

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK – INNENSTADT  
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. MED. M. REINCKE  
EHEMALIGER KOMM. DIREKTOR: PROF. DR. MED. D. SCHLÖNDORFF

**PLAZENTARES WACHSTUMSHORMON UND SEINE BEDEUTUNG BEI  
PATIENTINNEN MIT GLUKOSESTOFFWECHSELSTÖRUNGEN**

DISSERTATION  
ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN  
AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER  
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON  
STEPHANIE CHRISTIANE FRIESS

AUS  
ULM / DONAU  
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. J. Strasburger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Göke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. C. J. Thaler

Priv. Doz. Dr. med. H. Schmidt

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. M. Bidlingmaier

Dr. med. P. Buchinger

Dr. med. Z. Wu

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>Historischer Überblick</b>	<b>9</b>
<b>1.2</b>	<b>Plazentares Wachstumshormon (hGH-V)</b>	<b>10</b>
1.2.1	Gen-Struktur	10
1.2.2	Aminosäuresequenz und räumliche Molekülstruktur	10
1.2.3	Syntheseort und Regulation der Sekretion	12
1.2.4	Rezeptorinteraktionen	13
1.2.5	Physiologische Bedeutung	13
<b>1.3</b>	<b>Überblick über Glukosestoffwechselstörungen in der Schwangerschaft</b>	<b>15</b>
1.3.1	Diabetes mellitus Typ I	16
1.3.2	Diabetes mellitus Typ II	18
1.3.3	Gestationsdiabetes	19
<b>1.4</b>	<b>Insulinsensitivität in der Schwangerschaft</b>	<b>22</b>
<b>1.5</b>	<b>Rolle von Plazentarem Wachstumshormon für die Regulation des Glukosestoffwechsels</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>Arbeitsplan und Zielsetzung</b>	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>25</b>
2.1.1	Entwicklung eines immunofluorometrischen Assays zur Bestimmung von hGH-V	25
<b>2.2</b>	<b>Klinischer Teil</b>	<b>26</b>
2.2.1	Untersuchung der Bedeutung von hGH-V für den Glukosestoffwechsel	26
2.2.2	Untersuchung der Insulinsensitivität in der Schwangerschaft	27
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>28</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Geräte und Reagenzien</b>	<b>28</b>
3.1.1.1	Referenzreagenzien für Wachstumshormon und plazentares Laktogen	28
3.1.1.2	Reagenzien	28

3.1.1.3	Antikörper	30
3.1.1.4	Puffer	30
3.1.1.5	Geräte	32
3.1.1.6	Sonstige Materialien	32
<b>3.1.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>33</b>
3.1.2.1	Subtraktionsverfahren zur Bestimmung der Konzentration von hGH-V	33
3.1.2.1.1	Immunofunktionaler hGH-Assay	33
3.1.2.1.2	hGH-N-spezifischer immunofluorometrischer Assay	33
3.1.2.2	Kommerziell erhältlicher immunoradiometrischer Assay für hGH-V	34
3.1.2.3	hGH-V-spezifischer immunofluorometrischer Assay	35
3.1.2.3.1	Herstellung und Aufreinigung von rekombinantem hGH-V	35
3.1.2.3.2	Herstellung monoklonaler Antikörper	35
3.1.2.3.3	Biotin-Markierung von Antikörpern und anderen Proteinen	37
3.1.2.3.4	Selektion der monoklonalen Antikörper	37
3.1.2.3.5	Charakterisierung der monoklonalen Anti-hGH-Antikörper	37
3.1.2.3.6	Assayaufbau	38
3.1.2.3.7	Assaydurchführung	39
3.1.2.4	Kommerzieller Chemilumineszenz-Assay für hGH-N	40
3.1.2.5	Kommerzieller Chemilumineszenz-Assay für IGF-I	40
3.1.2.6	Kommerzieller Immunoenzymometrischer Assay für hPL	41
3.1.2.7	Insulin- und C-Peptid-Radioimmunoassay	42
3.1.2.8	Blutglukose- und HbA1c-Bestimmung	42
<b>3.2</b>	<b>Klinischer Teil</b>	<b>44</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Materialien und Geräte</b>	<b>44</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>44</b>
3.2.2.1	Studie: Plazentares Wachstumshormon und Glukosestoffwechselstörung	44
3.2.2.1.1	Studienprotokoll	44
3.2.2.1.2	Einschlusskriterien	46
3.2.2.1.3	Ausschlusskriterien	47
3.2.2.1.4	Aufklärungsbogen und Einverständniserklärung	47
3.2.2.2	Studie: Plazentares Wachstumshormon und Insulinsensitivität	48
3.2.2.2.1	Studienprotokoll	48
3.2.2.2.2	Einschlusskriterien	49
3.2.2.2.3	Ausschlusskriterien	49

