife und reduzierte Surfactantproduktion. Der schwere unbehandelte Gestationsdiabetes kann außerdem zum intrauterinen Fruchttod führen, wobei für ca. 28 % der intrauterinen Fruchttode ein Gestationsdiabetes ursächlich ist (Salzberger & Liban, 1975).

Die HAPO-Studie zeigte einen deutlichen Zusammenhang zwischen steigenden Plasmaglukosewerten der untersuchten Schwangeren und den primären Endpunkten Geburtsgewicht oberhalb der 90. Percentile (LGA), Serum C-Peptid-Konzentrationen, als Begleitprodukt der Insulinsynthese, im Nabelschnurblut oberhalb der 90. Percentile, Notwendigkeit einer Kaiserschnittentbindung und neonataler Hypoglykämie. Ebenso zeigte sich eine Korrelation zwischen steigenden Plasmaglukosewerten und den sekundären Endpunkten Präeklampsie, Frühgeburtlichkeit, Schulterdystokie, Hyperbilirubinämie und Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Versorgung der Neugeborenen (The HAPO Study Cooperative Research Group, 2008).

1.3.4 Diagnose des Gestationsdiabetes

In Anlehnung an HAPO Studie und die daraufhin erstellten Empfehlungen der IADPSG (International Association of the Diabetes in Pregnancy Study Group) empfiehlt die DDG in ihrer 2011 erstellten Leitlinie folgendes Vorgehen:

Zur Diagnostik des Gestationsdiabetes und des Diabetes mellitus in der Schwangerschaft diente bisher im Rahmen der Erstvorstellung in der Frühschwangerschaft (vor der 24. SSW) bei Vorliegen von Riskofaktoren die Bestimmung einer venösen Gelegenheits-Plasmaglukose oder einer Nüchternglukose, definiert als Blutglukosebestimmung nach einer Nahrungs- oder Flüssigkeitskarenz von mindestens 8 Stunden. Bei Werten von ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) der Gelegenheitsglukose oder ≥ 92 mg/dl (5,1 mmol/l) der Nüchternglukose sollte zunächst die Zweitmessung der Nüchternglukose erfolgen. Bei Messwerten der Gelegenheitsglukose von weniger als 200 mg/dl, aber mehr als dem Normwert bei einer glukosetoleranten Schwangeren, also zwischen 140-199 mg/dl (7,8-11,05 mmol/l), ist ebenfalls die Bestimmung der Nüchternglukose zum Ausschluss eines Gestationsdiabetes sinnvoll. Entsprechend dem Wert der Nüchternglukose-Zweitmessung erfolgt die Diagnosestellung: Bei einer Nüchternglukose von 92-125 mg/dl (5,1-6,9 mmol/l) wird die Diagnose eines Gestationsdiabetes gestellt, ab einem Nüchternglukosewert von ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l) liegt ein manifester Diabetes mellitus vor, ebenso bei zweimaliger Gelegenheitsglukose ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) (Kleinwechter et al., 2011). Seit 2012 ist in den Mutterschaftsrichtlinien des Bundes im Rahmen der Vorsorgeuntersuchungen bei jeder Schwangeren zwischen der 24. – 27+6. SSW die einmalige Bestimmung der Plasmaglukose nach Einnahme von 50g Glukoselösung festgelegt. Bei Blutzuckerwerten $\geq 7,5$ mmol/l (≥ 135 mg/dl) und $\leq 11,1$ mmol/l (≤ 200 mg/dl) soll ein oraler Glukosetoleranztest ergänzt werden. Nach Bestimmung der Blutglukose vor Testbeginn und Trinken von 75 g Glukose gelöst in 300 ml Wasser, erfolgt die Blutglukosebestimmung ein und zwei Stunden nach dem Trinken. Ein Gestationsdiabetes liegt vor, wenn die Blutglukose nüchtern 92 mg/dl (5,1 mmol/l), nach einer Stunde 180 mg/dl (10,0 mmol/l) oder nach zwei Stunden 153 mg/dl (8,5 mmol/l) übersteigt (Richtlinien des Gemeinsamen Bundesausschusses über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung („Mutterschafts-Richtlinien“, 2015)).

Eine nach Diagnosestellung eines Gestationsdiabetes eingeleitete Therapie mittels diätetischer Maßnahmen, Blutzuckermonitoring und medikamentöser Therapie, z.B. mit Insulin, kann das Risiko der Diabetes-assoziierten Komplikationen während einer Schwangerschaft, insbesondere eines intrauterinen Fruchttodes, Schulterdystokie, Knochenfrakturen, Nervenlähmungen, LGA und Makrosomie, sowie Präekklampsie von 4 % auf 1 % reduzieren (Crowther et al., 2005).

1.3.5 Nichtmedikamentöse Therapie

Die Therapie des Gestationsdiabetes wird zunächst mittels nichtmedikamentöser Maßnahmen begonnen. Hierzu zählen medizinische Ernährungstherapie, Bewegung und Blutzuckerselbstmessungen.

Die medizinische Ernährungstherapie des Gestationsdiabetes dient dem Erreichen der Blutglukosezielwerte, der empfohlenen Gewichtszunahme der Mutter und eines normalen fetalen Wachstums. Hierzu gehört unter anderem eine kalorisch ausreichende, ballaststoffreiche, der Schwangerschaft angepasste Nährstoffverteilung. Der tägliche Kalorienbedarf normalgewichtiger Schwangerer ($\text{BMI } 18,5\text{-}24,9 \text{ kg/m}^2$) beträgt 34 kcal/kg KG, bei Untergewicht ($\text{BMI} < 18,5 \text{ kg/m}^2$) ca. 35-40 kcal/kg KG und bei übergewichtigen Schwangeren ($\text{BMI } 25\text{-}29,9 \text{ kg/m}^2$) ca. 25-29 kcal/kg KG. Anhand des präkonzeptionellen BMI der Schwangeren wird außerdem die empfohlene Gewichtszunahme in der Schwangerschaft ermittelt, welche bei normalgewichtigen Frauen 11,5-16 kg betragen sollte (Kleinwechter et al., 2011). Da ein präkonzeptionell erhöhter BMI einen Risikofaktor für das Auftreten von Schwangerschaftskomplikationen, wie z. B. Präekklampsie, Entbindung mittels Sectio und Makrosomie (Bhattacharya et al., 2007) darstellt, ist insbesondere bei übergewichtigen ($\text{BMI } 25\text{-}29,9 \text{ kg/m}^2$) und adipösen Patientinnen ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$) auf eine kontrollierte Gewichtszunahme zu achten.

Der Kohlenhydratanteil sollte bei 40-50 % liegen und die größte Kohlenhydratmenge aufgrund der am Morgen bestehenden gesteigerten Insulinresistenz mittags oder abends zugeführt und auf insgesamt 5-6 kleinere Mahlzeiten verteilt werden (Jovanovic, 2000). Hierdurch soll außerdem das Auftreten postprandialer Hyperglykämien einerseits und Hungerketosen andererseits vermieden werden (Kautzky-Willer & Winzer, 2002). Durch Zufuhr komplexer, verzögert resorbierbarer Kohlenhydrate sollen postprandiale Blutzucker- und Insulinspitzen vermieden und so eine Insulintherapie umgangen werden (American Diabetes Association, Bantle et al., 2008), (Moses et al., 2006). Des Weiteren sollte der Ballaststoffgehalt 30g /Tag betragen, 20 % der Nahrung sollten auf Proteine und 30-35 % auf Fette entfallen (Kleinwechter et al., 2011).

Bei 60-70 % der Gestationsdiabetikerinnen sind diätetische Maßnahmen zum Erreichen der Blutzuckerzielwerte ausreichend, so dass auf eine medikamentöse Therapie verzichtet werden kann. Insbesondere bei einem Blutzucker von <95 mg/dl im 3h-oGTT scheinen nichtmedikamentöse Therapiemaßnahmen ausreichend (McFarland et al., 1999). Einen positiven Effekt auf den Kohlenhydratstoffwechsel hat außerdem die körperliche Bewegung, insbesondere bei Ausdauersportarten. Bei zunehmender Muskelaktivität wird der gesteigerte Energiebedarf zunächst aus muskeleigenen Glykogenreserven, später durch insulinunabhängige vermehrte Glukoseaufnahme aus dem Blut in die Skelettmuskelzelle gedeckt. Durch Freisetzung kontrainsulinärer Hormone, z.B. Katecholamine, Glukagon und Kortisol, findet außerdem eine Hemmung der Insulinfreisetzung und dadurch gesteigerte hepatische Glykogenolyse statt (Kemmer et al., 2007).

Ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung sollte innerhalb von zwei Wochen anhand von mehrmals täglich durchgeführten Blutzuckerselbstbestimmungen der Schwangeren, sowie erhobener biometrischer Daten, z.B. BMI der Schwangeren und fetaler Ultraschalluntersuchungen, entschieden werden, ob eine nichtmedikamentöse Therapie

fortgeführt werden kann oder eine Insulintherapie eingeleitet werden muss. Hierzu erfolgt in den ersten ein bis zwei Wochen eine 4- mal tägliche Blutglukose- Selbstkontrolle, morgens nüchtern sowie 1-2 Stunden postprandial nach den Hauptmahlzeiten. Befinden sich mehr als 50 % der Messwerte innerhalb einer Woche oberhalb des Zielbereichs (nüchtern > 65-95 mg/dl (3,6-5,3 mmol/l), 1 h postprandial \geq 140 mg/dl (7,8 mmol/l) oder 2 h postprandial \geq 120 mg/dl (6,7 mmol/l)) sollte eine Insulintherapie eingeleitet werden. Auch bei einzelnen Messungen von nüchtern \geq 110 mg/dl (6,1 mmol/l) oder postprandial \geq 162 mg/dl (9,0 mmol/l) sollte eine medikamentöse Therapie erfolgen (Kleinwechter et al., 2011), (Landon et al., 2010) (Crowther et al., 2005), da diese Werte kaum diätetisch beeinflusst werden können. Etwa 20 % der Gestationsdiabetikerinnen benötigen eine Insulintherapie (Kleinwechter et al., 2011).

1.3.6 Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie des Diabetes mellitus in der Schwangerschaft richtet sich nach dessen Ätiologie. Bei vorbestehendem Diabetes mellitus Typ 1 wird die notwendige Insulintherapie fortgeführt, es muss jedoch aufgrund der veränderten Stoffwechsellage mit erhöhter Insulinempfindlichkeit und geringerem Insulinbedarf im 1. Trimenon und erhöhtem Insulinbedarf ab dem 2. Trimenon eine Dosisanpassung erfolgen. Bei einem vorbestehenden Diabetes mellitus Typ 2 sollte nach Bekanntwerden der Schwangerschaft eine Umstellung einer oralen Antidiabetikamedikation auf Insulin erfolgen. Bei geplanten Schwangerschaften sollte bereits mindestens drei Monate präkonzeptionell eine normnahe Blutzuckereinstellung mit einem HbA1c < 7 % sowie Umstellung auf eine Insulintherapie erfolgen (Kleinwechter et al., 2014) .

Beim Gestationsdiabetes sollten neben den Blutzuckerselbstmessungen der Schwangeren weitere Parameter in die Therapieentscheidung mit einbezogen werden. So kann auch aufgrund einer fetalen Makrosomie oder eines erhöhten Insulinspiegels im Fruchtwasser die

Indikation zur medikamentösen Therapie gestellt werden (Weiss et al., 1986), (Hopp et al., 1996). Da die gemessenen mütterlichen Blutglukosewerte kaum mit den fetalen Insulinwerten korrelieren, lassen sie nur einen ungenügenden Rückschluss auf die Ausbildung der durch fetalen Hyperinsulinismus bedingten fetalen Makrosomie zu (Kainer et al., 1997). Insulin wird renal eliminiert und kann daher im Fruchtwasser bestimmt werden. Die Einleitung einer Insulintherapie nach Bestimmung der fetalen Insulinkonzentration im Fruchtwasser hat keinen Einfluss auf die Rate an Schwangerschaftskomplikationen, kann jedoch die Inzidenz einer diabetischen Fetopathie und postnatalen Hypoglykämie verringern (Hopp et al., 1996). Aufgrund der Invasivität einer hierzu nötigen Amniosentese wird sie jedoch nicht routinemäßig eingesetzt. Nicht invasiv leicht zu erhebende fetale Parameter, welche in die Therapieentscheidung einfließen sollten, sind jedoch Ultraschallparameter, wie z.B. der Abdominalumfang des Feten. Er gilt im 3. Trimenon als prädiktiv für einen Hyperinsulinismus und ein Geburtsgewicht oberhalb der 90. Perzentile (LGA) und sollte ab der 24. SSW, also wenn die fetale Insulinbildung ausgeprägt ist, alle 2-3 Wochen kontrolliert werden. Ein fetaler Abdominalumfang ab der 75. Perzentile korreliert eng mit einem fetalen Hyperinsulinismus und den damit verbundenen neonatalen Risiken und der Langzeitmorbidität makrosomer Kinder (Schaefer-Graf et al., 2003). Anhand des so bestimmten fetalen Risikos können die maternalen Blutzuckerzielwerte und entsprechend die Therapie dem Risiko angepasst werden. So empfiehlt die DDG in ihrer Leitlinie von 2011 die Einleitung einer Insulintherapie bereits ab einem fetalen Abdominalumfang > 75.Perzentile zum Erreichen niedrigerer Blutzuckerzielwerte, wodurch sowohl die neonatale Morbidität, als auch die Rate an LGA und Sectiones deutlich gesenkt werden kann (Kleinwechter et al., 2011). Da eine zu strenge Blutzuckereinstellung der Mutter mit fetaler Wachstumsretardierung einhergehen kann (Kessel et al., 2007), sollte andererseits bei Feten mit einem niedrigen Risiko für eine Makrosomie und normalem Wachstum (Abdominalumfang 10.- 75. Perzentile) eine moderatere Blutzuckereinstellung erfolgen.

Die medikamentöse Therapie des Gestationsdiabetes erfolgt in der Regel nach dem Schema einer intensivierten konventionellen Insulintherapie (ICT). Nach diesem Schema erfolgt zur Deckung des Basisinsulinbedarfs die morgendliche und abendliche Injektion eines Intermediärinsulins (NPH-Insulin), zu den Mahlzeiten erfolgen Bolusgaben von Normalinsulin oder Insulinanaloga. Dabei richtet sich die angewandte Dosis vor allem nach dem präprandial ermittelten Blutzuckerwert, sowie nach Größe der Mahlzeit, körperlicher Belastung und der Tageszeit. Gestationsdiabetikerinnen zeigen aufgrund der peripheren Insulinresistenz in der Schwangerschaft einen höheren Insulinbedarf als Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 oder 2.

1.3.7 Insulin

Medikament der Wahl ist das Insulin, da hierzu die meisten Erfahrungen im Einsatz während der Schwangerschaft vorliegen. Neben dem Intermediärinsulin (NPH-Insulin) zur Basistherapie werden zur Blutzuckereinstellung in der Schwangerschaft kurzwirksame Insuline zur Bolustherapie, vor allem Humaninsulin und, bei unzureichender Blutzuckersenkung durch Humaninsulin, Insulinanaloga wie Insulin-Aspart und Insulin-Lispro eingesetzt. Studien konnten für beide eine verbesserte postprandiale Blutzuckersenkung gegenüber Humaninsulin und sichere Anwendung in der Schwangerschaft zeigen (Hod et al., 2008), (Lambert & Holt, 2013), (McCance et al., 2008), (Colatrella et al., 2013). Gleiches gilt für das Insulin-Glargin, wobei die Studienlage hierzu schlechter ist. Aufgrund fehlender Studien sollte Insulin-Glulisin nicht in der Schwangerschaft verwendet werden (Lambert & Holt, 2013). Bei bereits präkonzeptionell bestehender guter Blutzuckereinstellung mittels der o.g. in der Schwangerschaft als unbedenklich anzusehenden Insulinanaloga, kann diese Therapie fortgeführt werden. Andernfalls ist der Einsatz von Humaninsulin zu empfehlen (Kleinwechter et al., 2014). Das langwirksame Insulinanalogon Insulin-Detemir zeigt im Vergleich zum derzeit verwendeten NPH-Insulin eine Verbesserung

der Nüchternglukose, jedoch keinen positiven Einfluss auf das perinatale Ergebnis. Da der Vorteil der Insulinanaloga in der Risikoverminderung für das Auftreten postprandialer Hyperglykämien liegt, welches bei Gestationsdiabetikerinnen ohnehin gering ist, scheint ihr Einsatz vor allem in der Therapie des Typ-1-Diabetes in der Schwangerschaft von Vorteil zu sein (Lambert & Holt, 2013).

1.3.8 Orale Antidiabetika

Der Einsatz oraler Antidiabetika in der Schwangerschaft erfolgt aufgrund fehlender Zulassung und Studien derzeit nicht routinemäßig. Einige Studien belegen, dass der Einsatz oraler Antidiabetika, wie z. B. das Biguanidpräparat Metformin und das Sulfonylharnstoffpräparat Glibenclamid, hinsichtlich Erreichen der Blutglukosezielwerte und Reduktion mütterlicher und fetaler Risiken im Vergleich zum Insulin gleichwertig sind. Für eine erhöhte Fehlbildungsrate gibt es keine Hinweise (Nicholson et al., 2009). Eine Studie von Rowan et. al. (Rowan et al., 2008) konnte zeigen, dass Metformin im Vergleich zu Insulin bei einer mittleren Tagesdosis von 2500 mg nicht zu einer Erhöhung der Rate an perinatalen Komplikationen führt. Es bestanden außerdem keine signifikanten Unterschiede in den fetalen anthropometrischen Messungen oder der Serum-Insulinkonzentration im Nabelschnurblut. Die Häufigkeit schwerer Hypoglykämien (Glukose < 28,8 mg/dl, < 1,6 mmol/l) unter Metformintherapie zeigte sich sogar um 4,8 % geringer als unter Insulintherapie. Ebenso zeigten die mit Metformin therapierten Frauen eine geringere Gewichtszunahme während der Schwangerschaft. Von den mit Metformin therapierten Schwangeren benötigten 46,3 % eine zusätzliche Insulintherapie. Die benötigte Insulindosis und die Gewichtszunahme, als Nebenwirkung einer Insulintherapie, war hier geringer als unter alleiniger Insulintherapie. Obwohl die Frühgeburtlichkeitsrate bei den mit Metformin therapierten Frauen höher war, stellt Metformin nach Meinung der Autoren eine sichere Therapiealternative zum Insulin dar.

Metformin passiert die Plazentaschranke und kann im fetalen Blut bis zu 50 % der mütterlichen Konzentration erreichen (Charles et al. 2006), (Kovo et al., 2008).

Für das Sulfonylharnstoffpräparat Glibenclamid (Glyburid) konnten ähnliche Ergebnisse gezeigt werden. Sulfonylharnstoffe sind insulinotrope Substanzen, welche die Insulinsekretion durch Verbesserung der Ansprechbarkeit der β -Zellen des Pankreas auf Glukose steigern. Da sie im Gegensatz zum Metformin direkt an der β -Zelle wirken, besteht die Gefahr einer Hypoglykämie bei falscher Dosierung. Eine Studie von Langer et al. (Langer et al., 2000) konnte zeigen, dass keine Unterschiede zwischen Insulintherapie und Glibenclamidtherapie bezüglich maternaler und fetaler Komplikationen bestehen. Hierzu gehörten u.a. Präeklampsie, LGA, Makrosomie, postnatale Hypoglykämie und fetale Anomalien. Die erreichte Blutzuckerkontrolle war ebenfalls bei beiden Substanzen ähnlich, die neonatale Hypoglykämierate war jedoch unter Glibenclamidtherapie um 3 % höher als unter Insulintherapie. Ein Vorteil gegenüber dem Metformin könnte in der bisher nicht nachgewiesenen Plazentagängigkeit der neueren Sulfonylharnstoffe, wie z.B. dem Glibenclamid, liegen. Langer et al konnten dies durch fehlenden Nachweis von Glibenclamid im Nabelschnurserum sowie in direkt postpartal untersuchten Plazenten weitgehend ausschließen. Glibenclamid stellt also bei Einsatz nach Abschluss der Organogenese eine Alternative zum Insulin dar.

Die Thiazolidindione (Rosiglitazon und Pioglitazon) gehören wie die Biguanide zu den nicht-insulinotropen oralen Antidiabetika und bewirken durch Verbesserung der Empfindlichkeit der peripheren Zellen für Insulin durch Aktivierung eines PPAR- γ - Rezeptors eine Senkung der Insulinresistenz.

Weitere orale Antidiabetika, wie z.B. α -Glukosidasehemmer, Glinide, GLP-1-Analoga und DDP-4 Hemmer werden derzeit aufgrund fehlender Zulassung und Studien nicht während der Schwangerschaft und Stillzeit eingesetzt.

Stoffwechselveränderungen während der Schwangerschaft können die pharmakokinetischen Eigenschaften von Medikamenten verändern, so dass gegebenenfalls eine Dosisanpassung erfolgen muss. Ob ein Medikament plazentagängig ist, hängt von mehreren Faktoren ab: physiochemische Eigenschaften des Medikaments (z.B. Molekulargewicht oder Proteinbindung), physiologische Eigenschaften der Plazenta (z.B. Gestationsalter, transplazentarer Blutfluss) und das Vorhandensein und die Aktivität von Enzymen zur Metabolisierung und Effluxtransportern. Effluxtransporter befinden sich auf der apikalen Seite der Synzytiotrophoblasten und beeinflussen durch Exkretion von Stoffwechselprodukten und Medikamenten die fetale Exposition gegenüber diesen Substanzen (Hemauer et al., 2010). In der Plazenta konnten bisher P-Glycoprotein, MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1) und BRCP (breast cancer resistance protein) nachgewiesen werden (St-Pierre et al., 2000). Da Medikamente um diese Transportproteine konkurrieren und orale Antidiabetika häufig in einer Kombinationstherapie aus mehreren Präparaten verwendet werden, hat dies einen Einfluss auf die Konzentration in der fetalen Zirkulation und damit auf die fetale Exposition. So hemmt Metformin den transplazentaren Efflux von Rosiglitazon bei gleichzeitiger Therapie um ca. 69 % (Hemauer et al., 2010). Solche Medikamenteninteraktionen und ihre Folgen für den Fetus müssen bei der Wahl der oralen Antidiabetika in der Therapie des Gestationsdiabetes mit bedacht werden.

1.4 Metformin und Thiazolidindion

1.4.1 Metformin

Metformin ist ein Biguanid-Derivat und gehört zu den nicht-insulinotropen oralen Antidiabetika. Es ist Mittel der Wahl zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 bei adipösen Patienten und kann sowohl als Monotherapie in Kombination mit diätetischen Maßnahmen als auch in Kombination mit anderen oralen Antidiabetika oder Insulin eingesetzt werden. Es führt zu einer Senkung der Mortalität um 36 % im Vergleich zur diätetischen Therapie

(UKPDS UK Prospective Diabetes Study Group, 1998). Da es nicht direkt die Insulinsekretion an den β -Zellen des Pankreas stimuliert, bleiben insulinabhängige Nebenwirkungen, z. B. Hypoglykämie und Gewichtszunahme, aus. Andererseits ergibt sich daraus ein möglicher Einsatz nur bei Patienten mit erhaltener Insulinsekretion, wie es beim Diabetes mellitus Typ 2 oder Gestationsdiabetes der Fall ist. Der Wirkmechanismus auf molekularer Ebene ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Die Wirkung beruht wahrscheinlich auf einer Senkung der hepatischen Glukoseproduktion durch Hemmung der Glukoneogenese und Glykogenolyse. Außerdem stimuliert Metformin durch Aktivierung der Glykogensynthase die zelluläre Glykogensynthese. Eine verbesserte Glukoseverwertung in den peripheren Zellen wird durch eine dem Insulin ähnliche Translokation an die Zelloberfläche und gesteigerte Transportkapazität der Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-4 ermöglicht. Metformin scheint auch die Bindung von Insulin an dessen Rezeptoren zu verstärken und in Postrezeptoreffekte einzutreten. Zur Blutzuckersenkung trägt außerdem eine Hemmung der intestinalen Glukoseresorption bei. Des Weiteren besitzt Metformin günstige Wirkungen auf den Fettstoffwechsel, wie eine Senkung des VLDL, Erhöhung des HDL und Senkung der Plasmaspiegel von Triglyceriden, LDL- und VLDL-Cholesterin. Da Metformin nicht zu einer direkten Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas führt, ist die Hypoglykämiegefahr unter der Metformintherapie gering. Die größte Gefahr in der Anwendung von Metformin geht von einer Laktatazidose aus, welche bei Überdosierung oder verminderter renaler oder hepatischer Elimination sowie bei Vorliegen hypoxischer Zustände auftreten kann. Weitere Nebenwirkungen sind gastrointestinale Störungen, metallischer Geschmack, sowie selten allergische Hautreaktionen. Bezuglich der Anwendung in Schwangerschaft und Stillzeit haben tierexperimentelle Studien für Metformin keine Reproduktionstoxizität gezeigt, dass potentielle Risiko für den Menschen ist allerdings nicht bekannt. Da Metformin in geringen Mengen auch in die Muttermilch sezerniert wird, ist eine Anwendung in der Stillzeit aufgrund der Gefahr einer Hypoglykämie bei Neugeborenen

kontraindiziert (Mutschler et al., 2008). Metformin ist ein Substrat organischer Kationentransporter, von denen der OCT 2 und 3 moderate bis hohe Expression in der humanen Plazenta zeigt (Kovo et al., 2008). Es passiert die Plazentaschranke und kann im fetalen Blut bis zu 50 % der mütterlichen Konzentration erreichen (Charles et al., 2006), (Kovo et al., 2008), so dass von einer gewissen Exposition des Fetus bei Gebrauch in der Schwangerschaft ausgegangen werden muss, wobei es keine Daten über den Metforminmetabolismus des Feten gibt. In Folgeuntersuchungen an 2-jährigen Kindern von während der Schwangerschaft mit Metformin behandelten Müttern konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu Kindern, dessen Mütter in der Schwangerschaft mit Insulin therapiert worden sind, mehr subkutanes als intraabdominelles Körperfett besaßen. Diese Fettverteilung wiederum spricht für eine höhere Insulinsensitivität, so dass sich der Effekt der Steigerung der Insulinsensitivität der peripheren Zellen unter Metformintherapie möglicherweise auch auf die Kinder der Gestationsdiabetikerinnen auswirkt (Rowan et al., 2011).

1.4.2 Thiazolidindione

Glitazone (Thiazolidindione) gehören ebenso wie Metformin zu den nicht-insulinotropen oralen Antidiabetika und werden auch als „Insulinsensitizer“ bezeichnet. Sie werden in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 in der Kombinationstherapie mit Metformin bei übergewichtigen Patienten oder mit Sulfonylharnstoffen bei Metforminunverträglichkeit oder -kontraindikationen eingesetzt. Die Kombination von Rosiglitazon mit Insulin ist aufgrund einer erhöhten Inzidenz von Herzinsuffizienz kontraindiziert. Zu den Thiazolidindionen zählen Pioglitazon, Troglitazon und Rosiglitazon. Sie verringern die Insulinresistenz durch Aktivierung des γ -Subtyps des PPAR (Peroxisomal Proliferator Activated Receptor) (Lehmann et al., 1995), welcher als intrazellulärer Rezeptor mit dem RXR (Retinoid-X-Rezeptor) heterodimerisiert. Dieser aktivierte Rezeptorkomplex führt durch Interaktion mit

der DNA zur Transkription verschiedener Gene, welche u.a. Schlüsselproteine für insulinabhängige Prozesse kodieren (Matthaei et al., 2001). Die Wirkung der Thiazolidindione umfasst daher neben gesteigerter peripherer Glukoseaufnahme durch vermehrte Translokation und Expression von Glukosetransportern auch eine Senkung der hepatischen Glukoneogenese und Erhöhung der Glykolyse und Hemmung der Lipidsynthese (Schoonjans et al., 1997). Neben Stoffwechselvorgängen wird durch diesen Wirkmechanismus auch als Folge der vermehrten Expression adipozytenspezifischer Gene die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten verstärkt (Tafuri, 1996). Thiazolidindione bewirken neben einer Senkung des HbA_{1c} und der Nüchternblutglukose auch eine Senkung der Triglyceride, freien Fettsäuren und des C-Peptids im Serum, während die HDL-Konzentration steigt (Mutschler et al., 2008). Zu den Nebenwirkungen der Thiazolidindione gehören neben gastrointestinalen Symptomen und leichter Neutropenie auch eine bei Typ-2-Diabetikern unerwünschte dosisabhängige Gewichtszunahme von 1-3 kg innerhalb von 6 Monaten nach Therapiebeginn (Matthaei et al. 2001), (Mori et al., 1999). Das Präparat Troglitazon wurde bereits im März 2000 aufgrund schwerer hepatischer Komplikationen vom US-Markt genommen. Im Vergleich zu Pioglitazon zeigte sich in einer 2010 veröffentlichten Studie bei Anwendung von Rosiglitazon bei Patienten über 65 Jahren außerdem das Risiko von Schlaganfällen, Herzinsuffizienz und Tod signifikant erhöht (Graham et al., 2010), so dass auf Beschluss der europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) im Herbst 2010 auch die Zulassung für Rosiglitazon entzogen wurde. In den USA wurde eine vorübergehende Einschränkung der Anwendung von Rosiglitazon von der FDA (Food And Drug Administration) wieder gelockert. Studien konnten für Pioglitazon ein im Vergleich zu Rosiglitazon dosisabhängig erhöhtes Blasenkarzinomrisiko nachweisen (Turner et al., 2014).

Laut Herstellerinformationen sind sowohl Pioglitazon als auch Rosiglitazon plazentagängig. In Tierstudien zeigte sich bei Anwendung von Pioglitazon keine Veränderung der Fertilität,

jedoch eine fetale Wachstumsretardierung und Übergang des Medikamentes in die Muttermilch. Für Rosiglitazon wurde in tierexperimentellen Studien eine Reproduktionstoxizität gezeigt, es passiert außerdem die Plazentaschranke und geht in die Muttermilch über (Herstellerinformation Glustin), (Herstellerinformation Avandia).

Der Wirkmechanismus der Thiazolidindione beruht, wie oben beschrieben, auf einer Stimulation des PPAR- γ -Rezeptors. PPAR- γ wird auch auf Zytotrofoblasten und Syncytiotrophoblasten der humanen Plazenta exprimiert (Fournier et al., 2007). An Versuchen in PPAR- γ -knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von PPAR- γ in Embryonen zu einem Fehlen von braunem Fettgewebe führt und sich auch in der weiteren Entwicklung kein weißes Fettgewebe entwickelt, da PPAR- γ eine wichtige Rolle in der Differenzierung der Adipozyten spielt. Mit Rosiglitazon behandelte schwangere Mäuse zeigten außerdem eine Desorganisation der normalen Plazentastruktur und Veränderung der materno-fetalen Oberfläche. Dieselbe Studie konnte zeigen, dass die Exposition der Mäuse gegenüber Rosiglitazon eine Hemmung der plazentaren Angiogenese durch verminderte plazentare Expression der Angiogenesefaktoren Prl2c2 und VEGF zur Folge hat. Die PPAR- γ vermittelte Hemmung der Angiogenese hat negative Folgen für die Entwicklung der Plazenta, woraus eine Beeinträchtigung der maternalen Blutzufuhr zum Feten und damit fetale Wachstumsretardierung resultiert (Nadra et al., 2010).

1.5 Plazenta und Hormone (Östrogen und Progesteron)

Östrogene und Gestagene gehören zu den wichtigsten weiblichen Sexualhormonen. Beide Hormone sind Steroide, welche neben der Nebennierenrinde auch in der Plazenta, den Ovarialfollikeln und dem Corpus luteum, bei Männern auch im Hoden, gebildet werden. Ihre Synthese unterliegt einem Regelkreis. Das im Hypothalamus gebildete LHRH (luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon) regt die Produktion und Sekretion von LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (folikelstimulierendes Hormon) in der Hypophyse an,

wobei LH die Östrogensynthese und FSH die Progesteronsynthese steuert. Die LHRH-Sekretion wird nach dem Prinzip der negativen und positiven Rückkopplung wiederum durch Progesteron und niedrige Östrogenkonzentrationen gehemmt, bei hohen Östrogenkonzentrationen stimuliert. Auch die Gonadotropinsekretion (LH und FSH) wird durch niedrige Östrogenkonzentrationen und Progesteron gehemmt und durch hohe Östrogenkonzentrationen stimuliert.

Während des Menstruationszyklus stimulieren LH und FSH gemeinsam die Follikelreifung, LH induziert die Ovulation und Bildung des Corpus luteum und Östrogen und Progesteron bewirken zyklusabhängige Veränderungen an den Organen des weiblichen Reproduktionstraktes. Nach Befruchtung einer Eizelle wird das Corpus luteum durch Progesteron und in der Blastozyste gebildetes HCG (humanes Choriongonadotropin) aufrechterhalten. Bei ausbleibender Befruchtung der weiblichen Eizelle bildet sich das Corpus luteum zurück, wodurch die Östrogen- und Progesteronkonzentrationen sinken und die negative Rückkopplung auf den Hypothalamus und die Hypophyse entfällt (Haag & Hanhart, 2010).

Während der Schwangerschaft finden Veränderungen der mütterlichen Steroidsynthese statt, während zusätzlich die fetoplazentare Einheit in der Lage ist, Steroidhormone zu synthetisieren. Endogenes Östrogen und Progesteron ist für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft von Bedeutung und ihre Konzentrationen im Serum lassen einen Rückschluss auf die Funktion der Plazenta zu. Die Serumkonzentrationen von 17β -Östradiol, Progesteron und 17α -Hydroxyprogesteron nehmen im Verlauf einer gesunden Schwangerschaft stetig zu. Dabei steigt die Östradiolkonzentration bis zur 32. SSW um das 6fache des Ausgangswertes an, die Konzentration des 17α -Hydroxyprogesteron um das 3,5-fache des Ausgangswertes (Soldin et al., 2005). Eine geringe Serumkonzentration an

unkonjugiertem Östradiol ist mit einer erhöhten Rate an Schwangerschaftskomplikationen und fetaler Morbidität assoziiert (Gagnon et al., 2008), (Kundu et al., 1978).

1.5.1 Östrogen

Die Östrogenkonzentration steigt während der gesamten Schwangerschaft kontinuierlich an. Östrogene (Östradiol und Östriol) werden initial vom Folliklelepithel der Tertiärfollikel gebildet, später dann vom Corpus luteum und nach Befruchtung der Eizelle von den Trophoblastzellen der Plazenta. Die chemischen Vorstufen dieser in der Plazenta synthetisierten Östrogene werden anfangs in der mütterlichen, später dann in der fetalen Nebennierenrinde synthetisiert. Neben der Ausbildung der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale der Frau sind sie während des Menstruationszyklus auch für die Proliferation des Myo- und Endometriums des Uterus, Angiogenese und Veränderung des Zervixschleims von Bedeutung (Haag & Hanhart, 2010). Zu den wichtigsten Funktionen während der Schwangerschaft gehört neben der Beeinflussung der Progesteronbiosynthese (Albrecht et al., 2000) und der Einleitung der Geburt durch einen deutlichen Östrogenanstieg am Ende der Schwangerschaft (Gibb et al., 2006) auch die Beeinflussung der plazentaren Angiogenese und der fetalen Entwicklung der Ovarien. Östrogen hat insbesondere in der ersten Schwangerschaftshälfte einen Einfluss auf die Expression des endothelialen Wachstumsfaktors VEGF (vascular endothelial growth factor) (Albrecht & Pepe, 2010), welcher von Zytotrophoblasten, Syncytiotrophoblasten und Hofbauermakrophagen der Plazenta synthetisiert wird (Ahmed et al., 1995). Der Östrogen-induzierte Anstieg des VEGF bewirkt, im Zusammenspiel mit anderen Wachstumsfaktoren, eine Anordnung der vaskulären Endothelzellen zu Kapillaren, um die für die Entwicklung des Feten nötige maximale Blutversorgung über die Plazenta zu gewährleisten (Albrecht & Pepe, 2010). Die Steigerung des uterinen Blutflusses durch gesteigerte Angiogenese und endotheliale Anpassungsvorgänge wird somit zumindest partiell durch endogenes Östrogen gesteuert

(Pastore et al., 2012). Eine weitere Funktion des Östrogens in der Schwangerschaft ist die Modulation des mütterlichen Immunsystems. So kann Östradiol die immunsuppressive Funktion der CD4⁺ CD25⁺ regulatorischen T-Zellen durch Steigerung der Proliferation erhöhen. Diese wiederum bewirken eine Suppression der Effektorzellen, wodurch eine autoimmunologische Reaktion auf väterliche Antigene des Feten verhindert wird (Prieto & Rosenstein, 2006). Eine niedrige Anzahl von CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen scheint wiederum mit dem Risiko eines spontanen Abortes assoziiert. (Sasaki et al., 2004) Diese Veränderungen führen nicht zu einer Immunsuppression der Mutter, sondern lediglich zu einer Veränderung der Immunlage hin zu einem antiinflammatorischen Phänotyp (Robinson & Klein, 2012).

1.5.2 Progesteron

Progesteron wird bis zur 10. SSW vom Corpus luteum graviditatis, danach von den Trophoblastzellen der Plazenta gebildet (Zhuang et al., 1991) und steigt ebenso wie das Östrogen während der Schwangerschaft kontinuierlich an. Es ist das wichtigste Hormon zur Schwangerschaftserhaltung, da es die für die Einnistung der befruchteten Eizelle nötigen Veränderungen des Endometriums und später auch die Proliferation des Brustdrüsengewebes bewirkt. Des Weiteren hat es immunoprotektive Funktionen, es steigert die T-Suppressorzellsynthese und führt zur Ausbildung antigenmaskierender Antikörper gegen väterliche Antigenanteile des Embryos, wodurch eine Abstoßung der Frucht verhindert wird (Haag & Hanhart, 2010). Progesteron inhibiert die Th1-Immunantwort und fördert die TH2-Immunantwort (Robinson & Klein, 2012). Erhöhte Progesteronkonzentrationen im 2. Trimester sind mit einer reduzierten Aktivität regulatorischer T-Zellen (Mjösberg et al., 2009) und Suppression der Antikörperbildung assoziiert. Eine Studie von Gailego et al an pluripotenten humanen Embryonenstammzellen, in der der Einfluss von Opioiden und Progesteron auf die frühe Embryogenese untersucht worden ist, konnte zeigen, dass die Hemmung der Progesteronwirkung durch den Progesteronantagonisten RU-486 das

Ausbleiben der normalen Entwicklung zystischer Strukturen des Embryos zur Folge hat. Auch die Differenzierung der Stammzellen zu neuroektodermalen Rosetten bleibt nach Antagonisierung der Progesteronwirkung aus (Gallego et al., 2009). Andere Studien haben außerdem gezeigt, dass eine Blockade der Progesteronwirkung mittels des Progesteronrezeptorantagonisten RU-486 zu einer Degeneration der endometrialen Dezidua, Minderung der Trophoblastenhaftung am Endometrium und verringelter β -HCG- und Progesteronsynthese der Synzytiotrophoblasten führt. Des Weiteren wird nach Antagonisierung der Progesteronwirkung eine Weitung des Zervikalkanals, vermehrte Freisetzung von und Ansprechbarkeit des Myometriums auf Prostaglandine beobachtet, was zu einem Verlust der Frucht führt (Fiala & Danielsson, 2006).

2. Zielstellung

Gestationsdiabetes und Diabetes mellitus in der Schwangerschaft zählen zu den häufigsten Komplikationen einer Schwangerschaft. Bei etwa 1 % der Schwangeren besteht ein präkonzeptionell bekannter Diabetes mellitus, der Gestationsdiabetes liegt bei ca. 2-6 % der Schwangeren vor. Es handelt sich dabei um eine Stoffwechselerkrankung, welche durch absoluten oder relativen Mangel an Insulin zu einer chronischen Hyperglykämie führt. Um den maternalen und fetalen Risiken dieser Hyperglykämie vorzubeugen, ist eine frühzeitige Diagnostik und entsprechende Therapie unverzichtbar. Entsprechend der deutschen und internationalen Leitlinien erfolgt die Therapie derzeit mit Insulin. Obwohl es für einige der beim Typ-2-Diabetes an Nicht-Schwangeren zugelassenen oralen Antidiabetika in Studien keine Hinweise auf eine erhöhte Fehlbildungsrate gibt und einige dieser Medikamente gleichzeitig mit einem geringeren Risiko an Nebenwirkungen, wie z.B. Hypoglykämien und Gewichtszunahme, einhergehen, werden diese aufgrund fehlender Studien bisher nicht in der Therapie des Gestationsdiabetes eingesetzt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von zwei der oralen Antidiabetika, Metformin und Glitazone, auf die Hormonsekretion von humanen Trophoblastzellen zu untersuchen, um daraus Rückschlüsse auf mögliche Risiken für deren Einsatz in der Schwangerschaft zu ziehen. Hierfür wurden die aus Plazenten des 3. Trimenon isolierten Trophoblastzellen in einem Kulturmedium mit verschiedenen Konzentrationen der Medikamente versetzt und deren Einfluss auf die Sekretion der zur Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft notwendigen Hormone Östrogen und Progesteron sowie auf den Glukosestoffwechsel untersucht. In diesem Zusammenhang wurde außerdem der Einfluss der beiden untersuchten Medikamente auf die Vitalität der Trophoblastzellen untersucht. Dies erfolgte zum einen durch die mikroskopische Darstellung der Fusion von Trophoblastzellen zu Synzytiotrophoblasten in einem mit den Medikamenten versetzten Zellkulturmedium. Zum anderen erfolgte eine Quantifizierung mittels zweier biochemischer Zytotoxizitätstests.

3. Hypothesen

- Metformin und Thiazolidindion besitzen keine zytotoxische Wirkung auf humane Trophoblastzellen.
- Metformin und Thiazolidindion besitzen keinen Einfluss auf die Glukosekonzentration im Zellkulturmedium.
- Metformin bedingt keine verminderte Östrogenexpression humaner Trophoblastzellen.
- Thiazolidindion bedingt keine verminderte Östrogenproduktion humaner Trophoblastzellen.
- Metformin bedingt keine verminderte Progesteronexpression humaner Trophoblastzellen.
- Thiazolidindion bedingt keine verminderte Progesteronproduktion humaner Trophoblastzellen.
- Metformin und Thiazolidindion besitzen keinen Einfluss auf die PIGF-Expression humaner Trophoblastzellen.