3.2.2.2.4	Aufklärungsbogen und Einverständniserklärung	50
3.2.2.2.5	Berechnung der Insulinsensitivität	50
<b>3.3</b>	<b>Statistik</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>52</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Charakterisierung von in Maus-Fibroblasten exprimiertem rekombinanten hGH-V</b>	<b>52</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Herstellung und Charakterisierung der hGH-V-spezifischen Antikörper</b>	<b>52</b>
<b>4.1.3</b>	<b>hGH-V-spezifischer immunofluorometrischer Assay</b>	<b>55</b>
4.1.3.1	Auswahl der anti-hGH-V-Antikörper	55
4.1.3.2	Optimierung der Inkubation	59
4.1.3.3	Optimierung der Standardkurve	60
4.1.3.4	Protokoll des hGH-V-spezifischen immunofluorometrischen Assays	61
4.1.3.5	Sensitivität und Messbereich	62
4.1.3.6	Linearität und Wiederfindung	62
4.1.3.7	Intra- und Interassayvarianz	64
4.1.3.8	Einfrier- und Auftauzyklen	65
4.1.3.9	Spezifität des hGH-V-spezifischen immunofluorometrischen Assays	65
4.1.3.10	Interferenz von hGHBP	65
<b>4.1.4</b>	<b>Vergleich des hGH-V-spezifischen immunofluorometrischen Assays mit einem Subtraktionsverfahren</b>	<b>66</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Vergleich: inhouse hGH-V-spezifischer immunofluorometrischer Assay mit kommerziell erhältlichem immunoradiometrischen Assay für hGH-V</b>	<b>67</b>
<b>4.2</b>	<b>Klinischer Teil</b>	<b>68</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Studie: Plazentares Wachstumshormon und Glukosestoffwechsel</b>	<b>68</b>
4.2.1.1	Morphologische Daten	68
4.2.1.2	Sekretion von hGH-V in normalen Schwangerschaften	71
4.2.1.2.1	hGH-V-Konzentrationen im Verlauf der Schwangerschaft	72
4.2.1.2.2	Peripartale Kinetik	73
4.2.1.3	hGH-V-Konzentrationen in Schwangerschaften mit Glukosestoffwechselstörungen	73

4.2.1.4	Beeinflussung der hGH-V-Konzentration durch den Body Mass Index (BMI) vor der Schwangerschaft	76
4.2.1.4.1	hGH-V-Konzentration und Body Mass Index vor der Schwangerschaft im Normalkollektiv	76
4.2.1.4.2	hGH-V-Konzentration normalgewichtiger Patientinnen im Gruppenvergleich	77
4.2.1.5	Korrelation der hGH-V-Konzentration mit Stoffwechselfparametern	79
4.2.1.5.1	Insulin-like-growth-factor (IGF-I)	79
4.2.1.5.2	Glykosyliertes Hämoglobin (HbA1c)	83
4.2.1.6	Korrelation der hGH-V-Konzentration mit Parametern des Kindes	83
4.2.1.7	Korrelation der hGH-V-Konzentration mit dem Plazentagewicht	85
4.2.1.8	hGH-V-Konzentration im Nabelschnurblut	86
<b>4.2.2</b>	<b>Studie: Plazentares Wachstumshormon und Insulinsensitivität</b>	<b>87</b>
4.2.2.1	Morphologische Daten	87
4.2.2.2	Vergleich der Stoffwechselfparameter zwischen erstem und zweitem OGTT	87
4.2.2.3	Beeinflussung der hGH-V-Sekretion durch die Gabe von Glukose	90
4.2.2.4	Bestimmung der Insulinsensitivität in der Schwangerschaft	91
4.2.2.5	Korrelation der hGH-V-Konzentration mit der Insulinsensitivität	92
4.2.2.6	Korrelation der IGF-I-Konzentration mit der Insulinsensitivität	94
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>96</b>
<b>5.1</b>	<b>Experimenteller Teil – Assay</b>	<b>96</b>
<b>5.2</b>	<b>Klinischer Teil</b>	<b>98</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Studie: Plazentares Wachstumshormon und Glukosestoffwechsel</b>	<b>98</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Studie: Plazentares Wachstumshormon und Insulinsensitivität</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>112</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>121</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>123</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

<b>Ag</b>	Antigen
<b>Ak</b>	Antikörper
<b>As</b>	Aminosäure
<b>BMI</b>	Body Mass Index
<b>bp</b>	Basenpaare (Nukleinsäuren)
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin
<b>BZ</b>	Blutzucker
<b>DELFLIA®</b>	Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay
<b>DM I</b>	Diabetes mellitus Typ I
<b>DM II</b>	Diabetes mellitus Typ II
<b>GCT</b>	Glukose-Challenge-Test
<b>GDM</b>	Gestationsdiabetes
<b>GHD</b>	Growth Hormone Deficiency (Wachstumshormonmangel)
<b>GHRH</b>	Growth Hormone Releasing Hormone
<b>HbA1c</b>	glykosiliertes Hämoglobin
<b>hCS</b>	humanes Chorionsomatotrophin
<b>hGH</b>	human Growth Hormone (humanes Wachstumshormon)
<b>hGH-N</b>	human Growth Hormone-Norm (humanes hypophysäres Wachstumshormon)
<b>hGH-V</b>	human Growth Hormone-Variant (humanes plazentares Wachstumshormon)
<b>hGHBP</b>	human Growth Hormone binding protein (humanes Wachstumshormon-Bindungsprotein)
<b>hGHR</b>	human Growth Hormone Receptor (humaner Wachstumshormon-Rezeptor)
<b>hPL</b>	humanes Plazentares Laktogen
<b>hPRL</b>	humanes Prolaktin
<b>HS</b>	Horse Serum (Pferdeserum)
<b>IFA</b>	Immunofunktionaler Assay
<b>IFMA</b>	Immunofluorometrischer Assay
<b>IGF</b>	Insulin-like Growth Factor
<b>IGFBP</b>	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IR</b>	Insulinrezeptor
<b>IRMA</b>	Immunoradiometrischer Assay