Das für das experimentelle Arbeiten mit primären Trophoblastzellkulturen aus humanen Plazenten nötige Votum der Ethikkommission der Universität Rostock wurde bereits für die Dissertationsarbeit von Dr. Maria Petereit eingeholt, in welcher nach identischer Methodik die Isolation von Trophoblastzellen erfolgt (Petereit, 2010).

4. Material

4.1 Plazenta

Die für die Isolation der Trophoblastzellen verwendeten Plazenten stammten aus der Universitätsfrauenklinik Rostock. Die Plazenten stammten sowohl von vaginalen Entbindungen, als auch von Sectiones im III.Trimenon. Nach Begutachtung durch die Hebamme wurden die Plazenten in der vorbereiteten Lösung gelagert, bevor sie im Forschungslabor aufgearbeitet wurden.

4.2 Antibiotika und Antikoagulantien für die Aufbewahrung der Plazenten

- Amphotericin B (Fungizone, 250 UGML, GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland)
- Streptomyin-Solution (10 000 Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin/ml 0,9 % NaCl, Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Deutschland)
- Heparin-Natrium-250000-ratiopharm (Antikoagulat, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland, Heparin-Natrium 250 000 IE/10 ml H₂O)

4.3 Lösungen, Puffer und Chemikalien zur Trophoblastisolierung siehe Anhang 1

4.4 Zellkulturmedium

450 ml DMEM (= Dulbecco`s Modified Eagle Medium + Phenolrot + Glutamin) + 50 ml FKS (10%ig) + 5 ml Streptomycin Solution + 2,5 ml Amphotericin (pH 7,4)

4.5 Medikamente

- 1,1- Dimethylbiguanid- Hydrochloride (Metformin)
Firma: Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- 2,4- Thiazolidinedione (Glitazon)
Firma: Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

4.5.1 Medikamentenverdünnungen

- Medikamentenverdünnungen des 1,1- Dimethylbiguanid- Hydrochlorid:

Stammlösung: 1 g/ 1 ml DMSO (Dimethylsulfoxid)

750 mg/ml (750 µl Stammlösung + 250 µl NaCl 0,9%)

500 mg/ml (500 µl Stammlösung + 500 µl NaCl 0,9%)

250 mg/ml (250 µl Stammlösung + 750 µl NaCl 0,9%)

125 mg/ml (125 µl Stammlösung + 875 µl NaCl 0,9%)

- Medikamentenverdünnungen des 2,4- Thiazolidinedione:

Stammlösung 1: 40 mg/ 1 ml DMSO (Dimethylsulfoxid)

15 mg/ml (750 µl Stammlösung + 250 µl NaCl 0,9%)

10 mg/ml (500 µl Stammlösung + 500 µl NaCl 0,9%)

Stammlösung 2: 10 mg/ 1 ml DMSO

7,5 mg/ml (750 µl Stammlösung + 250 µl NaCl 0,9%)

5,0 mg/ml (500 µl Stammlösung + 500 µl NaCl 0,9%)

2,5 mg/ml (250 µl Stammlösung + 750 µl NaCl 0,9%)

4.6 Biochemische Assays

- Cytotoxicity Detection Kit (LDH)

Firma: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

- CellTiter- Blue® Cell Viability Assay

Firma: Promega Corporation, Madison, WI, USA

4.7 Immunhistochemische Assays

- ImmPRESS™ UNIVERSAL REAGENT Anti-Mouse/Rabbit Ig
Firma: Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
- HISTOPRIME® LinRed (R.T.U.)
Firma: LINARIS Biologische Produkte GmbH, Wertheim- Bettingen, Deutschland
- Quantikine® Human PIGF
Firma: R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA

5. Methoden

5.1 Isolierung der Trophoblastzellen

Die Isolation der Trophoblastzellen erfolgte nach den Methoden von Kliman et al. (Kliman et al. 1986) und mit Modifikationen von Jeschke et al. (Jeschke et al. 1996).

Die Plazenta wird von der Geburt bis zur Verarbeitung in einer mit Natrium-Heparin, Streptomycin/Penicillin und Amphotericin B versetzter 0,9%-iger NaCl-Lösung aufbewahrt.

Die sterile Präparation der Plazenta erfolgt unter einer Vertikalstrombank. Zuerst wird die maternale Seite der Plazenta mit einer Schere in ihre Kotyledone zerteilt, wobei diese vorsichtig von der grauen Dezidua abgelöst werden müssen. Dann werden die Kotyledone in drei aufeinanderfolgende Bechergläser mit steriler 0,9%-iger NaCl-Lösung überführt, um sie von Blut zu reinigen und ihr Austrocknen zu verhindern. Anschließend wird von jedem der Kotyledone mit Hilfe einer Skalpellklinge und einer anatomischen Pinzette das Plazentagewebe zwischen dem Gefäß- und Bindegewebe abpräpariert. Die so erhaltenen 50 ml des Gewebes werden in eine sterile 500 ml Flasche überführt. Um die Trophoblastzellen aus diesem Gewebe zu isolieren, sind im Folgenden mehrere Verdauungsschritte mit Trypsin und DNase I nötig.

Die einzelnen Verdauungsschritte werden folgendermaßen durchgeführt:

Verdauungsschritt 1:

142,55 mg Trypsin und 5 mg DNase I werden in 12,6 ml HBSS-Hepes-Puffer gelöst und zum Trophoblastzellgewebe hinzugefügt. Diese Lösung wird dann 10 min bei 37°C unter ständigem Rotieren inkubiert. Anschließend werden nochmals 5 mg DNase I zur Lösung gegeben und diese weitere 10 min bei 37°C wie o.g. behandelt. Nachdem die Gewebeteile sedimentiert sind, werden mit einer sterilen Pipette je 35 ml des Überstandes abgenommen, durch sterile Gaze (Porengröße 40 µm) gefiltert und in zwei 50 ml Zentrifugationsröhren überführt. Jede der beiden Lösungen wird dann mit 3,25 ml steriles NBCS (Neonatales

Bovines Kälberserum) unterschichtet, wodurch der enzymatische Verdauungsvorgang abgebrochen wird. Die Röhrchen werden dann bis zur weiteren Verarbeitung bei 8°C gelagert.

Verdauungsschritt 2:

94,95 mg Trypsin und 5 mg DNase I werden in 75 ml HBSS –Hepes-Puffer gelöst und zum restlichen Trophoblastzellgewebe gegeben. Die Lösung wird dann 20 min bei 37°C unter ständigem Drehen inkubiert, anschließend wird wie im Verdauungsschritt 1 verfahren, die zwei weiteren Zentrifugationsröhren werden ebenfalls bei 8°C gelagert.

Verdauungsschritt 3:

75,0 mg Trypsin und 5 mg DNase I werden in 47,5 ml HBSS-Hepes-Puffer gelöst und zum Trophoblastzellgewebe hinzugefügt , alles weitere erfolgt wie in den beiden vorangegangenen Verdauungsschritten.

Alle sechs gewonnenen Röhrchen werden 10 min bei 2500 U/min und Raumtemperatur ohne Abbremsen zentrifugiert, der Überstand wird dekantiert. Jetzt folgt die Erythrolyse.

Die erhaltenen Zellsedimente werden in je 15 ml eiskaltem, destilliertem Wasser gelöst, wodurch die noch enthaltenen Erythrozyten lysieren. Um den physiologischen Salzgehalt wieder herzustellen, werden danach 7,5 ml 2,7%-iger NaCl-Lösung hinzugegeben. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1800 U/min und Dekantieren wird der Vorgang so lange wiederholt, bis die Zellpellets weiß, d.h. frei von Erythrozyten sind. Die Überstände werden dekantiert.

Während der Erythrolyse wird schon die Percoll-Gradienten- Zentrifugation vorbereitet.

6 mg DNase I und 60 ml DMEM –Hepes-Puffer werden in einem Becherglas gemischt. Von dieser Lösung werden je 8,25 ml zu den Zellpellets pipettiert. Dabei werden zuerst 8,25 ml

der Lösung in die Röhrchen 1,3 und 5 gegeben, mittels Vortexer werden die Zellpellets gelöst und der Inhalt in die Röhrchen 2,4 und 6 überführt. Mit weiteren 8,25 ml werden die Röhrchen 1,3 und 5 nochmals ausgespült und der Inhalt in die Röhrchen 2,4 und 6 umgefüllt. Jetzt sind drei Zentrifugationsröhren mit jeweils 17,5 ml DMEM-Hepes-DNAse I-Lösung und den Zellpellets vorhanden. Diese werden 10 min bei 1800 U/min und Raumtemperatur ohne Abbremsen zentrifugiert, die Überstände werden dekantiert. Das Zellpellet des ersten Röhrchens wird mit 2-3 ml HBSS-Hepes-Puffer gelöst, in das zweite Röhrchen, und nach Lösen in das dritte Röhrchen überführt. Mit einem weiteren ml HBSS-Hepes-Puffer werden die beiden ersten Röhrchen nochmals ausgespült, um möglichst alle Trophoblastzellen mit zu überführen.

Aus den erhaltenen 4 ml Zellsuspension müssen die Trophoblastzellen durch Percoll-Gradienten-Zentrifugation von den anderen darin enthaltenen Zellaggregaten separiert werden.

Percoll-Gradienten-Zentrifugation:

In ein spitzes 50-ml-Zentrifugationsröhren werden in absteigender Dichte die Percoll-Lösungen unterschichtet, beginnend mit 4 ml der niedrigsten Konzentration, welche dann mit der jeweilig nächsthöheren Konzentration unterschichtet wird. So erhält man einen 6-schichtigen Percoll-Gradienten (70-, 60-, 50-, 40-, 30-, 20-%ig), der anschließend vorsichtig mit 4 ml der Zellsuspension überschichtet wird. Dann wird 20 min bei 3000 U/min und Raumtemperatur ohne Abbremsen zentrifugiert, wodurch die unterschiedlichen Zellpopulationen voneinander getrennt werden. Die Trophoblastzellen finden sich anschließend zwischen der 3. und 4. Bande und müssen mit einer Spritze vorsichtig abgezogen und in ein 50-ml-Zentrifugationsröhren überführt werden.

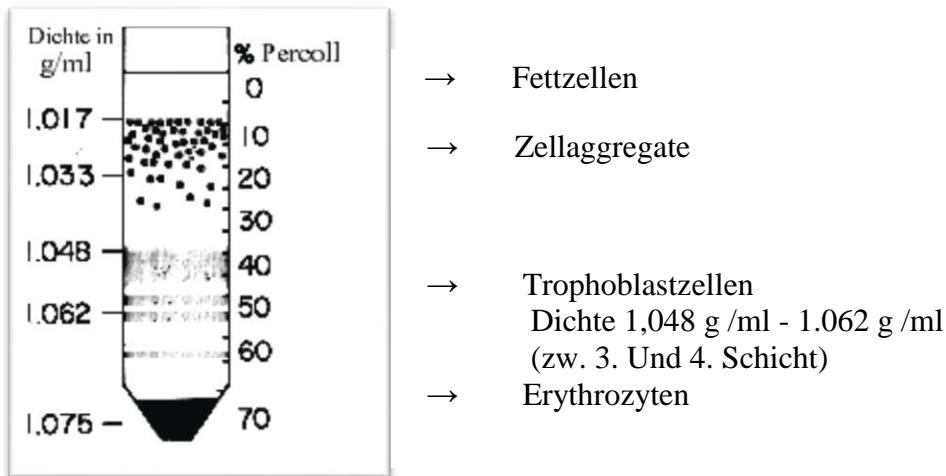


Abbildung 5a: Bandenverteilung nach Percoll-Gradienten-Zentrifugation (modifiziert nach Kliman (Kliman, 1999))

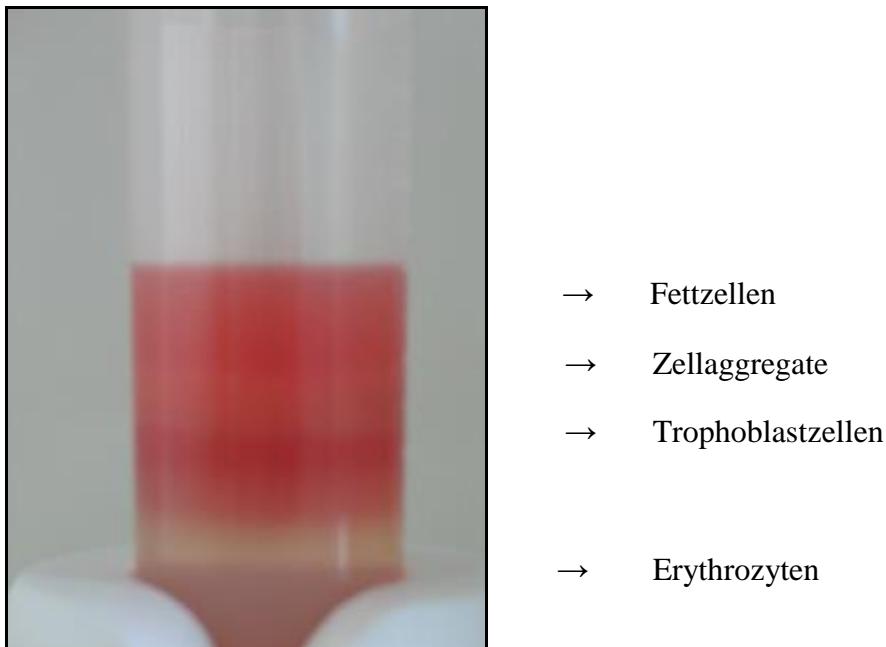


Abbildung 5b: Percoll-Gradient nach Zentrifugation (experimentelle Arbeit aus dem Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock)

5.2 Zellzählung und Erstellung der Zellkonzentration

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgt in einer Bürker-Zählkammer. Dazu werden 20 µl der gewonnenen Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß pipettiert und mit 360 µl DMEM und 20 µl Trypanblau gemischt. Dies entspricht einer Verdünnung der Zellen von 1:20. Das

Trypanblau dringt durch beschädigte Zellmembranen in die Zellen ein und ermöglicht so die Identifikation von toten Zellen. In jede Zählkammerhälfte werden je 10 µl der Mischung pipettiert. Pro Kammerhälfte müssen in 25 Quadranten die noch vitalen Zellen ausgezählt werden, die ermittelte Summe der ausgezählten Zellen ergibt die Zellzahl $\times 10^4$ /ml, welche aufgrund der Verdünnung noch mit 10 multipliziert wird.

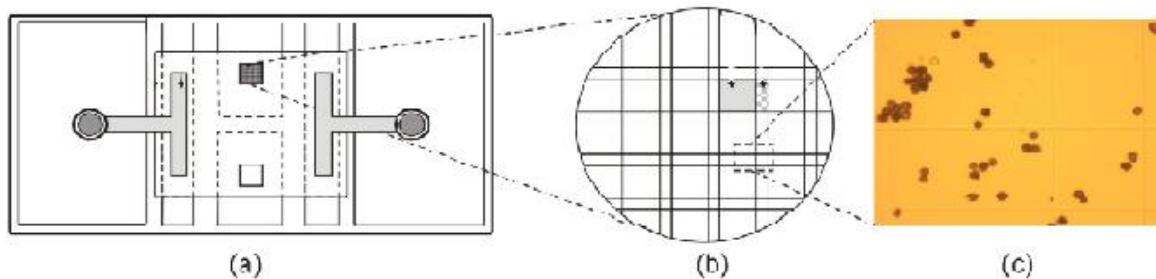


Abbildung 6: Zählkammer nach Bürker (a) Zählkammer, (b) vergrößertes Gitter, (c) Zellen in der Bürker-Zählkammer unter dem Mikroskop (Tóth et al., 2013)

Die Berechnung der Zellzahl erfolgt nach der Formel:

$$\text{Zellzahl} (2 \times 25 \text{ Quadranten}) \times 10 (\text{=Verdünnung}) \times 10^4 (\text{Kammertiefe}) = \text{vitale Zellen/ml}$$

Für die nachfolgenden Versuche wird eine Zellkonzentration von 1,5 Mio. Zellen/Well (1 Well = 1,5 ml, also 1,0 Mio. Zellen/ml) hergestellt. Dazu wird die gewonnene Zellsuspension für 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand wird dekantiert und die Zellen in der entsprechenden Menge Medium gelöst. Als Medium dient DMEM mit Zugabe von 10%-igem FKS, 5 ml Penicillin/ Streptomycin und 2,5 ml Amphotericin B.

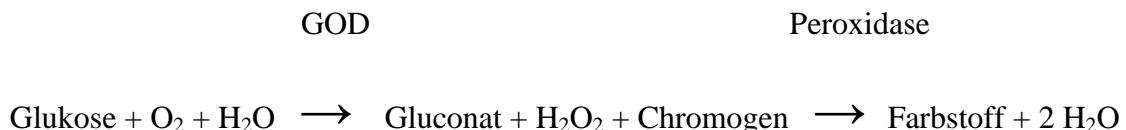
Unter Inkubation bei 37°C findet im Nährmedium innerhalb von 72 h-120 h durch Zellfusion die Entwicklung der Zytotrophoblastzellen zu Synzytiotrophoblastzellen statt.

Bevor diese Zellen entsprechend der Fragestellung bearbeitet werden können, müssen sie mittels einer immunhistochemischen Reaktion identifiziert werden.

5.3 Methodischer Ablauf

Nach Herstellung der gewünschten Zellkonzentration wird das Röhrchen kurz anzentrifugiert und die Bestimmung der Glukose und der Hormone zum Zeitpunkt 0 h vorgenommen. Dazu werden 500µl des Überstandes abpipettiert und in ein Eppendorfgefäß übertragen. Die Bestimmung von Östrogen und Progesteron erfolgte in der Firma Primacyt Cell Culture Technology GmbH. Die Glukose-Konzentration als indirekter Hinweis auf die Zellvitalität wird mit Hilfe des Biosen 5140 bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine enzymatische Methode, bei der Glukose in Anwesenheit von Wasser und Sauerstoff mittels des Enzyms Glukoseoxidase (GOD) zu Glukonat oxidiert. Dabei entsteht Wasserstoffperoxid. In einer zweiten Reaktion wird Wasserstoff durch Peroxidase vom Wasserstoffperoxid auf einen Indikatorfarbstoff übertragen. Dieser ist photometrisch messbar, wobei dessen Konzentration proportional zur umgesetzten Glukosemenge ist. (Bruhn et al., 2011).

Prinzip der enzymatischen Glukoseanalyse:



Als Referenzwert wird außerdem die Glukose-Konzentration im Medium ohne Zellen bestimmt. Anschließend werden je 1,5 ml der Zellsuspension in die Wells der Wellplatten pipettiert und je 15 µl der entsprechenden Medikamentenverdünnungen hinzugefügt. Im weiteren Verlauf werden zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h jeweils die Glukose- und Hormonkonzentrationen für jede Verdünnung beider Medikamente bestimmt, wobei für die Hormonbestimmung die Wellplatten kurz anzentrifugiert werden, damit sich die Zellen am Boden der Wellplatten absetzen. Danach werden 500 µl pro Well entnommen und in ein

steriles Eppendorfgefäß überführt, 2 min bei 1000U/min zentrifugiert und der Überstand erneut in ein Eppendorfgefäß dekantiert. Die Bestimmung der Glukosenkonzentration erfolgt wieder mit dem Biosen 5140.

Des Weiteren werden zu jedem dieser Zeitpunkte Fotos von den Zellen jeder Medikamentenkonzentration aufgenommen, um die Fusion der Trophoblastzellen zu Synzytiotrophoblastzellen zu verfolgen.

Für die Herstellung der Medikamentenverdünnungen wurde die Substanzen 1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride und 2,4-Thiazolidinedione in DMSO (Dimethylsulfoxid), einem Lösungsmittel und Trägersubstanz für viele Arzneimittel, gelöst.

Ausgangspunkt für die gewählten Konzentrationen waren die empfohlenen Tagesdosen der Medikamente.

5.4 Charakterisierung der Trophoblastzelle

Zur Identifizierung der Trophoblastzellen wurde einmalig bei der ersten Präparation nach acht Tagen Inkubation im Brutschrank eine immunhistochemische Reaktion durchgeführt. Bei dem verwendeten Test handelt es sich um eine indirekte Darstellung des CK 7 mittels mit Polymer-Molekülen bestückten Sekundärantikörpern, welche mit der für die Farbreaktion verantwortlichen Peroxidase konjugiert sind.

Cytokeratin 7 ist ein intrazellulär gelegenes Keratinfilament und eines der wenigen Zytokeratine, welches nicht in mesenchymalen Zellen der Plazenta, sondern ausschließlich in Trophoblastzellsubpopulationen zu finden ist (Blaschitz et al., 2000), (Maldonado-Estrada et al., 2004). Es dient somit als Identifikationsmerkmal der Trophoblastzellen.

Für die Durchführung dieses Test werden je 300 µl der gewonnenen Zellsuspension in vier Wells pipettiert, was einer Zelldichte von ca. 45 000 Zellen/Well entspricht. Nach Zentrifugation der Platte für eine Minute bei 1000 U zur Adhäsion der Zellen am Boden der

Wells wird das Medium abpipettiert. Die Wells werden zweimal mit PBS gespült und, anschließend mit 4%-igem Formafix für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert und dann nochmals für 5 min mit PBS gespült. Um die endogene Peroxidaseaktivität der Zellen zu dämpfen, erfolgt nun die 30-minütige Inkubation der Zellen in PBS gelöstem 0,3%-igem H₂O₂ bei Raumtemperatur. Nach nochmaligem Spülen mit PBS werden nun drei Tropfen des Pferdeserums zum Blocken der Enzymreaktion in jedes Well gegeben, die Platte für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und das Serum anschließend wieder entfernt.

Nun werden je 100 µl der mit Primärantikörper in die Wells pipettiert und die Platte über Nacht bei 4° C inkubiert. Am Folgetag werden die Wells nach dreimaligem Spülen mit PBS mit je drei Tropfen des ImmPRESS™-Reagenz, eines mit Peroxidase konjugierten Sekundärantikörpers, versetzt. Nach Inkubation für 30 min. bei Raumtemperatur und anschließendem Auswaschen des ungebundenen Antikörpers mit PBS, werden nun drei Tropfen des Enzymsubstrats, der H₂O₂-haltigen LinRed-Lösung, in jedes Well gegeben. Hierbei entsteht nach 30 minütiger Inkubation im Dunkeln eine unter dem Lichtmikroskop sichtbare rote Reaktion der Zellen, welche durch Spülen mit Leitungswasser gestoppt wird (ImmPRESS™ UNIVERSAL REAGENT). Das Ergebnis wurde mit Hilfe des Mikroskops dokumentiert.

5.5 Biochemische Assays

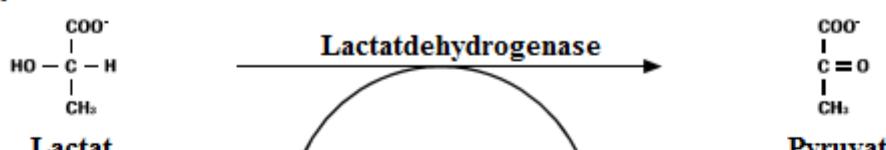
5.5.1 LDH- Zytotoxizitätstest

Der LDH-Zytotoxizitätstest ist ein Test zur quantitativen photometrischen Bestimmung der Zytolyse. Er basiert auf der Aktivität der von den lysierten Zellen freigesetzten Laktat-Dehydrogenase (LDH), einem intrazellulären Enzym, welches bei einem Zellmembranschaden mit nachfolgendem Zelltod in das Zellkulturmedium austritt, und dessen gemessene Aktivität mit dem Anteil an lysierten Zellen in dieser Kultur korreliert.

Für die Durchführung dieses Tests werden 15 µl Triton® X-100 in eines der Wells mit zellhaltigem Medium pipettiert und gründlich mit dem Zellkulturmedium vermischt. Triton® X-100 ist ein Tensid (Octoxinol 9), welches Membranproteine aus ihrer Zellmembran lösen kann und dadurch zur Permeabilitätssteigerung und zum Zelltod führt, so dass in dem mit Triton® X-100 versetzten Well die maximale LDH-Freisetzung erfolgt und dieses als Positivkontrolle dient. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wird dann der Test durchgeführt. Dazu werden in eine 96er Wellplatte je 4 x 400 µl der mit Triton® X-100 und der mit den verschiedenen Medikamentenkonzentrationen versetzten Zellsuspensionen pipettiert. Außerdem werden für die Negativkontrolle 4 x 400 µl der Zellsuspension ohne Medikamentenzugabe sowie für den Leerwert nur Medium in die Wells überführt. Dann werden je 100 µl der Katalysatorlösung in die Wells pipettiert und die Platte 5-30 min. im Dunkeln inkubiert bis sich die Lösungen rot färben. Um die Enzymreaktion zu stoppen werden 50 µl NHCl-Lösung hinzugegeben. Die photometrische Messung der LDH-Aktivität erfolgt im Microplate reader bei 490 nm Wellenlänge (Referenzwellenlänge 620 nm).

Schematische Darstellung der LDH-Reaktion:

1.Schritt



2.Schritt

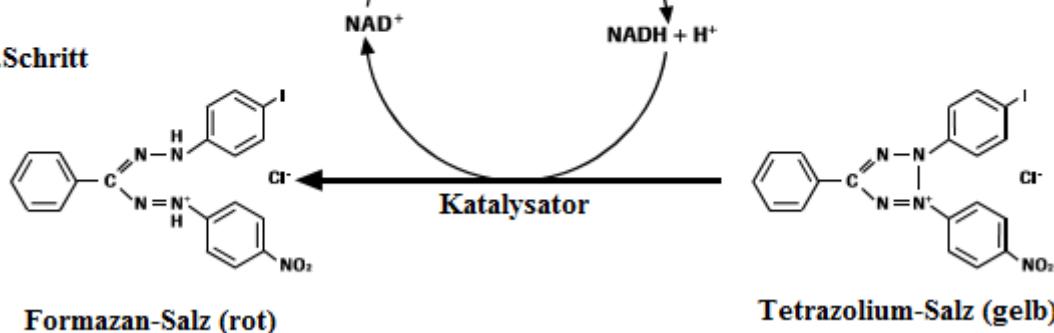


Abbildung 7: Prinzip des LDH-Zytotoxizitätstests (modifiziert nach *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*)

Aus den ermittelten Messwerten für die Postiv- und Negativkontrolle und die Zellsuspensionen mit Medikamentenzugabe kann dann die Zytotoxizität nach folgender Formel für jede der Medikamentenkonzentrationen berechnet werden:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Extinktion Probe} - \text{Extinktion Negativkontrolle}}{\text{Extinktion Positivkontrolle} - \text{Extinktion Negativkontrolle}} \times 100$$

Dieser Test wurde nach Abschluss der übrigen Bestimmungen in einem Zellalter von 96 Stunden durchgeführt (Cytotoxicity Detection Kit (LDH)).

5.5.2 CellTiter-Blue®-Zytotoxizitätstest

Dieser Test dient dem Nachweis lebens- und wachstumsfähiger Zellen mittels des für Zellen ungiftigen Indikatorfarbstoffes Resazurin, welcher in vitale Zellen diffundieren kann. Dort wird er entsprechend der metabolischen Kapazität der Zellen zum fluoreszierenden Resorufin reduziert, dieses diffundiert zurück ins Medium. Das Ausmaß der gemessenen Fluoreszenz verhält sich in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der Menge des zugeführten CellTiter-Blue®-Reagens proportional zur Anzahl lebensfähiger Zellen in diesem Medium.

Dieser Test wurde 42 Stunden nach Isolation und Kultivierung der Trophoblastzellen durchgeführt.

Für die Durchführung des Tests werden je 10 µl des CellTiter-Blue®-Reagens zu den 90 µl des Zellkulturmediums einer 96er Wellplatte pipettiert. Dabei enthalten je drei Wells nur das Medium als Leerwert zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz, die Zellsuspension ohne Zugabe der Medikamente als Negativkontrolle sowie die Zellsuspensionen mit den zu untersuchenden Medikamentenverdünnungen und die Tritonkontrolle als Positivkontrolle. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur erfolgt die Messung der

Absorption mittels des Microplate readers. Da das Absorptionsmaximum für Resorufin bei 573nm und Resazurin bei 605nm liegt, wurden die Referenzwellenlängen des Micoplate readers auf 570 und 620nm festgelegt. (CellTiter-Blue® Cell Viability Assay)

Aus den ermittelten Messwerten lässt sich nun der Anteil vitaler Zellen in den Zellsuspensionen mit den zugefügten Medikamentenverdünnungen im Vergleich zum Leerwert ablesen. Dazu wird der Mittelwert der Fluoreszenz des Mediums von den Mittelwerten der Fluoreszenz der einzelnen Proben subtrahiert und das Ergebnis gegen die verwendete Medikamentenkonzentration aufgetragen.

5.5.3 PIgf- Immunoassay

Beim PIgf handelt es sich um einen plazentaren Wachstumsfaktor aus der Familie der VEGF, welcher eine in vitro nachgewiesene Funktion beim Überleben, dem Wachstum und der Migration von Endothelzellen hat sowie in vivo an der Gefäßneubildung beteiligt ist. Er wird vor allem in der Plazenta, aber auch im Endothel von Kapillaren und der Umbilikalvene produziert.

In der Plazenta wurde für den PIgf unter In-vitro-Bedingungen eine Stimulation der Signaltransduktion in Trophoblastzellen und Schutz vor Wachstumsfaktormangel bedingter Apoptose nachgewiesen.

Beim dem zum Nachweis einer durch die zugegebenen Medikamente verursachten Beeinflussung der PIgf-Exkretion verwendeten PIgf-Immunoassay handelt es sich um einen ELISA-Test zur quantitativen photometrischen Bestimmung des PIgf in Zellsuspensionen.

Für die Durchführung des Tests werden, nach Herstellung einer Verdünnungsreihe der PIgf-Lösung entsprechend der Anleitung und Einbringen von 100 µl des Verdünnungsmittels in jedes Well, je 100 µl der sieben PIgf-Standardlösungsverdünnungen als Positivkontrolle, der Zellsuspension ohne Medikamente als Negativkontrolle und der Zellsuspensionen mit den verschiedenen Verdünnungen der Medikamente in die mit einem monoklonalen

Primärantikörper gegen PIgf präparierten Wells pipettiert. Der Ansatz wird für zwei Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wird der nicht antikörpergebundene Anteil des PIgf mittels 400 µl pro Well eines Waschpuffers entfernt, dieser Vorgang wird viermal durchgeführt. Dann werden je 200 µl eines mit Peroxidase konjugierten polyklonalen Sekundärantikörpers gegen den an PIgf gebundenen Primärantikörper hinzugegeben und nochmals für eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Nachdem die nicht gebundenen Anteile des Antikörper-Enzym-Komplexes wieder durch viermaliges Waschen entfernt worden sind, werden je 200 µl des Enzymsubstrates für die Peroxidase in die Wells pipettiert und der Ansatz für 30 min unter Lichtschutz inkubiert. Hierbei zeigt sich durch die enzymatische Reaktion der Peroxidase eine der Menge des gebundenen PIgf proportionale Farbänderung von blau zu gelb. Diese Reaktion wird durch Zugabe von 50 µl einer H₂SO₄-Lösung gestoppt. Die photometrische Messung der PIgf-Aktivität erfolgt im Microplate reader bei 450 nm Wellenlänge (Referenzwellenlänge 570 nm) (Quantikine® Human PIgf). Anschließend kann, nach Berechnung einer Standardkurve entsprechend der Anleitung, für jede der Medikamentenkonzentrationen zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 Stunden eine PIgf- Konzentration ermittelt werden. Dazu wird vom Mittelwert der Messwerte jeder Probe der Mittelwert der Messwerte der Negativkontrolle subtrahiert und das Ergebnis gegen die PIgf-Konzentration aufgetragen.

5.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Unterstützung des Instituts für Medizinische Informatik und Biometrie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden. Die Auswertung des Einflusses der beiden untersuchten Medikamente auf die Glukose-, Östrogen- und Progesteronkonzentration erfolgte nach dem Modell der „mixed models“ mit Hilfe des Programmes SPSS, in welchem der Einfluss von

festen und zufälligen Faktoren auf eine Zielgröße sowie deren Wechselwirkung untersucht werden kann. Als feste Faktoren gelten die Beobachtungszeit, sowie die eingesetzte Medikamentenverdünnung, als zufälliger Faktor gilt die untersuchte Plazenta, bzw. die daraus isolierten Trophoblastzellen. Dabei wurde das 95%-Konfidenzintervall mit ausgegeben. Dieses Modell ermöglicht eine statistische Auswertung von unvollständigen Datensätzen. Um die mit jedem paarweisen Vergleich steigende Fehlerwahrscheinlichkeit auf $\alpha < 0,05$ zu reduzieren, erfolgte eine Bonferroni-Adjustierung.

Während initial noch die Bestimmung der Konzentrationen von Glukose, Östrogen und Progesteron für jede der untersuchten Medikamentenverdünnung erfolgte, wurde im Verlauf der Arbeit aus Kostengründen auf die Bestimmung einzelner Werte verzichtet, sofern sich im Vorfeld abzeichnete, dass diese keinen Einfluss auf die Aussagefähigkeit der Daten haben. Benutzerdefinierte fehlende Werte wurden bei der statistischen Auswertung als fehlend gewertet.

Die statistische Auswertung des LDH-Zytotoxizitätstest erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney *U*-Tests, eines nichtparametrischen Verfahrens zur Berechnung der Signifikanz bei fehlender Normalverteilung der Werte.

6. Ergebnisse

Untersucht wurde der Einfluss der beiden oralen Antidiabetika Metformin und Thiazolidindion auf humane Trophoblastzellen. Hierzu wurde eine festgelegte Anzahl von aus der Plazenta isolierten Trophoblastzellen (1,5 Mio. Zellen/Well [1 Well = 1,5 ml, also 1,0 Mio. Zellen/ml]) in das Zellkulturmedium gegeben und mit Medikamentenverdünnungen des Metformin und Thiazolidindion einer festgelegten Konzentration versetzt. Die Nachbeobachtung der Zellen unter dem Mikroskop und Bestimmung der Konzentrationen von Glukose, Östrogen und Progesteron in den Zellüberständen erfolgten zum Zeitpunkt 0 h, 24 h, 48 h und 72 h. Untersucht wurden vier Konzentrationen des Metformin und fünf Konzentrationen des Thiazolidindion an aus jeweils drei verschiedenen Plazenten isolierten Trophoblastzellkulturen.

6.1 Charakterisierung der Trophoblastzellen

Zur Identifizierung der Trophoblastzellen erfolgte einmalig direkt im Anschluss an die Isolation der Zellen eine immunhistochemische Färbung mit Hilfe des ImmPRESS™ UNIVERSAL REAGENT Anti-Mouse/Rabbit Ig. Nach Zugabe des Enzymsubstrates, des HISTOPRIME® LinRed (R.T.U.), für die mit Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper auf der Zelloberfläche der Trophoblastzellen, entsteht eine unter dem Mikroskop sichtbare Rotfärbung, anhand derer die Trophoblastzellen identifiziert werden können. Dargestellt wurde das intrazelluläre Keratinfilament CK7 (Abbildung 8).

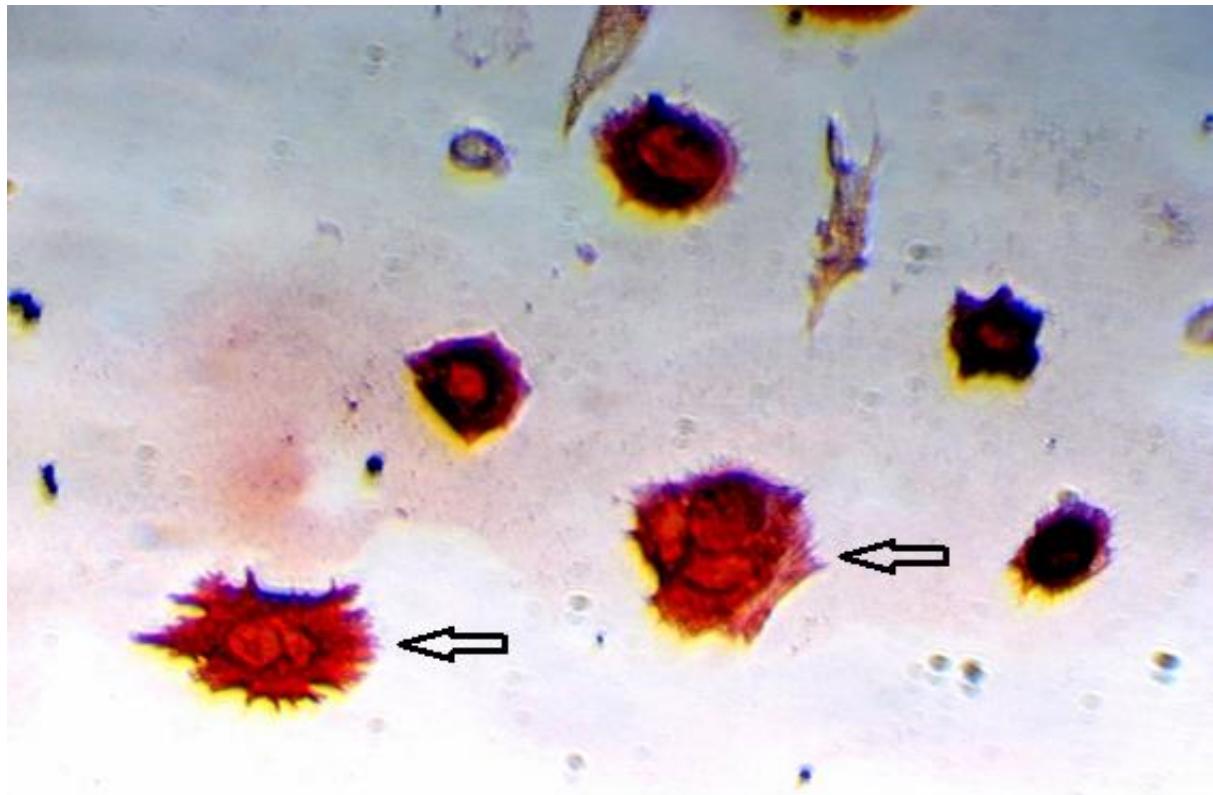


Abbildung 8: Identifikation der Synzytiotrophoblastzellen anhand der Rotreaktion des intrazellulären CK7 (IHC)

6.2 Mikroskopische Vitalitätsprüfung

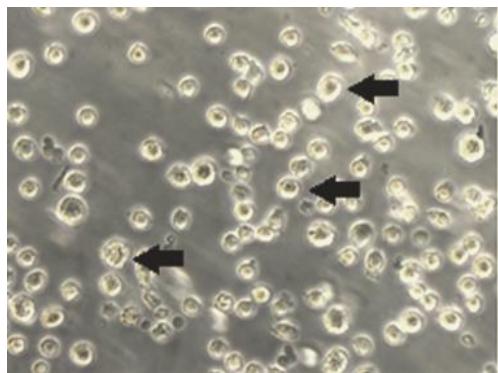
Zur Überprüfung der Vitalität der Zellen in den mit den Medikamentenkonzentrationen versetzten Ansätzen im Vergleich zur Vitalität der Trophoblastzellen im Kulturmedium ohne Medikamentenzusatz erfolgte eine mikroskopische Dokumentation der physiologischen Fusion von Trophoblasten zu Synzytiotrophoblasten unter Inkubation bei 37°C. Dies erfolgte mit einer Fotokamera (AxioCam MRc; Zeiss) bei einer 32-fachen Vergrößerung zum Zeitpunkt 0, sowie nach 24 h, 48 h, und 72 h. Unter dem Mikroskop zeigt sich sowohl im Ansatz ohne Zugabe von Medikamenten, als auch den Wells mit Zugabe der Medikamentenverdünnungen, dass die Zellfusion der Trophoblastzellen weiterhin stattfindet. Es zeigt sich außerdem rein makroskopisch kein Unterschied zwischen dem Ausmaß der

Ergebnisse

Zellfusion zu Synzytiotrophoblasten innerhalb der Versuchsreihen mit Metformin und Thiazolidindion in ansteigender Konzentration, als auch im Vergleich zwischen den mit Metformin versetzten Zellansätzen, und denen, welche mit Thiazolidindion versetzt wurden. Diese Dokumentation erfolgte für jede der insgesamt je drei Versuchsreihen mit Metformin und Thiazolidindion und ist im Folgenden dargestellt.