<b>IUGR</b>	Intrauterine growth retardation (Intrauterine Wachstumsretardierung)
<b>LIFA</b>	Ligandenimmunofunktionaler Assay
<b>LLL</b>	Lower Limit of Normal (5. Perzentile)
<b>mAb</b>	Monoklonaler Antikörper
<b>mAb-Biotin</b>	mAb-Biotin-Komplex
<b>Max</b>	Maximum
<b>Min</b>	Minimum
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>NeutrEu</b>	Europium-markiertes Neutravidin
<b>NSB</b>	Nicht spezifische Bindung, unspezifische Bindung
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>OGTT</b>	Oraler-Glukose-Toleranz-Test
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (Phosphat buffered Saline)
<b>p.p.</b>	post partum, nach der Entbindung
<b>rhGH-N</b>	rekombinantes humanes hypophysäres Wachstumshormon (22kD)
<b>rhGHBP</b>	rekombinantes humanes Wachstumshormon-Bindungsprotein
<b>r-Protein A</b>	rekombinantes Protein A
<b>RIA</b>	Radioimmunoassay
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SD</b>	Standarddeviation (Standardabweichung)
<b>SE</b>	Standarderror (Standardfehler)
<b>SS</b>	Schwangerschaft
<b>SSW</b>	Schwangerschaftswoche
<b>Std</b>	Standard
<b>StavEu</b>	Europium-markiertes Streptavidin
<b>STAW</b>	Standardabweichung
<b>ULN</b>	Upper Limit of Normal (95. Perzentile)

# 1 Einleitung

## 1.1 Historischer Überblick

Die Grundlage für die Erforschung des plazentaren Wachstumshormons bildete die Arbeit von Peter H. Seeburg vom Department of Molecular Biology in San Francisco, U.S.A., der im Jahre 1982 erstmals den Genlokus des Wachstumshormon-Varianten (hGH-V) definierte (Seeburg PH 1982).

1985 stießen belgische Forscher im Rahmen einer Verlaufsstudie über das hypophysäre Wachstumshormon (hGH-N) während der Schwangerschaft (SS) auf ein Wachstumshormon-ähnliches Antigen und gaben ihm den Namen plazentares Wachstumshormon (hGH-V). Diese Gruppe um Georges Hennen, Liège, Belgien, beschäftigt sich bis heute mit Physiologie und Pathophysiologie dieses Hormons (Hennen G et al. 1985).

1988 schlossen sich Studien über Expression und Funktion dieses Gens an, die vornehmlich von der Forschungsgruppe um Stephen A. Liebhaber, Universität von Pennsylvania, U.S.A., durchgeführt wurden (Cooke NE et al. 1988; Liebhaber SA et al. 1989). Sie setzten sich neben molekulargenetischen Ansätzen auch die Identifikation des Rezeptors für hGH-V zum Ziel (Urbanek M et al. 1992; Urbanek M et al. 1993).

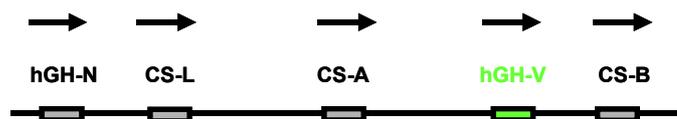
Unabhängig voneinander beschrieben 1998 Untergasser und Boguszewski eine weitere Variante des hGH-V-Gens, genannt hGH-V $\Delta$ 4 bzw. hGH-V3, das sich aber nur durch die Forschungsgruppen spezifische Bezeichnung unterscheidet (Boguszewski CL et al. 1998; Untergasser G et al. 1998).

Seit einigen Jahren beschäftigen sich nun mehrere Arbeitsgruppen mit der möglichen Rolle von hGH-V in der Schwangerschaft. Untersuchungen von hGH-V in normalen und pathologischen Schwangerschaften (Diabetes mellitus, Gestationsdiabetes, IUGR) lassen eine metabolische Funktion immer wahrscheinlicher werden (McIntyre HD et al. 2000; Lacroix MC et al. 2002). Unterstützt wird diese Aussage durch die Arbeit von Barbour (Barbour LA et al. 2002), bei der sich zeigte, dass transgene Mäuse, die hGH-V überexprimieren, eine starke Insulinresistenz entwickeln.

## 1.2 Plazentares Wachstumshormon (hGH-V)

### 1.2.1 Gen-Struktur

Das plazentare Wachstumshormon gehört zur Wachstumshormon-Gen-Familie, lokalisiert auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (17q22–q24). Hier befinden sich in enger Nachbarschaft fünf hGH/hCS-Gene. Jedes dieser Gene besteht aus fünf Exons (1–5) und vier Introns (A-D) an identischen Stellen mit einer Sequenzhomologie von 90–95% (Seeburg PH 1982). HGH-N wird in der Hypophyse exprimiert, während die anderen vier Gene in der Plazenta exprimiert werden. Zu diesen gehören hGH-V, sowie die drei Gene hCS-A / hCS-B / hCS-L für das humane Chorionsomatomammotropin (hCS), entsprechend humanem plazentaren Laktogen (hPL) (Chen EY et al. 1989; Su Y et al. 2000).