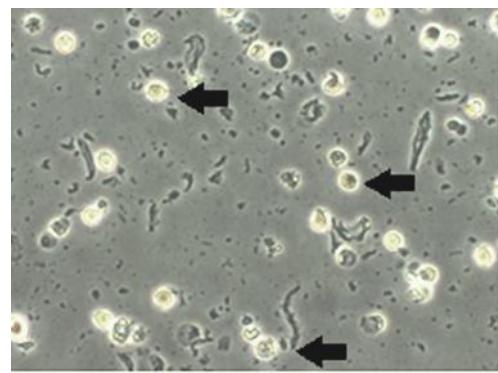
Fusion von Trophoblastzellen zu Synzytiotrophoblasten unter dem Mikroskop:

a) Zellen im Kulturmedium ohne Medikamentenzugabe:



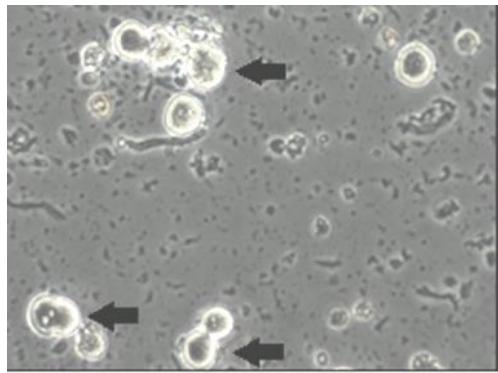
Trophoblastzellen nach 0 h

Vergrößerung 32x



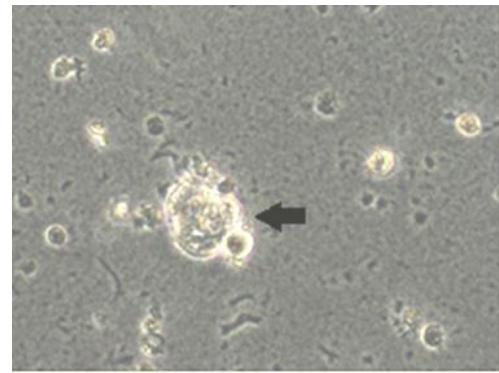
Trophoblastzellen nach 24 h

Vergrößerung 32x



Beginnende Fusion zum Synzytiotrophoblasten nach 48 h

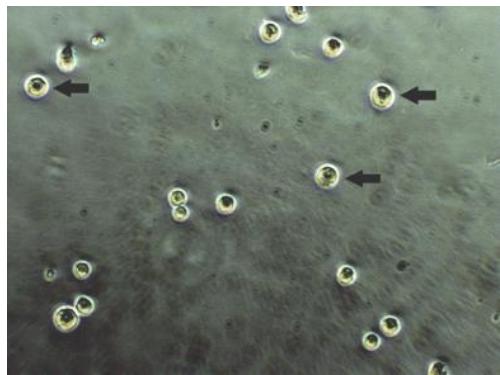
Vergrößerung 32x



Synzytiotrophoblast nach 72 h

Vergrößerung 32x

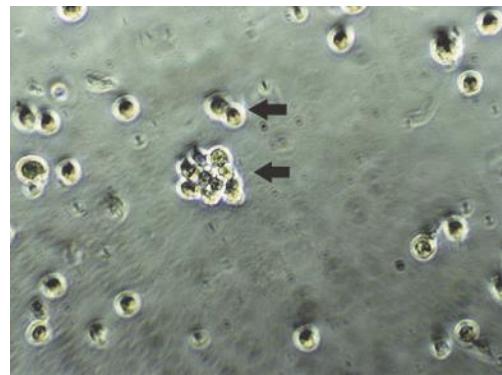
b) Zellen im Kulturmedium unter Zugabe von Metformin 125 mg/ml



125 mg/ml Metformin nach 0 h

Trophoblastzellen

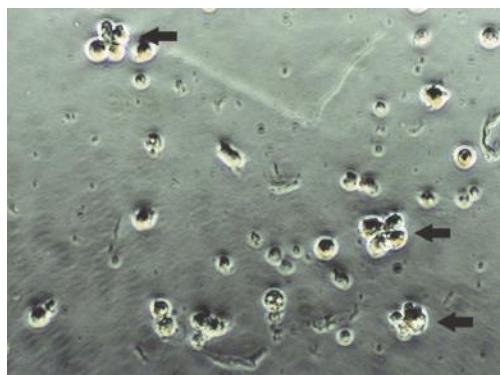
Vergrößerung 32x



125 mg/ml Metformin nach 24 h

Trophoblastzellen

Vergrößerung 32x



125 mg/ml Metformin nach 48 h

Beginnende Fusion zum Synzytiotrophoblasten

Vergrößerung 32x

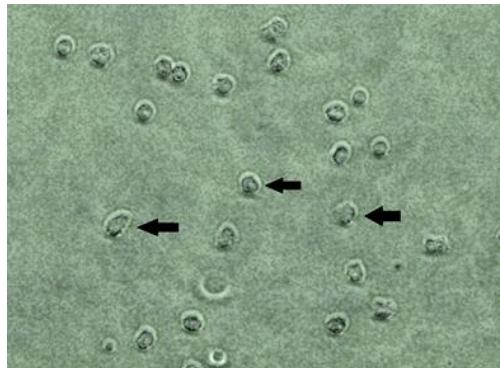


125 mg/ml Metformin nach 72 h

Synzytiotrophoblast

Vergrößerung 32x

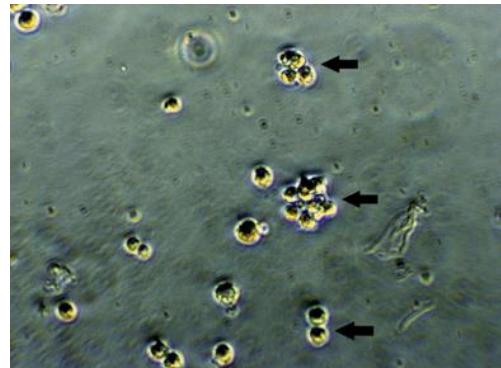
c) Zellen im Kulturmedium unter Zugabe von Metformin 250 mg/ml



250 mg/ml Metformin nach 0 h

Trophoblastzellen

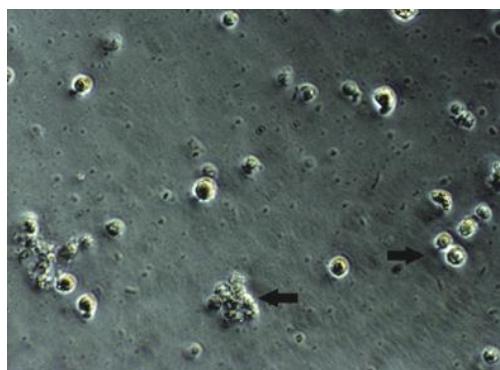
Vergrößerung 32x



250 mg/ml Metformin nach 24 h

Trophoblastzellen

Vergrößerung 32x



250 mg/ml Metformin nach 48 h

Beginnende Fusion zum Synzytiotrophoblasten

Vergrößerung 32x

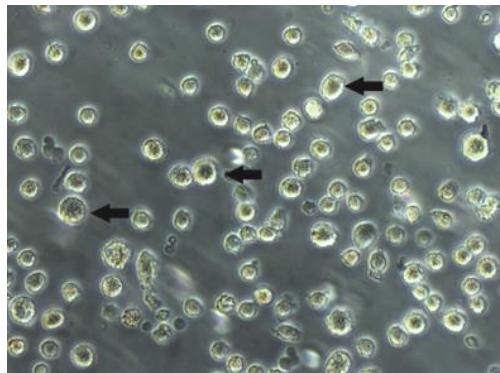


250 mg/ml Metformin nach 72 h

Synzytiotrophoblast

Vergrößerung 32x

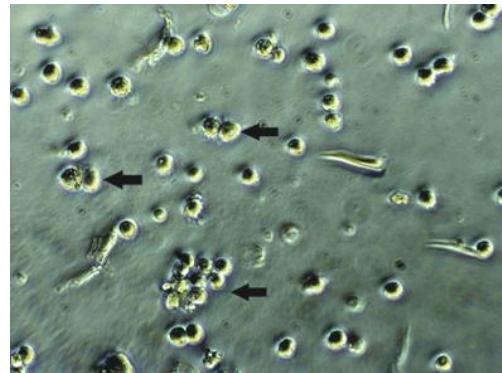
d) Zellen im Kulturmedium unter Zugabe von Metformin 500 mg/ml



500 mg/ml Metformin nach 0 h

Trophoblastzellen

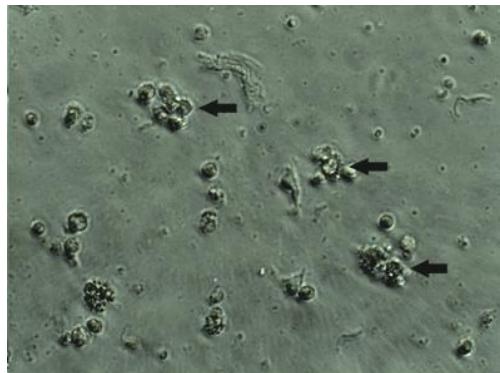
Vergrößerung 32x



500 mg/ml Metformin nach 24 h

Trophoblastzellen

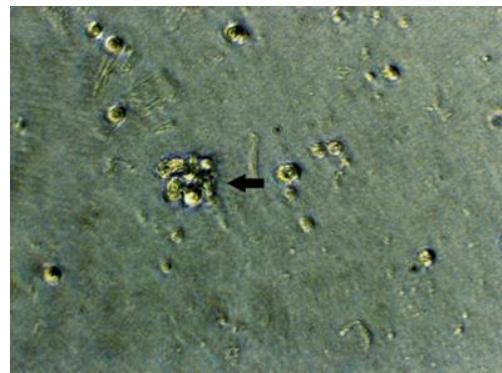
Vergrößerung 32x



500 mg/ml Metformin nach 48 h

Beginnende Fusion zum Synzytiotrophoblasten

Vergrößerung 32x

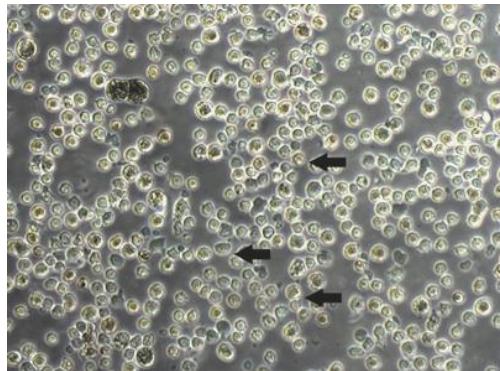


500 mg/ml Metformin nach 72 h

Synzytiotrophoblast

Vergrößerung 32x

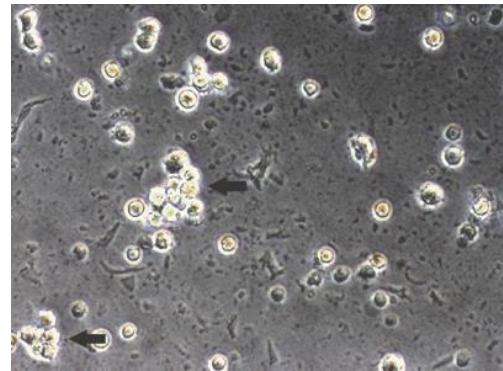
e) Zellen im Kulturmedium unter Zugabe von Metformin 750 mg/ml



750 mg/ml Metformin nach 0 h

Trophoblastzellen

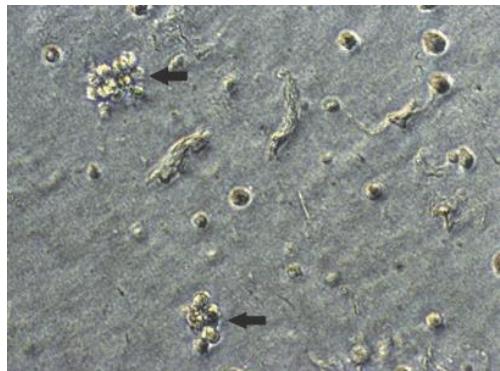
Vergrößerung 32x



750 mg/ml Metformin nach 24 h

Trophoblastzellen

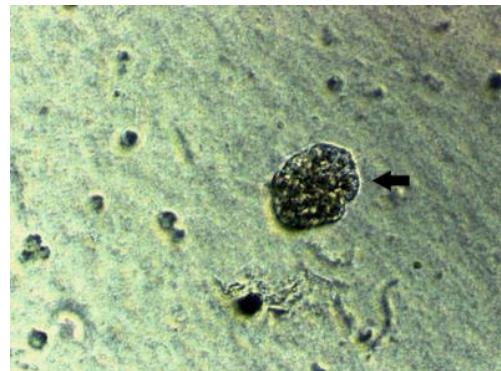
Vergrößerung 32x



750 mg/ml Metformin nach 48 h

Beginnende Fusion zum Synzytiotrophoblasten

Vergrößerung 32x

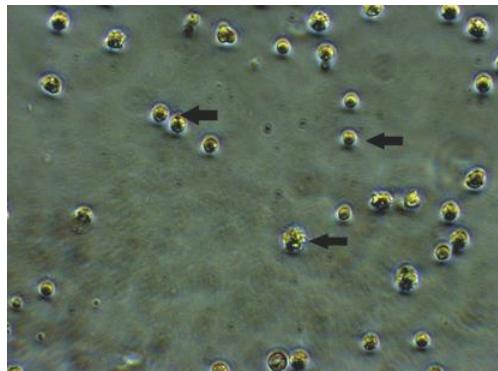


750 mg/ml Metformin nach 72 h

Synzytiotrophoblast

Vergrößerung 32x

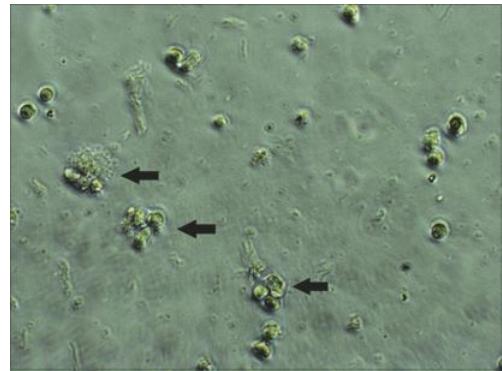
f) Zellen im Kulturmedium unter Zugabe von Thiazolidindion 2,5 mg/ml



2,5 mg/ml Thiazolidindion nach 0 h

Trophoblastzellen

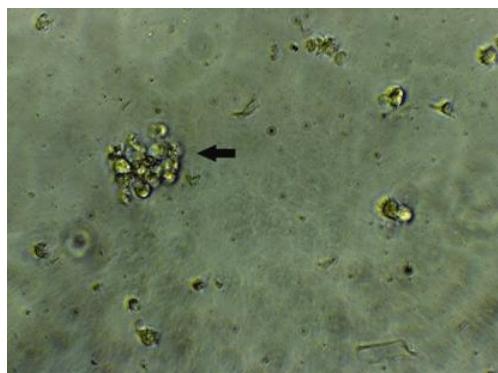
Vergrößerung 32x



2,5 mg/ml Thiazolidindion nach 24 h

Trophoblastzellen

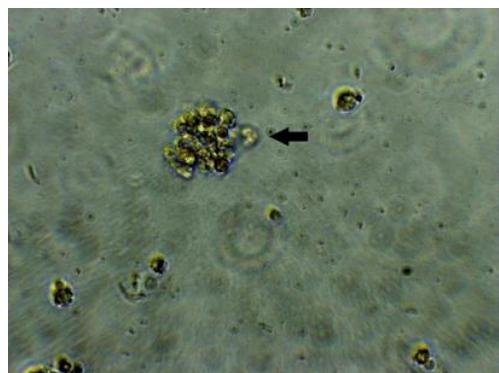
Vergrößerung 32x



2,5 mg/ml Thiazolidindion nach 48 h

Beginnende Fusion zum Synzytiotrophoblasten

Vergrößerung 32x

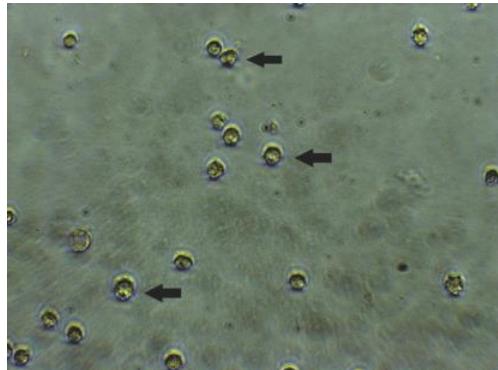


2,5 mg/ml Thiazolidindion nach 72 h

Synzytiotrophoblast

Vergrößerung 32x

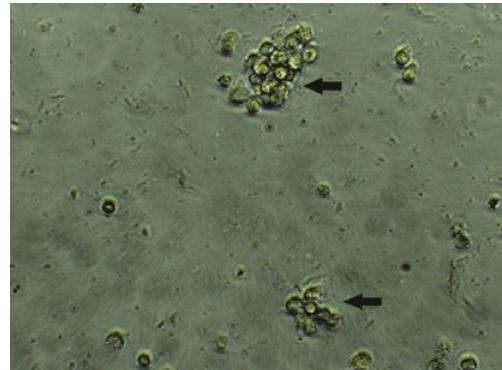
g) Zellen im Kulturmedium unter Zugabe von Thiazolidindion 5,0 mg/ml



5 mg/ml Thiazolidindion nach 0 h

Trophoblastzellen

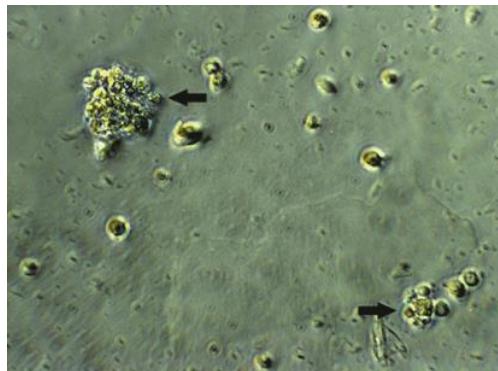
Vergrößerung 32x



5 mg/ml Thiazolidindion nach 24 h

Trophoblastzellen

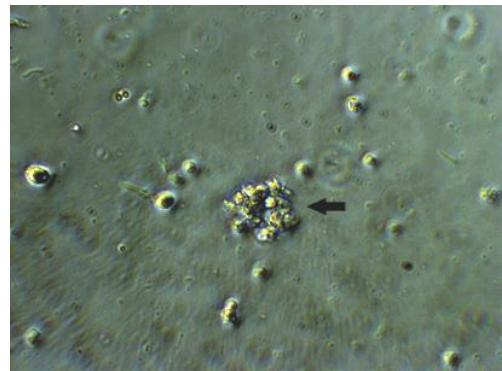
Vergrößerung 32x



5 mg/ml Thiazolidindion nach 48 h

Beginnende Fusion zum Synzytiotrophoblasten

Vergrößerung 32x

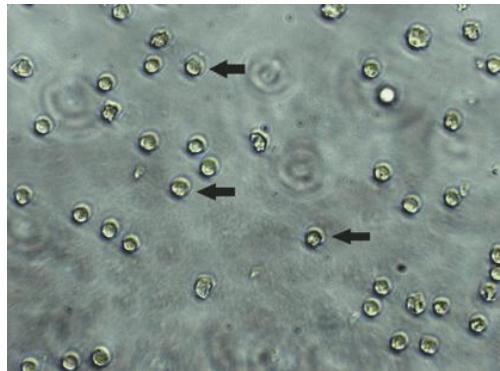


5 mg/ml Thiazolidindion nach 72 h

Synzytiotrophoblast

Vergrößerung 32x

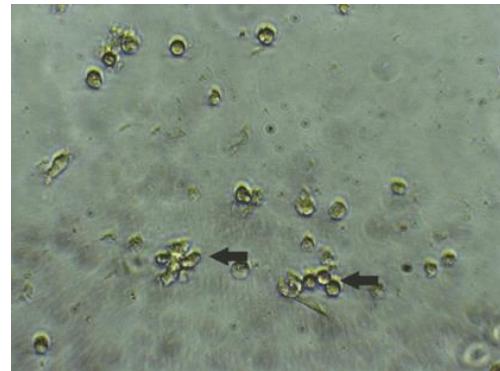
h) Zellen im Kulturmedium unter Zugabe von Thiazolidindion 7,5 mg/ml



7,5 mg/ml Thiazolidindion nach 0 h

Trophoblastzellen

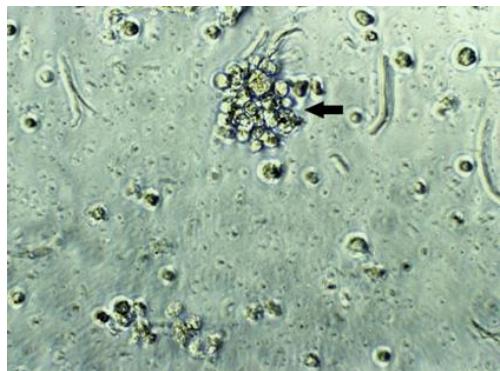
Vergrößerung 32x



7,5 mg/ml Thiazolidindion nach 24 h

Trophoblastzellen

Vergrößerung 32x

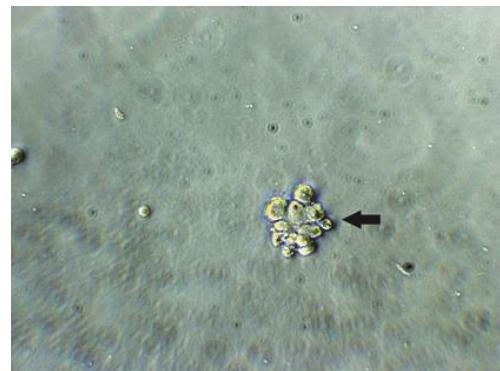


7,5 mg/ml Thiazolidindion nach 48 h

beginnende Fusion zum

Synzytiotrophoblasten

Vergrößerung 32x

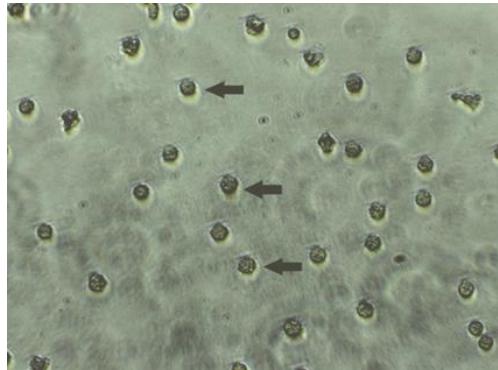


7,5 mg/ml Thiazolidindion nach 72 h

Synzytiotrophoblast

Vergrößerung 32x

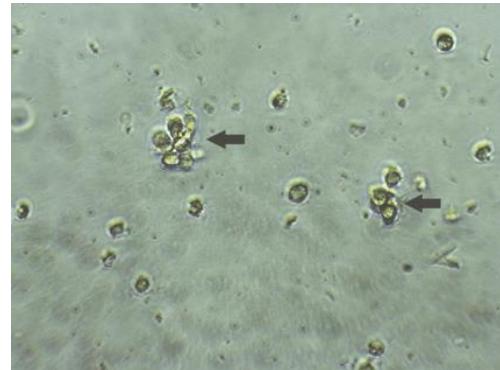
i) Zellen im Kulturmedium unter Zugabe von Thiazolidindion 10 mg/ml



10 mg/ml Thiazolidindion nach 0 h

Trophoblastzellen

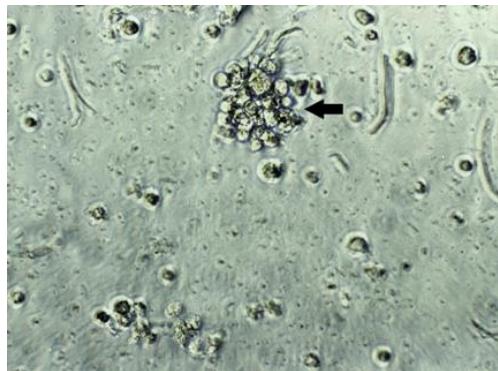
Vergrößerung 32x



10 mg/ml Thiazolidindion nach 24 h

Trophoblastzellen

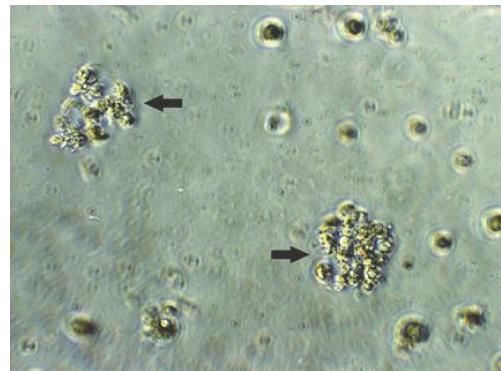
Vergrößerung 32x



10 mg/ml Thiazolidindion nach 48 h

Beginnende Fusion zum Synzytiotrophoblasten

Vergrößerung 32x

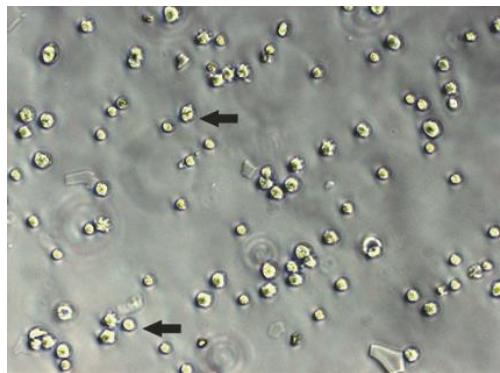


10 mg/ml Thiazolidindion nach 72 h

Synzytiotrophoblast

Vergrößerung 32x

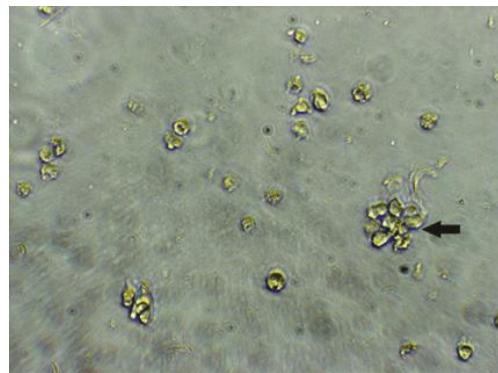
j) Zellen im Kulturmedium unter Zugabe von Thiazolidindion 15 mg/ml



15 mg/ml Thiazolidindion nach 0 h

Trophoblastzellen

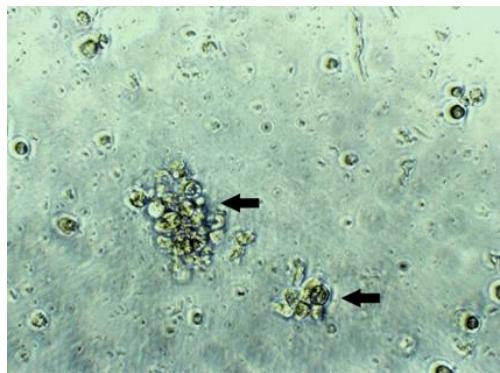
Vergrößerung 32x



15 mg/ml Thiazolidindion nach 24 h

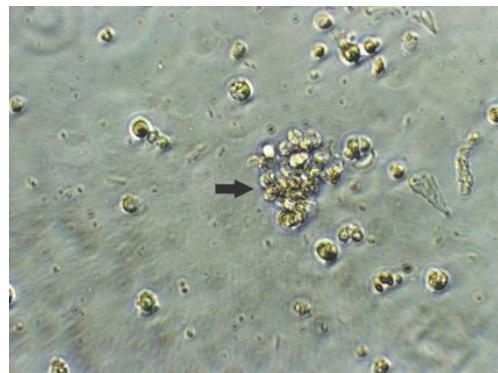
Trophoblastzellen

Vergrößerung 32x



15 mg/ml Thiazolidindion nach 48 h

Beginnende Fusion zum Synzytiotrophoblasten, Vergrößerung 32x



15 mg/ml Thiazolidindion nach 72 h

Synzytiotrophoblast

Vergrößerung 32x

6.3 LDH-Zytotoxizitätstest

Zur Objektivierung und Quantifizierung der Vitalität der Trophoblastzellen unter dem Einfluss steigender Medikamentenkonzentration im Medium wurde außerdem eine Vitalitätsprüfung mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kit (LDH) durchgeführt. Es handelt

Ergebnisse

sich um einen Test zur quantitativen photometrischen Bestimmung der Zytolyse, welcher auf der Aktivität der von den lysierten Zellen freigesetzten Laktat-Dehydrogenase (LDH) basiert. Anhand dieses Tests kann die letale Dosis 50 (LD_{50}), also die Medikamentendosis, unter deren Einfluss 50 % der Zellen sterben, ermittelt werden. Dieser wurde sowohl für Metformin, als auch für Thiazolidindion jeweils an zwei Versuchsreihen in einem Zellalter von 96 Stunden durchgeführt. Anschließend erfolgte die Bildung des Mittelwertes der gemessenen Extinktionswerte aus beiden Ansätzen und Berechnung des prozentualen Anteils nicht vitaler Zellen. Unter Zusatz von Triton zum Zellkulturmedium ergibt sich die Zytotoxizität der Positivkontrolle (100 %), im Medium ohne Medikamentenzusatz ergibt sich die Zytotoxizität der Negativkontrolle (0 %). Diese spiegelt die spontane LDH-Sekretion der Zellen im Medium wider.

Für die Zytotoxizität unter der Zugabe von Metformin in vier verschiedenen Konzentrationen zeigt sich folgendes Ergebnis:

Tabelle 1: LDH- Zytotoxizitätstest für Metformin: Mittelwerte der Zytotoxizität [%] und Standardabweichung

Metforminkonzentration	0mg/ml	125mg/ml	250mg/ml	500mg/ml	750mg/ml	Triton
Mittelwert	0	113,7	55,5	71,9	48	100
Standardabweichung	0	15,98	78,49	94,89	67,88	0
Signifikanz p =		0,102	0,317	0,102	0,317	

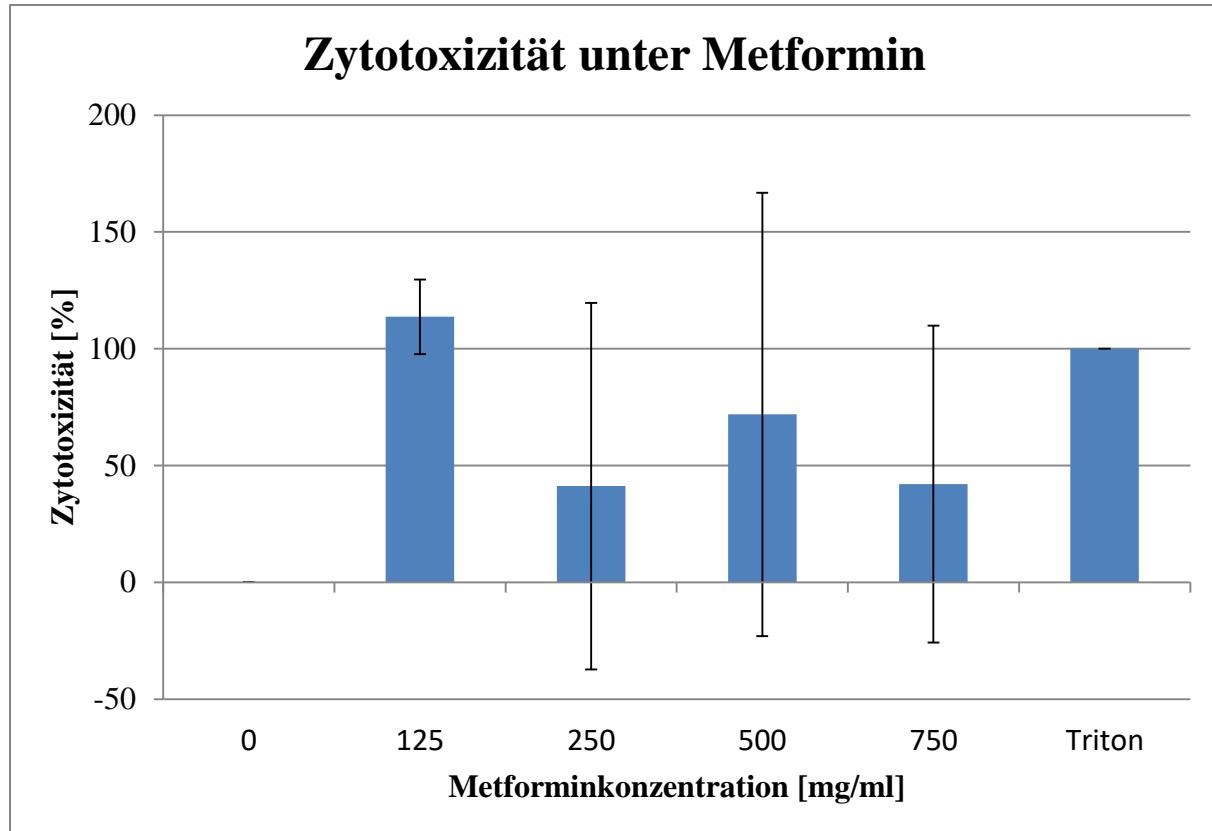


Abbildung 9 : LDH-Zytotoxizitätstest für Metformin:

Darstellung der Zytotoxizität [%] für die mit den untersuchten Konzentrationen einer Metforminlösung versetzten Zellkulturmedien. Die Werte (Mittelwert \pm Standardabweichung) entsprechen den aus den Extinktionswerten errechneten Zytotoxizitäten. Für die Metforminkonzentrationen 250, 500 und 750 mg/ml konnte eine geringere Zytotoxizität im Vergleich zur Tritonkontrolle nachgewiesen werden, dieser war jedoch nicht signifikant.

Die in der Grafik dargestellten Werte entsprechen der aus den Extinktionswerten berechneten Zytotoxizität in %. Alle ermittelten Zytotoxizitäten der Zellmedien mit Medikamentenzusatz lagen deutlich über der Negativkontrolle, also der spontanen LDH-Sekretion der Zellen. Die mit 750 mg/ml, 500 mg/ml und 250 mg/ml Metforminlösung versetzten Zellmedien zeigen eine geringere, jedoch statistisch nicht signifikante Zytotoxizität als die Positivkontrolle (Triton). Lediglich die Zytotoxizität der mit 125 mg/ml der Metforminlösung versetzten Zellmedien entsprach der unter Zugabe von Triton. Dabei wird jeweils unter Zugabe der

Ergebnisse

Konzentrationen 125 mg/ml und 500 mg/ml die LD₅₀ erreicht. Es zeigt sich dabei kein Zusammenhang zwischen steigender Konzentration der Medikamentenverdünnung und der ermittelten Zytotoxizität in den damit versetzten Zellkulturen.

Beide Tests einzeln betrachtet ergaben jedoch, wie an der Standardabweichung erkennbar, deutlich voneinander abweichende Ergebnisse, so dass sich zusammenfassend anhand des durchgeföhrten LDH-Zytotoxizitätstests keine sichere Aussage über die Zytotoxizität des Metformin in verschiedenen Konzentrationen treffen lässt. Mögliche Fehlerquellen sind eine Interferenz des Metformin mit der Messmethode der Extinktionsmessung sowie eine möglicherweise schlechte Qualität der verwendeten Zellen mit einem hohen Anteil an nicht-vitalen Zellen.

Für den LDH-Test unter Zugabe der Thiazolidindionverdünnungen ergeben sich folgende Werte:

Tabelle 2: LDH-Zytotoxizitätstest für Thiazolidindion: Mittelwerte der Zytotoxizität [%] und Standardabweichung

Thiazolidindion-konzentration	0 mg/ml	2,5mg/ml	5mg/ml	7,5mg/ml	10mg/ml	15mg/ml	Triton
Mittelwert	0,1	21,75	23,7	0	0	36,85	100
Standardabweichung	0	28,78	33,5	0	0	52,11	0
Signifikanz p =		0,102	0,32	1	1	0,317	

Die graphische Darstellung der Zytotoxizität unter Thiazolidindion in fünf verschiedenen Konzentrationen erfolgt in Abbildung 10.

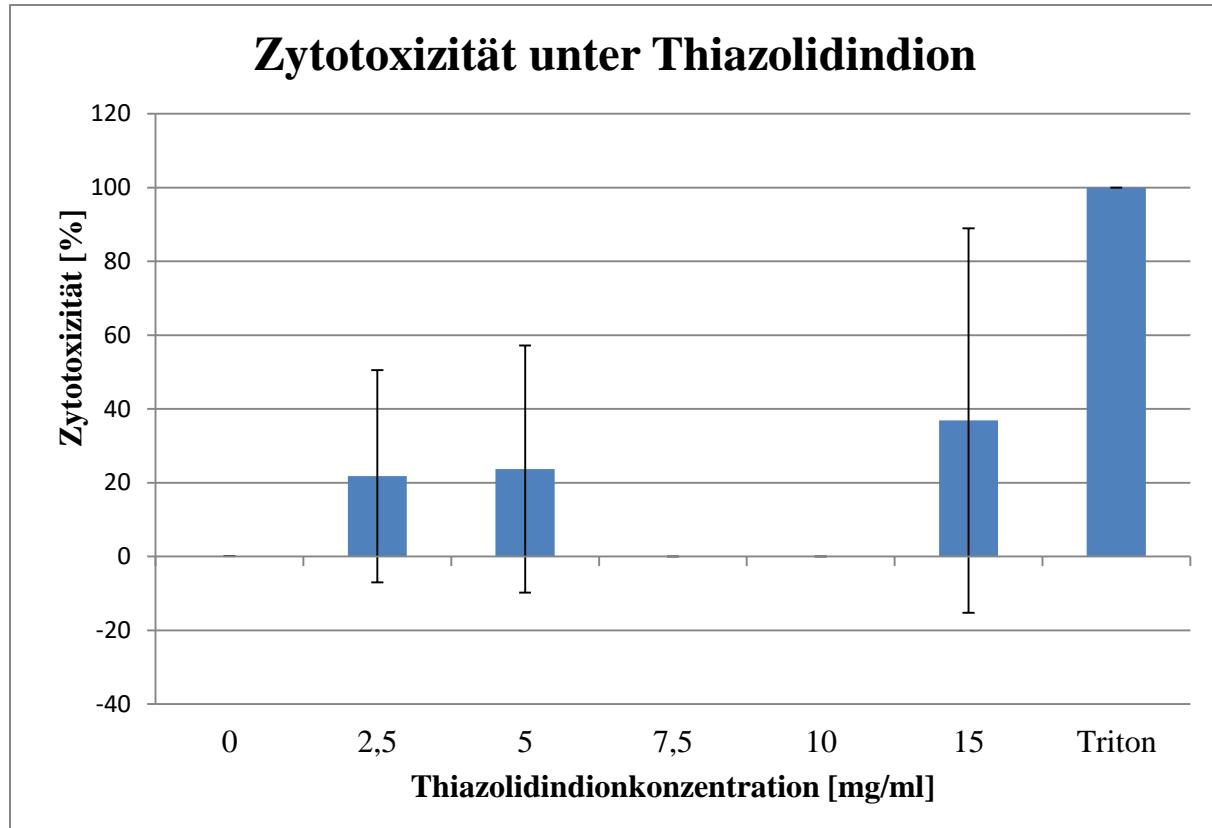


Abbildung 10: LDH-Zytotoxizitätstest für Thiazolidindion:

Darstellung der Zytotoxizität [%] für die mit den untersuchten Konzentrationen einer Thiazolidindionlösung versetzten Zellkulturmedien. Die Werte (Mittelwert \pm Standardabweichung) entsprechen den aus den Extinktionswerten errechneten Zytotoxizitäten. Alle untersuchten Konzentrationen weisen eine deutlich geringere Zytotoxizität als die Tritonkontrolle auf. Unter den Konzentrationen 2,5, 5 und 15 mg/ml ist eine im Vergleich zur Kontrolle höhere Zytotoxizität nachweisbar. Keines dieser Ergebnisse ist statistisch signifikant.

Hier zeigt sich für die Medikamentenverdünnungen 2,5 mg/ml, 5 mg/ml und 15 mg/ml eine im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte und scheinbar dosisabhängige Zytotoxizität, wobei keine der verwendeten Konzentrationen die Zytotoxizität der Positivkontrolle überschreitet. Des Weiteren erreicht keine der untersuchten Konzentrationen die LD₅₀. Für die Konzentrationen 7,5 mg/ml und 10 mg/ml scheint keine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Zytotoxizität zu bestehen. Keines dieser Ergebnisse ist dabei statistisch signifikant.

Da pro Medikament nur zwei Ansätze untersucht worden sind, ist eine valide statistische Analyse aufgrund der kleinen Datenmenge auch hier nicht möglich. Hier gilt ähnlich wie beim LDH-Zytotoxizitätstest für Metformin, dass die Standardabweichung sehr groß ist, so dass auch für Thiazolidindion mit Hilfe des LDH-Tests keine sichere Aussage zur Zytotoxizität zu treffen ist. Aus diesem Grund wurde im Anschluss der CellTiter-Blue®-Zytotoxizitätstest durchgeführt.

6.4 CellTiter-Blue®-Zytotoxizitätstest

Mittels des für die Trophoblastzellen nicht toxischen Indikatorfarbstoffes Resazurin, welcher in vitalen Zellen zum fluoreszierenden Resorufin reduziert wird und so als Indikator für die metabolische Kapazität der vitalen Zellen dient, kann der Anteil vitaler Zellen in den mit den Medikamentenverdünnung versetzten Zellkulturen im Vergleich zur Kontrolle (Zellkultur ohne Medikamentenzugabe) dargestellt werden. Dieser wurde 42 Stunden nach Isolation der Trophoblastzellen durchgeführt. Es wurden dabei die im weiteren Verlauf noch verwendeten zwei Verdünnungen des Metformin, sowie alle fünf Verdünnungen des Thiazolidindion in ihrer Wirkung auf die Zellvitalität untersucht. Des Weiteren ergibt sich beim Zusatz von Triton zur Zellkultur die Positivkontrolle, die Zellkultur ohne Zugabe eines Medikamentes dient als Negativkontrolle. Das Ausmaß der gemessenen Fluoreszenz verhält sich proportional zur Anzahl lebensfähiger Zellen im Medium.

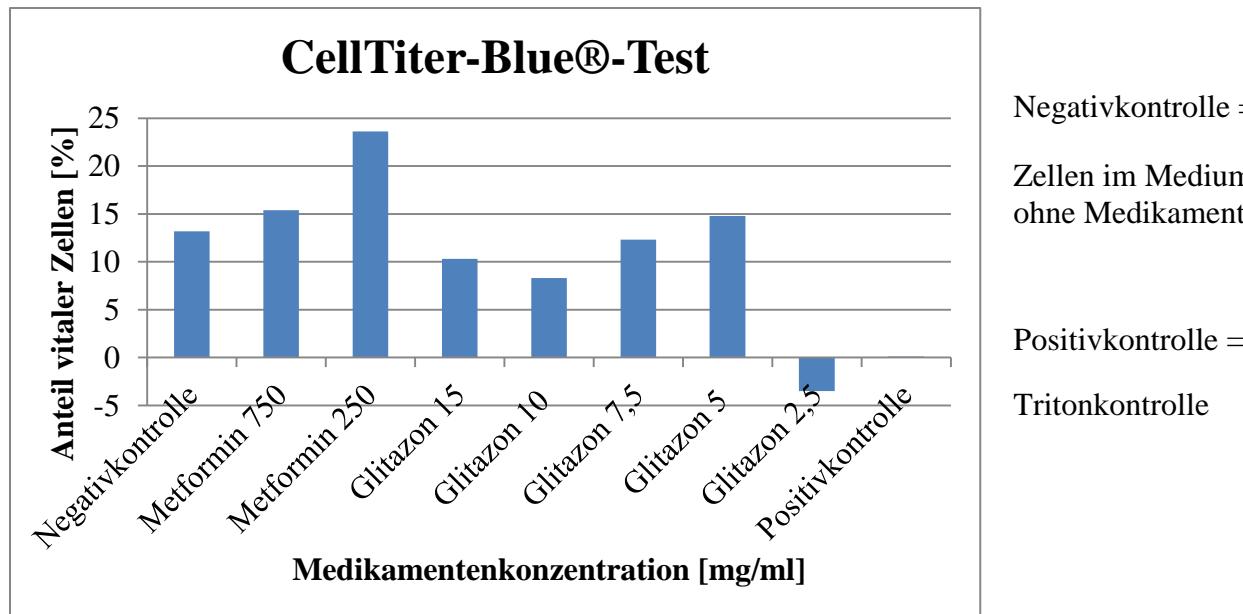


Abbildung 11: CellTiter-Blue®-Test:

42 Stunden nach Isolation zeigt sich eine im Vergleich zur Tritonkontrolle höhere Zellvitalität nahezu aller untersuchten Medikamentenverdünnungen. Lediglich in der mit 2,5 mg/ml einer Thiazolidindionlösung versetzten Zellkultur zeigt sich ein geringerer Anteil vitaler Zellen. Ein im Vergleich zur Negativkontrolle geringerer Anteil vitaler Zellen lässt sich unter Thiazolidindion 15, 10, 7,5 und 2,5 mg/ml nachweisen.

Aus der grafischen Darstellung des Versuches in der Abbildung 11 wird anhand der gemessenen Fluoreszenz ersichtlich, dass nach 42 Stunden die Zellvitalität in den beiden mit Metforminverdünnungen versetzten Ansätzen höher ist als im Vergleich zur Positivkontrolle. Auch die mit Thiazolidindion versetzten Ansätze zeigen bei allen Verdünnungen, mit Ausnahme der Verdünnung 2,5 mg/ml, einen höheren Anteil vitaler Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle. Des Weiteren lässt sich bei beiden untersuchten Konzentrationen des Metformin und bei Zugabe von Thiazolidindion 5 mg/ml eine im Vergleich zur Negativkontrolle leicht erhöhte Zellvitalität nachweisen. Dieser Test wurde einmalig durchgeführt. Aufgrund der kleinen verwendeten Datenmenge ist auch bei diesem Test daher

keine statistische Analyse der erhobenen Messwerte möglich. Es zeigt sich aber, dass die Zugabe von Metformin zu den Zellkulturen nicht mit einer erhöhten Zytotoxizität einhergeht.

6.5 Glukose, Östrogen und Progesteron unter dem Einfluss von Metformin

Nach mehrfacher Zentrifugation des Zellüberstandes wurden jeweils 500 µl dieses Überstandes bei -85°C gelagert, bevor sie zur Bestimmung der Konzentration von Glukose, Östrogen und Progesteron unter dem Einfluss der hinzugefügten Medikamente in verschiedenen Konzentrationen ins Labor versendet wurden. Untersucht wurde der Einfluss von Metformin und Thiazolidindion auf die Sekretion von Östrogen und Progesteron, sowie die Konzentration von Glukose im Nährmedium, über einen zeitlichen Verlauf von 72 Stunden.

6.5.1 Einfluss von Metformin auf die Glukosekonzentration im Überstand

In der Betrachtung der drei Versuchsreihen mit Zugabe von Metforminlösungen der Konzentrationen 125 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml und 750 mg/ml zu den Zellkulturen im Vergleich zu einer Kontrolle, bestehend nur aus dem Zellmedium, zu den vier untersuchten Zeitpunkten zeigt sich Folgendes:

Es erfolgte hier zunächst die Bildung eines Mittelwertes aus den jeweils zwei gemessenen Glukosekonzentrationen im Überstand jedes Wells. Schon in der Einzelbetrachtung aller drei Versuchsreihen mit Metformin scheint bei den niedrigeren Medikamentenkonzentrationen eine Abnahme der Glukosekonzentration im Überstand der Zellkulturen zu erfolgen (s. Anhang 2). Das Ergebnis nach Bildung des Mittelwertes aus den gemessenen Konzentrationen aller drei Versuchsreihen mit Metformin ist zusammenfassend in Abbildung 12 dargestellt.

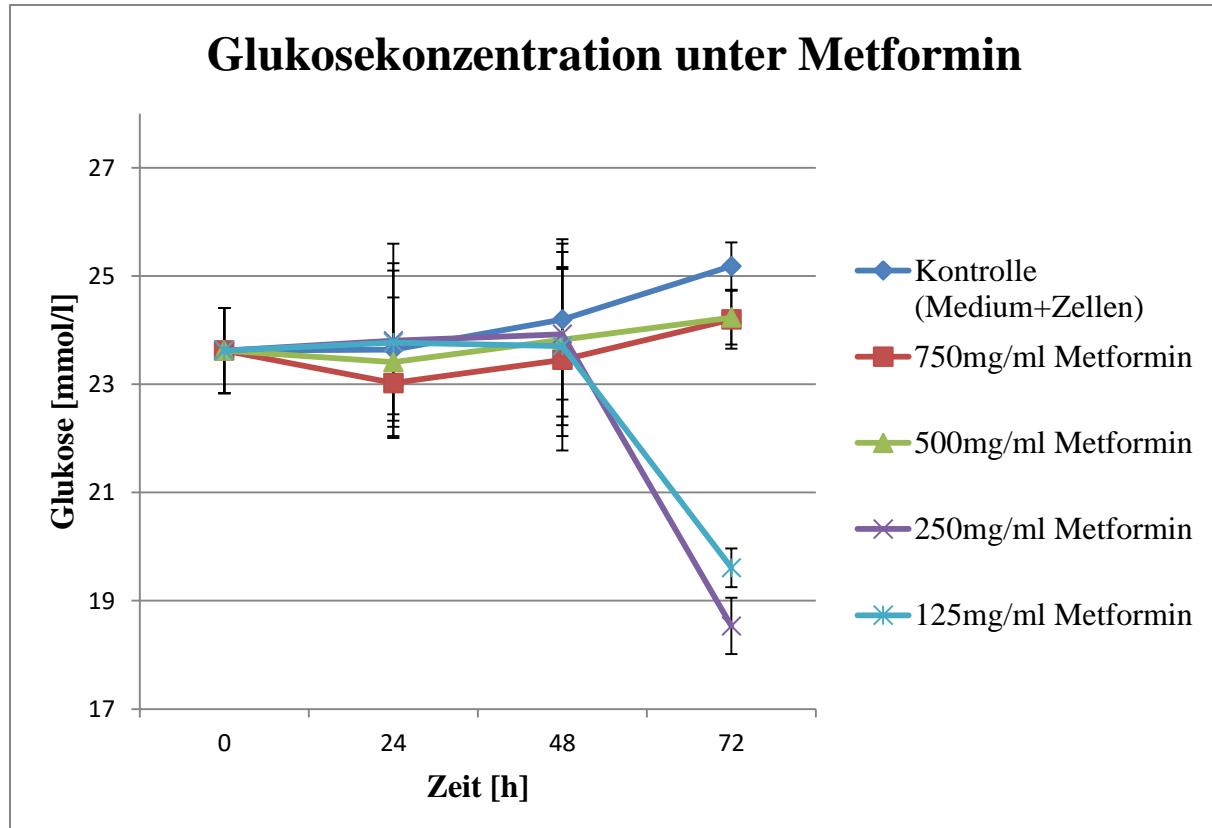


Abbildung 12: Einfluss von Metformin auf die Glukosekonzentration

Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Abnahme der Glukosekonzentration unter den Metforminkonzentrationen 125 mg/ml ($p= 0,023$) und 250 mg/ml ($p= 0,005$) 72 Stunden nach Isolation der Trophoblastzellen.

Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Glukosekonzentration bei 125 mg/ml ($p= 0,023$) und 250 mg/ml ($p=0,005$) der Metforminverdünnung nach einer Beobachtungszeit von 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle (Zellkultur ohne Medikamentenzugabe).

6.5.2 Einfluss von Metformin auf die Östrogenkonzentration im Überstand

Es wurde ein Vergleich der Östrogenkonzentration im Überstand des mit den verschiedenen Metforminverdünnungen versetzten Zellmedium mit Kontrolle vorgenommen. Zunächst werden alle drei Ansätze getrennt voneinander dargestellt (s. Anhang 3). Ab der zweiten

Ergebnisse

Versuchsreihe mit Metformin wurde im weiteren Verlauf aus Kostengründen auf die Bestimmung der Zellüberstände der Konzentrationen 125mg/ml und 500mg/ml verzichtet, da sich bereits im 1. Ansatz der größte Effekt auf die Östrogenkonzentration in den Verdünnungen 750 mg/ml und 250 mg/ml zeigte und diese als ausreichend für die Darstellung signifikanter Änderungen der Östrogenkonzentration erachtet wurden. Im letzten Ansatz wurde dann auch auf die Messung der Ausgangskonzentration des Östrogens im Zellkulturüberstand verzichtet, da sich der größte Effekt in den beiden vorhergehenden Versuchsreihen nach 72 Stunden Beobachtungszeit darstellte und primär ein Vergleich der Östrogenkonzentrationen unter den verschiedenen Verdünnungen, und weniger der absoluten Änderung über die Zeit vorgenommen werden sollte.

Hier zeigt sich bei Betrachtung der zweiten und dritten Versuchsreihe eine deutliche dosisabhängige Abnahme der von den Trophoblastzellen sezernierten Östrogenkonzentration um bis zu 400 pg/ml nach 72 Stunden im Vergleich mit der Kontrolle. Die berechneten Mittelwerte der Messwerte aus allen drei Versuchsreihen sind in Abbildung 13 dargestellt.

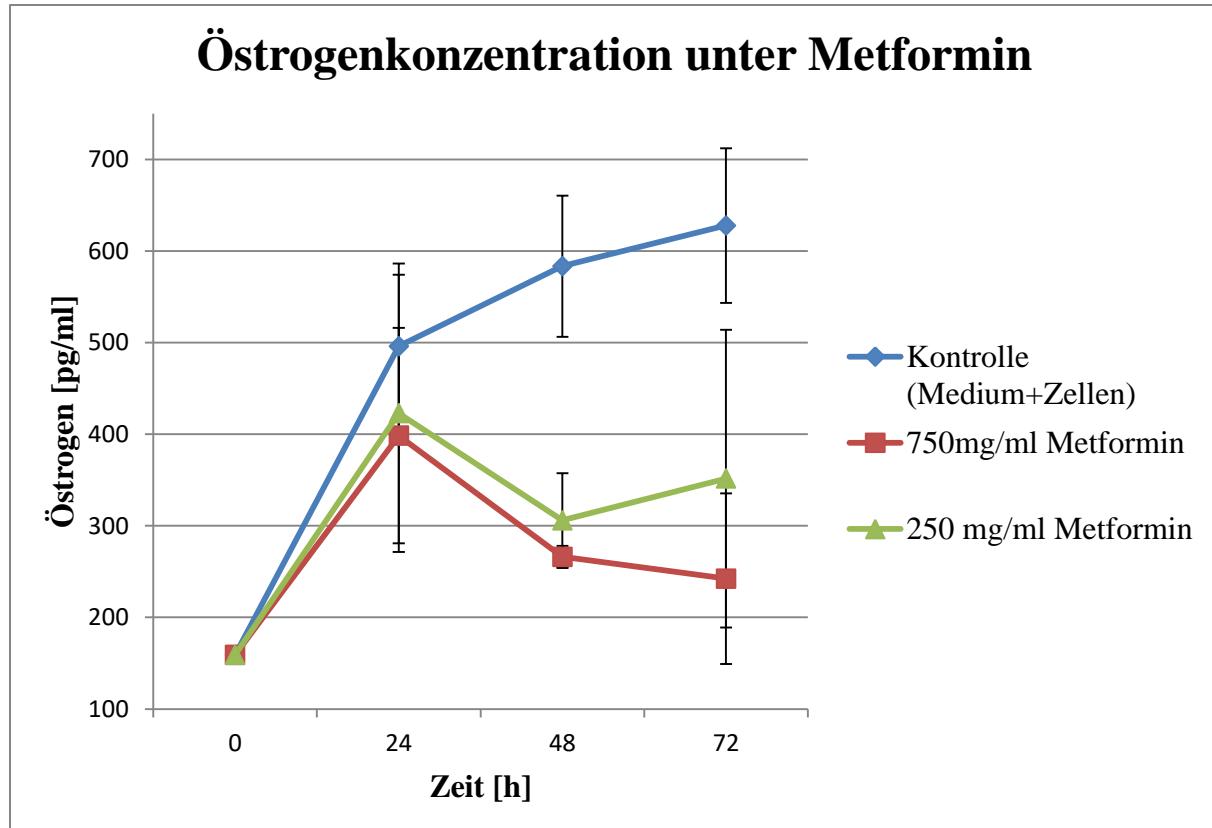


Abbildung 13: Einfluss von Metformin auf die Östrogenkonzentration

Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Reduktion der Östrogenkonzentration in den mit 250 mg/ml ($p= 0,003$) und 750 mg/ml ($p= 0,001$) versetzten Zellkulturen 72 Stunden nach Isolation der Trophoblastzellen.

In der statistischen Analyse zeigt sich nach 72 Stunden somit eine signifikante Reduktion der von den Trophoblastzellen sezernierten Östrogenkonzentration für die Metforminverdünnungen 250 mg/ml ($p= 0,003$) und 750 mg/ml ($p= 0,001$). Dies ist weniger deutlich auch schon nach 48 Stunden Beobachtungszeit sichtbar (bei 250 mg/ml $p= 0,006$ und bei 750 mg/ml $p= 0,002$). Es ist somit von einer negativen Beeinflussung der Östrogensekretion durch die Trophoblastzellen unter dem Einfluss von Metformin auszugehen. Gleichzeitig zeigt sich insgesamt der durch Hormonproduktion und -sekretion

durch die Trophoblastzellen erwartete Anstieg der Östrogenkonzentration im nicht mit Metformin versetzten Zellmedium über den Beobachtungszeitraum von 72 Stunden.

6.5.3 Einfluss von Metformin auf die Progesteronkonzentration im Überstand

Es erfolgte ein Vergleich der Progesteronkonzentration im Überstand der mit den vier Metforminverdünnungen versetzten Zellkulturen mit der Kontrolle (Zellkultur ohne Metforminzugabe). Ab dem zweiten Ansatz wurde bei der Ermittlung der Progesteronkonzentration aus den bereits oben erwähnten Gründen außerdem auf die Bestimmung des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 0 Stunden verzichtet (s. Anhang 4).

Bei der Betrachtung des 1. und 3. Ansatzes entsteht der Eindruck, dass nach 72 Stunden eine dosisabhängige Zunahme der Progesteronkonzentration im Zellüberstand vorliegt. Nach Zusammenfassung der Messwerte aller drei Versuchsreihen durch Bildung der Mittelwerte wird dieser Eindruck bestätigt, wie in der folgenden Abbildung 14 ersichtlich wird.

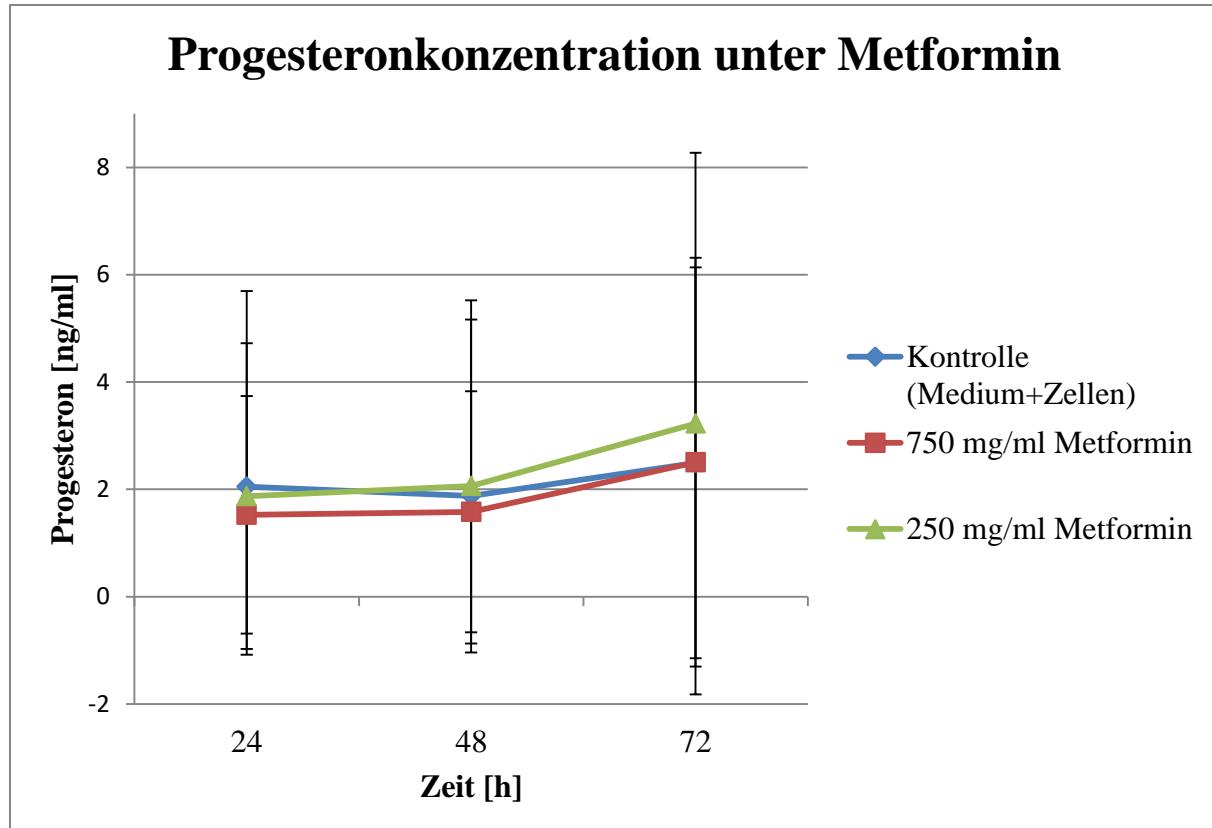


Abbildung 14: Einfluss von Metformin auf die Progesteronkonzentration

Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Keine signifikante Abnahme der Progesteronkonzentration unter 250 mg/ml und 750 mg/ml Metformin.

In der statistischen Auswertung zeigt sich keine signifikante Veränderung der Progesteronproduktion und -sekretion der Trophoblastzellen unter dem Einfluss der Metforminverdünnung nach 72 Stunden.

6.6 Glukose, Östrogen und Progesteron unter dem Einfluss von Thiazolidindion

Analog zum oben genannten Vorgehen bei den Versuchsreihen mit Metformin, erfolgte die Bestimmung der Konzentration von Glukose, Östrogen und Progesteron unter dem Einfluss von Thiazolidindion in fünf verschiedenen Konzentrationen über einen Beobachtungszeitraum von 72 Stunden.

6.6.1 Einfluss von Thiazolidindion auf die Glukosekonzentration im Überstand

Die Bestimmung der Glukosekonzentration im Überstand der mit den fünf verschiedenen Thiazolidindionkonzentrationen (2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 7,5 mg/ml, 10 mg/ml und 15 mg/ml) versetzten Zellkulturen im Vergleich zur Zellkultur ohne Medikamentenzugabe ist in Anhang 5 dargestellt. Bei den in Anhang 5 gezeigten Diagrammen erfolgte wieder zunächst die Bildung eines Mittelwertes aus jeweils zwei gemessenen Glukosekonzentrationen im Überstand jedes Wells zu den vier Untersuchungszeitpunkten. Aus den drei Diagrammen wird ersichtlich, dass kein eindeutiger Einfluss des Thiazolidindion in den fünf verschiedenen Konzentrationen auf die Glukoseverstoffwechselung der Trophoblastzellen vorliegt. In der statistischen Analyse bei Betrachtung aller drei Versuchsreihen zusammen zeigt sich jedoch eine signifikante Zunahme der Glukosekonzentration nach 72 Stunden unter der Verdünnung 5 mg/ml ($p= 0,036$) im Vergleich zur Kontrolle. Dies ist grafisch in Abbildung 15 dargestellt.

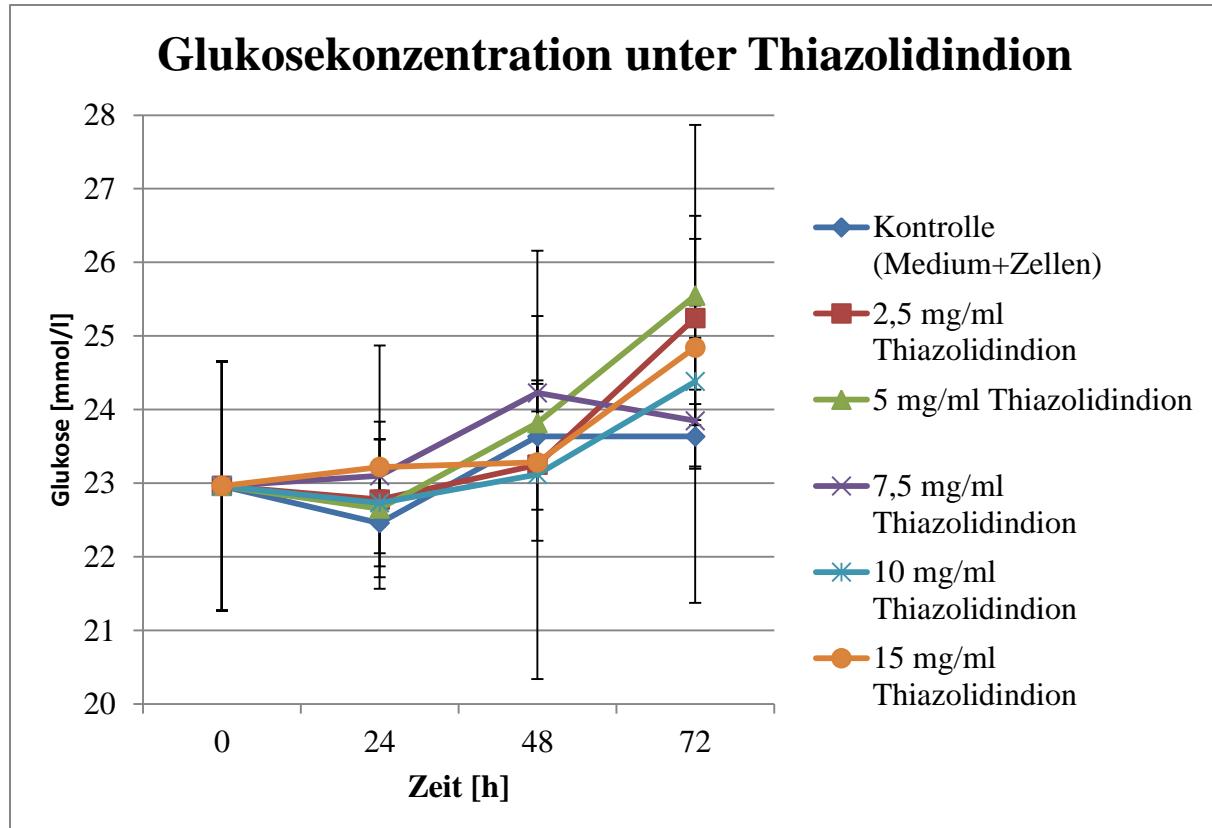


Abbildung 15: Einfluss von Thiazolidindion auf die Glukosekonzentration

Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Zunahme der Glukosekonzentration unter 5 mg/ml ($p=0,036$) der Thiazolidindionverdünnung 72 Stunden nach Isolation der Trophoblastzellen.

6.6.2 Einfluss von Thiazolidindion auf die Östrogenkonzentration im Medium

Untersucht wurde der Einfluss der fünf verschiedenen Konzentrationen von Thiazolidindion auf die Östrogensekretion der Trophoblastzellen im Zellkulturmedium im Vergleich zur Kontrolle (Zellkultur ohne Medikamentenzugabe). Im Folgenden werden zunächst die drei Versuchsreihen einzeln betrachtet. In der grafischen Darstellung der einzelnen Versuchsreihen scheint nur im 1. Ansatz eine Reduktion der Östrogenkonzentration im Zellkulturmedium mit den Medikamentenkonzentrationen 2,5 mg/ml, 5 mg/ml und 15 mg/ml im Vergleich zur Kontrolle vorzuliegen. Betrachtet man nun alle drei Versuchsreihen zusammen, so zeigt sich in der statistischen Auswertung tatsächlich keine signifikante

Ergebnisse

Reduktion der Östrogenkonzentration in den mit Thiazolidindion versetzten Zellkulturen im Vergleich zur Kontrolle nach 72 Stunden. In der grafischen Darstellung aller drei Versuchsreihen wird dies ebenfalls ersichtlich (s. Abbildung 16).

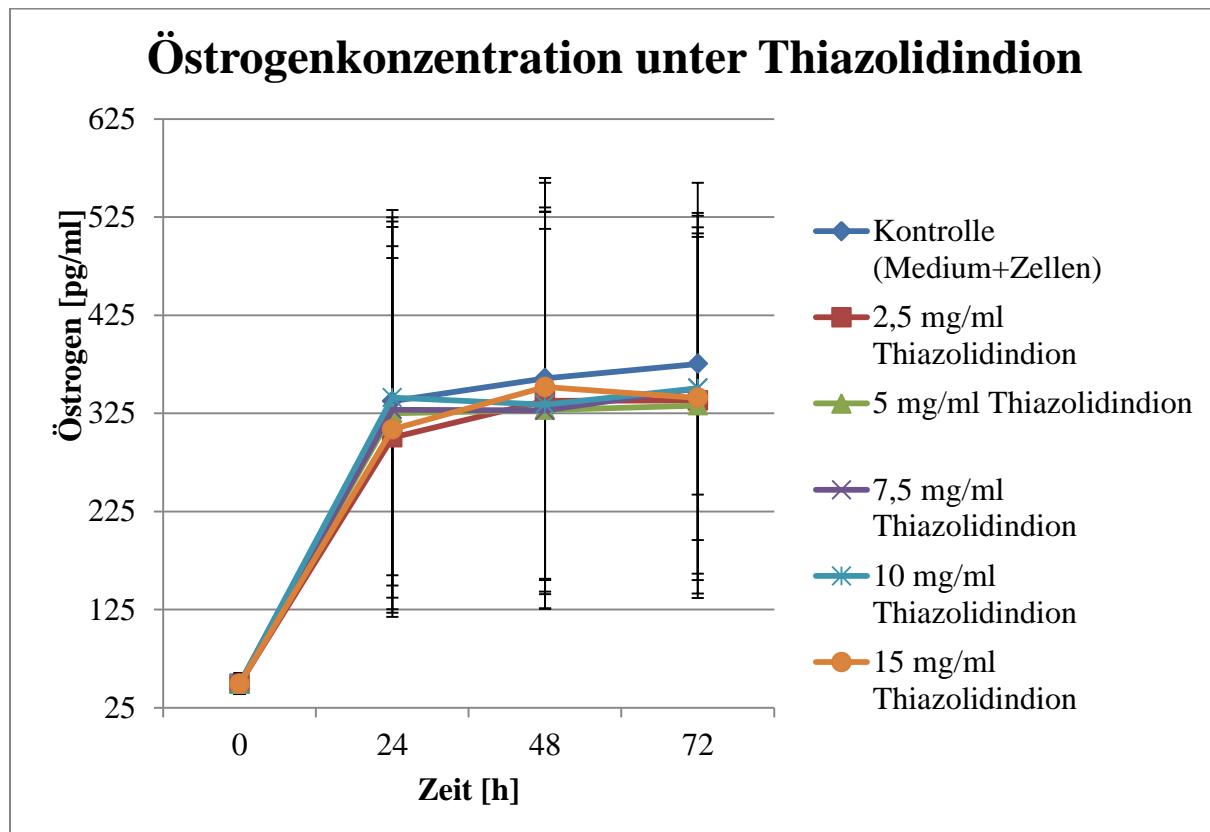


Abbildung 16: Einfluss von Thiazolidindion auf die Östrogenkonzentration

Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Kein Nachweis einer signifikanten Reduktion der Östrogenkonzentration in den mit Thiazolidindion versetzten Zellkulturen 72 Stunden nach Isolation.

6.6.3 Einfluss von Thiazolidindion auf die Progesteronkonzentration im Überstand

Im Folgenden wird zunächst der Einfluss der fünf verschiedenen Thiazolidindionkonzentrationen auf die Progesteronproduktion und -sekretion der Trophoblastezellen in den drei Versuchsreihen untersucht (s. Anhang 7). Als Kontrolle gilt wie zuvor die Zellkultur im Medium ohne Zugabe des Medikamentes. In der statistischen

Ergebnisse

Auswertung aller drei Versuchsreihen bestätigt sich die anhand der drei Grafiken schon vermutete statistisch signifikante Zunahme der Progesteronkonzentration der Trophoblastzellen unter den Thiazolidindionverdünnungen 5 mg/ml ($p= 0,012$) und 7,5 mg/ml ($p= 0,003$) nach 72 Stunden (s. Abbildung 17).

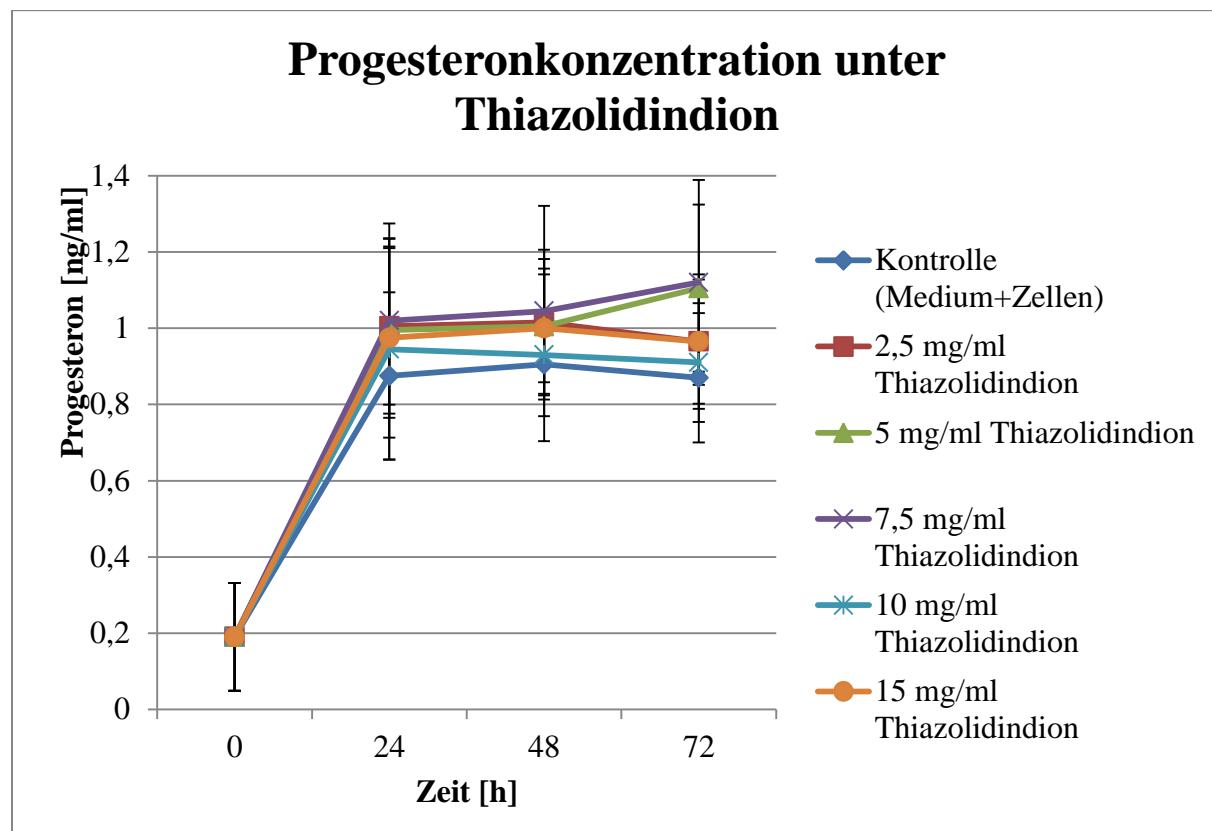


Abbildung 17: Einfluss von Thiazolidindion auf die Progesteronkonzentration

Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Zunahme der Progesteronkonzentration unter den Thiazolidindionverdünnungen 5 mg/ml ($p= 0,012$) und 7,5 mg/ml ($p= 0,003$) 72 Stunden nach Isolation der Zellen.

6.7 Ergebnisse des PIgf-Immunoassay

Beim PIgf handelt es sich um einen von den humanen Trophoblastzellen produzierten plazentaren Wachstumsfaktor. Mittels des PIgf-Immunoassays, eines ELISA-Tests zur quantitativen photometrischen Bestimmung des PIgf in Zellsuspensionen, wurde zunächst

Ergebnisse

der PIgf im Zellüberstand von mit 750 mg/ml, 500 mg/ml und 250mg/ml einer Metforminlösung versetzten Trophoblastzellkultur nach 0 h, 24 h ,48 h und 72 h ermittelt. Hierzu wurde aus der ermittelten optische Dichte einer Verdünnungsreihe einer Standard-PIGF-Lösung zunächst eine Standardkurve ermittelt, aus welcher sich dann anhand der aufgeführten Formel für jede der Medikamentenkonzentrationen zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 Stunden eine PIgf- Konzentration ermittelt ließ (s. Abbildung 18).

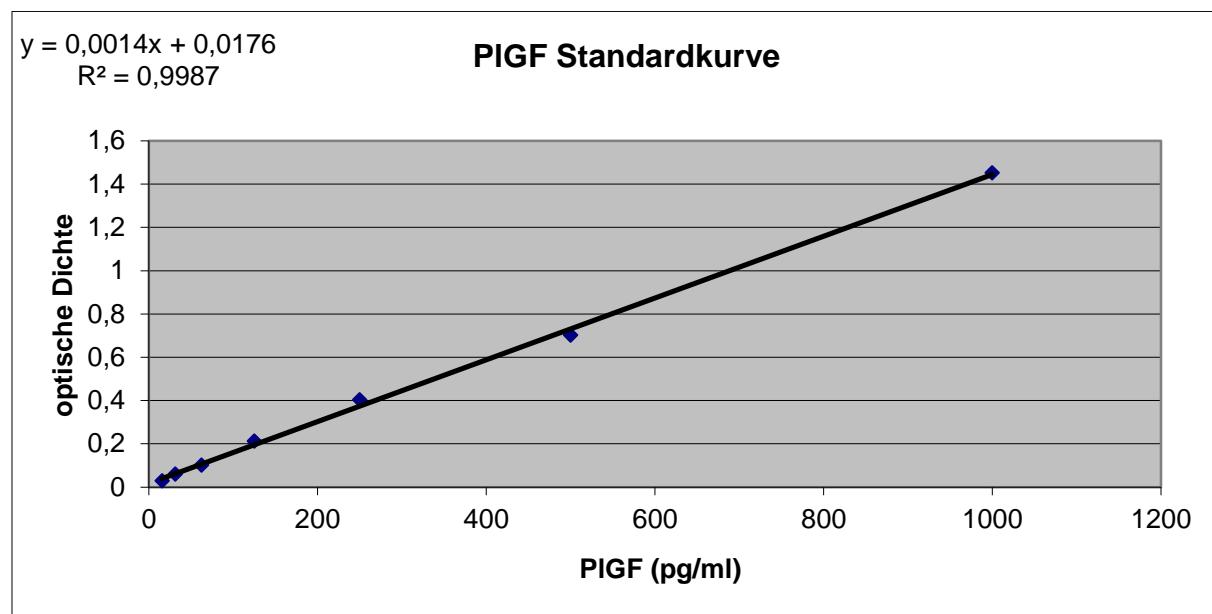


Abbildung 18: PIgf Standardkurve zur Berechnung der PIgf-Konzentrationen der mit Metformin und Thiazolidindion versetzten Zellkulturen

Hier zeigte sich nach 48 und 72 Stunden Beobachtungszeit, dass lediglich in der Kontrolle (Zellkultur ohne Medikamentenzugabe) eine PIgf-Produktion und -sekretion stattgefunden hat, es ließ sich jedoch zu keinem Zeitpunkt und in keiner der verschiedenen untersuchten, mit Metforminlösungen versetzten, Zellkulturen PIgf nachweisen (s. Abbildung 19).

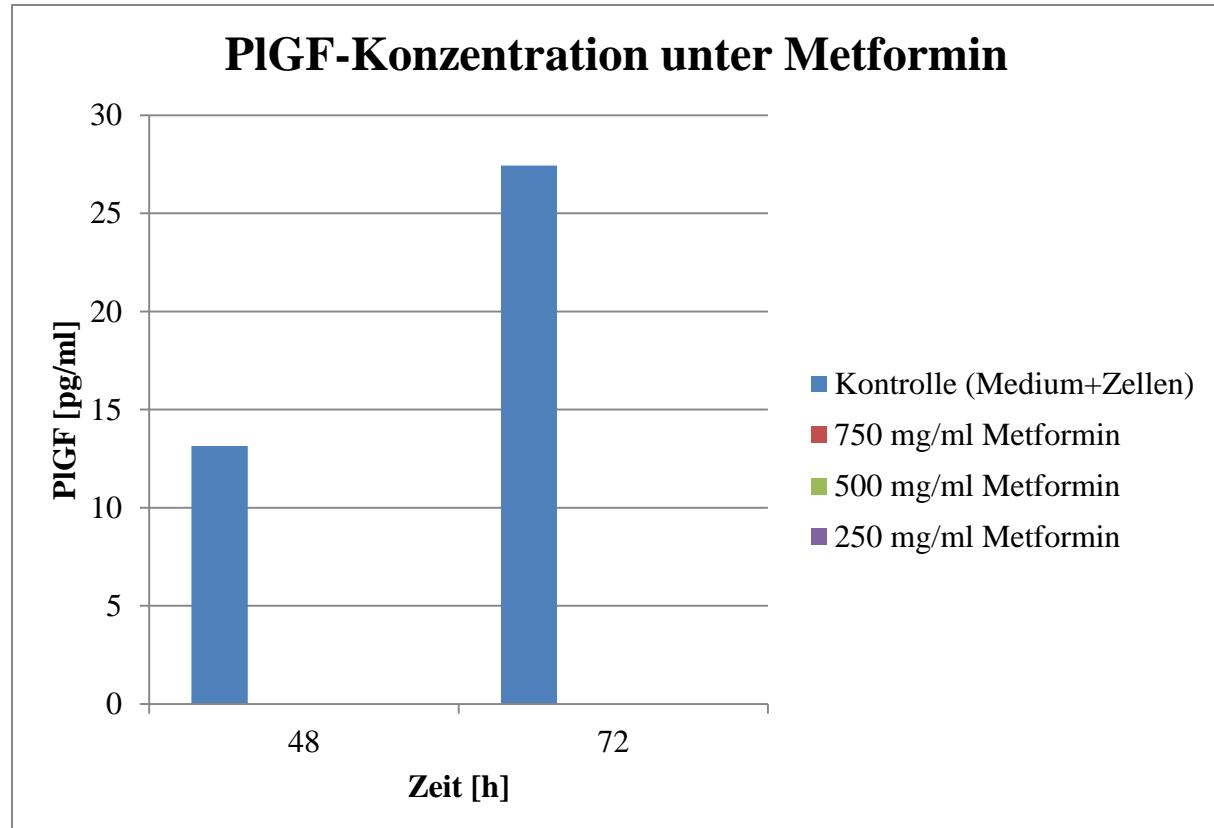


Abbildung 19: PIGF- Immunoassay für Metformin

Reduktion der PIGF-Konzentration aller mit einer Metforminlösung versetzten Zellkulturen im Vergleich zur Zellkultur ohne Medikamentenzugabe.

Weiterhin wurde eine Bestimmung von PIGF im Zellüberstand von mit 15 mg/ml, 7,5 mg/ml und 2,5 mg/ml einer mit Thiazolidindionlösung versetzten Zellkultur zu den genannten Beobachtungszeitpunkten vorgenommen. Es zeigte sich eine bis zu 25 pg/ml geringere PIGF-Produktion und -sekretion in den mit Thiazolidindion versetzten Zellkulturen im Vergleich zur Kontrolle nach 72 Stunden Beobachtungszeit. Dabei ist die Reduktion des PIGF umso stärker ausgeprägt, je geringer konzentriert die verwendete Thiazolidindionlösung ist. Dies ist in Abbildung 20 dargestellt.

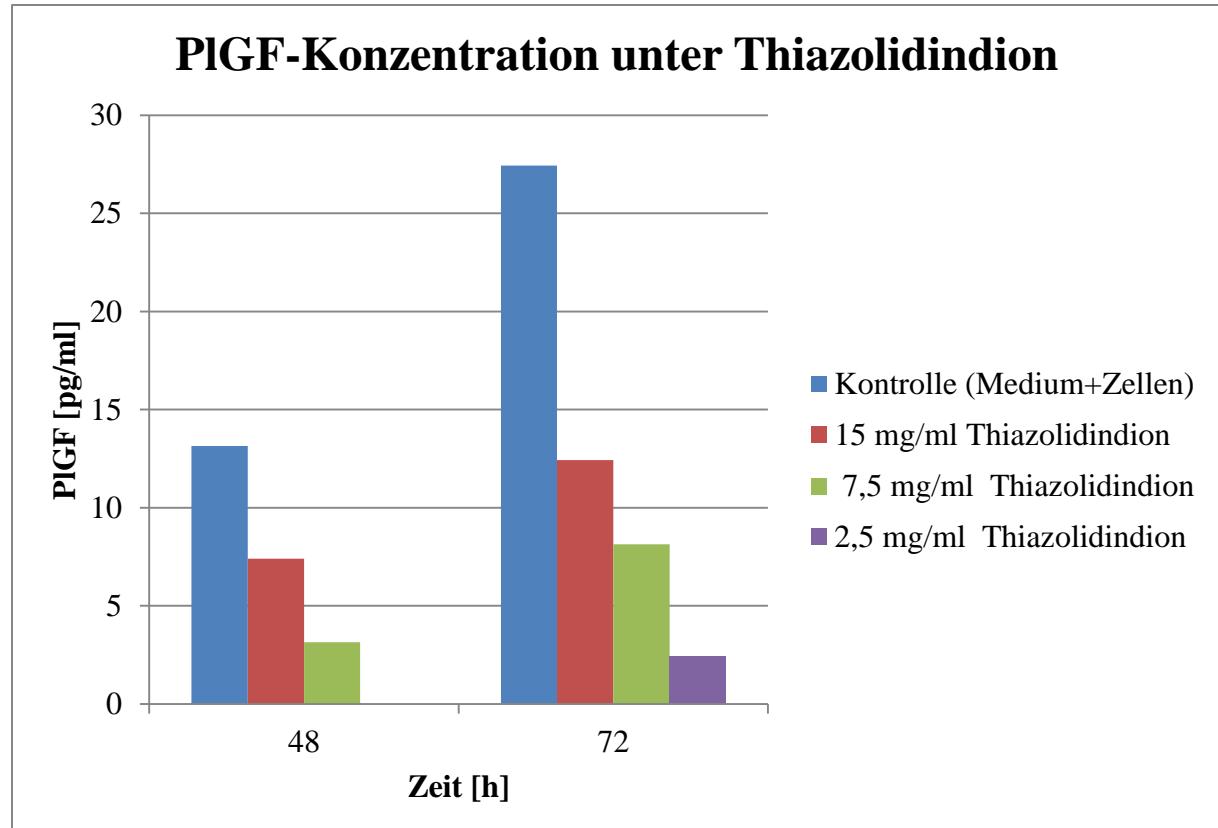


Abbildung 20: PIGF- Immunoassay für Thiazolidindion

Nachweis einer bis zu 25 pg/ml geringeren PIGF- Produktion (unter 2,5 mg/ml Thiazolidindion) in den mit Thiazolidindion versetzten Zellkulturen im Vergleich zur Kontrolle 72 Stunden nach Isolation der Zellen.