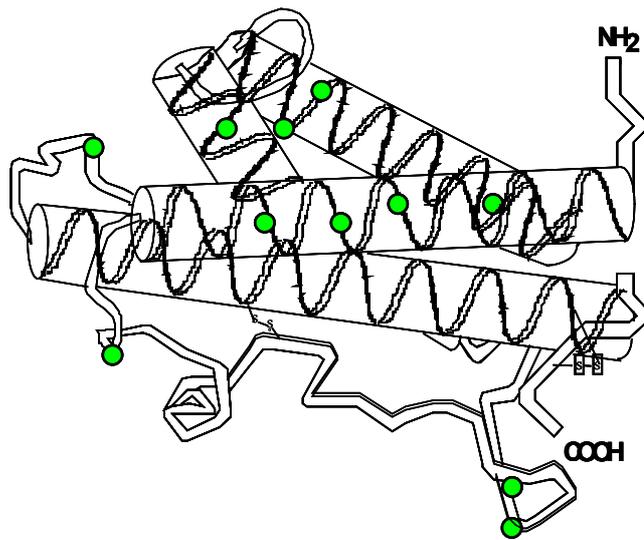


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Genlokalisierungen der hGH / hCS-Genfamilie, lokalisiert auf dem langen Arm des Chromosoms 17.

### 1.2.2 Aminosäuresequenz und räumliche Molekülstruktur

Das hGH-V-Gen bildet die Expressionsgrundlage für das plazentare Wachstumshormon. Dieses Gen wird vorzugsweise von den Synzytiotrophoblasten der Plazenta exprimiert und als Peptidhormon bestehend aus 191 Aminosäuren (As) sezerniert (Liebhaber SA et al. 1989; Frankenne F et al. 1990). Es unterscheidet sich von hGH-N nur in 13 As und zeigt somit eine Übereinstimmung von 93% (Alsat E et al. 1997). Die Homologie mit hCS ist mit 85% ebenfalls hoch (Seeburg PH 1982).





**Abbildung 3:** Raumstruktur des hGH-V Moleküls (grün: As different zu hGH-N).

### 1.2.3 Syntheseort und Regulation der Sekretion

Die plazentare Expression des hGH-V-Gens ist spezifisch für villöses Gewebe (Cooke NE et al. 1988). Jara konnte mittels immunozytochemischer Lokalisation die Synzytiotrophoblasten der plazentaren Villi als Produktionsstätte ausmachen. Daneben fanden sich auch in der plazentaren Basalplatte, einem Ort, an dem Chorion und Dezidua basalis fusionieren und damit maternale und fetale Zellen den engsten Kontakt haben, geringe Konzentrationen von hGH-V (Jara CS et al. 1989). Inwiefern sich maternale Zellen bei der Synthese beteiligen, ist aber bis heute unklar.

HGH-V war ferner in humanen trophoblastischen Neoplasien, Chorionkarzinomen und manchen hydatiformen Molen messbar (Nickel BE et al. 1991; Lytras A et al. 1994). Periphere mononukleäre Zellen exprimieren hGH-V auch bei Frauen ohne SS und bei Männern, was darauf hinweist, dass hGH-V wie hGH-N in der Immunregulation involviert ist (Melen L et al. 1997).

HGH-V ist im Gegensatz zu hGH-N weder in vivo noch in vitro durch Wachstumshormon Releasing Hormon (GHRH) stimulierbar (de Zegher F et al. 1990; Evain-Brion D et al. 1990). Dies zeigt auch eine kürzlich erschienene Untersuchung an Schafplazenten, in denen ein der Plazenta eigenes GHRH gefunden wurde. Bei externer Gabe von GHRH ließ sich die hGH-V-Sekretion nicht beeinflussen (Lacroix MC et al. 2002).

Nach heutigem Kenntnisstand scheint Glukose der Regulator von hGH-V zu sein. Die genauen Interaktionen sind jedoch noch Gegenstand aktueller Untersuchungen (Lacroix MC et al. 2002).

#### 1.2.4 Rezeptorinteraktionen

Aufgrund der großen Ähnlichkeit mit hGH-N hat hGH-V zu den Wachstumshormonrezeptoren (hGHR) unterschiedlicher Gewebe und zu dem Wachstumshormonbindungsprotein (hGHBP) im Plasma die gleiche, wenn nicht sogar noch höhere Bindungsaffinität (Ray J et al. 1990; Baumann G et al. 1991; Schiffer C et al. 2002). Die Aktivität des hGH-V ist zum größten Teil somatogener Natur und verhält sich zu hGH-N deutlich agonistisch. Die laktogene Aktivität wird im Vergleich zu hGH-N als erniedrigt beschrieben (Baumann G et al. 1991; MacLeod JN et al. 1991; Igout A et al. 1995).

Eine Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion von hGH-V ergab eine Aktivierung des STAT5b-Transkriptionsfaktors aller hGHR-tragenden Gewebe. Dieser Effekt konnte bei hCS nicht nachgewiesen werden. Daneben zeigte sich, analog zu dem hGH-N, eine Inhibition der hGH-V-Signaltransduktion durch Zugabe von hGH-Antagonisten. Diese Befunde weisen auf hGH-N-ähnliche Effekte im mütterlichen Organismus während der SS hin (Silva CM et al. 2002).

Ferner ist in den plazentaren Villi eine Isoform des Wachstumshormonrezeptors (hGHRd3) beschrieben, bei der 66 Basenpaare im Exon 3 fehlen. Diese Unterform stellt einen stabilen und funktionellen Rezeptor dar, der fest in die Zellmembran integriert ist und seine Liganden – hierzu gehören alle Mitglieder der Wachstumshormonfamilie – effizient bindet und internalisiert (Urbanek M et al. 1993).