Aus finanziellen Gründen wurde der PIGF-Test für jedes der Medikamente nur einmal durchgeführt, wodurch seine Aussagekraft gering ist.

7. Diskussion

7.1 Die zytotoxische Wirkung von Metformin und Thiazolidindion

Trophoblastzellen sind aufgrund ihrer Möglichkeit zum invasiven Wachstum und zur Hormonsynthese essentiell für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft und den Stoffaustausch zwischen maternalem und fetalem Gewebe. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Metformin und Thiazolidindion eine zytotoxische Wirkung auf humane Trophoblastzellen besitzen. Hierzu erfolgte die mikroskopische Beobachtung der mit den verschiedenen Konzentrationen der Metformin- und Thiazolidindionlösung versetzten Trophoblastzellkulturen im Vergleich zu Trophoblastzellkulturen ohne Medikamentenzugabe zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h. Es zeigt sich mikroskopisch kein Unterschied in der Zellfusion der Zytotrophoblasten zu Synzytiotrophoblasten, sowohl im Vergleich der mit Medikamenten versetzten Zellkulturen zu denen ohne Medikamentenzusatz, als auch im Vergleich der mit Metformin und Thiazolidindion unterschiedlicher Konzentration versetzten Zellkulturen untereinander. Des Weiteren sind, soweit mikroskopisch beurteilbar, Zeitpunkt und Ausmaß der Zellfusion unabhängig von der jeweils verwendeten Medikamentenkonzentration.

In der immunhistochemischen Vitalitätsprüfung mittels LDH-Zytotoxizitätstest zeigte sich 96 Stunden nach Isolation der Zellen und Zugabe der fünf verwendeten Konzentrationen der Thiazolidindionlösung eine im Vergleich zur Negativkontrolle (Zellen im Medium ohne Medikamentenzugabe) erhöhte Zytotoxizität unter den Konzentrationen 2,5 mg/ml, 5mg/ml und 15 mg/ml. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme des prozentualen Anteils nicht-vitaler Zellen, wobei sich unter den Konzentrationen 7,5 mg/ml und 10 mg/ml keine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Zytotoxizität darstellen ließ. Alle verwendeten Thiazolidindionkonzentrationen lagen jedoch deutlich unter der Zytotoxizität der Positivkontrolle mit dem Zellgift Triton (s. Abbildung 10). Da die Tritonkontrolle eine

signifikant höhere Zytotoxizität zeigte, ist davon auszugehen, dass nach 96 Stunden noch ausreichend viele vitale Zellen vorhanden waren und es sich bei der ermittelten Zytotoxizität der mit den Thiazolidindionverdünnungen versetzten Zellkulturen nicht um den normalen, kulturbedingten Zelltod, sondern um den medikamenten-induzierten Zelltod handelte. Es stellt sich jedoch die Frage, wie sich die unter 7,5 und 10 mg/ml Thiazolidindion nicht erhöhte Zytotoxizität erklärt. Da alle pro LDH-Test verwendeten Zellen aus demselben Präparat stammen und unter einheitlichen Bedingungen inkubiert worden sind, ist nicht von einer hohen spontanen LDH-Freisetzung aufgrund eines natürlichen Zelltodes in den übrigen Wells auszugehen. Bei dem verwendeten Test handelt es sich um eine quantitative photometrische Bestimmung des freigesetzten LDH mittels Extinktionsmessung, es wird die stoff- und frequenzabhängige Schwächung der verwendeten Strahlung ermittelt. Eine mögliche Fehlerquelle ist somit eine Interferenz der verwendeten Medikamente, z.B. aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften, mit der Messmethode. Insbesondere bei Verwendung der hohen Medikamentenkonzentrationen zeigte sich bereits makroskopisch eine Trübung des Zellkulturmediums, was möglicherweise die Extinktion beeinflusst. So lässt sich dann auch bei Durchführung des LDH-Zytotoxizitätstest bei den mit Metformin versetzten Zellkulturmedien keine sichere Aussage zu dessen Zytotoxizität treffen, da wie in Abbildung 9 ersichtlich, zwar bei allen verwendeten Konzentrationen des Metformin eine im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte Zytotoxizität ermittelt wird, jedoch auch hier keine Proportionalität der Dosis zur Zytotoxizität besteht. Darüber hinaus lässt sich aufgrund der sehr kleinen Datenmenge für jeden der beiden Tests ($n = 2$) keine valide statistische Auswertung durchführen. Um eine sichere Aussage zur Zytotoxizität beider Medikamente treffen zu können, sind demnach weitere Untersuchungen nötig.

Zur quantitativen Bestimmung der Zellvitalität unter dem Einfluss der beiden untersuchten Medikamente erfolgte außerdem der CellTiter-Blue®-Zytotoxizitätstest, welcher 42 Stunden

nach Isolation der Zellen durchgeführt wurde und mit dessen Hilfe der Anteil lebender Zellen im Medium im Vergleich zu einer Negativkontrolle (ohne Medikamentenzugabe) und einer Positivkontrolle (Triton) bestimmt werden kann. Da dieser Test nur einmalig durchgeführt worden ist, ist wie auch beim LDH-Zytotoxizitätstest, aufgrund der kleinen Datenmenge keine valide statistische Aussage möglich. Im Vergleich zur Positivkontrolle zeigten jedoch alle untersuchten Medikamentenkonzentrationen des Metformin und des Thiazolidindione (bis auf 2,5 mg/ml) einen gering höheren Anteil vitaler Zellen im Medium (Abbildung 11), welcher allerdings nicht relevant erscheint.

Zusammenfassend lässt sich mit den in dieser Arbeit durchgeföhrten Tests keine sichere Aussage über die Zytotoxizität von Metformin und Thiazolidindion treffen. Lichtmikroskopisch ließ sich nach 72 Stunden unter dem Einfluss beider Medikamente jedoch eine normale Zellfusion zu Synzytiotrophoblasten nachweisen. Um eine sichere Aussage zur Zytotoxizität beider Medikamente treffen zu können sind daher weitere Untersuchungen mit einer größeren Datenmenge gegebenenfalls unter Verwendung anderer, nicht mit den Stoffeigenschaften interferierender Messverfahren, nötig.

Die in dieser Arbeit verwendete Glukosekonzentration des Kulturmediums liegt bei ca. 25 mmol/l, was hyperglykämen Bedingungen entspricht. Der Normwert der Serumglukose liegt im Vergleich dazu bei 3,9 – 5,5 mmol/l. Diese Arbeit liefert einen Hinweis auf eine durch die verwendeten Metforminlösungen und drei der fünf verwendeten Thiazolidindionlösungen bedingte erhöhte Zytotoxizität. Da alle Untersuchungen jedoch ausschließlich unter hyperglykämen Bedingungen erfolgten, ist nicht sicher zu differenzieren, ob die ermittelte Zytotoxizität auf die, in allen Kultursätzen vorhandene, Hyperglykämie zurückzuföhren ist. Es bedarf somit einer vergleichenden Untersuchung in einem normoglykämen Kulturmedium, um zwischen einer durch Hyperglykämie und einer durch die verwendeten Medikamente bedingten Zytotoxizität zu unterscheiden.

In einer gesunden Schwangerschaft liegt während des ersten Trimesters ein niedriger Sauerstoffpartialdruck vor. Mit der Trophoblastzellinvasion und Entwicklung der Spiralarterien erfolgt eine hämatotrophe Ernährung der Trophoblastzellen und damit ein Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe gegen Ende des ersten Trimesters. Der Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes geht physiologischerweise mit erhöhtem oxidativen Stress und Bildung antioxidativer Enzyme, wie z.B. Katalase und Glutathionperoxidase, einher (Myatt & Cui, 2004). Mehrere Studien haben den Einfluss einer Hyperglykämie bei Gestationsdiabetes oder Diabetes mellitus auf die Zytotoxizität untersucht. Das Vorliegen eines Gestationsdiabetes ist mit erhöhtem oxidativen Stress verbunden (Coughlan et al., 2004). Aus einem gestörten Gleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoffspezies und Antioxidantien ergibt sich oxidativer Stress (West, 2000). Dieser wird in der Plazenta über verschiedene Mechanismen vermittelt. Hierzu gehören eine Aktivierung von Proteinkinase C-Isoformen, vermehrte Aktivierung des Hexosamin- und Polyol-Stoffwechselweges, sowie eine vermehrte Bildung des Advanced Glycation End Product (AGE). Eine Aktivierung des Polyol-Stoffwechsels hat über Bildung von Sorbitol aus Glukose eine Reduktion der Antioxidantien NADPH und Glutathion zur Folge (Rolo & Palmeira, 2006). Eine Hyperglykämie führt in der mitochondrialen Atmungskette zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und oxidierten Proteine (Palmeira et al., 2007), welche eine wesentliche Bedeutung für den klinischen Verlauf und Komplikationen des Diabetes mellitus haben. In einer Studie von Lappas et al. wurde Plazentagewebe gesunder und an Gestationsdiabetes erkrankter Frauen mit Hypoxanthin/Xanthin-Oxidase (HX/XO), einem Bildner freier Radikale, versetzt und die Expression antiinflammatorischer Zytokine und Antioxidantien untersucht. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Genexpression der Antioxidantien Catalase und Glutathion-Reduktase im Plazentagewebe der an Gestationsdiabetes erkrankten Frauen im Vergleich zu gesunden Frauen. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass in der Plazenta gesunder Frauen 13 der 16 untersuchten inflammatorischen Zytokine vermehrt

freigesetzt wurden, im Vergleich zu nur 3 Zytokinen in der erkrankten Plazenta. Dies unterstützt die Vermutung, dass die Plazenta erkrankter Frauen eine geringere Reaktionsfähigkeit auf endogenen oxidativen Stress besitzt als die gesunder Frauen (Lappas et al., 2010). Oxidativer Stress kann zur Induktion von Apoptose oder Zellnekrose führen. Den Zusammenhang zwischen einer durch Hyperglykämie bedingten vermehrten Produktion freier reaktiver Sauerstoffspezies in den Mitochondrien und Apoptose bewiesen Piconi et al. Sie wiesen eine vermehrte Expression der Apoptosemarker Bcl-2 und Caspase-3 sowie erhöhte Konzentrationen von Nitrotyrosin und 8-Hydroxydesoxyguanosin (8OHdG) als Biomarker für oxidativen Stress nach (Piconi et al., 2006). An Mesangiumzellen, welche entweder in 5 mM oder 25 mM D-Glukosemedium kultiviert worden sind, zeigte sich unter den Einfluss hoher Glukosekonzentrationen eine um das 2,7-fach erhöhte Aktivität der Caspase-3 sowie erniedrigte Aktivierung des antiapoptotischen Transkriptionsfaktors NF-κB. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass glukosebedingte Apoptose über TGF- β 1 vermittelt wird (Khera et al., 2006). Dass Hyperglykämie eine Apoptose induzieren kann, konnten auch Pal et al. an GnRH- produzierenden GT-1-1 Neuronen nachweisen. Nach 72 stündiger Kultivierung der Zellen entweder in DMEM high-glucose oder DMEM low-glucose Medium zeigten die der höheren Glukosekonzentration ausgesetzten Zellen eine um 13 % höhere Apoptoserate (Pal et al., 2007). Die Plazenta verfügt jedoch auch über antioxidative Systeme, wie z.B. Katalase, Glutathion, Glutathion-Peroxidase, Thioredoxin, und andere (Myatt & Cui, 2004). Patientinnen mit Gestationsdiabetes zeigen eine höhere Serumkonzentration der Antioxidantien Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase (López-Tinoco et al., 2013). An den Trophoblastzellen ähnlichen humanen Chorionkarzinomzellen, den BeWo, Jar und Jeg-3-Zellen, konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress eine erhöhte Thioredoxinproduktion zur Folge hat. Während intrazelluläres Thioredoxin reaktive Sauerstoffspezies reduziert, moduliert extrazelluläres Thioredoxin die zytokinvermittelte

Zellbindung (Di Trapani et al., 1998). Dies gibt Hinweise darauf, dass möglicherweise Adaptationsmechanismen der Zellen vorliegen.

Andere Studien treffen gegensätzliche Aussagen. Eine zytotoxische Wirkung der Hyperglykämie konnte von Hinck et al. widerlegt werden. Sie zeigten an Chorionkarzinomzellen von Ratten, dass keine Zunahme der Apoptoserate unter hyperglykämen Kulturbedingungen vorliegt. Es wird jedoch ein Einfluss auf die Trophoblastzelldifferenzierung vermutet. Die für die Differenzierung wichtige Endoredublikation, also die DNA-Replikation ohne nachfolgende Zellteilung, war unter Einfluss der Hyperglykämie erhöht, bei gleichzeitig reduziertem Zellwachstum scheint eine Hyperglykämie den Zellzyklus jedoch negativ zu beeinflussen. Außerdem konnte unter hyperglykämen im Gegensatz zu normoglykämen Bedingungen keine Zunahme der Progesteronkonzentration verzeichnet werden (Hinck et al., 2003). Auch in Untersuchungen an humanen Chorionkarzinomzellen konnte die zytotoxische Wirkung der Hyperglykämie nicht bestätigt werden. Es gelang jedoch auch hier der Nachweis, dass eine Hyperglykämie zu einem Zellzyklusarrest führt (Weiss et al., 2001). Da Karzinomzellen als Voraussetzung für ein malignes Wachstum jedoch eine gewisse Apoptoseresistenz besitzen, ist fraglich in wie weit die oben genannten Ergebnisse Rückschlüsse auf humane Trophoblastzellen zulassen.

Das Antidiabetikum Metformin besitzt neben einem blutzuckersenkenden auch antioxidative Effekte. Hou et al. konnten zeigen, dass Metformin sowohl intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies reduzieren, als auch die Expression von Thioredoxin erhöhen kann. Endotheliale Zellen wurden mit Palmitinsäure, einem Bildner von Antioxidantien, versetzt, und der intrazelluläre Gehalt an Antioxidantien bestimmt. In den zusätzlich mit 100- 500 µM Metformin inkubierten Zellen wurde eine dosisabhängige Reduktion der intrazellulären Antioxidantien im Vergleich zu nicht mit Metformin versetzten Zellen gemessen. Die ebenfalls unter dem Einfluss von Metformin dosisabhängig erhöhte Thioredoxin-Expression

wird dabei durch Phosphorylierung der AMP-activated Protein Kinase (AMPK) vermittelt (Hou et al., 2010). An Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine, z.B. durch Hyperglykämie bedingte, vermehrte Stimulation der AMPK über verminderte Expression des Pax3-Gens Neuralrohrdefekte verursachen kann (Fine et al., 1999). Obwohl Metformin bei schwangeren Mäusen eine Stimulation der AMPK in der Leber bewirkte, konnte dieser Effekt in den Mauseembryonen nicht nachgewiesen werden. Außerdem ging die Metforminexposition mit keiner erhöhten Rate an Neuralrohrdefekten einher. Dies ist möglicherweise auf einen embryonalen Mangel an Metformin-Transportern zurückzuführen (Lee & Wei, 2014). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass Metformin AMPK-unabhängig eine Reduktion endogener reaktiver Sauerstoffspezies bewirkt. Es hemmt sowohl Komplex I als auch Komplex III der Atmungskette und reduziert die Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen (Algire et al., 2012) Ouslimani et al. zeigten ebenfalls an Endothelzellen eine Reduktion intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies unter dem Einfluss von Metformin und postulierten, dass diese durch eine Reduktion der NAD(P)H Oxidase oder Aktivität der mitochondrialen Atmungskette verursacht wird (Ouslimani et al., 2005).

Zyto- und genotoxische Effekte wurden für Rosiglitazon, Pioglitazon und Troglitazon nachgewiesen. Die Genotoxizität der Thiazolidindione ist dabei auf eine erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zurückzuführen (Bedir et al., 2006), (Bedir et al., 2008). Oz Gul et al. untersuchten den zytotoxischen Effekt einer 6-monatigen Therapie von an Diabetes mellitus Typ II erkrankten Patienten mit Rosiglitazon (4 mg/d) oder Pioglitazon (30 mg/d) anhand peripherer Lymphozyten. Es zeigten sich sowohl der mitotische Index (MI) als auch der Replikationsindex (RI) und der Kernteilungsindex (nuclear division index, NDI) in den untersuchten Lymphozyten signifikant erniedrigt im Vergleich zu einer diätetischen Therapie. Des Weiteren wurden signifikant erhöhte genotoxische Effekte, gemessen an der Anzahl von Schwester-Chromatid-Austausch (SCE, sister chromatid exchange), chromosomalen

Diskussion

Aberrationen (TCA, total chromosome aberrations) und Micronucleus-Bildung (MN) im Vergleich zur diätetischen Therapie ermittelt. Es bestand dabei kein signifikanter Unterschied zwischen Pioglitazon und Rosiglitazon (Oz Gul et al., 2013). Der direkte zytotoxische Effekt von Troglitazon und seines Metaboliten Troglitazonbisulfat auf humane Hepatozyten scheint durch oxidativen Stress bedingt zu sein und induziert Apoptose (Saha et al., 2010). Racheck et al. berichteten, dass Troglitazon die mitochondriale DNA schädigt, die Zellviabilität durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies herabsetzt, die ATP-Konzentration reduziert und die Apoptose induziert. Diese Effekte sind unabhängig von PPAR- γ , also nicht rezeptorvermittelt, und konnten für Rosiglitazon nicht nachgewiesen werden (Racheck et al., 2009).

Die in dieser Studie verwendeten Konzentrationen des Metformin sind mit 125 mg/ml – 750 mg/ml deutlich höher als die unter der Einnahme der täglichen therapeutischen Dosen von 500mg- 3000mg Metformin ermittelte Serumkonzentration. Diese beträgt zwischen 0,0005 mg/ml (0,5 mg/l) und 0,002 mg/ml (2 mg/l) (Scheen, 1996). Die verwendeten Dosen des Thiazolidindion liegen mit 2,5 mg/ml – 15 mg/ml ebenfalls deutlich über den zu erwartenden Serumkonzentrationen bei Einnahme der empfohlenen Tagesdosis. Die Serumkonzentration von Troglitazon beträgt beispielsweise 0,0003 -0,0005 mg/ml (0,3 – 0,5 μ g/ml) (Saha et al., 2010). Für Rosiglitazon liegt die Serumkonzentration bei einer täglichen Dosis von 4 mg bei 110,3 +/- 47,9 ng/ml (Chan et al., 2005). Nach Einnahme von 30mg Pioglitazon beträgt die Serumkonzentration bei ca. 0,001 mg/ml (1,01 – 1,05 μ g/ml) (Wong et al. 2004). Da sich lichtmikroskopisch kein Hinweis auf eine Zytotoxizität beider Medikamente in den untersuchten, hohen Konzentrationen ergab, ist dies auch unter dem Einfluss der oben beschriebenen, deutlich geringeren Serumkonzentrationen nicht zu erwarten. Die Bestätigung dieser Vermutung bedarf jedoch einer Wiederholung der lichtmikroskopischen Dokumentation und der Zytotoxizitätstests mit den Serumkonzentrationen ähnlichen Medikamentenverdünnungen.

Rosiglitazon und Troglitazon sind auf dem deutschen Markt nicht mehr erhältlich. Rosiglitazon ist 2010 aufgrund eines erhöhten Risikos kardiovaskulärer Erkrankungen die Zulassung entzogen worden, Troglitazon ist aufgrund hepatotoxischer Nebenwirkungen 2000 vom Markt genommen worden. Beim Pioglitazon ist die zulässige Anwendungsdauer aufgrund eines erhöhten Risikos für Blasenkarzinome auf zwei Jahre beschränkt (Azoulay et al., 2012).

In Tierstudien ist bisher kein teratogener Effekt des Metformin nachgewiesen worden. Denno und Sadler exponierten Mauseembryonen gegenüber Metformin in therapeutischen Konzentrationen. Nach 48-stündiger Exposition konnten weder Malformationen noch eine Wachstumsretardierung nachgewiesen werden. 10% der Embryonen wiesen zwar eine Verzögerung des Neuralrohrverschlusses auf, diese resultierte jedoch nicht in einem Neuralrohrdefekt (Denno et al., 1994). Klinische Studien wurden bisher v.a. an schwangeren Frauen mit polyzystischem Ovarialsyndrom durchgeführt. Bolton et al. untersuchten 66 Schwangerschaften unter Metformintherapie im ersten Trimester und konnten keinen signifikanten Unterschied bezüglich Geburtsgewicht, Anzahl an Malformationen, Aufnahme auf eine neonatologische Intensivstation und neonataler Hypoglykämie im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen (Bolton et al., 2009). Rosiglitazon passiert die Plazentaschranke, insbesondere bei Applikation nach der 10. Schwangerschaftswoche (Chan et al., 2005). In Tierversuchen an Ratten konnten Bedir et al. eine dosisabhängige Zunahme der DNA-Schäden in Lymphozyten und Hepatozyten unter Therapie sowohl mit Rosiglitazon, als auch mit Pioglitazon nachweisen, so dass ein teratogener Effekt der Thiazolidindione nicht ausgeschlossen werden kann (Bedir et al., 2006), (Bedir et al., 2008). Ihr Einsatz während der Schwangerschaft ist daher kontraindiziert.

7.2 Der Einfluss von Metformin und Thiazolidindion auf die Glukosekonzentration im Zellkulturmedium

Humane Trophoblastzellen nutzen Glukose für die Energiegewinnung und Aufrechterhaltung intrazellulärer Stoffwechselprozesse. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Metformin und Thiazolidindion auf die Glukosekonzentration im Zellkulturmedium untersucht. Die ermittelte Glukosekonzentration sollte dabei einen Rückschluss auf die Zellvitalität und den Glukosemetabolismus zulassen. Hierfür wurden die Glukosekonzentrationen im Serum 0 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Zugabe der verschiedenen Konzentrationen der Metformin- und Thiazolidindionlösungen im Vergleich zur Negativkontrolle untersucht. Nach 72 Stunden Beobachtungszeit zeigte sich eine signifikante Abnahme der Glukosekonzentration nur für die mit den Metforminkonzentrationen 250 mg/ml und 125 mg/ml versetzten Trophoblastzellen. Bei den mit den verschiedenen Konzentrationen einer Thiazolidindionlösung versetzten Zellkulturen ergab sich hingegen eine signifikante Zunahme der Glukosekonzentration nach 72 Stunden unter der Verdünnung 5 mg/ml gegenüber der Negativkontrolle. Des Weiteren zeigte sich in allen Zellkulturen, wie schon für Metformin beobachtet, eine deutliche Zunahme der Glukosekonzentration im Vergleich zum Ausgangswert bei 0 Stunden.

Metformin wird über organische Kationentransporter (OCT) über die Zellmembran transportiert. Während OCT 1 und 2 vor allem in Hepatozyten und renalen Tubuli zu finden sind, wird OCT 3 neben Myozyten auch in Nervenzellen und in der Plazenta exprimiert (Chen et al., 2011). Es bewirkt unter anderem die Translokation von Glukosetransportern in die Zellmembran sowie eine gesteigerte Aktivität dieser Transporter. Der Wirkmechanismus liegt in einer Aktivierung des γ -Subtyps des Transkriptionsfaktors PPAR begründet. Dies führt über mehrere intrazelluläre Prozesse und Interaktion mit der DNA unter anderem ebenfalls zu einer vermehrten Expression und Translokation von Glukosetransportern und damit intrazellulärer Glukoseaufnahme (Mutschler et al., 2008). Dementsprechend ist durch Exposition der Zellen gegenüber beiden Medikamenten mit einem Abfall der

Glukosekonzentration im Zellkulturmedium über den Beobachtungszeitraum von 72 Stunden zu rechnen gewesen. Stattdessen zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Glukosekonzentration im Vergleich zum Ausgangswert bei 0 Stunden. Zum einen ist hier, wie auch beim LDH-Zytotoxizitätstest, eine Interferenz der im Medium befindlichen verwendeten Medikamente mit der Messmethode des Glukosemessgerätes nicht auszuschließen. Hiergegen spricht jedoch die auch in der Negativkontrolle ansteigende Glukosekonzentration über 72 Stunden. Zum anderen könnte das Ergebnis darin begründet sein, dass über den Beobachtungszeitraum der prozentuale Anteil nicht vitaler Zellen zunimmt und aus diesen im Rahmen der Apoptose neben anderen intrazellulären Bestandteilen auch Glukose freigesetzt wird. Zusammenfassend scheinen die verwendeten Medikamentenkonzentrationen im Vergleich zum Zellkulturmedium ohne Zugabe eines Medikamentes keinen wesentlichen Einfluss auf den Glukosemetabolismus der Zellen im Medium zu haben. Dies kann auch darin begründet sein, dass beide Medikamente neben einer direkten Wirkung auf die Zellen vor allem auch über indirekte Mechanismen ihre antidiabetogene Wirkung entfalten. Die Wirkung beider beruht auch auf einer Senkung der hepatischen Glukoseproduktion durch Hemmung der Glukoneogenese und Glykogenolyse, Erhöhung der Glykolyse und Hemmung der Lipidsynthese (Mutschler et al., 2008), (Schoonjans et al., 1997).

7.3 Der Einfluss von Metformin und Thiazolidindion auf die Hormonexpression

Neben verschiedenen Antigenen und Rezeptoren kommt vor allem den Hormonen eine bedeutende Rolle sowohl für den physiologischen Ablauf einer Schwangerschaft, als auch für Schwangerschaftskomplikationen, z.B. Aborten oder Fehlbildungen, zu (Weyerstahl & Stauber, 2007). Sowohl der Fetus, als auch die Plazenta produzieren Hormone, welche für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft essentiell sind und deren Konzentration sich im Verlauf der Schwangerschaft verändern. Zu den plazentaren Steroidhormonen zählt das 17β -Estradiol, welches bis zur 6. SSW im Corpus luteum, nachfolgend in der Plazenta produziert

wird (Tulchinsky & Hobel, 1973). Dessen Konzentration steigt von 0,1 ng/ml in der Lutealphase des Menstruationsszyklus bis auf bis zu 30ng/ml im 3. Trimenon (Lindberg et al., 1974). Es wird initial in der Plazenta synthetisiert, und dann, mit einsetzender Funktion der fetalen Nebennierenrinde, zunehmend durch den Feten produziert (Tulchinsky & Hobel, 1973). Die höchste Konzentration im maternalen Serum wird zwischen der 35. und 40. SSW erreicht. Ausgangsmolekül für die Estrogensynthese ist dabei maternales und fetales DHEAS (Dihydroepiandrostenediene Sulfat) (Strauss, 1991), (Siiteri & MacDonald, 1966). Ein Cytochrom P450-Enzym ist entscheidend an der Konversion der Hormonvorstufen zum Östrogen beteiligt (Simpson et al., 1994). Neben einer über Vasodilatation vermittelten Zunahme des uterinen Blutflusses kommt dem Östrogen auch eine Bedeutung bei der Entwicklung der fetalen Nebennieren sowie der maternalen Milchdrüsen zu (Resnik et al., 1974), (Henson et al., 1991). Auch Progesteron wird initial im Corpus luteum gebildet, dann ab der 10. SSW jedoch ausschließlich von der Plazenta produziert. Dieser Übergang wird als luteoplazentarer Shift bezeichnet (Tulchinsky & Hobel, 1973), (Tulchinsky et al., 1972). Als Ausgangsmolekül der Progesteron-Biosynthese dient dabei maternales LDL-Cholesterin (Carr et al., 1982). Die Plasmakonzentration steigt während der Schwangerschaft von 1 ng/ml auf bis zu 300 ng/ml an (Tulchinsky & Hobel, 1973). Dem Progesteron kommt dabei eine wichtige Rolle bei der Implantation der befruchteten Eizelle, aber auch bei der Hemmung der T-Lymphozyten vermittelten Abstoßungsreaktion sowie der Kontraktion der glatten Muskulatur des Uterus zu (Siiteri et al., 1977), (Moriyama & Sugawa 1972). Des Weiteren dient es als Substrat für die fetale Cortisol- und Aldosteronsynthese (Partsch et al., 1991). Neben dem Progesteron wird in der Plazenta außerdem 17 α -Hydroxyprogesteron synthetisiert, welches erst ab der 32. SSW im Serum ansteigt und mit dem fetalen Reifungsprozess korreliert (Tulchinsky & Simmer, 1972).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Metformin auf die Expression von Östrogen und Progesteron im Zellkulturmedium untersucht. Nach einem Beobachtungszeitraum von 72 Stunden ergab sich eine signifikante Reduktion der Konzentration des Östrogens im Zellkulturmedium unter dem Einfluss von Metforminverdünnungen von 250 mg/ml und 750 mg/ml, während sich in der Kontrolle der zu erwartende Anstieg der Östrogenkonzentration über den Beobachtungszeitraum zeigte. Es konnte hingegen kein statistisch signifikanter Einfluss der verschiedenen Metforminverdünnungen auf die Progesteronkonzentration in den Zellkulturmedien nachgewiesen werden. Bei den mit den Thiazolidindionverdünnungen versetzten Zellulturen ergab sich kein signifikanter Effekt auf die Östrogenkonzentration im Vergleich zur Kontrolle. Es kam jedoch eine statistisch signifikante Zunahme der Progesteronkonzentration in den mit 5 mg/ml und 7,5 mg/ml versetzten Zellkulturen zur Darstellung. Dies lässt sich jedoch in den höher konzentrierten Verdünnungen der Thiazolidindione nicht mehr nachweisen, so dass eine Interferenz des Medikamentes mit der Messmethode oder eine direkte zytotoxische Wirkung nicht auszuschließen ist. Des Weiteren ist aufgrund der kleinen Datenmenge, wie bereits diskutiert, keine sichere Aussage zur Signifikanz zu treffen und eine Wiederholung der Versuche mit größeren Datenmengen nötig. Vergleichbare Untersuchungen zum Einfluss von Metformin und Thiazolidindion auf die Hormonproduktion humaner Trophoblastzellen liegen derzeit nicht vor.

Studien konnten jedoch zeigen, dass eine verminderte Östrogenkonzentration in der Schwangerschaft mit einem erhöhten Risiko für Aborte korreliert. Nelson et al. wiesen nach, dass bei Patientinnen mit einem Abort bis zur 22. SSW signifikant niedrigere Serumkonzentrationen an Estradiol und Progesteron vorlagen, wo bei v.a. die Progesteronkonzentration mit einem spontanen Abort korrelierte (Nelson et al., 2002). Des Weiteren ließen sich in Plazenten von spontanen Aborten eine signifikant geringere Expression von Progesteron-Rezeptor A nachweisen, im Vergleich zu denen von elektiven

Aborten der gleichen SSW (Papamitsou et al. 2011). Auch Frühgeburtlichkeit scheint mit einem erniedrigten Progesteron-Serumspiegel zu korrelieren. Im Vergleich zu einer gesunden Schwangerschaft ließen sich bei Schwangerschaften mit einer drohenden Frühgeburt niedrigere Progesteronkonzentrationen sowie eine erhöhte Estrogen/Progesteron-Ratio im Serum der Schwangeren nachweisen (Csapo et al., 1974). Dies legt nahe, dass falls eine Therapie mit den in dieser Arbeit untersuchten oralen Antidiabetika einen Einfluss auf die Hormonproduktion der Trophoblastzellen nimmt, damit das Risiko eines Abortes oder einer Frühgeburt erhöht sein kann. Da klinische Studien an Schwangeren fehlen, ist bisher jedoch unklar, ob sich der Einfluss der oralen Antidiabetika auch im klinischen Einsatz bestätigt. Des Weiteren liegen die in dieser Arbeit verwendeten Medikamentenkonzentrationen deutlich über denen der unter oraler Therapie mit der empfohlenen Tagesdosis bestehenden Serumkonzentrationen, so dass keine Aussage über den Einfluss der zu erwartenden Serumkonzentrationen auf die Hormonproduktion der Trophoblastzellen zu treffen ist. Einem Einsatz oraler Antidiabetika in der Schwangerschaft sollten daher dringend weiterführende Studien über deren Einfluss auf die Hormonproduktion vorausgehen.

An schwangeren Pavianen konnte hingegen bereits gezeigt werden, dass eine mittels des Aromatasehemmers Letrozol herbeigeführte Reduktion der Östrogenkonzentration im mütterlichen Serum zu keinem signifikanten Unterschied der fetalen biometrischen Daten, wie z.B. Humeruslänge, Kopf- und Bauchumfang, sowie der uterinen und fetalen Durchblutung im Vergleich zu unbehandelten Tieren führte (Aberdeen et al., 2010). Ob dies einen Rückschluss auf humane Schwangerschaften zulässt, ist nicht sicher.

7.4 Der Einfluss von Metformin und Thiazolidindion auf die PIIGF-Expression

Beim plazentaren Wachstumsfaktor (PIGF) handelt es sich um einen zur VEGF (vascular endothelial growth factor) Familie gehörigen Wachstumsfaktor, welcher ab der 6. Schwangerschaftswoche nachweisbar ist und im Verlauf der Schwangerschaft das hypophysäre Wachstumshormon ersetzt (Maglione et al., 1991), (Fuglsang et al., 2003). Er besitzt eine proangiogenetische Wirkung, welche er wie alle anderen VEGF über Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren entfaltet, wobei er ausschließlich an den VEGFR-1 bindet (Park et al., 1994). PIGF wird während der gesamten Schwangerschaft in den villösen Trophoblastzellen und Synzytiotrophoblastzellen der Plazenta gebildet und beeinflusst sowohl das Wachstum als auch die Trophoblastzell differenzierung und deren Invasion in die maternale Dezidua und hat damit eine wesentliche Bedeutung für die Entwicklung und Funktion der Plazenta (Maglione et al., 1993), (Vuorela et al., 1997). In vitro ist für PIGF eine Wirkung als antiapoptotischer Faktor für Trophoblastzellen nachgewiesen worden (Desai et al., 1999). Des Weiteren wird PIGF auch in anderen Organen wie Lunge, Herz, Fettgewebe und Muskelzellen produziert (Persico et al., 1999), (Voros et al., 2005). Koh et al. zeigten anhand von Ratten, bei denen durch Injektion von Streptozotocin ein Diabetes mellitus induziert wurde und deren Plazenten und Feten an Tag 20 einer Schwangerschaft untersucht worden sind, dass eine durch den Diabetes verursachte Hyperglykämie mit einer Reduktion der Expression von PIGF- mRNA und damit Reduktion des PIGF-Proteins einhergeht (Koh et al., 2007). Da PIGF eine wesentliche Bedeutung für eine normale Funktion der Plazenta besitzt, könnte dessen Mangel bei Vorliegen eines Gestationsdiabetes die Plazentafunktion negativ beeinflussen. Andere Studien hingegen haben diese Erkenntnis widerlegt. Dies ist v.a. darauf zurückzuführen, dass Streptozotocin eine sehr ausgeprägte Hyperglykämie bedingt, welche in intrauteriner Wachstumsretardierung resultiert und toxisch auf β -Zellen des Pankreas wirkt. So konnte Cisse et al. im Versuch mit Ratten keine veränderte Genexpression von VEGF und PIGF unter milden hyperglykämischen Bedingungen im Vergleich zu

normoglykämen Schwangerschaften nachweisen (Cisse et al., 2013). An Versuchen mit mikrovaskulären Endothelzellen wurde nach Exposition gegenüber VEGF und Glukose ein Anstieg der PlGF-Expression nachgewiesen, welcher über den MAPK- und Protein Kinase-C - Signalweg vermittelt wird. Dies lässt vermuten, dass eine Hyperglykämie VEGF- und VEGFR-2 vermittelt eine vermehrte PlGF-Expression bedingt (Zhao et al., 2004). Auch McIntyre et al. postulieren eine positive Korrelation einer erhöhten postprandialen Serumglukose und PlGF, sowohl in freier als auch gebundener Form (McIntyre et al., 2000). Cawyer et al. bestätigten hingegen die von Koh et al. postulierte Abnahme der PlGF-Expression unter hyperglykämen Bedingungen. Sie inkubierten humane Trophoblastzellen für 48 Stunden in unterschiedlich konzentrierten Glukoselösungen und wiesen bei Konzentrationen von mehr als 135 mg/dl Glukose eine signifikante Abnahme der Konzentration von VEGF und PlGF im Medium nach (Cawyer et al., 2014). Unter In-vivo Bedingungen konnten Loukovaara et al. hingegen zeigen, dass die PlGF-Konzentration im Nabelschnurserum von gesunden Schwangeren, Schwangeren mit Typ-I-Diabetes und Schwangeren mit Gestationsdiabetes ähnlich hoch sind. Es zeigte sich in dieser Arbeit lediglich ein Trend in Richtung niedrigerer PlGF Konzentrationen im Nabelschnurserum von diabetischen Schwangerschaften mit Preeklampsie im Vergleich zu denen ohne Preeklampsie. Die Autoren schlussfolgern, dass eine diabetische Stoffwechsellage keinen Einfluss auf die PlGF- Produktion besitzt (Loukovaara et al., 2005).

Sowohl VEGF als auch PlGF und deren Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 sind wesentlich an der plazentaren Angiogenese beteiligt. Unter hyperglykämen Bedingungen erfolgen kompensatorische morphologische Veränderungen der Plazenta in Form einer Zunahme an Villi und kleinen Gefäßen (Calderon et al., 2007). Im Vergleich zu gesunden Schwangeren lassen sich bei Schwangeren mit Diabetes mellitus und Gestationsdiabetes signifikant höhere Konzentrationen an PlGF und löslicher Tyrosinkinase 1 im Serum und signifikant höhere

PlGF- und TK-1-Expression in der Plazenta nachweisen. Diese wiederum korrelieren signifikant mit einem erhöhten Index für eine Unreife der distalen Villi (El-Tarhouny et al. 2014). Während beim Gestationsdiabetes und Diabetes mellitus in der Schwangerschaft erhöhte Konzentrationen an PlGF und TK 1 nachweisbar sind, ist die 5 % aller Schwangeren betreffende, häufigste Schwangerschaftskomplikation, die Preeklampsie, mit einer reduzierten PlGF-Konzentration assoziiert (Levine et al., 2004). Eine reduzierte Konzentration an PlGF ist wiederum mit dem Vorliegen einer intrauterinen Wachstumsretardierung, der Entwicklung einer Preeklampsie und schwereren Ausprägung der Preeklampsie assoziiert (Shim et al. 2015). Patientinnen mit Diabetes mellitus und Preeklampsie haben eine 15-fach höhere TK1/PlGF-Ratio zwischen der 27. und 34. Schwangerschaftswoche, und 9-fach höhere TK1/PlGF-Ratio in der 35.-40. Woche im Vergleich mit Preeklampsie-Patientinnen ohne Diabetes mellitus (Cohen et al., 2014). Dies stimmt mit den bereits erwähnten Ergebnissen anderer Studien überein, die eine Reduktion der PlGF- Konzentration bei Patientinnen mit Preeklampsie zeigen konnten, wobei diese als Risikofaktor für die Entwicklung und nicht als Folge einer Preeklampsie gewertet wird.

In dieser Arbeit wurde die PlGF-Konzentration im Überstand der mit den verschiedenen Konzentrationen einer Metformin- und Thiazolidindionlösung versetzten Trophoblastzellkulturen bestimmt. Unter dem Zusatz von Metformin wurde dosisunabhängig eine Hemmung der PlGF-Konzentration nach 72 Stunden nachgewiesen, während in den Zellkulturen ohne Zugabe eines Medikamentes im Beobachtungszeitraum eine deutliche Zunahme der PlGF-Konzentration nachweisbar war. Da, wie in der Studie von Cawyer et al. belegt, eine durch den hohen Glukosegehalt der Zellkulturmediums bedingte Hyperglykämie eine Reduktion der PlGF-Sekretion zur Folge haben kann, ist ein vom Metformin unabhängiger Einfluss der Hyperglykämie auf die PlGF-Sekretion nicht auszuschließen. Die erhaltene und im Beobachtungszeitraum progradiente PlGF-Sekretion in der Negativkontrolle

unter identischen Kulturbedingungen bestätigt jedoch, dass die Reduktion der PIgf-Sekretion auf die Wirkung des Metformin zurückzuführen ist. Um zwischen der durch Hyperglykämie und durch das Metformin bedingten Hemmung der PIgf-Sekretion zu differenzieren, sind weitere vergleichende Untersuchungen unter normo- und hyperglykämen Bedingungen nötig. Auch in den mit verschiedenen Konzentrationen der Thiazolidindionlösung versetzten Zellkulturen ließ sich eine im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich reduzierte PIgf-Konzentration nach 72 Stunden nachweisen. Eine statistische Signifikanz besteht aufgrund der kleinen Datenmenge nicht und kann nur durch Wiederholung mit größeren Datensätzen ermittelt werden. Die negative Korrelation der Thiazolidindionkonzentrationen mit der Abnahme der PIgf-Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle ist möglicherweise auf eine Interferenz der Stoffeigenschaften des Thiazolidindion mit der Messmethode zurückzuführen, wodurch der Test für die Versuchsreihe mit Thiazolidindion keine Aussagekraft besitzt.

7.5 Orale Antidiabetika in der Therapie des Gestationsdiabetes und Diabetes mellitus in der Schwangerschaft

Patientinnen mit einem insulinabhängigen Diabetes mellitus und guter Blutzuckerkontrolle leiden nicht unter einem im Vergleich zu gesunden Frauen erhöhten Risiko für die Entwicklung von Schwangerschaftskomplikationen. Ein erhöhter HbA1c geht hingegen mit einem erhöhten Risiko für Aborte und kongenitale Malformationen einher (Greene et al., 1989). Obwohl also besonders während der Schwangerschaft eine normoglykäme Stoffwechselleage anzustreben ist, ist bisher allein Insulin zur Therapie des Gestationsdiabetes und Diabetes mellitus in der Schwangerschaft zugelassen. Da die Insulintherapie mit einer Gewichtszunahme und der Gefahr der Hypoglykämie vergesellschaftet ist, und die mehrmals tägliche Applikation eine hohe Compliance erfordert, wäre eine Therapie mit oralen Antidiabetika erstrebenswert. In der klinischen Praxis wird bereits in Einzelfällen eine Metformintherapie durchgeführt, zu dieser liegen auch die meisten Daten vor. Der Einsatz

von Metformin während der Schwangerschaft erfolgt jedoch zurückhaltend, da dieses die Plazentaschranke passiert und somit auch ins fetale Serum gelangt. Die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) ordnet Metformin der Kategorie B zu – reproduktive Tierversuche haben kein Risiko für den Feten ergeben, es fehlen aber hinreichende Studien beim Menschen. Klinische Erfahrungen zur Metformintherapie bei Schwangeren existieren bisher v.a. bei Patientinnen mit einem Syndrom der polyzystischen Ovarien (PCO- Syndrom). Dieser Erkrankung liegt, ähnlich dem Gestationsdiabetes, eine Insulinresistenz zugrunde, wodurch die Konzentration frei zirkulierenden Insulins durch kompensatorische Hyperinsulinämie erhöht ist. Dies bewirkt über die Freisetzung von IGF-1 und Testosteron eine Hemmung der Follikelreifung und dadurch Infertilität (Dumitrescu et al., 2015). In der Therapie des PCO-Syndroms bewirkt Metformin über eine Verbesserung der Insulinsensitivität eine Abnahme der Androgenkonzentration und dadurch verbesserte Fertilität. Metformin wirkt dabei unter anderem über eine Aktivierung der AMPK (AMP activated protein kinase), welche über eine Hemmung des Pax-3-Gens Neuralrohrdefekte bewirken kann. Studien an Mäusen konnten bisher zwar in-vivo keine Zunahme der AMPK-Aktivität in Embryonen nachweisen, in vitro gelang dies hingegen (Lee et al., 2014). Glueck et al. konnten zeigen, dass eine Metformintherapie in diesem Patientenkollektiv mit einer Reduktion der Anzahl an Spontanaborten einhergeht und zugleich kein signifikanter Unterschied bezüglich kongenitaler Anomalien, Geburtsgewicht und – Größe im Vergleich zu gesunden Schwangerschaften besteht (Glueck et al., 2002). Des Weiteren konnten unter Metformintherapie im ersten Trimester weniger neonatale Hypoglykämien beobachtet werden und es bestand kein erhöhter Bedarf an intensivmedizinischer Betreuung der Neugeborenen im Vergleich zu Schwangerschaften ohne Metformintherapie (Bolton et al., 2009). Eine große Metaanalyse konnte nach Auswertung von sechs Studien außerdem für Patientinnen mit Gestationsdiabetes zeigen, dass die Therapie des Gestationsdiabetes mit Metformin gegenüber der Insulintherapie keinen statistisch signifikanten Unterschied in Bezug auf den HbA1c in

der 36./37. Schwangerschaftswoche, Nüchternglukosekonzentration, Hypertonus und Rate an erforderlichen Sectiones aufweist. Mit Metformin therapierte Schwangere zeigten eine statistisch signifikant geringere Gewichtszunahme im Vergleich zur Insulintherapie. Bezuglich des neonatalen Outcomes ergab sich unter Metformintherapie kein Unterschied zur Insulintherapie in Bezug auf das Geburtsgewicht, Geburtstraumata, Geburtsdefekte und anderer, wie z.B. die Aufnahme auf die Intensivstation, Atemnotsyndrom und Notwendigkeit der Phototherapie. Einzig die Rate an Frühgeburten war gegenüber der Insulintherapie leicht erhöht (Su & Wang, 2014). Diese Studien geben bisher jedoch nur Aussagen zu Frühfolgen einer Metformintherapie in der Schwangerschaft. Die Gonaden des Embryos sind besonders im ersten Trimester sensiv gegenüber exogenen Substanzen (Bertoldo et al., 2014). An humanen und murinen Hoden wurde eine Reduktion der Testosteronsynthese unter dem Einfluss von Metformin beschrieben. Dabei wurde bisher an Mäusen zwar keine Störung des Hodendescensus in utero beschrieben, es fand sich jedoch eine Abnahme der Hodengröße, Tubuli-Durchmesser und Anzahl der Sertolizellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Exposition gegenüber Metformin (Tartarin et al., 2012). Dies hat möglicherweise Einfluss auf die Fertilität der Kinder, die in utero einer Metformintherapie ausgesetzt waren, so dass weitere Untersuchungen zu Langzeitfolgen einer Metformintherapie nötig sind. In mehreren Studien wurde bereits die kognitive und motorische Entwicklung von Kindern deren Mütter in der Schwangerschaft mit entweder Insulin oder Metformin therapiert worden sind verglichen. So fanden Tertti et al. keinen signifikanten Unterschied bezüglich kognitiver Entwicklung, fein- und grobmotorischer Entwicklung und Kommunikation bei Kindern im Alter von 2 Jahren, deren Mütter aufgrund eines Typ-2-Diabetes während der Schwangerschaft Insulin oder Metformin erhielten (Tertti et al., 2015). Auch Ijäs et al. konnten zeigen, dass die motorische, soziale und sprachliche Entwicklung der Kinder von an Gestationsdiabetes erkrankten Müttern im Alter von 18 Monaten nach Metformin- und Insulintherapie keinen signifikanten Unterschied aufwiesen (Ijäs et al., 2015).

Neben dem Metformin wurden weitere orale Antidiabetika bezüglich ihrer Eignung zur Therapie des Gestationsdiabetes und Diabetes mellitus in der Schwangerschaft untersucht. Der Einsatz von Acarbose, einem alpha-Glucosidase-Inhibitor, wird aufgrund der Notwendigkeit der Kombination mit anderen oralen Antidiabetika zum Erreichen einer ausreichenden Blutzuckerkontrolle vermieden (Bertini et al., 2005). Der Einsatz von Sulfonylharnstoffen der ersten Generation wird aufgrund der Gefahr der prolongierten postnatalen Hypoglykämie durch fetale Hyperinsulinämie ebenfalls vermieden (Kemball et al., 1970). Die Sulfonylharnstoffe der zweiten Generation hingegen passieren die Plazentaschranke nicht (Elliott et al. 1991). Im Vergleich zur Insulintherapie konnten Langer et al unter Therapie mit Glyburide, einem Sulfonylharnstoff der zweiten Generation, eine vergleichbare Blutzuckerkontrolle nachweisen. Es bestand kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Rate an Präeklampsie, Sectiones und neonataler Hypoglykämie zwischen beiden Therapiegruppen (Langer et al. 2000). Andere Studien wiederum wiesen eine erhöhte Rate an Aufnahmen auf die Neugeborenenintensivstation aufgrund einer Hypoglykämie und respiratorischer Komplikationen im Vergleich zur Insulintherapie nach (Cheng et al. 2012), (Rochon et al., 2006). Nur wenige Studien nahmen bisher einen Vergleich der Therapie mit Metformin und Glyburid vor, diese zeigten jedoch eine geringere Gewichtszunahme, geringere Rate an Makrosomie und ein geringeres Geburtsgewicht unter Metformin im Vergleich zu Glyburid (Silva et al. 2012), (Moore et al., 2010). Sowohl Metformin, als auch Glyburid scheinen anhand bisher existierender Studien effektiv und sicher für die Therapie des Gestationsdiabetes zu sein (Carroll & Kelley, 2014). Beide Medikamente haben jedoch den Nachteil, dass sie aufgrund unzureichender Blutzuckerkontrolle im Verlauf der Schwangerschaft um Insulin ergänzt werden müssen, dabei das Metformin bis zu 11,5 mal häufiger als das Glyburid (Singh & Singh 2015).

Orale Antidiabetika stellen aufgrund ihrer einfacheren Anwendung, geringerer Kosten und gegenüber Insulin höheren Akzeptanz durch die Patientinnen eine Alternative zur Insulintherapie dar, es fehlen jedoch bisher ausreichende klinische Studien, um ihren Einsatz in den Leitlinien festzuhalten. Während die aktuelle deutsche S3-Leitlinie zum Gestationsdiabetes den Einsatz oraler Antidiabetika ausdrücklich nicht empfiehlt (Kleinwechter et al., 2011), so bewertet das American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) die oralen Antidiabetika als gleichwertig zum Insulin einsetzbar (Committee on Practice Bulletins Obstetrics, 2013). Das National Institute for Health and Care Excellence (NICE) empfiehlt sogar den Therapiebeginn mit Metformin, welches bei Verfehlten der Therapieziele um Insulin ergänzt oder durch dieses ersetzt werden sollte (National Institute for Health and Care Excellence, 2015). Bei Patientinnen mit Diabetes mellitus Typ 2 sollte eine vor der Schwangerschaft bestehende Therapie mit oralen Antidiabetika beendet und durch Humaninsulin ersetzt werden, beim Diabetes mellitus Typ I können das langwirksame Insulin Detemir und die kurzwirksamen Insuline Apsart, Lispro und Glargin weiter verwendet werden (Kleinwechter et al., 2014).

7.6 Ausblick: orales Insulin

Da zur Sicherheit und Wirksamkeit des subcutan oder intravenös zu applizierenden Insulins ausreichend Studien vorliegen und es bereits seit Jahrzehnten klinisch zum Einsatz kommt, bestehen neuere Bestrebungen darin, ein oral zu verabreichendes Insulin zu entwickeln. Dies soll die gute Wirksamkeit und Verträglichkeit des Insulin mit der einfacheren Handhabbarkeit der oralen Antidiabetika vereinen. Kidron et al. konnten an einer kleinen Studienpopulation von gesunden Probanden zeigen, dass an ein an das Trägermolekül SNAC gekoppeltes humanes Insulin nach peroraler Aufnahme im Gastrointestinaltrakt resorbiert wird und zu einer Senkung der Blutglukosekonzentration führt (Kidron et al. 2004). Die Absorptionsrate

ist dabei bisher jedoch sehr gering und Wechselwirkungen mit simultan oral verabreichten Medikamenten nicht auszuschließen, so dass weiterführende Studien nötig sind.

7.7 Methodenkritik

Für die vorliegende Arbeit wurden für jedes der beiden untersuchten Medikamente Trophoblastzellen aus je drei Plazenten gesunder Schwangerer isoliert. Aufgrund des nicht dokumentierten Alters (in SSW) der Plazenten und der annehmbaren interindividuellen Unterschiede der Hormonexpression und Stoffwechselaktivität sind die daraus angelegten Zellkulturen und daran durchgeführten Untersuchungen nur begrenzt untereinander vergleichbar. Um den Einfluss der Medikamente in ihren verschiedenen Konzentrationen besser untereinander vergleichen zu können, wäre es daher von Vorteil gewesen, alle für die Untersuchung nötigen Zellen aus einer einzigen Plazenta zu gewinnen, was leider technisch nicht möglich ist. Daher wäre es sinnvoll, die gleichen Untersuchungen an deutlich mehr Plazenten zu wiederholen, um anhand einer größeren Datenmenge den Fehler durch individuelle Unterschiede in Stoffwechselaktivität und Hormonproduktion einzelner Plazenten so gering wie möglich zu halten. Die kleine Datenmenge schränkt auch die Aussagekraft des CellTiter-Blue®-Zytotoxizitätstests ($n=1$) und des LDH-Zytotoxizitätstests ($n=2$) ein. Beim LDH-Zytotoxizitätstest handelt es sich zudem um eine photometrische Messung des von den Zellen freigesetzten LDHs, eine Messmethode welche stoffabhängig ist und somit möglicherweise mit den untersuchten Medikamenten interferiert. Dies ist insbesondere zu vermuten, da sich nach Zugabe der höheren Medikamentenkonzentrationen bereits makroskopisch eine Trübung des Kulturmediums zeigte. Auch bei der ermittelten Hemmung der PIGF-Sekretion unter dem Einfluss beider Medikamente ist eine Interferenz mit der Messmethode nicht auszuschließen. Bei dem entgegen der Erwartung beobachteten Anstieg der Glukose unter dem Einfluss der Thiazolidindione und einiger Metforminverdünnungen ist hingegen nicht von einer ungeeigneten Messmethode

auszugehen, da sich in der Negativkontrolle der erwartete Abfall der Glukosekonzentration zeigt. Hier handelt es sich möglicherweise um eine apoptose-bedingt vermehrte Glukosefreisetzung. Das verwendete Kulturmedium schafft mit einem Glukosegehalt von ca. 25 mmol/l hyperglykäme Kulturbedingungen, so dass sowohl die ermittelte Zytotoxizität als auch die möglicherweise apoptose-bedingte Zunahme der Glukosekonzentration hierauf zurück zu führen sind. Daher sind weitere Untersuchungen auch unter normoglykämen Kulturbedingungen nötig. Weiterhin ist anzumerken, dass die untersuchten Konzentrationen beider Medikamente deutlich über der unter der empfohlenen Tagesdosis zu erwartenden Serumkonzentration liegen und die Untersuchungsergebnisse daher nur begrenzt Rückschlüsse auf deren Einsatz in der Therapie des Gestationsdiabetes zulassen.

8. Zusammenfassung

Der Gestationsdiabetes, definiert als jede erstmals während einer Schwangerschaft aufgetretene und diagnostizierte Glukosetoleranzstörung, tritt bei 2-6 % aller Schwangeren auf. Es handelt sich damit um eine der häufigsten Komplikationen während der Schwangerschaft. Die dadurch bedingte hyperglykäme Stoffwechsellage geht mit einem erhöhten maternalen und fetal Risiko einher. Die leitliniengerechte Therapie des Gestationsdiabetes ist derzeit eine Humaninsulintherapie. Vereinzelt kommt es jedoch auch zum Einsatz oraler Antidiabetika, welche nach Studienlage hinsichtlich Erreichen der Blutglukosezielwerte und Reduktion mütterlicher und fetaler Risiken im Vergleich zum Insulin gleichwertig sind. Für eine erhöhte Fehlbildungsrate gibt es derzeit keine Hinweise.

In dieser Arbeit wurden die oralen Antidiabetika Metformin und Thiazolidindion an aus humanen Plazenten isolierten Trophoblastzellen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität und ihres Einflusses auf die Produktion der Hormone Östrogen und Progesteron sowie des plazentaren Wachstumshormons PIGF untersucht. Dazu erfolgte nach Zugabe von vier verschiedenen Konzentrationen einer Metforminlösung und fünf Konzentrationen einer Thiazolidindionlösung zu den isolierten Trophoblastzellen im Kulturmedium zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 und 72 Stunden die mikroskopische Beobachtung der isolierten Zellen sowie die Bestimmung der Zytotoxizität und der Östrogen- und Progesteronkonzentration im Überstand des Zellkulturmediums. Als Kontrolle dienten Trophoblastzellkulturen ohne Medikamentenzusatz.

In der mikroskopischen Betrachtung der mit den untersuchten Konzentrationen einer Metformin- und Thiazolidindionlösung versetzten Zellkulturen zeigte sich nach 72 Stunden eine im Vergleich zur Kontrolle regelrechte Fusion der Trophoblastzellen zu Synzytiotrophoblasten. Der LDH-Zytotoxizitätstest ergab für Thiazolidindion eine unter 2,5 mg/ml, 5 mg/ ml und 15 mg/ml im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte und scheinbar

dosisabhängige Zytotoxizität, für die Konzentrationen 7,5 mg/ml und 10 mg/ml bestand keine erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zur Kontrolle. Zur Zytotoxizität des Metformin ließ sich anhand dieses Tests keine sichere Aussage treffen. Da das verwendete Zellkulturmedium mit einem Glukosegehalt von ca. 25 mmol/l hyperglykäme Bedingungen schafft und Studien einen mit einer erhöhten Apoptoseinduktion und Störung der Trophoblastzelldifferenzierung einhergehenden oxidativen Stress unter Hyperglykämie nachgewiesen haben, ist unklar, inwiefern die Ergebnisse dieser Studie einen Rückschluss auf die Zytotoxizität der untersuchten Medikamente zulässt. Es sind hierzu Untersuchungen unter normoglykämen Bedingungen und mit den Serumkonzentrationen ähnlichen Medikamentenkonzentrationen nötig. Bezuglich des Einflusses auf die Hormonproduktion zeigte sich für Metformin nach 72 Stunden Beobachtungszeit eine signifikante Reduktion des Östrogens im Zellkulturüberstand für die Konzentrationen 250 mg/ml ($p= 0,003$) und 750 mg/ml ($p= 0,001$), während die Progesteronkonzentration nicht signifikant beeinflusst worden ist. In den mit Thiazolidindion versetzten Zellkulturen war nach 72 Stunden eine signifikante Zunahme der Progesteronkonzentration unter den Thiazolidindionverdünnungen 5 mg/ml ($p= 0,012$) und 7,5 mg/ml ($p= 0,003$) nachweisbar, während kein signifikanter Einfluss auf die Östrogenkonzentration bestand. Beide Hormone sind wesentlich für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft sowie regelrechte fetale Entwicklung, so dass eine medikamentös bedingte Änderung der Hormonkonzentrationen möglicherweise eine erhöhte Rate an Aborten, Frühgeburtlichkeit und Missbildungen zur Folge hat. Da klinische Studien an Schwangeren fehlen, ist bisher jedoch unklar, ob dieser Einfluss der oralen Antidiabetika auch im klinischen Einsatz zu finden wäre. Dem Einsatz oraler Antidiabetika in der Schwangerschaft sollten daher dringend weiterführende Studien, insbesondere auch mit den Serumkonzentrationen ähnlichen Konzentrationen, über deren Einfluss auf die Hormonproduktion vorausgehen. Des Weiteren wurde in allen mit Metformin versetzten Zellkulturen eine deutliche Reduktion der PIGF-Konzentration im Vergleich zur Zellkultur

Zusammenfassung

ohne Medikamentenzugabe beobachtet, während sich unter Thiazolidindion ebenfalls eine für alle Konzentrationen bestehende und bis zu 25 pg/ml geringere PIgf-Produktion im Vergleich zur Kontrolle zeigte. PIgf ist wesentlich für die Entwicklung und Funktion der Plazenta. Da Studien zeigen konnten, dass eine reduzierte PIgf-Konzentration mit dem Vorliegen einer intrauterinen Wachstumsretardierung und der Entwicklung einer Preeklampsie assoziiert ist, sind auch hier weitere Untersuchungen unter klinischen Bedingungen nötig. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ist daher derzeit von einem Einsatz oraler Antidiabetika in der Schwangerschaft abzuraten.

9. Thesen

1. Die durch den Gestationsdiabetes bedingte hyperglykäme Stoffwechsellage während der Schwangerschaft führt zu Störungen der Plazentafunktion und geht mit einem erhöhten maternalen und fetalnen Risiko einher.
2. Die leitliniengerechte Therapie des Gestationsdiabetes und Diabetes mellitus in der Schwangerschaft basiert derzeit auf dem Einsatz von Humaninsulin, gelegentlich kommen jedoch auch orale Antidiabetika zum Einsatz.
3. Der Nachweis einer erhöhten Zytotoxizität der Antidiabetika Metformin und Thiazolidindion und deren Modifikation der Hormonexpression erfolgt an humanen Trophoblastzellen.
4. Als Parameter der Plazentafunktion werden die Hormone Östrogen und Progesteron sowie der Wachstumsfaktor PIGF gewählt.
5. Für diese Arbeit werden Trophoblastzellen aus humanen Plazenten isoliert und mit vier Konzentrationen einer Metformin- und fünf Konzentrationen einer Thiazolidindionlösung versetzt.
6. In der mikroskopischen Beobachtung zeigt sich nach 72 Stunden sowohl in der Kontrolle als auch in den mit den Medikamenten versetzten Zellkulturen eine regelrechte Fusion der Trophoblastzellen zu Synzytiotrophoblasten.
7. Metformin und Thiazolidindion führen nach 96 Stunden im LDH- Zytotoxizitätstest zu einer im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhten Zellyse. Dies lässt auf eine zytotoxische Wirkung beider Medikamente in den untersuchten Konzentrationen schließen, welche jedoch über der zu erwartenden Serumkonzentration unter einer Therapie liegen.

8. Metformin führt zu einer Reduktion der Östrogenproduktion humaner Trophoblastzellen.

Dies hat negativen Einfluss auf den intrauterinen Blutfluss und die fetale Entwicklung und geht mit einem erhöhten Risiko für Aborte und Frühgeburtlichkeit einher.

9. Thiazolidindion führt zu einer vermehrten Progesteronproduktion humaner Trophoblastzellen. Negative Effekte, wie eine erhöhte Abortrate sind bisher jedoch nur bei Vorliegen einer verminderten Progesteronkonzentration beobachtet worden, so dass die Auswirkung dessen auf die Schwangerschaft unklar ist.

10. Metformin und Thiazolidindion bedingen eine Reduktion der PIGF-Produktion humaner Trophoblastzellen. Dies beeinträchtigt die Entwicklung und Funktion der Plazenta und ist sowohl mit einem erhöhten Risiko für Preeklampsie, als auch mit einer intrauterinen Wachstumsretardierung vergesellschaftet.

11. Die leitliniengerechte Therapie des Diabetes mellitus in der Schwangerschaft und Gestationsdiabetes besteht in Deutschland weiterhin in einer Insulintherapie. Klinische Erfahrungen zum Einsatz von Metformin in der Schwangerschaft existieren beim PCO-Syndrom, Studien haben bisher eine im Vergleich zum Insulin gleichwertiges Erreichen der Therapieziele und vergleichbares neonatales Outcome belegt. Metformintherapie in der Schwangerschaft ist nicht mit einer im Vergleich zur Insulintherapie beeinträchtigten kognitiven und motorischen Entwicklung der Kinder assoziiert.

12. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch vermuten, dass eine Metformintherapie in der Schwangerschaft mit einer Veränderung der plazentaren Hormonexpression einhergeht, deren Folgen unbekannt sind.

10. Literaturverzeichnis

Die Erstellung des Literaturverzeichnisses erfolgte mit dem Literaturverwaltungsprogramm Mendeley.

- Aberdeen, G. W., Baschat, A. a, Harman, C. R., Weiner, C. P., Langenberg, P. W., Pepe, G. J., & Albrecht, E. D. (2010). Uterine and fetal blood flow indexes and fetal growth assessment after chronic estrogen suppression in the second half of baboon pregnancy. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 298(3), H881–H889. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00611.2009>
- Ahmed, A., Li, X. F., Dunk, C., Whittle, M. J., Rushton, D. I., & Rollason, T. (1995). Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 12(3), 235–243.
- Albrecht, E. D., Aberdeen, G. W., & Pepe, G. J. (2000). The role of estrogen in the maintenance of primate pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 182(2), 432–438. [http://doi.org/10.1016/S0002-9378\(00\)70235-3](http://doi.org/10.1016/S0002-9378(00)70235-3)
- Albrecht, E. D., & Pepe, G. J. (2010). Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(2-3), 397–408. <http://doi.org/10.1387/ijdb.082758ea>.
- Algire, C., Moiseeva, O., Deschenes-Simard, X., Amrein, L., Petruccelli, L., Birman, E., Pollak, M. N. (2012). Metformin Reduces Endogenous Reactive Oxygen Species and Associated DNA Damage. *Cancer Prevention Research*, 5(4), 536–543. <http://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0536>
- al-Okail, M. S., & al-Attas, O. S. (1994). Histological changes in placental syncytiotrophoblasts of poorly controlled gestational diabetic patients. *Endocrine Journal*, 41(4), 355–360. <http://doi.org/10.1507/endocrj.41.355>
- American Diabetes Association, Bantle JP, Wylie-Rosett J, Albright AL, Apovian CM, Clark NG, Franz MJ, Hoogwerf BJ, Lichtenstein AH, Mayer-Davis E, Mooradian AD, W. M. (2008). Nutrition recommendations and interventions for diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 31(Suppl. 1), 61–78.
- Aplin, J. D. (2000). The cell biological basis of human implantation. *Baillière's Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 14(5), 757–64.
- Azoulay, L., Yin, H., Filion, K. B., Assayag, J., Majdan, A., Pollak, M. N., & Suissa, S. (2012). The use of pioglitazone and the risk of bladder cancer in people with type 2 diabetes: nested case-control study. *BMJ*, 344: e3645. <http://doi.org/10.1136/bmj.e3645>
- Bedir, A., Aliyazicioglu, Y., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Uysal, M., Suvaci, D.E., Okuyucu, A., Kahraman, H., Hökelek, M., (2008). Assessment of genotoxicity in rats treated with the antidiabetic agent, pioglitazone. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49(3), 185–91.
- Bedir, A., Aliyazicioglu, Y., Kahraman, H., Yurdakul, Z., Uysal, M., Suvaci, D.E., Okuyucu, A., Hökelek, M. (2006). Genotoxicity in rats treated with the antidiabetic agent, rosiglitazone. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 9(47), 718–24.

- Bellamy, L., Casas, J.-P., Hingorani, A. D., & Williams, D. (2009). Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 373(9677), 1773–1779. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60731-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60731-5)
- Bertini, A. M., Silva, J. C., Taborda, W., Becker, F., Lemos Beber, F. R., Zucco Viesi, J. M., Ribeiro, T. E. (2005). Perinatal outcomes and the use of oral hypoglycemic agents. *Journal of Perinatal Medicine*, 33(6), 519–523. <http://doi.org/10.1515/JPM.2005.092>
- Bertoldo, M. J., Faure, M., Dupont, J., & Froment, P. (2014). Impact of metformin on reproductive tissues : an overview from gametogenesis to gestation, 2(8), 1–13. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.06.04>
- Bhattacharya, S., Campbell, D. M., Liston, W. a, & Bhattacharya, S. (2007). Effect of Body Mass Index on pregnancy outcomes in nulliparous women delivering singleton babies. *BMC Public Health*, 7, 168. <http://doi.org/10.1186/1471-2458-7-168>
- Blaschitz, a., Weiss, U., Dohr, G., & Desoye, G. (2000). Antibody reaction patterns in first trimester placenta: Implications for trophoblast isolation and purity screening. *Placenta*, 21(7), 733–741. <http://doi.org/10.1053/plac.2000.0559>
- Bolton, S., Cleary, B., Walsh, J., Dempsey, E., & Turner, M. J. (2009). Continuation of metformin in the first trimester of women with polycystic ovarian syndrome is not associated with increased perinatal morbidity. *European Journal of Pediatrics*, 168(2), 203–206. <http://doi.org/10.1007/s00431-008-0737-7>
- Bruhn, H. D., Junker, R., Schäfer, H., & Schreiber, S. (2011). Photometrische Bestimmungen diagnostisch wichtiger Metabolite. In *LaborMedizin, Indikationen, Methodik und Laborwerte, Pathophysiologie und Klinik* (3. überarb, p. 95). Schattauer Verlag.
- Buckley B.S., Harreiter J., Damm P., Corcoy R., Chico A., Simmons D., Vellinga A., (2012). Gestational diabetes mellitus in Europe: prevalence, current screening practice and barriers to screening. A review. *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association*, 29(7), 844–54. <http://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2011.03541.x>.
- Burton, G. J., Jauniaux, E., & Charnock-Jones, D. S. (2007). Human Early Placental Development: Potential Roles of the Endometrial Glands. *Placenta*, 28(SUPPL.), S64–S69. <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.01.007>
- Calderon, I. M. P., Damasceno, D. C., Amorin, R. L., Costa, R. a a, Brasil, M. a M., & Rudge, M. V. C. (2007). Morphometric study of placental villi and vessels in women with mild hyperglycemia or gestational or overt diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 78(1), 65–71. <http://doi.org/10.1016/j.diabres.2007.01.023>
- Carr B.R., MacDonald P.C., Simpson E.R. (1982). The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum. *Fertility and Sterility*, 38(3), 303–11.
- Carroll, D. G., & Kelley, K. W. (2014). Review of metformin and glyburide in the management of gestational diabetes, 12(4), 1–7.
- Catalano, P. M., Kirwan, J. P., Haugel-de Mouzon, S., & King, J. (2003). Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus. *The Journal of Nutrition*, 133(5 Suppl 2), 1674S–1683S.

- Cawyer, C.R., Horvat, D., Leonard, D., Allen, S. R., Jones, R. O., Zawieja, D. C. (2014). Hyperglycemia impairs cytotrophoblast function via stress signaling. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 211(5), 541.e1–541.e8.
<http://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.04.033>
- CellTiter- Blue® Cell Viability Assay*. Promega Corporation, Madison, WI, USA.
- Chan, L. Y. S., Yeung, J. H. K., & Lau, T. K. (2005). Placental transfer of rosiglitazone in the first trimester of human pregnancy. *Fertility and Sterility*, 83(4), 955–958.
<http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.10.045>
- Charles, B., Norris, R., Xiao, X., (2006). Population pharmacokinetics of metformin in late pregnancy. *Therapeutic Drug Monitoring*, 28(1), 67–72.
- Chen, L., Pawlikowski, B., Schlessinger, A., More, S. S., Stryke, D., Johns, S. J., Giacomini, K. M. (2011). Role of organic cation transporter 3 (SLC22A3) and its missense variants in the pharmacologic action of metformin, 20(11), 687–699.
<http://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833fe789.Role>
- Cheng, Y. W., Chung, J. H., Block-Kurbisch, I., Inturrisi, M., Caughey, A. B. (2012). Treatment of gestational diabetes mellitus: glyburide compared to subcutaneous insulin therapy and associated perinatal outcomes. *Journal of Materno-Fetal and Neonatal Medicine*, 25(4), 379–384. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted>
- Cisse, O., Fajardy, I., Dickes-Coopman, A., Moitrot, E., Montel, V., Deloof, S., Laborie, C. (2013). Mild Gestational Hyperglycemia in Rat Induces Fetal Overgrowth and Modulates Placental Growth Factors and Nutrient Transporters Expression. *PLoS ONE*, 8(5). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0064251>
- Cohen, A. L., Wenger, J. B., James-Todd, T., Lamparello, B. M., Halprin, E., Serdy, S., Brown, F. M. (2014). The association of circulating angiogenic factors and HbA1c with the risk of preeclampsia in women with preexisting diabetes. *Hypertension in Pregnancy : Official Journal of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy*, 33(1), 81–92. <http://doi.org/10.3109/10641955.2013.837175>
- Colatrella, A., Visalli, N., Abbruzzese, S., Leotta, S., Bongiovanni, M., & Napoli, A. (2013). Comparison of insulin lispro protamine suspension with NPH insulin in pregnant women with type 2 and gestational diabetes mellitus: Maternal and perinatal outcomes. *International Journal of Endocrinology*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/151975>
- Committee on Practice Bulletins Obstetrics. (2013). Practice Bulletin No. 137: Gestational diabetes mellitus. *Obstetrics and Gynecology*, 122(2), 406–16. <http://doi.org/doi:10.1097/01.AOG.0000433006.09219.f1>
- Coughlan, M. T., Vervaart, P. P., Permezel, M., Georgiou, H. M., & Rice, G. E. (2004). Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta*, 25(1), 78–84. [http://doi.org/10.1016/S0143-4004\(03\)00183-8](http://doi.org/10.1016/S0143-4004(03)00183-8)
- Crowther, C. A., Hiller, J. E., Moss, J. R., & McPhee, Andrew J., Jeffries, William S., Robinson, J. S. (2005). Effect of Treatment of Gestational Diabetes Mellitus on Pregnancy Outcomes. *New England Journal of Medicine*, 352(24), 2477–2486.

- Csapo, A. I., Pohanka, O., & Kaihola, H. L. (1974). Progesterone deficiency and premature labour. *British Medical Journal*, 1(5899), 137–140.
<http://doi.org/10.1136/bmj.1.5899.137>
- Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland.
- Denno K.M., S. T. (1994). Effects of the biguanide class of oral hypoglycemic agents on mouse embryogenesis. *Teratology*, 49(4), 260–6.
- Desai, J., Holt-Shore, V., Torry, R. J., Caudle, M. R., & Torry, D. S. (1999). Signal transduction and biological function of placenta growth factor in primary human trophoblast. *Biology of Reproduction*, 60(4), 887–892.
- Di Trapani, G., Perkins, A., & Clarke, F. (1998). Production and secretion of thioredoxin from transformed human trophoblast cells. *Molecular Human Reproduction*, 4(4), 369–375.
- Dudenhausen, J. W. (2003). *Frauenheilkunde und Geburtshilfe* (2. Auflage). Unter Mitarbeit von V.Briese. Berlin: de Gruyter (de Gruyter Lehrbuch).
- Dumitrescu, R., Mehedintu, C., Briceag, I., Vi, P., & Hudita, D. (2015). Metformin-Clinical Pharmacology in PCOs, 8(2), 187–192.
- Elliott, B.D., Langer, O., Schenker, S., Johnson, R.F. (1991). Insignificant transfer of glyburide occurs across the human placenta. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 165(4 Pt 1), 807–12.
- El-Tarhouny S.A., Almasry S.M., Elfayomy A.K., Baghdadi H., Habib. F.A. (2014). Placental growth factor and soluble Fms-like tyrosine kinase 1 in diabetic pregnancy: A possible relation to distal villous immaturity. *Histology and Histopathology*, 29(2), 259–72.
- Fadl, H. E., Östlund, I. K., Magnuson, A. F. K., & Hanson, U. S. (2010). Maternal and neonatal outcomes and time trends of gestational diabetes mellitus in Sweden from 1991 to 2003. *Diabetic Medicine*, 27(4), 436–441. <http://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2010.02978.x>
- Fiala, C., & Gemzel-Danielsson, K. (2006). Review of medical abortion using mifepristone in combination with a prostaglandin analogue. *Contraception*, 74(1), 66–86.
<http://doi.org/10.1016/j.contraception.2006.03.018>
- Fine, E. L., Horal, M., Chang, T. I., Fortin, G., & Loeken, M. R. (1999). Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Diabetes*, 48(12), 2454–2462.
<http://doi.org/10.2337/diabetes.48.12.2454>
- Fournier T, Tsatsaris V, Handschuh K, Evain-Brion D. (2007). PPARs and the placenta. *Placenta*, 28(2-3), 65–76.
- Fuglsang J, Lauszus F, Flyvbjerg A, Ovesen P. (2003). Human placental growth hormone, insulin-like growth factor I and -II, and insulin requirements during pregnancy in type 1 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(10), 4355–61.
- Gagnon A, Wilson RD, Audibert F, Allen VM, Blight C, Brock JA, Désilets VA, Johnson JA, Langlois S, Summers A., (2008). Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 30(10), 918–49.

- Gallego, M. J., Porayette, P., Kaltcheva, M. M., Meethal, S. V., & Atwood, C. S. (2009). Opioid and progesterone signaling is obligatory for early human embryogenesis. *Stem Cells and Development*, 18(5), 737–740. <http://doi.org/10.1089/scd.2008.0190>
- Genbacev O.D., Prakobphol A., Foulk R.A., Krtolica A.R., Ilic D., Singer M.S., Yang Z.Q., Kiessling L.L., Rosen S.D., Fischer S.J. (2003). Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science*, 299(5605), 405–408.
- Gheorman, L., Leșea, I. E., Gheorman, V. (2012). Histopathological considerations of placenta, 53(2), 329–336.
- Gibb W., Lye S.J. (2006). Parturition. In *Physiology of Reproduction* (pp. 2925–2974). Academic Press.
- Glueck, C. J., Wang, P., Goldenberg, N., & Sieve-Smith, L. (2002). Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 17(11), 2858–2864.
- Graham, D. J., Ouellet-Hellstrom, R., MaCurdy, T. E., Ali, F., Sholley, C., Worrall, C., & Kelman, J. A. (2010). Risk of acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and death in elderly Medicare patients treated with rosiglitazone or pioglitazone. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 304(4), 411–418. <http://doi.org/10.1097/01.SA.0000394255.03573.05>
- Greene, M.F., Hare J.W., Cloherty J.P., Benacerraf B.R., Soeldner, J. (1989). First-trimester hemoglobin A1 and risk for major malformation and spontaneous abortion in diabetic pregnancy. *Teratology*, 39(3), 225–31.
- Gude, N.M., Roberts C.T., Kalionis B., King R.G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*, 114(5-6), 397–407.
- Haag, P., Hanhart, N., Müller, M. (2010). *Gynäkologie und Urologie*. (D. med. M. Müller, Ed.) (5. Auflage). Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste. S.140-147.
- Hemauer, S. J., Patrikeeva, S. L., Nanovskaya, T. N., Hankins, G.D., Ahmed, M. S. (2010). Role of human placental apical membrane transporters in the efflux of glyburide, rosiglitazone, and metformin. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 202(4), 383.cl– 383.e.7. <http://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.01.035>.
- Henson, M. C., Pepe, G. J., & Albrecht, E. D. (1991). Regulation of placental low-density lipoprotein uptake in baboons by estrogen: dose-dependent effects of the anti-estrogen ethamoxitytriphetol (MER-25). *Biology of Reproduction*, 45(1), 43–48. <http://doi.org/10.1095/biolreprod45.1.43>
- Hepp, K.D., Dittmar, F. W. (2003). *Diabetologie in Klinik und Praxis*. (E. Mehnert, H., Standl, Ed.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Herstellerinformation Avandia. SmithKline Beecham Ltd, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex, TW8, 9GS, Vereinigtes Königreich.*
- Herstellerinformation Glustin. Takeda Pharma A/S, Langebjerg 1, DK-4000 Roskilde, Denmark.*

- Hinck, L., Thissen, J. P., Pampfer, S., & De Hertogh, R. (2003). Effect of high concentrations of glucose on differentiation of rat trophoblast cells in vitro. *Diabetologia*, 46(2), 276–283. <http://doi.org/10.1007/s00125-002-1016-1>
- Hod, M., Damm, P., Kaaja, R., Visser, G. H. A., Dunne, F., Demidova, I., Mersebach, H. (2008). Fetal and perinatal outcomes in type 1 diabetes pregnancy: a randomized study comparing insulin aspart with human insulin in 322 subjects. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198(2). <http://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.08.005>
- Homko, C., Sivan, E., Chen, X., Reece, E. A., & Boden, G. (2001). Insulin secretion during and after pregnancy in patients with gestational diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(2), 568–573. <http://doi.org/10.1210/jcem.86.2.7137>
- Hopp, H., Vollert, W., Ragosch, V., Novak, A., Weitzel, H.K., Glöckner, E., Besch, W. (1996). Indication and results of insulin therapy for gestational diabetes mellitus. *Journal of Perinatal Medicine*, 24(5), 521–30.
- Hou, X., Song, J., Li, X. N., Zhang, L., Wang, X., Chen, L., & Shen, Y. H. (2010). Metformin reduces intracellular reactive oxygen species levels by upregulating expression of the antioxidant thioredoxin via the AMPK-FOXO3 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(2), 199–205. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.017>
- Huppertz, B. (2008). The anatomy of the normal placenta. *Journal of Clinical Pathology*, 61(12), 1296–1302. <http://doi.org/10.1136/jcp.2008.055277>
- Huppertz, B., Borges, M. (2008). Placenta trophoblast fusion. *Methods in Molecular Biology*, 475, 135–147. http://doi.org/10.1007/978-1-59745-250-2_8
- Ijäs, H., Vääräsmäli, M., Saarela, T., Keravuo, R., & Raudaskoski, T. (2015). A follow-up of a randomised study of metformin and insulin in gestational diabetes mellitus: growth and development of the children at the age of 18 months. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 122(7), 994–1000. <http://doi.org/doi: 10.1111/1471-0528.12964>
- Instructions for immunohistochemical staining using mouse or rabbit primary antibodies. (n.d.). In *ImmPRESS™ UNIVERSAL REAGENT Anti-Mouse/Rabbit Ig*. Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA.
- Jerome F. Strauss, R. L. B. (1991). Endocrine-metabolic adaptations in pregnancy. In J. R. Yen SSC (Ed.), *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management*. (p. 947). Philadelphia: WB Saunders Company.
- Jeschke U., Briese V., Richter D., Kunkel S., (1996). Stimulierungsversuche von Trophoblasten in vitro mit Hilfe von PP14. *Zeitschrift Fur Geburtshilfe Und Neonatologie*, 200(5), 199–201.
- Jovanovic L., Knopp R.H., Brown Z., Conley M.R., Park E., Mills J.L., Metzger B.E., Aarons J.H., Holmes L.B., Simpson J.L., National Institute of Child Health and Human Development Diabetes in Early Pregnancy Study Group, (2001). Declining insulin requirement in the late first trimester of diabetic pregnancy. *Diabetes Care*, 24(7), 1130–6.
- Jovanovic, L. (2000). Role of diet and insulin treatment of diabetes in pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 43(1), 46–55.