#### 1.2.5 Physiologische Bedeutung

Mit den bisherigen Meßmethoden ist hGH-V ab der 12. Schwangerschaftswoche (SSW) messbar. Die mit Fortschreiten der Schwangerschaft steigenden Spiegel des hGH-V sollen in der Regel bis zur 20. Woche durch physiologische Rückkopplung fast vollständig die maternale, pulsatile, hypophysäre hGH-N-Sekretion unterdrücken und ersetzt sie durch eine kontinuierliche, plateauartige hGH-V-Ausschüttung (Frankenne F et al. 1988; Eriksson L

et al. 1989). Die Sekretion erfolgt ausschließlich in den mütterlichen Organismus. Die plazentare Blutschranke wird nach bisherigen Erkenntnissen nicht übertreten (Chowen JA et al. 1996).

Die Konzentration von hGH-V steigt mit dem Wachstum der Plazenta und ist unabhängig von der Ausschüttung des GHRH (de Zegher F et al. 1990; Chowen JA et al. 1996). Sie korreliert stark positiv mit der Höhe der mütterlichen IGF-I-Konzentration, und dieser wiederum mit dem Geburtsgewicht des Kindes (Caufriez A et al. 1990; Caufriez A et al. 1994).

Nach der Geburt, im speziellen nach Lösung der Plazenta, sinkt hGH-V im mütterlichen Blut innerhalb von Minuten rapide ab und ist nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar. Ab diesem Zeitpunkt steigt die hGH-N-Sekretion wieder an. Allerdings ist hGH-N auch während der Schwangerschaft nicht völlig eliminiert, sondern bleibt als Basisausschüttung erhalten (Eriksson L et al. 1988; Wu Z et al. 1998).

Die vom hypophysären hGH-N unabhängige Produktion von IGF-I in der SS wird auch in Schwangerschaften von Patientinnen mit Akromegalie bzw. Wachstumshormonmangel (GHD) deutlich: Hier zeigen sich trotz kontinuierlich hoher (Akromegalie), respektive nicht messbarer hGH-N-Spiegel (GHD) der jeweiligen SSW entsprechende hGH-V- und IGF-I-Werte (Beckers A et al. 1990; Verhaeghe J et al. 2000). Selbst unter Substitutionstherapie mit rekombinantem hGH-N in der SS bei einer Patientin mit bekanntem Wachstumshormonmangel blieben die hGH-V-Konzentrationen unbeeinflusst (Lonberg U et al. 2003).

hGH-V wirkt vermutlich ausschließlich indirekt auf das Wachstum des Feten. Man findet bei Schwangerschaften mit intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR) deutlich niedrigere hGH-V-Konzentrationen bezogen auf die Schwangerschaftswoche (SSW), die wiederum den Zusammenhang zwischen diesem Hormon und der Plazenta- bzw. der Fetengröße wiedergeben (Chowen JA et al. 1996). Eine Fallstudie von Rygaard verdeutlicht dies: Er suchte bei einer Patientin, die ein stark wachstumsretardiertes, aber ansonsten gesundes Kind zur Welt brachte, nach genetischen Ursachen und stieß auf eine Deletion der hPL- und hGH-V-Gene auf Chromosom 17 (Rygaard K et al. 1998). Diese Untersuchung zeigt, dass die Abwesenheit von hGH-V zwar keinen die SS-limitierenden Faktor darstellt, jedoch zu einer deutlichen Einschränkung in der fetomaternalen Kommunikation führt.

### 1.3 Überblick über Glukosestoffwechselstörungen in der Schwangerschaft

Nach den Richtlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft ist der Diabetes mellitus definiert als „eine durch den Leitbefund chronische Hyperglykämie charakterisierte Regulationsstörung des Stoffwechsels.“ Ursächlich liegt entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine verminderte Insulinwirkung, zum Teil auch beides, zugrunde. „Die chronische Hyperglykämie führt über die diabetesspezifische Mikroangiopathie zu Folgeerkrankungen, vorwiegend der Augen, Nieren und des Nervensystems und über die diabetesassoziierte Makroangiopathie zu Folgeerkrankungen an Herz, Gehirn und den peripheren Arterien“ (Kerner W et al. 2001).

Eingeteilt wird der Diabetes mellitus heute international nach der Klassifikation der Amerikanischen Diabetes Gesellschaft (ADA, 1997). Hier werden vier Typen unterschieden:

1. Typ I Diabetes (DM I)  
basierend auf absolutem Insulinmangel infolge Beta-Zell-Zerstörung
2. Typ II Diabetes (DM II)  
basierend auf einer Insulinresistenz des Organismus. Hier ist der Übergang von einem relativen in einen absoluten Insulinmangel möglich.
3. andere spezifische Diabetes-Typen  
z. B. genetische Defekte, Endokrinopathien, Infektionen
4. Gestationsdiabetes (GDM) (Kerner W et al. 2001)

Die diabetische Schwangere lässt sich zudem nach White klassifizieren (White P 1949; White P 1965). Für diese Einteilung werden neben dem Manifestationszeitpunkt die Diabetesdauer und das Vorhandensein von Spätkomplikationen berücksichtigt. Somit lässt sich anhand der angegebenen Kriterien eine Aussage über das SS-Outcome bei diabetisch bedingten Risiko-SS treffen. Dies beruht auf der Erfahrung, dass sich ein sich früh im Leben manifestierender Diabetes in einer schlechteren SS-Prognose widerspiegelt.

White schloss einen durch die SS induzierten Diabetes nicht in das Klassifikationssystem ein, da er dabei von einem subklinischen Diabetes (Klasse A) ausgeht, der durch die SS manifest wird.

**Tabelle 1:** White Klassifikation des Diabetes in der SS.

<b>Klasse</b>	<b>Manifestations- Alter (Jahr)</b>	<b>Dauer des Diabetes vor der SS (Jahre)</b>	<b>Vaskuläre Erkrankungen</b>	<b>Therapie</b>
A	jedes	jede	keine	A-1, Diät
B	> 20	< 10	keine	A-2, Insulin
C	10-19	oder 10-19	keine	Insulin
D	10	oder 20	benigne Retinopathie	Insulin
F	jedes	jede	Nephropathie	Insulin
R	jedes	jede	proliferative Retinopathie	Insulin
H	jedes	jede	Herzerkrankung	Insulin

<b>Gestationsdiabetes Klasse</b>	<b>Nüchtern- glucose Spiegel</b>		<b>Postprandialer Glucosespiegel</b>
A-1	< 105 mg/dl	und	< 120 mg/dl
A-2	≥ 105 mg/dl	und / oder	≥ 120 mg/dl

(White P 1949; White P 1965)

Patientinnen mit Diabetes der Klassen White C, D, F, H und R haben ein erhöhtes Risiko für ein schlechtes SS-Outcome, das mit den metabolischen Effekten des DM I in Relation steht (Lucas MJ 2001).

Der DM I stellt in der SS per se eine Komplikation dar und erfordert dementsprechend engmaschige Kontrollen. Ein Screening auf GDM hat erst seit einigen Jahren, obwohl von Fachgesellschaften seit langem unterstützt, an Bedeutung gewonnen, da diese SS-begleitende Erkrankung sowohl Risiken für die Mutter als auch für das Kind birgt. Ein weiteres nicht zu unterschätzendes Phänomen ist, bedingt durch die sozioökonomische Entwicklung, der DM II. Als Bestandteil des metabolischen Syndroms kann dieser bereits in jungen Jahren eine SS unmöglich machen oder diese in ihrem Fortgang beeinflussen.

Im Folgenden soll auf diese drei Formen des Diabetes mellitus genauer eingegangen werden.

### 1.3.1 Diabetes mellitus Typ I

Der DM I tritt bevorzugt in jüngeren Lebensjahren auf und ist gekennzeichnet durch eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden B-Zellen des Pankreas. Der sich auf diese Weise einstellende Insulinmangel spiegelt sich in Polyurie, Polydipsie, Keto(azido)se und

Gewichtsverlust wieder. Er beginnt meist abrupt. In 15-25% der Fälle kommt es zu einer ketoazidotischen Stoffwechsellage. Die Erstmanifestation eines DM I in der SS ist keine Seltenheit und erfordert damit besondere Aufmerksamkeit (Kerner W et al. 2001).

DM I stellt speziell in der SS ein großes Problem dar. Die Morbidität einer Patientin mit DM I in der SS ist im Wesentlichen abhängig von ihrem körperlichen Gesundheitszustand und ihrer Blutzuckereinstellung zum Zeitpunkt der Konzeption.

In den letzten Jahren führten bedeutende Veränderungen in der Diagnostik und Behandlung des Diabetes in der SS dazu, dass eine Normalisierung des Blutzuckers in Verbindung mit kontinuierlicher Kontrolle – bereits schon vor der SS – zu einer reduzierten Komplikationsrate und einem besseren SS-Outcome führt.

Hauptkomplikationen schwangerer Patientinnen mit DM I sind häufig Folgeerscheinungen der Grunderkrankung und sind gravierender bei Patientinnen, bei denen diese schon vor der SS bestehen. Hierzu zählen Proteinurie – selten bis hin zur Niereninsuffizienz – und arterieller Hypertonus, die in Form einer Präeklampsie nicht selten eine Ursache für eine vorzeitige Entbindung mittels Sectio caesarea darstellen. Darüber hinaus sind proliferative Retinopathie, Angina pectoris und Ketoazidose – häufig in Verbindung mit Infektionen – große Gefahren für Mutter und Kind (Lucas MJ 2001).

Bei Kindern von Müttern mit DM I ist das Fehlbildungsrisiko um das Zwei- bis Dreifache erhöht. Dieses steht in direktem Zusammenhang mit der Blutzuckereinstellung zum Zeitpunkt der Konzeption und der Frühschwangerschaft. Eine Normalisierung nach der Organogenese hat keine protektive Wirkung mehr.

Eine sich oft einstellende fetale Komplikation ist die Makrosomie. Bedingt durch die maternale und damit zwangsläufig auch fetale Hyperglykämie entwickelt sich eine fetale Hyperinsulinämie und schließlich eine fetale Makrosomie. Diese birgt wiederum Geburtsrisiken, wie beispielsweise Schulterdystokie, prolongierte Austreibungsperiode mit dem Risiko einer operativen Entbindung, neonatale Hypoglykämie, Hyperbilirubinämie und Atemnotsyndrom. Die Makrosomie scheint aber auch ein Grund für die bei DM I erhöhte Rate an Totgeburten zu sein. Im Gegensatz dazu ist jedoch bei bereits bestehender diabetischer Mikro- und Makroangiopathie von einer Entwicklungsstörung der Plazenta auszugehen, die sich schließlich in einer fetalen Wachstumsretardierung äußern kann (Lucas MJ 2001).

Therapeutisch ist eine engmaschige, interdisziplinäre Kontrolle der Patientinnen unumgänglich. Frühzeitige sonographische Untersuchungen und Kardiotokogramme ermöglichen ein gutes Monitoring des Fetus während der SS. Um das Risiko der Makrosomie zu minimieren, entscheidet man sich heute eher frühzeitig zur Geburtseinleitung. Dies hat auch die Rate der Totgeburten auf 1–2 von 1000 Lebendgeburten gesenkt (Lucas MJ 2001).