- Ju, H., Rumbold, A. R., Willson, K. J., & Crowther, C. A. (2008). Borderline gestational diabetes mellitus and pregnancy outcomes. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 8, 31. <http://doi.org/10.1186/1471-2393-8-31>
- Kainer, F. (2001). Diabetes und Schwangerschaft. *Gynäkologische Praxis*, 419–426.
- Kainer, F., Weiss, P. A. M., Hüttner, U., Haas, J., & Reles, M. (1997). Levels of amniotic fluid insulin and profiles of maternal blood glucose in pregnant women with diabetes type-I. *Early Human Development*, 49(2), 97–105. [http://doi.org/10.1016/S0378-3782\(97\)00027-3](http://doi.org/10.1016/S0378-3782(97)00027-3)
- Kautzky-Willer, A., Handisurya, A. (2009). Gestationsdiabetes. *Journal Für Klinische Endokrinologie Und Stoffwechsel*, 2(2), 7–13.
- Kautzky-Willer, A., Winzer, C. (2002). Übergewicht und Diabetes mellitus in der Schwangerschaft. *Journal Für Ernährungsmedizin*, 4(3), 7–12.
- Kemball, M. L., McIver, C., Milner, R. D. G., Nourse, C. H., Schiff, D., & Tiernan, J. R. (1970). Neonatal Hypoglycaemia in Infants of Diabetic Mothers given Sulphonylurea Drugs in Pregnancy. *Archives of Disease in Childhood*, 45(243), 696–701. <http://doi.org/10.1136/adc.45.243.696>
- Kemmer, F.W., Halle, M., Stumvoll, M., Thurm, U., Zimmer, P. (2007). Diabetes, Sport und Bewegung. *Diabetologie*, 2(Suppl. 2), 207–210.
- Kessel, S., Staboulidou, I., Oehler, K., Hillemanns, P., Scharf, A., & Günter, H. H. (2007). Der Gestationsdiabetes unter klinischen Bedingungen bei angestrebter Normoglykämie: Korrelationsuntersuchungen zwischen maternalen Blutzuckertagesprofilen und fetometrischen Ultraschallparametern. *Zeitschrift Fur Geburtshilfe Und Neonatologie*, 211(5), 185–190. <http://doi.org/10.1055/s-2007-981328>
- Khera, T., Martin, J., Riley, S., Steadman, R., & Phillips, A. O. (2006). Glucose enhances mesangial cell apoptosis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 86(6), 566–577. <http://doi.org/10.1038/labinvest.3700418>
- Kidron, M., Dinh, S., Menachem, Y., Abbas, R., Variano, B., Goldberg, M., Arbit, E., Bar-On, H. (2004). A novel per-oral insulin formulation: proof of concept study in non-diabetic subjects. *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association*, 21(4), 354–7.
- Kleinwechter, H., Schäfer-Graf, U., Bührer, C., Hösli, I., Kainer, F., Kautzky-Willer, A., Pawłowski, B., Schunk, K., & Somville, T. (2014). Diabetes und Schwangerschaft. *Diabetes Und Stoffwechsel*, 9(Suppl 2), 214–220. <http://doi.org/10.1055/s-0034-1385413>
- Kleinwechter, H., Schäfer-Graf, U., Bührer, C., Hösli, I., Kainer, F., Kautzky-Willer, A., Pawłowski, B., Schunck, K., Somville, T. & Sorger, M. (2011). *Gestationsdiabetes mellitus (GDM) Evidenzbasierte Leitlinie zu Diagnostik, Therapie u. Nachsorge der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG)*.
- Kleinwechter, H., Bührer, A.C., Hunger-Battefeld, W., Kainer, F., Kautzky-Willer, A., Pawłowski, B., Reiher, H. Schäfer-Graf, U., Sorger, M. (2014). *Diabetes und Schwangerschaft Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft*.

- Kliman H.J., Nestler J.E., Sermasi E., Sanger J.M., Strauss J.F., (1986). Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 118(4), 1567–82.
- Kliman, H.J., M. PhDD (1999). CYTOTROPHOBLAST PREPARATION.
http://medicine.yale.edu/obgyn/kliman/Cytotrophoblast%20Purification_tcm607-153425_tcm607-123097-32.pdf
- Koh, P.-O., Sung, J.-H., Won, C.-K., Cho, J.-H., Moon, J.-G., Park, O.-S., & Kim, M.-O. (2007). Streptozotocin-induced diabetes decreases placenta growth factor (PIGF) levels in rat placenta. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 69(9), 877–880. <http://doi.org/10.1292/jvms.69.877>
- Kousta E., Lawrence N.J., Godsland I.F., Penny A., Anyaoku V., Millauer B.A., Cela E., Johnston D.G., Robinson S. (2003). Insulin resistance and beta-cell dysfunction in normoglycaemic European women with a history of gestational diabetes. *Clinical Endocrinology*, 59(3), 289–97.
- Kovo, M., Haroutiunian, S., Feldman, N., Hoffman, A., & Glezerman, M. (2008). Determination of metformin transfer across the human placenta using a dually perfused ex vivo placental cotyledon model. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 136(1), 29–33. <http://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2007.01.013>
- Kundu, N., Carmody, P. J., Didolkar, S. M., & Petersen, L. P. (1978). Sequential determination of serum human placental lactogen, estriol, and estetrol for assessment of fetal morbidity. *Obstetrics and Gynecology*, 52(5), 513–520.
- Lacey, H., Haigh, T., Westwood, M., & Aplin, J. D. (2002). Mesenchymally-derived insulin-like growth factor 1 provides a paracrine stimulus for trophoblast migration. *BMC Developmental Biology*, 2: 5. <http://doi.org/10.1186/1471-213X-2-5>
- Lambert, K., & Holt, R. I. (2013). The use of insulin analogues in pregnancy. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 15(10), 888–900. <http://doi.org/10.1111/dom.12098>
- Landon, M. B., Spong, C. Y., Thom, E., Ph, D., Marshall, W., Ramin, S. M., Saade, G. (2010). A Multicenter, Randomized Trial of Treatment for Mild Gestational Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 361(14), 1339–1348. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa0902430.A>
- Langer, O., Conway, D. L., Berkus, M. D., Xenakis, E. M., Gonzales, O. (2000). A comparison of glyburide and insulin in women with gestational diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 343(16), 1134–1138.
- Lappas, M., Mittion, A., & Permezel, M. (2010). In response to oxidative stress, the expression of inflammatory cytokines and antioxidant enzymes are impaired in placenta, but not adipose tissue, of women with gestational diabetes. *Journal of Endocrinology*, 204(1), 75–84. <http://doi.org/10.1677/JOE-09-0321>
- Lee, H.Y., Wei, D., Loeken, M.R. (2014). Lack of metformin effect on mouse embryo AMPK activity: implications for metformin treatment during pregnancy. *Diabetes/metabolism Research and Reviews*, 30(1), 23–30. <http://doi.org/10.1002/dmrr.2451>

- Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M., & Kliewer, S. A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *The Journal of Biological Chemistry*, 270(22), 12953–12956. <http://doi.org/10.1074/jbc.270.22.12953>
- Leipold, H., Bancher-Todesca, D. (2002). Gestationsdiabetes- eine oft unerkannte Erkrankung in der Schwangerschaft. *Speculum*, 20(1), 13–17.
- Levine, R. J., Maynard, S. E., Qian, C., Lim, K.-H., England, L. J., Yu, K. F., Karumanchi, S. A. (2004). Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *The New England Journal of Medicine*, 350(7), 672–683. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa031884>
- Lindberg, B.S., Johansson, E.D., Nilsson, B.A. (1974). Plasma levels of nonconjugated oestrone, oestradiol-17 β and oestriol during uncomplicated pregnancy. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 32(0), 21–36.
- Lobner, K. (2006). Predictors of Postpartum Diabetes in Women With Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes*, 55(3), 792–797. <http://doi.org/10.2337/diabetes.55.03.06.db05-0746>
- López-Tinoco, C., Roca, M., García-Valero, A., Murri, M., Tinahones, F. J., Segundo, C., Aguilar-Diosdado, M. (2013). Oxidative stress and antioxidant status in patients with late-onset gestational diabetes mellitus. *Acta Diabetologica*, 50(2), 201–208. <http://doi.org/10.1007/s00592-011-0264-2>
- Loukovaara, M., Leinonen, P., Teramo, K., Andersson, S. (2005). Concentration of cord serum placenta growth factor in normal and diabetic pregnancies. *BJOG : An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 112(1), 75–79.
- Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, Del Vecchio S, Lei KJ, Chou JY, P. M. (1993). Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PIGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene*, 8(4), 925–931.
- Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., & Persico, M. G. (1991). Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(20), 9267–9271.
- Major, C. a., DeVeciana, M., Weeks, J., & Morgan, M. A. (1998). Recurrence of gestational diabetes: Who is at risk? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 179(4), 1038–1042. [http://doi.org/10.1016/S0002-9378\(98\)70211-X](http://doi.org/10.1016/S0002-9378(98)70211-X)
- Maldonado-Estrada, J., Menu, E., Roques, P., Barré-Sinoussi, F., & Chaouat, G. (2004). Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 286(1-2), 21–34. <http://doi.org/10.1016/j.jim.2003.03.001>
- Matthaei, S., Stumvoll, M., Häring, H.-U. (2001). Thiazolidindione (Insulinsensitizer): Neue Aspekte in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2. *Deutsches Ärzteblatt*, 98(14), A–912–918.
- Mayama, R., Izawa, T., Sakai, K., Sucin, N., & Iwashita, M. (2012). Improvement of insulin sensitivity promotes extravillous trophoblast cell migration stimulated by insulin – like growth, 60(3), 359–368. <http://doi.org/10.1507/endocrj>.

- McCance, D. R., Damm, P., Mathiesen, E. R., Hod, M., Kaaja, R., Dunne, F., Mersebach, H. (2008). Evaluation of insulin antibodies and placental transfer of insulin aspart in pregnant women with type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 51(11), 2141–2143. <http://doi.org/10.1007/s00125-008-1120-y>
- McFarland, M. B., Langer, O., Conway, D. L., & Berkus, M. D. (1999). Dietary therapy for gestational diabetes: How long is long enough? *Obstetrics and Gynecology*, 93(6), 978–982. [http://doi.org/10.1016/S0029-7844\(98\)00547-X](http://doi.org/10.1016/S0029-7844(98)00547-X)
- McIntyre, H.D., Serek, R., Crane, D.I., Veveris-Lowe, T., Parry, A., Johnson, S., Leung, K.C., Ho, K.K., Bougoussa, M., Hennen, G., Igout, A., Chan, F.Y., Cowley, D., Cotterill (2000). Placental growth hormone (GH), GH-binding protein, and insulin-like growth factor axis in normal, growth-retarded, and diabetic pregnancies: correlations with fetal growth. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(3), 1143–1150.
- Miller, E., Hare, J.W., Cloherty, J.P., Dunn, P.J., Gleason, R.E., Soeldner, J.S. (1981). Elevated maternal hemoglobin A1c in early pregnancy and major congenital anomalies in infants of diabetic mothers. *New England Journal of Medicine*, 304(22), 1331–1334.
- Mjösberg, J., Svensson, J., Johansson, E., Hellström, L., Casas, R., Jenmalm, M. C., Ernerudh, J. (2009). Systemic reduction of functionally suppressive CD4dimCD25highFoxp3+ Tregs in human second trimester pregnancy is induced by progesterone and 17beta-estradiol. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(1), 759–769. <http://doi.org/10.1016/j.jri.2009.06.225>
- Moore, L. E., Clokey, D., Rappaport, V., & Curet, L. (2010). Metformin Compared With Glyburide in. *Obstet Gynecol*, 115(1), 55–59.
- Mori, Y., Murakawa, Y., Okada, K., Horikoshi, H., Yokoyama, J., Tajima, N., & Ikeda, Y. (1999). Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 22(6), 908–912. <http://doi.org/10.2337/diacare.22.6.908>
- Moriyama, I., Sugawa, T. (1972). Progesterone facilitates implantation of xenogenic cultured cells in hamster uterus. *Nature: New Biology*, 236(66), 150–152.
- Moses, R. G., Luebcke, M., Davis, W. S., Coleman, K. J., Tapsell, L. C., Petocz, P., & Brand-Miller, J. C. (2006). Effect of a low-glycemic-index diet during pregnancy on obstetric outcomes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84(4), 807–812.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Ruth, P., & Schäfer-Korting, M. (2008). *Mutschler Arzneimittelwirkungen* (9. Auflage). Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. S. 417-420
- Myatt, L., & Cui, X. (2004). Oxidative stress in the placenta. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(4), 369–382. <http://doi.org/10.1007/s00418-004-0677-x>
- Nadra, K., Quignodon, L., Sardella, C., Joye, E., Mucciolo, A., Chrast, R., & Desvergne, B. (2010). PPAR γ in placental angiogenesis. *Endocrinology*, 151(10), 4969–4981. <http://doi.org/10.1210/en.2010-0131>
- National Institute for Health and Care Excellence. *Diabetes in pregnancy: management from preconception to the postnatal period*. <http://nice.org.uk/guidance/ng3>

- Nelson, D. B., Ness, R. B., Grisso, J. a., & Cushman, M. (2002). Sex hormones, hemostasis and early pregnancy loss. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 267(1), 7–10.
<http://doi.org/10.1007/s00404-001-0268-1>
- Nicholson, W., Bolen, S., Witkop, C. T., Neale, D., Wilson, L., & Bass, E. (2009). Benefits and risks of oral diabetes agents compared with insulin in women with gestational diabetes: a systematic review. *Obstetrics and Gynecology*, 113(1), 193–205.
<http://doi.org/10.1097/AOG.0b013e318190a459>
- O'Sullivan, J. B. (1982). Body weight and subsequent diabetes mellitus. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 248(8), 949–952.
- Ostlund, I., & Hanson, U. (2003). Occurrence of gestational diabetes mellitus and the value of different screening indicators for the oral glucose tolerance test. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 82(2), 103–108. <http://doi.org/001> [pii]
- Ouslimani, N., Peynet, J., Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Legrand, A., & Beaudeux, J. L. (2005). Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 54(6), 829–834.
<http://doi.org/10.1016/j.metabol.2005.01.029>
- Oz Gul, O., Cinkilic, N., Gul, C. B., Cander, S., Vatan, O., Ersoy, C., Tuncel, E. (2013). Comparative genotoxic and cytotoxic effects of the oral antidiabetic drugs sitagliptin, rosiglitazone, and pioglitazone in patients with type-2 diabetes: A cross-sectional, observational pilot study. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 757(1), 31–35. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.04.024>
- Pal, L., Chu, H.P., Shu, J., Topalli, I., Santoro, N., Karkanias, G. (2007). In vitro evidence of glucose induced toxicity in GnRH secreting neurons: High glucose concentrations influence GnRH secretion, impair cell viability and induce apoptosis in the GT1-1 neuronal cell line. *Fertility and Sterility*, 88(4), 1143–1149.
- Palmeira, C. M., Rolo, A. P., Berthiaume, J., Bjork, J. a., & Wallace, K. B. (2007). Hyperglycemia decreases mitochondrial function: The regulatory role of mitochondrial biogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225(2), 214–220.
<http://doi.org/10.1016/j.taap.2007.07.015>
- Papamitsou, T., Chatzistamatiou, M., Grammatikopoulou, D., Papadopoulou, K., Lakis, S., Economou, Z., Papadopoulou, C., Sioga, A. (2011). Low expression of progesterone receptor A in intermediate trophoblast of miscarriages. *Histology and Histopathology*, 26(5), 609–614.
- Park, J. E., Chen, H. H., Winer, J., Houck, K. a., & Ferrara, N. (1994). Placenta growth factor: Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *Journal of Biological Chemistry*, 269(41), 25646–25654. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0018076>
- Partsch, C. J., Sippell, W. G., Mackenzie, I. Z., & Aynsley-Green, A. (1991). The steroid hormonal milieu of the undisturbed human fetus and mother at 16-20 weeks gestation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 73(5), 969–974.
<http://doi.org/10.1203/00006450-198611000-00043>

- Pastore, M. B., Jobe, S. O., Ramadross, J., & Magness, R. R. (2012). Estrogen Receptor- α and Estrogen Receptor- β in the Uterine Vascular Endothelium during Pregnancy: Functional Implications for Regulating Uterine Blood Flow. *Seminars in Reproductive Medicine*, 30(1), 46–61. <http://doi.org/10.1055/s-0031-1299597>
- Persico, M.G., Vincenti, V., DiPalma, T. (1999). Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PIGF). *Current Topics in Mikrobiology and Immunology*, 237, 31–40.
- Petereit, M. (2010). Dissertation: *HYPERGLYKÄMIE UND HORMONEXPRESSION HUMANER TROPHOBLASTZELLEN*. Universität Rostock.
- Piconi, L., Quagliaro, L., Assaloni, R., Da Ros, R., Maier, A., Zuodar, G., & Ceriello, A. (2006). Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 22(3), 198–203. <http://doi.org/10.1002/dmrr.613>
- Prieto, G. A., & Rosenstein, Y. (2006). Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology*, 118(1), 58–65. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02339.x>
- Quantikine® Human PlGF*. Firma: R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA.
- Rachek, L. I., Yuzefovych, L. V., LeDoux, S. P., Julie, N. L., & Wilson, G. L. (2009). Troglitazone, but not rosiglitazone, damages mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunction and cell death in human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(3), 348–354. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2009.07.021>
- Redman, C. W. (1983). HLA-DR antigen on human trophoblast: a review. *American Journal of Reproductive Immunology*, 3(4), 175–177.
- Resnik, R., Killam, A.P., Battaglia, F.C., Makowski, E.L. (1974). The stimulation of uterine blood flow by various estrogens. *Endocrinology*, 94(4), 1192–1196.
- Richtlinien des Gemeinsamen Bundesausschusses über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung („Mutterschafts-Richtlinien“)*.
- Robinson, D. P., & Klein, S. L. (2012). Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Hormones and Behavior*, 62(3), 263–271. <http://doi.org/10.1016/j.ybeh.2012.02.023>
- Rochon, M., Rand, L., Roth, L., & Gaddipati, S. (2006). Glyburide for the management of gestational diabetes: Risk factors predictive of failure and associated pregnancy outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(4), 1090–1094. <http://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.07.029>
- Rolo, A. P., & Palmeira, C. M. (2006). Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212(2), 167–178. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2006.01.003>
- Rowan, J. A, Hague, W. M., Gao, W., Battin, M. R., & Moore, M. P. (2008). Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 358(19), 2003–2015. <http://doi.org/10.1097/01.ogx.0000327772.43649.2a>

- Rowan, J. A., Rush, E. C., Obolonkin, V., Battin, M., Wouldes, T., & Hague, W. M. (2011). Metformin in Gestational Diabetes : The Offspring Follow-Up (MiG TOFU). *Diabetes Care*, 34, 2279–2284.
- Ryan, E. A., & Enns, L. (1988). Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 67(2), 341–347. <http://doi.org/10.1210/jcem-67-2-341>
- Ryan, E.A, O'Sullivan, M.J., S. J. (1985). Insulin action during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. *Diabetes*, 34(4), 380–389.
- Saha, S., New, L. S., Ho, H. K., Chui, W. K., & Chan, E. C. Y. (2010). Direct toxicity effects of sulfo-conjugated troglitazone on human hepatocytes. *Toxicology Letters*, 195(2-3), 135–141. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.03.010>
- Saioa Torrealday,M.D., Hugh, S. T., O. Burney, R., Mooney, S.B., Giudice, L.C. (2012). Endocrinology of Pregnancy. In *Endocrinology of Female Reproduction*. Endotext ; The FREE Complete Source for Clinical Endocrinology.
- Salzberger M, Liban, E. (1975). Diabetes and antenatal fetal death. *Israel Journal of Medical Sciences*, 11(6), 623–628.
- Sasaki, Y., Sakai, M., Miyazaki, S., Higuma, S., Shiozaki, a, & Saito, S. (2004). Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Molecular Human Reproduction*, 10(5), 347–353. <http://doi.org/10.1093/molehr/gah044>
- Schaefer-Graf, U. M., Songster, G., Xiang, A., Berkowitz, K., Buchanan, T. a, & Kjos, S. L. (1997). Congenital malformations in offspring of women with hyperglycemia first detected during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 177(5), 1165–1171. [http://doi.org/10.1016/S0002-9378\(97\)70035-8](http://doi.org/10.1016/S0002-9378(97)70035-8)
- Schaefer-Graf, U.M., Kjos, S. L., Bühling, K. J., Henrich, W., Brauer, M., Heinze, T., Vetter, K. (2003). Amniotic fluid insulin levels and fetal abdominal circumference at time of amniocentesis in pregnancies with diabetes. *Diabetic Medicine*, 20(5), 349–354. <http://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2003.00946.x>
- Schaefer-Graf, U.M., Vetter, K. (1999). Diabetes und Schwangerschaft. *Therapeutische Umschau*, 56(10), 572–576.
- Schaefer-Graf, U.M., Goecke, T., Vetter, K. (2002). Diabetes und Schwangerschaft. *Der Gynäkologe*, 35(6), 575–586. <http://doi.org/10.1007/s00129-002-1209-1>
- Scheen, A.J. (1996). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical Pharmacokinetics*, 30(5), 359–371.
- Schoonjans, K., Martin, G., Staels, B., Auwerx, J. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Current Opinion in Lipidology*, 8(3), 159–166.
- Shim, S.S., Lee, C.H., Jun, J.K. (2015). Midtrimester maternal plasma concentrations of angiopoietin 1, angiopoietin 2, and placental growth factor in pregnant women who subsequently develop preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology*, 58(1), 10–16.

- Siiteri, P.K., Febres, F., Clemens, L. E., Chang, R. J., Gondos, B., & Stites, D. (1977). Progesterone and maintenance of pregnancy: is progesterone nature's immunosuppressant? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 286(Mlc), 384–397. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1977.tb29431.x>
- Siiteri P.K., MacDonald, P.C. (1966). Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 26(7), 751–761.
- Silva, J.C., Fachin, D.R., Coral, M.L., Bertini, A.M. (2012). Perinatal impact of the use of metformin and glyburide for the treatment of gestational diabetes mellitus. *Journal of Perinatal Medicine*, 40(3), 225–228. <http://doi.org/10.1515/jpm-2011-0175>
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews*, 15(3), 342–355.
- Singh, A.K., Singh, R. (2015). Metformin in gestational diabetes: An emerging contender. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 19(2), 236–244. <http://doi.org/10.4103/2230-8210.149317>
- Soldin, O. P., Guo, T., Weiderpass, E., Trachtenberg, R. E., Hilakivi-Clarke, L., & Soldin, S. J. (2005). Steroid hormone levels in pregnancy and 1 year postpartum using isotope dilution tandem mass spectrometry. *Fertility and Sterility*, 84(3), 701–710. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.02.045>.
- Steven, K. (2001). The importance of β- Cell Failure in the developement and Progression of Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(9), 4047–4057.
- St-Pierre, M. V., Serrano, M. a., Macias, R. I., Dubs, U., Hoechli, M., Lauper, U., Marin, J. J. (2000). Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(4), R1495–R1503.
- Su, D. F., & Wang, X. Y. (2014). Metformin vs insulin in the management of gestational diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 104(3), 353–357. <http://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.12.056>
- Suhonen, L., Teramo, K. (1993). Hypertension and pre-eclampsia in women with gestational glucose intolerance. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 72(4), 269–272.
- Tafuri, S. R. (1996). Troglitazone enhances differentiation, basal glucose uptake, and Glut1 protein levels in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*, 137(11), 4706–4712. <http://doi.org/10.1210/en.137.11.4706>
- Tartarin, P., Moison, D., Guibert, E., Dupont, J., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., Froment, P. (2012). Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Human Reproduction*, 27(11), 3304–3314. <http://doi.org/10.1093/humrep/des264>
- Tertti, K., Eskola, E., Rönnemaa, T., & Haataja, L. (2015). Neurodevelopment of Two-Year-Old Children Exposed to Metformin and Insulin in Gestational Diabetes Mellitus. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, 36(9), 752–757. <http://doi.org/doi:10.1097/DBP.0000000000000230>

- The HAPO Study Cooperative Research Group. (2008). Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. *New England Journal of Medicine*, 358(19), 1991–2002.
- Tóth, E. M., Borsodi, A. K., Felföldi, T., Balázs, V., Sipos, R., & Márialigeti, K. (2013). CELL- AND GERM-COUNTING METHODS. In *Practical Microbiology*. Eötvös Loránd University.
- Tulchinsky, D., Hobel, C.J. (1973). Plasma human chorionic gonadotropin, estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17 alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. 3. Early normal pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 117(7), 884–893.
- Tulchinsky, D., Hobel C.J., Yeager, E., Marshall, J.R. (1972). Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. Normal pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 112(8), 1095–100.
- Tulchinsky, D., & Simmer, H. H. (1972). Sources of plasma 17alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 35(6), 799–808. <http://doi.org/10.1210/jcem-35-6-799>
- Turner, R. M., Kwok, C. S., Chen-Turner, C., Maduakor, C. a., Singh, S., & Loke, Y. K. (2014). Thiazolidinediones and associated risk of bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 78(2), 258–273. <http://doi.org/10.1111/bcp.12306>
- UKPDS UK Prospective Diabetes Study Group. (1998). Effects of Intensive blood glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*, 352(9131), 854–865.
- Ulfing, N. (2005a). *Kurzlehrbuch Embryologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. S.33-39.
- Ulfing, N. (2005b). *Kurzlehrbuch Embryologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. S.36.
- Ulfing, N. (2005c). *Kurzlehrbuch Embryologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. S.14-20.
- Ulfing, N. (2005d). *Kurzlehrbuch Embryologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. S.35.
- Voros, G., Maquoi, E., Demeulemeester, D., Clerx, N., Collen, D., & Lijnen, H. R. (2005). Modulation of angiogenesis during adipose tissue development in murine models of obesity. *Endocrinology*, 146(10), 4545–4554. <http://doi.org/10.1210/en.2005-0532>
- Vuorela, P., Hatva, E., Lymboussaki, a, Kaipainen, a, Joukov, V., Persico, M. G., Halmesmäki, E. (1997). Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biology of Reproduction*, 56(2), 489–494. <http://doi.org/10.1095/biolreprod56.2.489>
- Weiss, P. A. M., Hofmann, H. M., Winter, R. R., Lichtenegger, W., Pfirschner, P., & Haas, J. (1986). Gynecology Diagnosis and Treatment of Gestational Diabetes, 81–91.
- Weiss, U., Cervar, M., Puerstner, P., Schmutz, O., Haas, J., Mauschitz, R., Desoye, G. (2001). Hyperglycaemia in vitro alters the proliferation and mitochondrial activity of the choriocarcinoma cell lines BeWo, JAR and JEG-3 as models for human first-trimester trophoblast. *Diabetologia*, 44(2), 209–219. <http://doi.org/10.1007/s001250051601>

- West, I. C. (2000). Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine*, 17(3), 171–180. <http://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2000.00259.x>
- Weyerstahl, T., & Stauber, M. (2007). *Gynäkologie und Geburtshilfe*. (T. Weyerstahl & M. Stauber, Eds.) (3. Auflage). Stuttgart: Georg Thieme Verlag. S.531-538.
- Wong, H., Ozalp, Y., Lainesse, A., Alpan, R.S. (2004). In vivo bioequivalence of oral antidiabetic agents: pioglitazone tablets. *Arzenimittelforschung*, 54(9A), 618–624.
- Xiang, A.H., Peters, R.K., Trigo, E., Kjos, S.L., Lee, W.P., Buchanan, T. (1999). Multiple metabolic defects during late pregnancy in women at high risk for type 2 diabetes. *Diabetes*, 48(4), 848–54.
- Zhao, B., Cai, J., Boulton, M. (2004). Expression of placenta growth factor is regulated by both VEGF and hyperglycaemia via VEGFR-2. *Microvascular Research*, 68(3), 239–246.
- Zhuang, L.Z., Li, R.H. (1991). Study on reproductive endocrinology of human placenta (II)-Hormone secreting activity of cytotrophoblast cells. *Science in China. Series B*, 34(9), 1092–1097.

11. Anhang

1. Lösungen, Puffer und Chemikalien zur Trophoblastisolierung

1.1. Lösungen:

- 0,9 %-ige NaCl-Lösung (physiologische Kochsalzlösung, 9,0 g / 1,0 l Aqua dest.)
- 2,7%-ige NaCl- Lösung (27g NaCl/ 1,0 l Aqua dest.)
- HBSS (10x) = Hanks gepufferte Salzlösung

Firma: Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Deutschland

- NBCS = Neonatales Kälberserum

Firma: Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland

- FKS = Fetales Kälberserum

Firma: Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland

- 10%-iges FKS (10g FKS /1,0 l Aqua dest.)

- Percoll

Firma: Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden

- 90 %-ige Percoll-Lösung in HBSS- Hepes- Puffer

(5,0 ml HBSS (10x) + 25 mM Hepes (0,2979 g) + 45,0 ml Percoll)

- 70%-ige Percoll- Lösung in HBSS- Hepes- Puffer

(3,5 ml 90%- ige Percoll- Lösung + 1,0 ml HBSS- Hepes-Puffer)

- 60%-ige Percoll- Lösung in HBSS- Hepes-Puffer

(3,0 ml 90%- ige Percoll- Lösung + 1,5 ml HBSS- Hepes-Puffer)

- 50%-ige Percoll- Lösung in HBSS- Hepes-Puffer

(2,5 ml 90%- ige Percoll- Lösung + 2,0 ml HBSS- Hepes-Puffer)

- 40%-ige Percoll- Lösung in HBSS- Hepes-Puffer

(2,0 ml 90%- ige Percoll- Lösung + 2,5 ml HBSS- Hepes-Puffer)

- 30%-ige Percoll- Lösung in HBSS- Hepes-Puffer

(1,5 ml 90%-ige Percoll- Lösung + 3,0 ml HBSS- Hepes-Puffer)

- 20%-ige Percoll- Lösung in HBSS- Hepes-Puffer

(1,0 ml 90%-ige Percoll- Lösung + 3,5 ml HBSS- Hepes-Puffer)

1.2. Puffer:

- PBS (phosphatgepufferte NaCl-Lösung), 10 mM, pH = 7,4
(8,0 g NaCl + 2,9 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O + 0,2 g NaH₂PO₄ + 0,2 g KCl / 1,0 l Aqua dest.)
- HBSS-Hepes-Puffer (1x), pH = 7,4
(50 ml HBSS (10x) + 0,2979 g Hepes (25 mM) + 450 ml Aqua dest.)
- DMEM-Hepes-Puffer = Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium, pH = 7,4
Firma: Biochrom KG, Berlin, Deutschland,
(13,4 g DMEM + 2,6 g Hepes + 3,0 g NaHCO₂)

1.3. Chemikalien:

- Trypsin (8,750 units / mg)
Firma: Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- DNase I (42 Mm)
Firma: Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- Hepes = [N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N-(2-ethanesulfonic acid)], (MG 238,3)
Firma: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Eindeckmedium für die Fluoreszenzmikroskopie
30 g Glycerin + 12 g Polyvinylalkohol (-30 000 molekular) + 30 ml Aqua dest. + 0,5 g Phenol, [Substanzen mischen; für 12 h bei 40-45°C stehen lassen; danach + 60 ml Tris, (0,1 M, pH = 8,5); unbegrenzt haltbar bei 4°C]

- Trypanblau (0,4 %-ig)

Firma: Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland

- DMSO zum Lösen der Medikamente

Firma: Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

- H₂SO₄

Firma: Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

- 4%-iges Formaldehyd

Firma: Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland

- 0,3%-iges H₂O₂

Firma: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2. Der Einfluss von Metformin auf die Glukosekonzentration im Überstand – Einzeldarstellung der drei Versuchsansätze

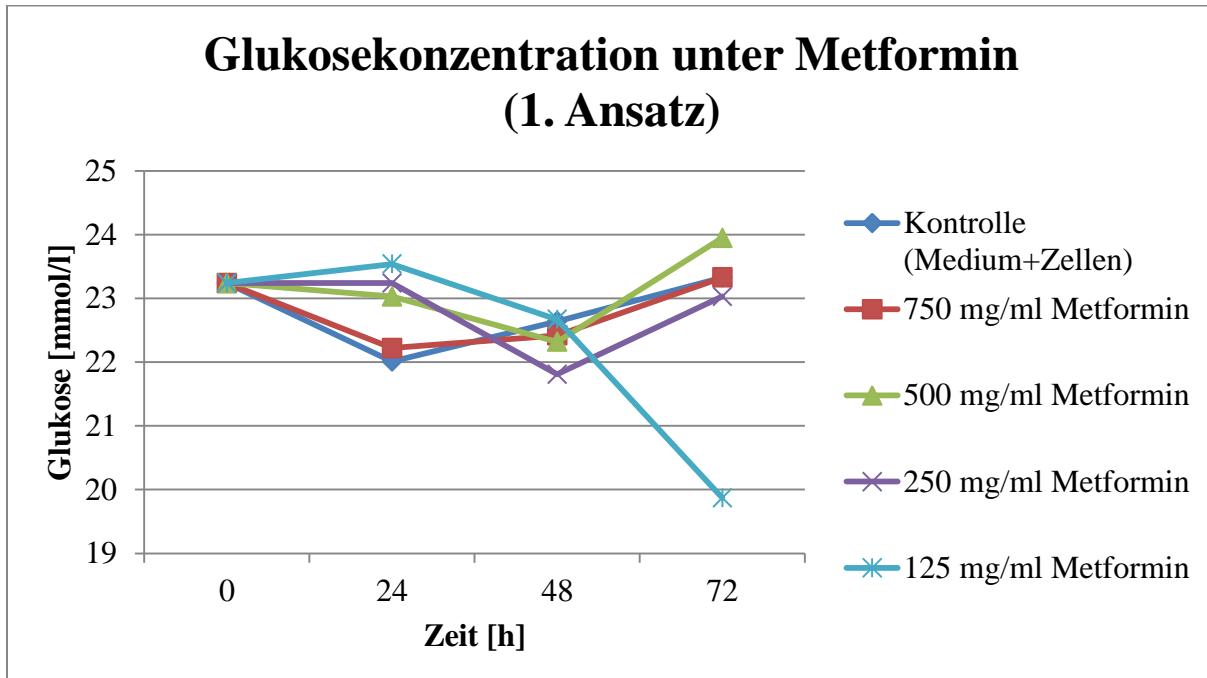


Abbildung 1: Glukosekonzentration im Überstand im ersten Versuchsansatz

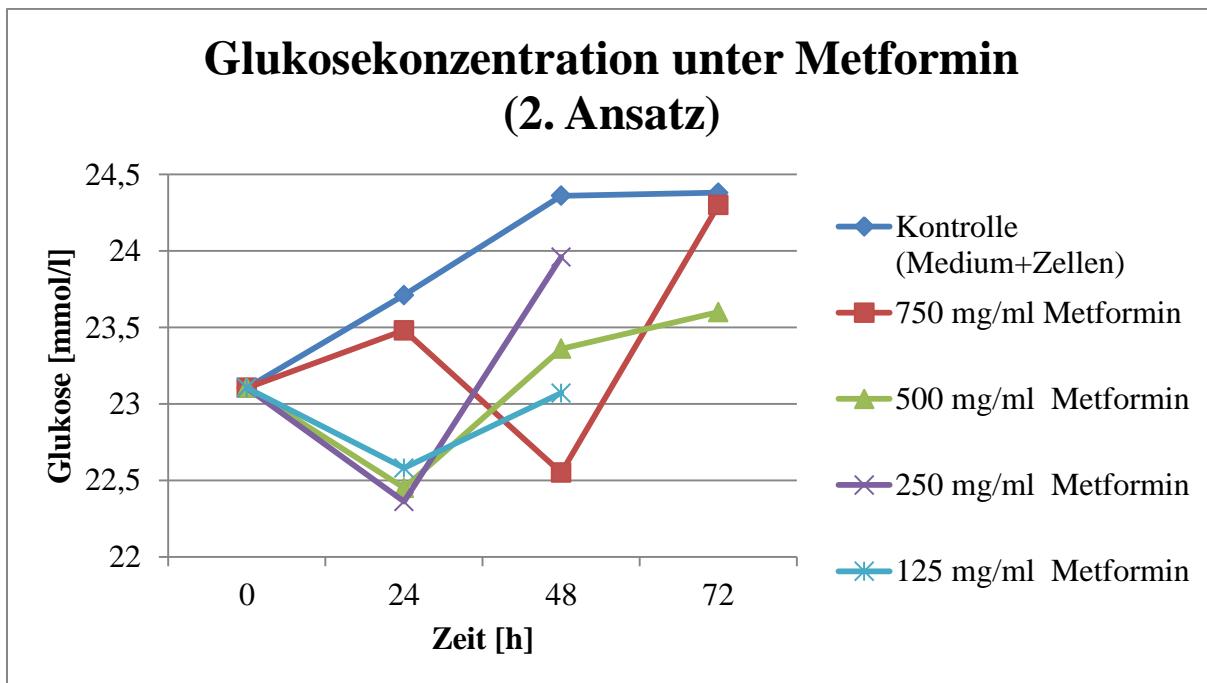


Abbildung 2: Glukosekonzentration im Überstand im zweiten Versuchsansatz

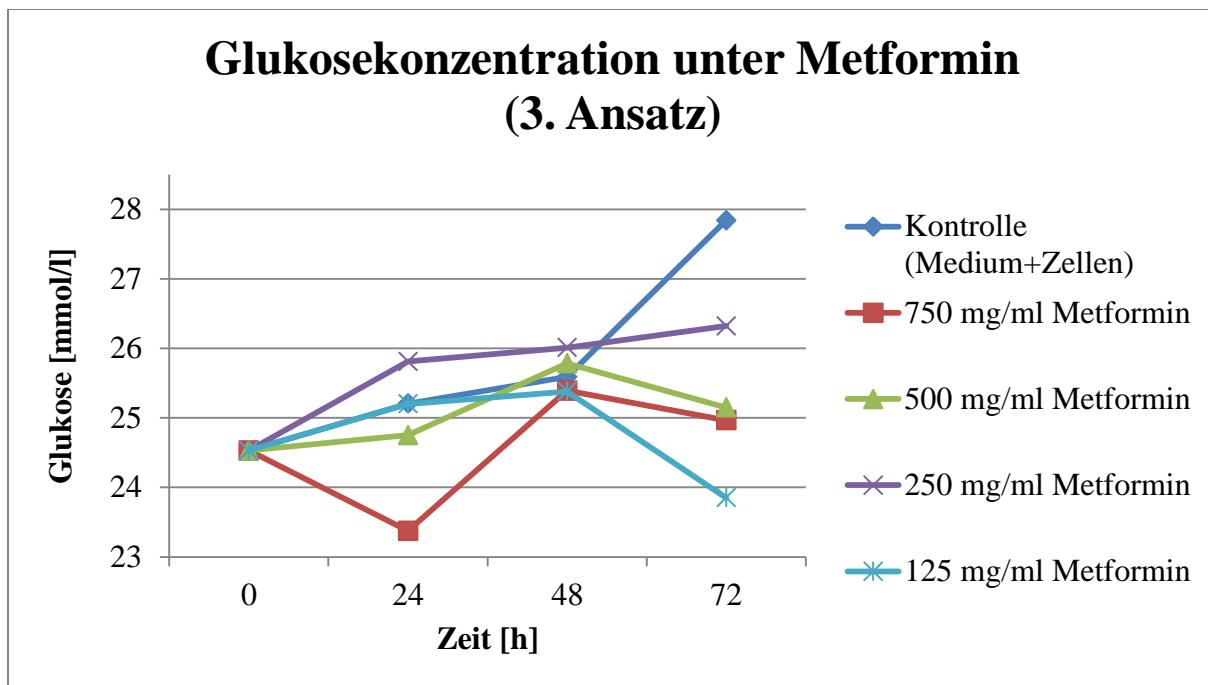


Abbildung 3: Glukosekonzentration im Überstand im dritten Versuchsansatz

**3. Der Einfluss von Metformin auf die Östrogenkonzentration im Überstand -
Einzeldarstellung der drei Versuchsansätze**