Die maternale Blutzuckereinstellung orientiert sich in der SS an den postprandialen Werten. Diese gilt es im Verlauf der SS in einem Rahmen von bis zu 140 mg/dl eine Stunde und bis zu 120 mg/dl zwei Stunden nach der Mahlzeit zu halten. Die Nüchtern glukose sollte 90 mg/dl nicht über- und 60 mg/dl nicht unterschreiten.

Der Insulinbedarf in der SS ist sehr starken interindividuellen Schwankungen unterworfen. Generell gilt aber, dass dieser zu Beginn der SS dem der prägraviden Situation gleicht, gelegentlich eher reduziert ist, und dann bis in etwa zur 36. SSW kontinuierlich ansteigt, anschließend konstant bleibt oder geringfügig abfällt.

Für eine Patientin mit DM I ist es heute möglich, eine SS komplikationsfrei auszutragen und ein gesundes Kind zur Welt zu bringen. Hierzu ist jedoch eine intensive Betreuung durch einen in der Diabetologie erfahrenen Internisten und Gynäkologen erforderlich (Otto H et al. 1998).

### 1.3.2 Diabetes mellitus Typ II

Der DM II ist eine sich vornehmlich im mittleren und höheren Lebensalter manifestierende Volkserkrankung, bei der es – meist auf dem Boden des metabolischen Syndroms (stammbetonte Adipositas, Dyslipoproteinämie, Hyperurikämie, essentielle Hypertonie, DM II) – zu einer gestörten Insulinsekretion und herabgesetzten Insulinwirkung kommt. Basis dieser Erkrankung ist eine pathologisch erhöhte Insulinresistenz. Da bei diesen Patienten kein absoluter Insulinmangel besteht, ist die Therapie anfangs mit Diät, Bewegungsaktivierung und oralen Antidiabetika gut möglich (Kerner W et al. 2001).

Durch die sozioökonomische Entwicklung ist der DM II in jungen Jahren zwar noch eine Seltenheit, aber deutlich im Vormarsch begriffen. Risikofaktoren hierfür sind neben der genetischen Veranlagung Adipositas, Bewegungsmangel und hochkalorische Ernährung, die schließlich in dem oben beschriebenen Wohlstandssyndrom enden. Eine weitere mit

Insulinresistenz einhergehende Erkrankung stellt das Polyzystische Ovar-Syndrom dar. Dieses bedingt durch eine ovarielle Überproduktion von männlichen Hormonen eine Hyperandrogenämie. Die Fehlfunktion des Ovars führt zu Oligomenorrhoe bis hin zu Amenorrhoe oft in Verbindung mit Infertilität. Wird die Patientin dennoch schwanger, ist das Risiko für eine Fehlgeburt erhöht, und die SS führt nicht selten zu einem GDM als Vorbote eines DM II (Fletcher B et al. 2002; Glueck CJ et al. 2002).

Ist eine Patientin mit DM II schwanger, gelten dieselben Richtlinien wie für eine Patientin mit DM I in der SS (siehe Kapitel 1.3.1, S.18). Eine sofortige Umstellung von oralen Antidiabetika auf Insulin ist erforderlich, da orale Antidiabetika in der SS kontraindiziert sind.

### 1.3.3 Gestationsdiabetes

Nach den Richtlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft ist der GDM definiert „als eine erstmals in der SS aufgetretene oder diagnostizierte Glukose-Toleranzstörung.“ Dieser können ein DM I, DM II oder eine auf die SS zeitlich begrenzte Glukosestoffwechselstörung zugrunde liegen. Die Häufigkeit des GDM ist von Population zu Population unterschiedlich. In Deutschland geht man von einem GDM in 1–5% aller SS aus.

Der GDM hat sowohl Folgen für die Mutter als auch für das Kind. Mütterlicherseits kommt es akut zu einem höheren Risiko für Harnwegsinfektionen, SS-induzierter Hypertonie und Präeklampsie / Eklampsie. Die Geburt geht häufiger mit vaginal-operativen Maßnahmen oder Sectio caesarea einher. Langfristig betrachtet besteht für die Mutter ein Risiko von 50% in einer weiteren SS erneut an einem GDM zu erkranken. In 40–50% der Fälle entwickeln die Frauen zehn Jahre postpartal einen manifesten DM, zumeist DM II.

Akute Folgen eines GDM für das Kind zeigen sich in der durch Hyperinsulinämie bedingten Makrosomie. Präpartal besteht die Gefahr einer Schulterdystokie, postpartal die einer neonatalen Hypoglykämie, Hypokalzämie, Polyglobulie, Hyperbilirubinämie und eines Atemnotsyndroms. Auch eine Totgeburt kann durch einen GDM hervorgerufen werden. Langfristig ließ sich nachweisen, dass Kinder von unzureichend behandelten Patientinnen mit GDM – unabhängig von ihrer genetischen Disposition – ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Adipositas und Glukosetoleranzstörungen / DM bereits in der Pubertät oder im frühen Erwachsenenalter haben.

Diese Risiken unterstreichen die Notwendigkeit eines generellen Screenings auf GDM (Bühling KJ et al. 2003). Hierzu stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung, die jeweils zwischen der 24. und 28. SSW unternommen werden sollten:

1. 50g-Glukose-Challenge-Test (GCT)

Dieser Test dauert eine Stunde. Eine Nahrungskarenz ist nicht erforderlich. Bei einer postprandialen Glukosekonzentration von über 140 mg/ml nach einer Stunde ist der Test pathologisch. Ein standardisierter 75g-OGTT muss nun die Diagnose GDM sichern.