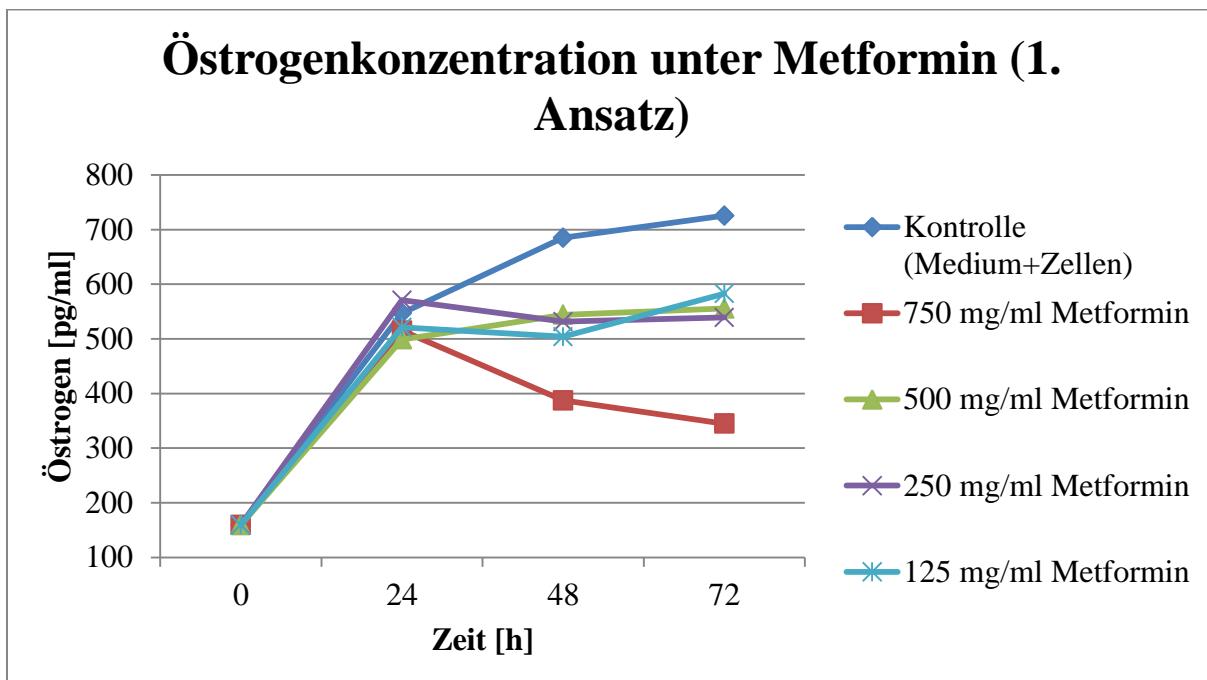


Abbildung 1: Östrogenkonzentration im Überstand im ersten Versuchsansatz

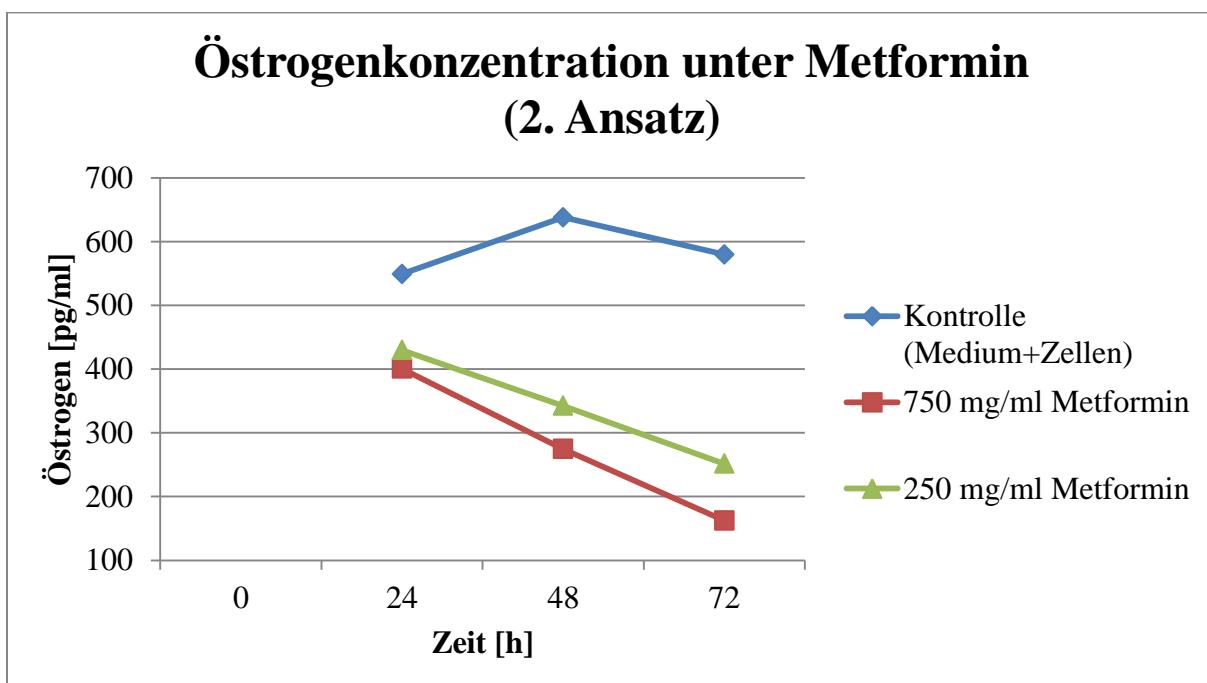


Abbildung 2: Östrogenkonzentration im Überstand im zweiten Versuchsansatz

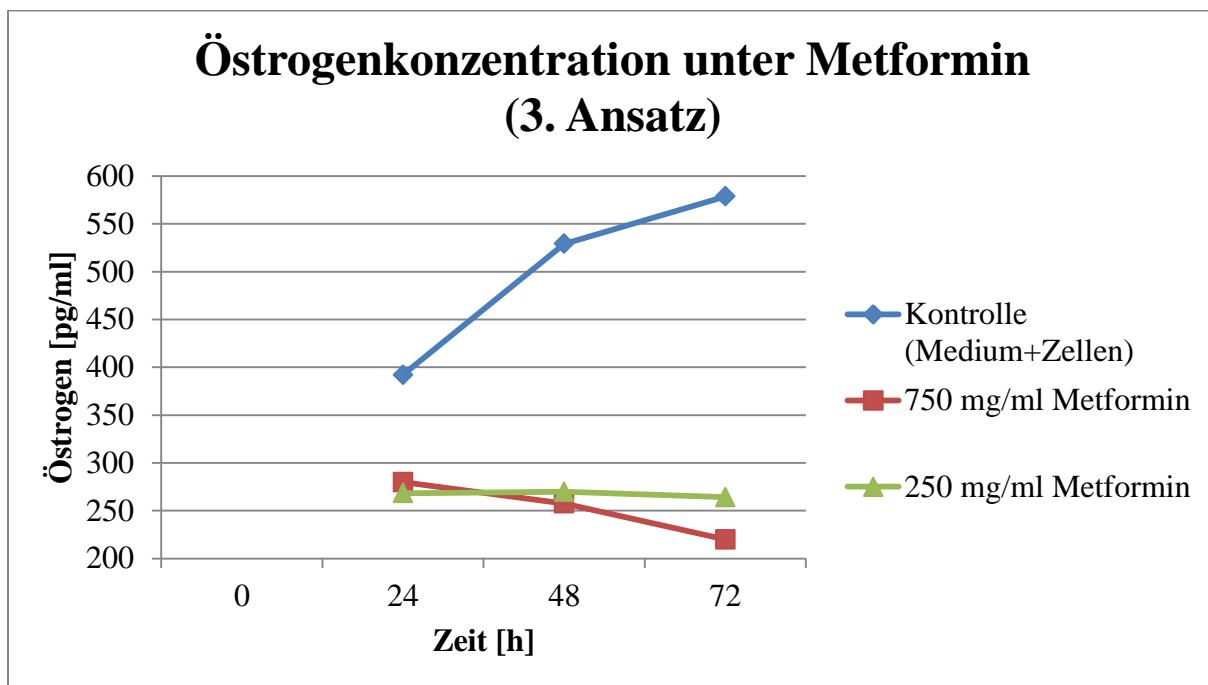


Abbildung 3: Östrogenkonzentration im Überstand im dritten Versuchsansatz

4. Der Einfluss von Metformin auf die Progesteronkonzentration im Überstand - Einzeldarstellung der drei Versuchsansätze

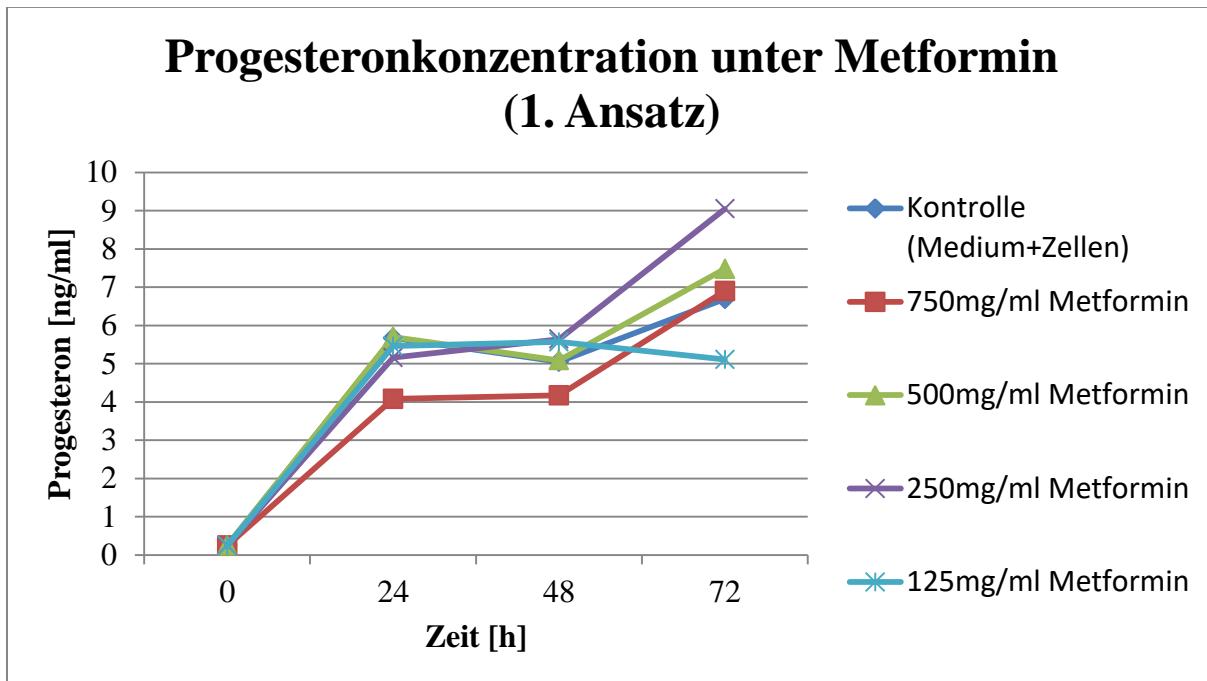


Abbildung 1: Progesteronkonzentration im Überstand im ersten Versuchsansatz

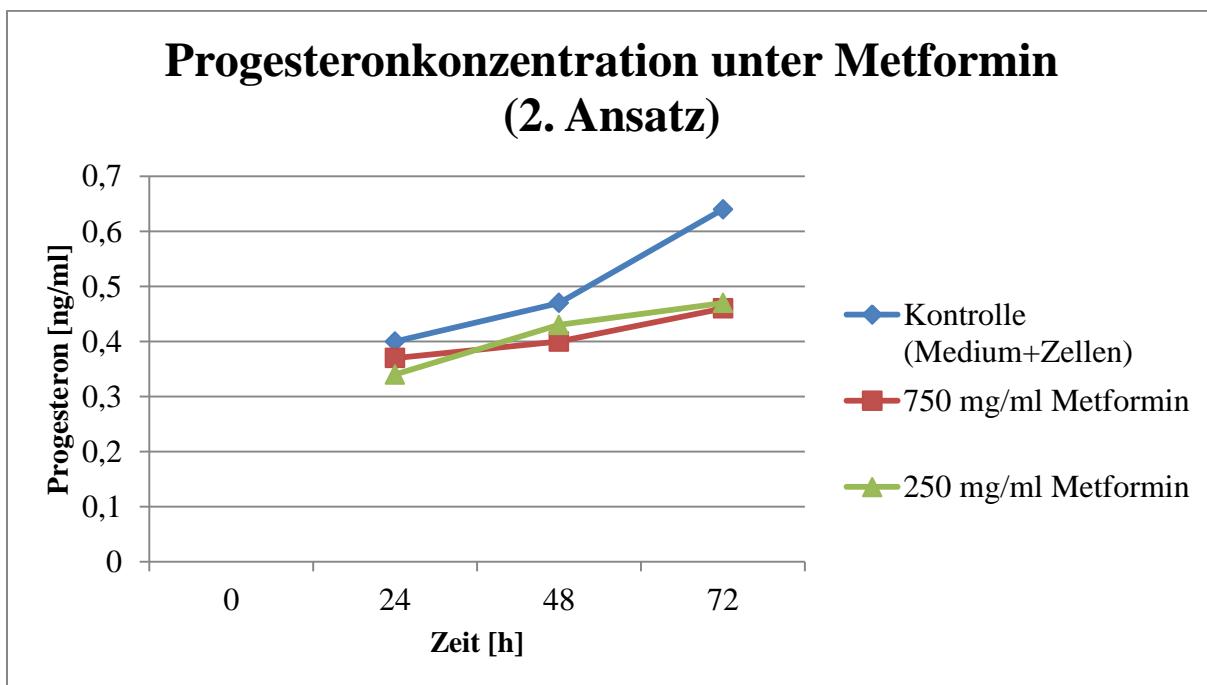


Abbildung 2: Progesteronkonzentration im Überstand im zweiten Versuchsansatz

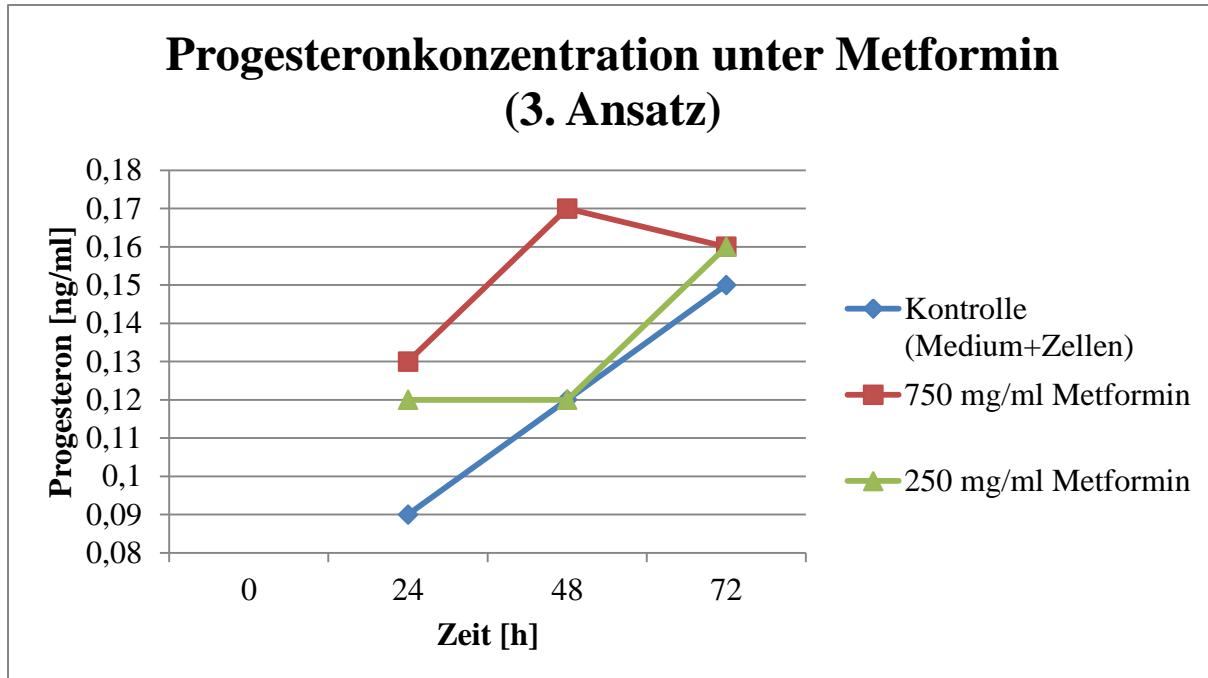


Abbildung 3: Progesteronkonzentration im Überstand im dritten Versuchsansatz

5. Der Einfluss von Thiazolidindion auf die Glukosekonzentration im Überstand - Einzeldarstellung der drei Versuchsansätze

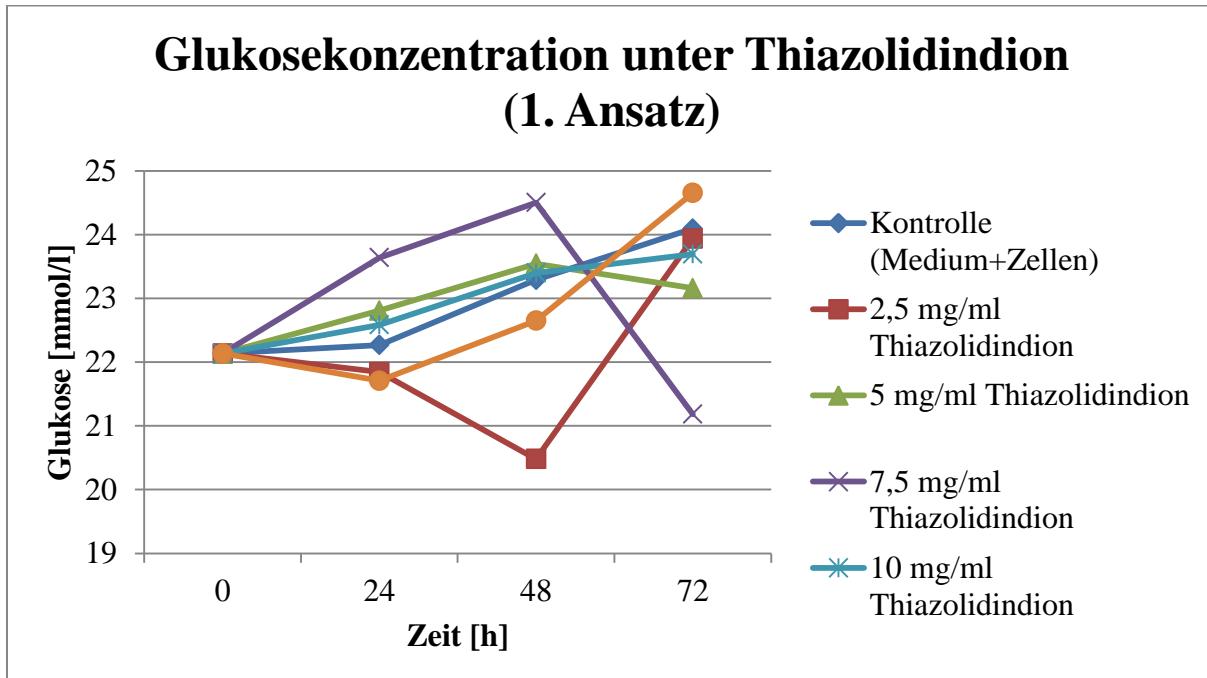


Abbildung 1: Glukosekonzentration im Überstand im ersten Versuchsansatz

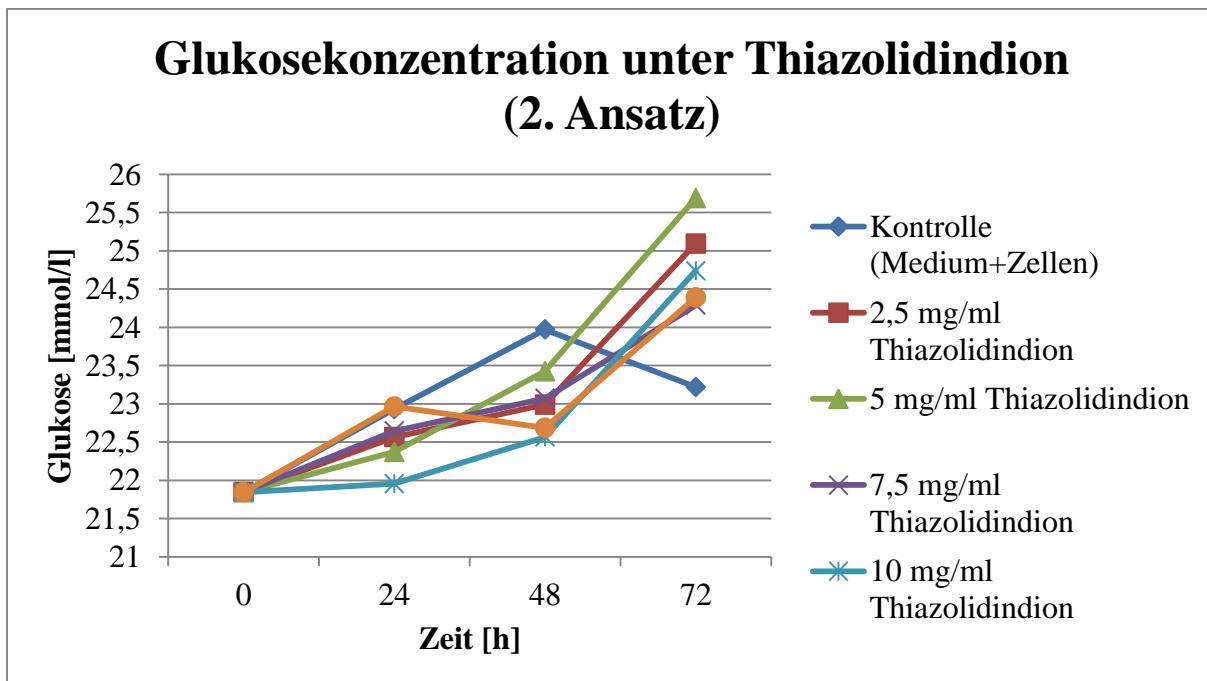


Abbildung 2: Glukosekonzentration im Überstand im zweiten Versuchsansatz

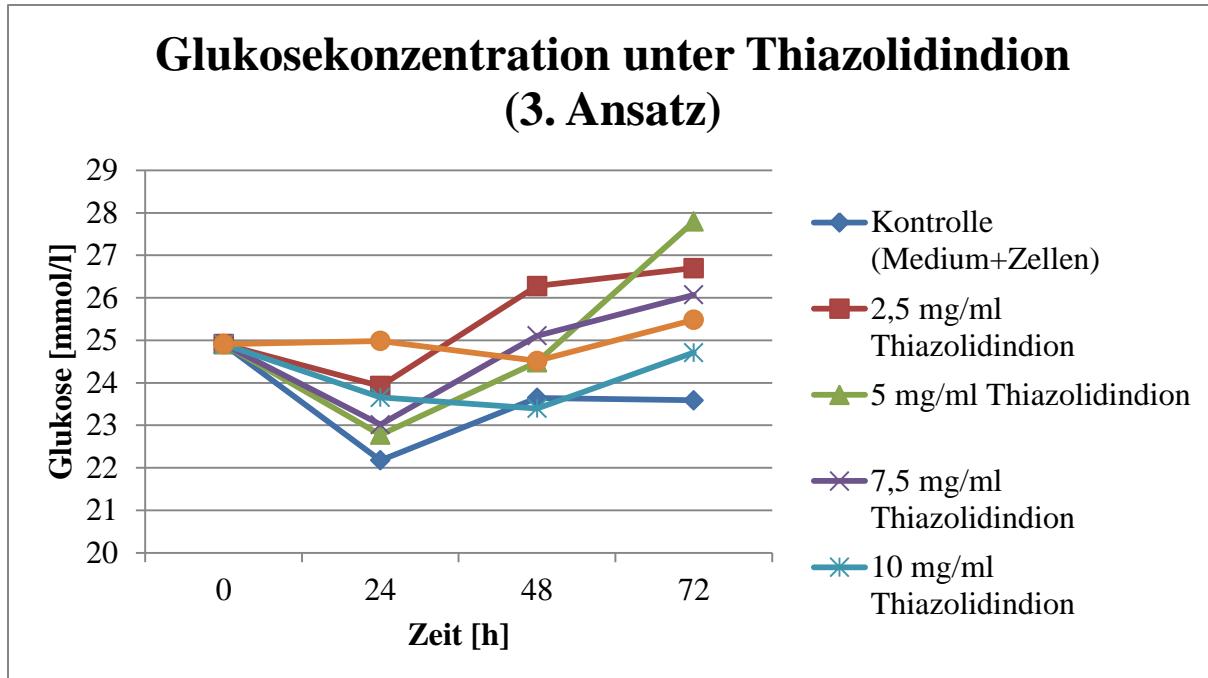


Abbildung 3: Glukosekonzentration im Überstand im dritten Versuchsansatz

6. Der Einfluss von Thiazolidindion auf die Östrogenkonzentration im Überstand - Einzeldarstellung der drei Versuchsansätze

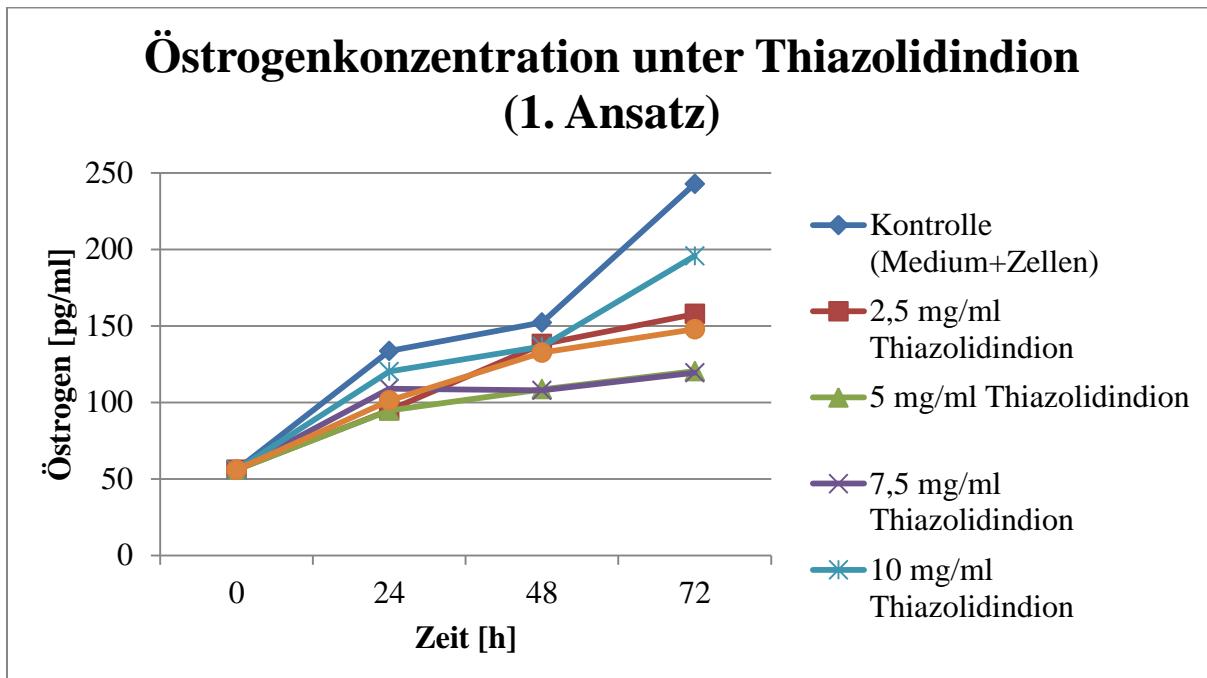


Abbildung 1: Östrogenkonzentration im Überstand im ersten Versuchsansatz

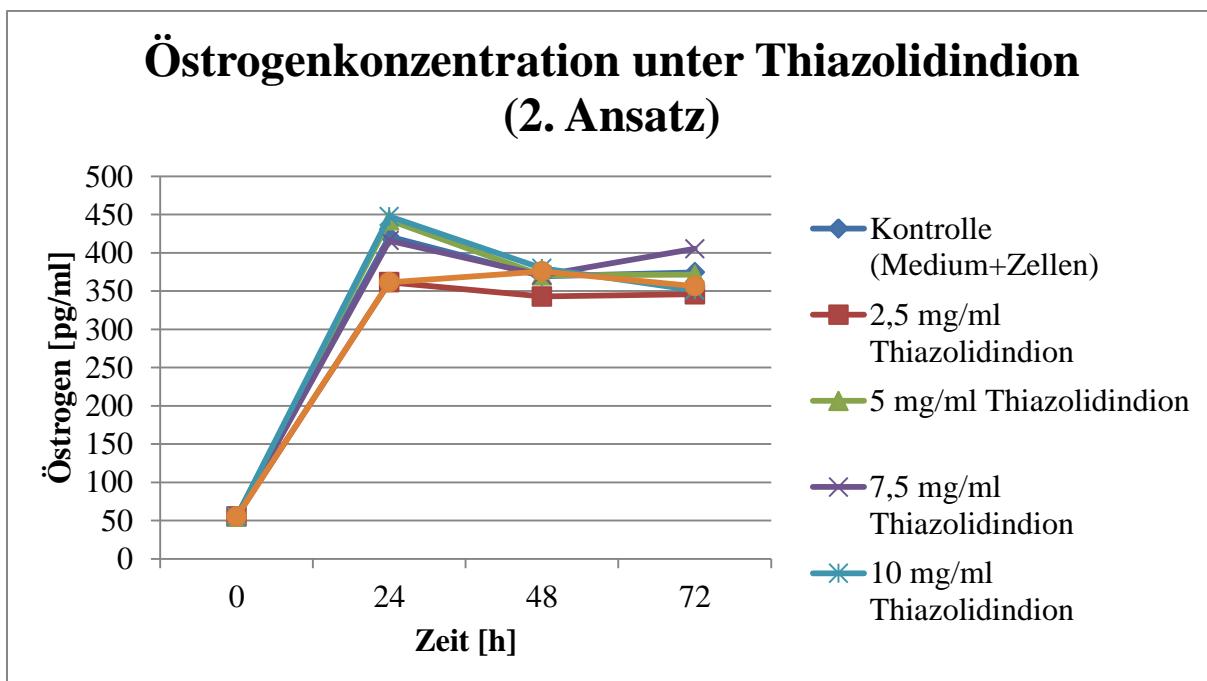


Abbildung 2: Östrogenkonzentration im Überstand im zweiten Versuchsansatz

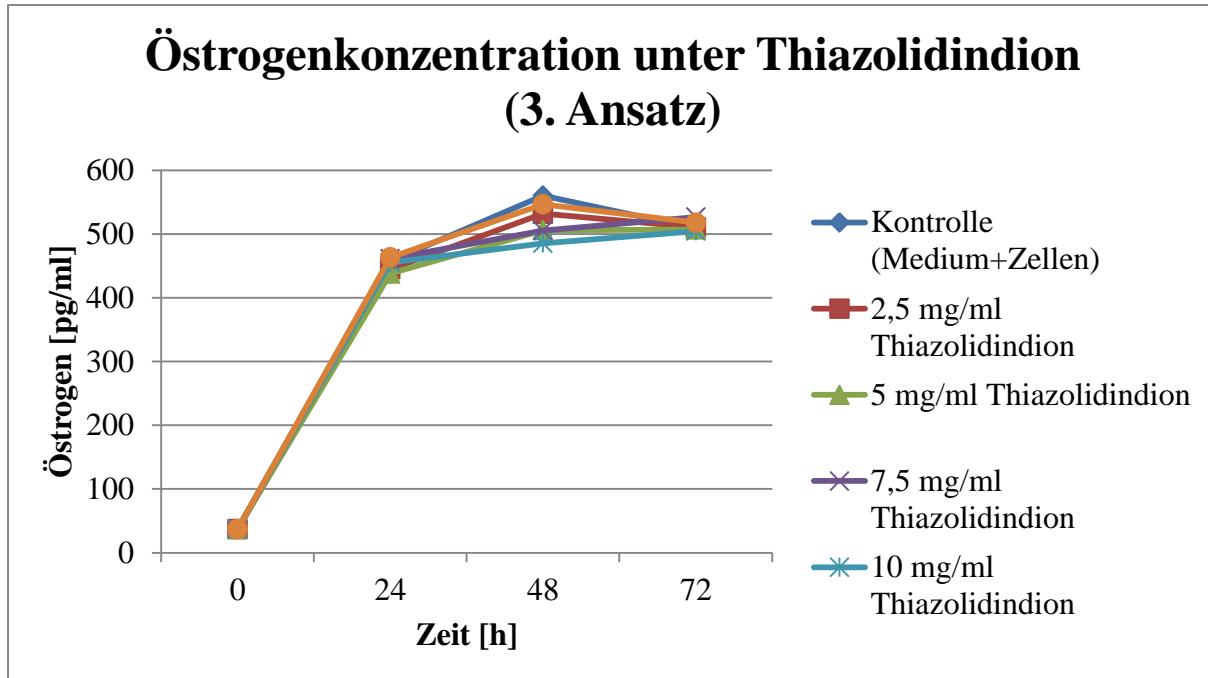


Abbildung 3: Östrogenkonzentration im Überstand im dritten Versuchsansatz

7. Der Einfluss von Thiazolidindion auf die Progesteronkonzentration im Überstand - Einzeldarstellung der drei Versuchsansätze

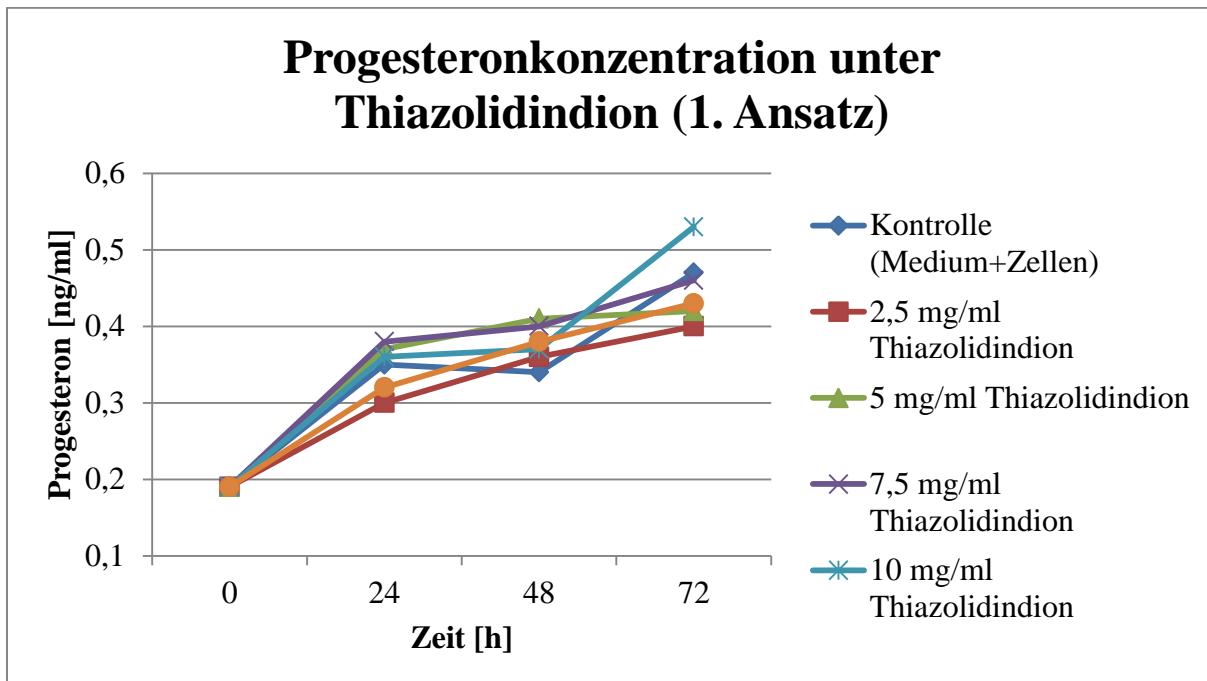


Abbildung 1: Progesteronkonzentration im Überstand im ersten Versuchsansatz

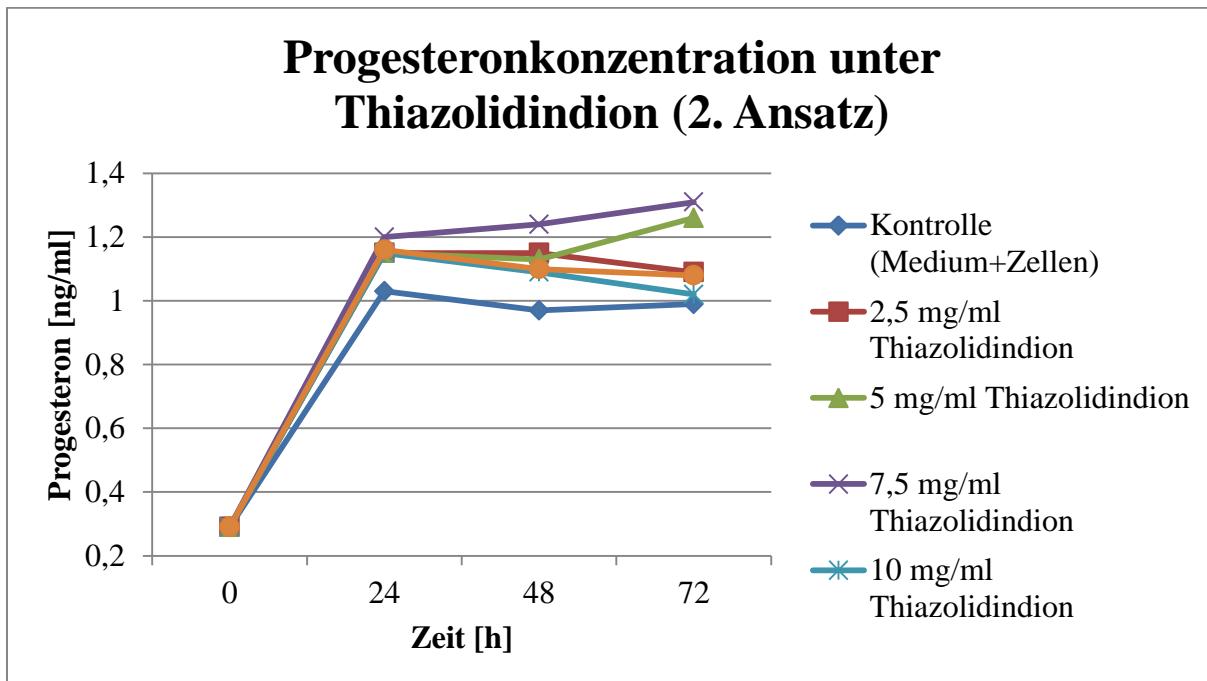


Abbildung 2: Progesteronkonzentration im Überstand im zweiten Versuchsansatz

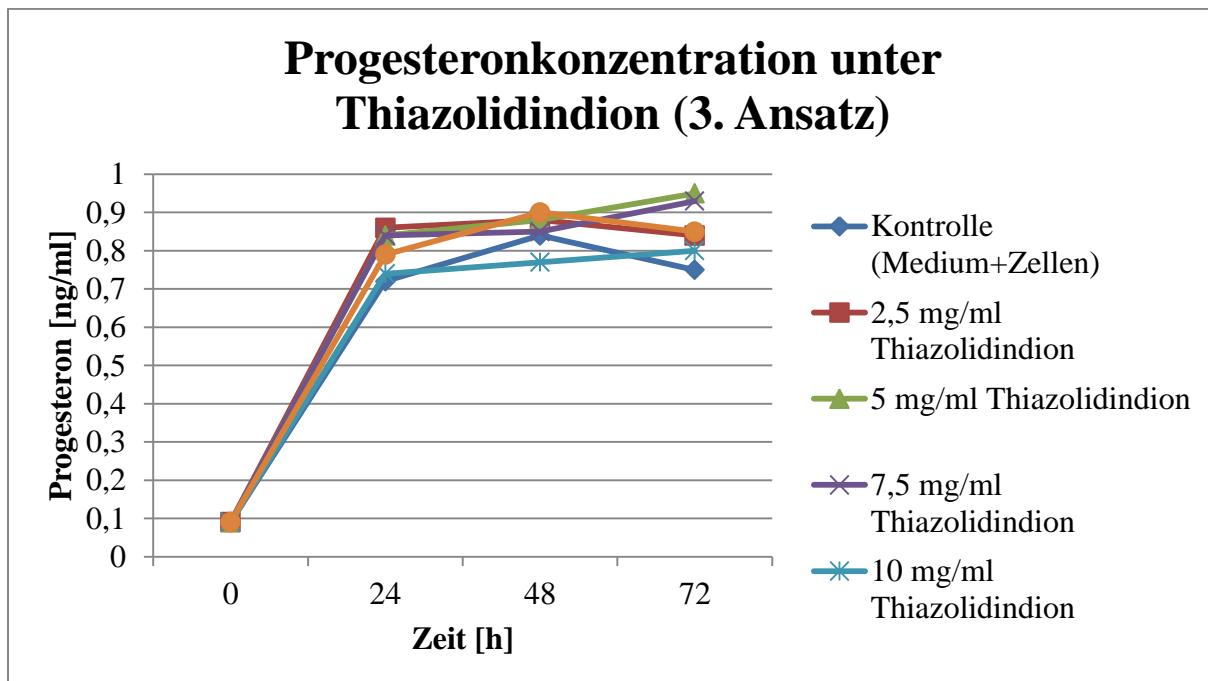


Abbildung 3: Progesteronkonzentration im Überstand im dritten Versuchsansatz

Lebenslauf

Name	Anna Facklam
Geburtsdatum/ -ort	09.01.1986 in Schwerin
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische Ausbildung

08/ 1996 - 12/ 2003	Gymnasium Dorf Mecklenburg
01/ 2004 - 07/ 2004	Madison High School, Madison, Missouri, USA
	High School Abschluss (Note: 1,0)
	American College Test: überdurchschnittlich
08/ 2004 - 06/ 2006	Goethe-Gymnasium Schwerin
	Abitur (Note: 1,3)

Studium

10/ 2006 - 12/ 2012	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
---------------------	---

Praktisches Jahr

Neurologie	Klinik für Neurologie der HELIOS Kliniken GmbH, Schwerin
Chirurgie	Klinik für Allgemein - und Viszeralchirurgie, HELIOS Kliniken GmbH, Schwerin
Innere Medizin	Royal Alpert Medical School, Brown University, Providence, USA

Famulaturen

- Gastroenterologie und Infektiologie, HELIOS Kliniken GmbH, Schwerin
- Kardiologie, Hanse Klinikum Wismar
- Allgemeinmedizin, Dipl. med. B. Markwardt, Grevesmühlen
- Chirurgie, chirurgische Gemeinschaftspraxis Dr. med. U. Braune, Schwerin
- Chirurgie, Hanse Klinikum Stralsund
- Pädiatrie, Sydney University, Nepean Hospital, Penrith, Australien

Aktivitäten

- Seminar „Notfallversorgung für Berufseinsteiger im Gebiet Chirurgie“ des BDC
- Nahtkurs (MLP)
- EKG-Kurs (Dr. med. Voß)
- English Lecture Club
- Teilnahme an fakultativen Vorlesungen über Transfusionsmedizin (Prof. Dr. med. Kiefel) und endoskopische Diagnostik (Prof. Dr. med. Liebe)
- Teilnahme am Grundkurs Strahlenschutz
- Teilnahme am Kurs zur technischen Durchführung in der Teleradiologie
- Teilnahme am 6. Dresdner Schlaganfalltag
- Teilnahme am Neurophysiologischen Wochenende, Städtisches Klinikum Dresden-Neustadt

Beruflicher Werdegang

01/2013 – 12/2013	Klinik für Allgemein-, Visceral-, und Thoraxchirurgie des Evangelischen Krankenhauses Göttingen Weende GmbH
Seit 01/2014	Klinik für Neurologie des ELBLANDKLINIKUM Meißen

Rostock, 11.06.2016

Anna Facklam

Danksagung

Nach vielen Jahren intensiver Arbeit möchte ich mich bei denen bedanken, die mich in dieser herausfordernden Zeit begleitet und unterstützt haben. Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. med. habil. V. Briese für die Bereitstellung des Promotionsthemas, die konstruktive Kritik und seinen akademischen Rat.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Dagmar- U. Richter, ohne deren Anregungen, zielführende Diskussionen und sehr häufig auch aufmunternden Worte diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Bedanken möchte ich mich auch beim gesamten Team des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik, insbesondere bei Frau Greschkowitz und Frau Dr. Szewczyk, die mir stets mit Rat und Tat zur Seiten standen.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dipl.-Math. Ursula Range vom Institut für Medizinische Informatik und Biometrie der Technischen Universität Dresden für die wertvolle und geduldige Beratung und Unterstützung.

Nicht weniger intensiv und aufreibend waren die vergangenen Jahre für meine Familie, Hans-Martin und Fiete, die mich in allen Phasen unterstützt, bestärkt und motiviert haben. Ihnen gilt mein ganz besonderer Dank.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe, alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind und die hier vorgelegte Dissertation noch nicht in gleicher oder ähnlicher Form an anderer Stelle eingereicht wurde.

Rostock, 11.06.2016

Anna Facklam