2. 75g-Oraler Glukose Toleranz Test (OGTT)

Dieser standardisierte Test dauert zwei Stunden und erfordert eine Nahrungskarenz von mindestens acht Stunden. Die Grenzwerte sind in Tabelle 2a bzw. 2b beschrieben:

**Tabelle 2a:** Glukosegrenzwerte im 75g-OGTT nach O' Sullivan, umgerechnet von Carpenter und Coustan (O'Sullivan JB et al. 1964; O'Sullivan JB et al. 1973; Carpenter MW et al. 1982).

Messzeitpunkt	kapilläres Vollblut		venöses Plasma	
	(mg/dl)	(mmol/l)	(mg/dl)	(mmol/l)
Nüchtern	≤ 90	≤ 5,0	≤ 95	≤ 5,3
nach einer Stunde	≤ 180	≤ 10,0	≤ 180	≤ 10,0
nach zwei Stunden	≤ 155	≤ 8,6	≤ 155	≤ 8,6

**Tabelle 2b:** Glukosegrenzwerte im 75g-OGTT nach den Kriterien der WHO (Metzger BE et al. 1998) und entsprechend der Praxis-Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (Brückel J et al. 2002).

Messzeitpunkt	kapilläres Vollblut		venöses Plasma	
	(mg/dl)	(mmol/l)	(mg/dl)	(mmol/l)
Nüchtern	≤ 85	≤ 4,7	≤ 85	≤ 4,7
nach einer Stunde	≤ 180	≤ 10,0	≤ 165	≤ 9,2
nach zwei Stunden	≤ 155	≤ 8,6	≤ 140	≤ 7,8

Ein GDM liegt vor, wenn mindestens zwei der drei angegebenen Grenzwerte überschritten sind. Ist nur ein Wert erhöht, liegt eine eingeschränkte Glukosetoleranz vor. Diese unterscheidet sich in der Therapie nicht von der eines GDM (Brueckel J et al. 2002).

Bei dem Vorliegen folgender Risikofaktoren sollte in jedem Fall eine Untersuchung unternommen werden: Adipositas, Diabetes in der Familie, GDM in vorangegangener SS, Zustand nach Geburt eines Kindes über 4500g und Zustand nach Totgeburt. Ferner ist jeder Glukosurie genauer nachzugehen.

Nicht geeignet für das Screening und die Diagnostik des GDM erwiesen sich HbA1c, Fructosamin, Nüchtern- und Einzelglukosewerte.

Das Ziel der Diabetes-Therapie ist es, die Glukosewerte in fest definierten Grenzen zu halten. Diese sind, entsprechend DM I / II, nüchtern unter 90 mg/dl, bei Insulintherapie über 60 mg/dl, eine Stunde nach der Mahlzeit unter 140 mg/dl und zwei Stunden nach der Mahlzeit unter 120 mg/dl.

**Tabelle 3:** Einstellungsziele des Blutzuckers bei GDM, DM I / II in der SS nach den Richtlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft (Schäfer-Graf UM et al. 2001).

<b>Einstellungsziele</b>	<b>kapilläres Vollblut</b>	
	<b>(mg/dl)</b>	<b>(mmol/l)</b>
Nüchtern / Präprandial	60-90	3,3-5,0
1 Stunde postprandial	≤ 140	≤ 7,8
2 Stunden postprandial	≤ 120	≤ 6,7

Bei akzeptablen Glukosewerten unter Diät ist eine Therapie mit Insulin nicht erforderlich. Kann das Einstellungsziel jedoch mit diesen Maßnahmen nicht erreicht werden, ist eine Insulintherapie indiziert. Diese sollte individuell an die Bedürfnisse der Patientin angepasst werden. Die Betreuung in der SS stimmt mit der der Patientinnen mit DM I überein (siehe Kapitel 1.3.1, S.18).

Nach der Entbindung bildet sich der GDM in den meisten Fällen wieder zurück. Um sicher zu gehen, dass es sich nicht um eine inapparente Glukosestoffwechselstörung handelt, führt man bei postpartal unauffälligen Blutglukosewerten einen erneuten OGTT 6-12 Wochen nach der Entbindung durch, unabhängig davon, ob diese Patientin stillt oder nicht (Schäfer-Graf UM et al. 2001).

## 1.4 Insulinsensitivität in der Schwangerschaft

Die Insulinsensitivität des mütterlichen Organismus ist in der SS starken Veränderungen ausgesetzt, um die Nährstoffzustellung von der Mutter zum Kind zu gewährleisten. Da der Fetus vor allem im dritten Trimenon einen großen Nährstoffbedarf hat (80% werden durch Glukose gedeckt), kommt es physiologisch – zum Schutz der Mutter vor zu viel Glukoseaufnahme - zur Entwicklung einer maternalen Insulinresistenz. Die normale SS ist gekennzeichnet durch eine Abnahme von durch Insulinwirkung nach intrazellulär transportierter Glukose um etwa 50% und eine kompensatorische Zunahme der Insulinsekretion um 200–250%, um die Euglykämie der Mutter und den Glukose-Flux zur fetoplazentaren Einheit aufrecht zu halten (Catalano PM et al. 1999; Yamashita H et al. 2000). Ursache für diese Veränderung sind plazentare Hormone.

HPL hat insulinähnliche wie auch anti-insulinerge Effekte. Dabei konnte gezeigt werden, dass hPL die Insulinsekretion der pankreatischen B-Zellen in der SS steigert (Brelje TC et al. 1993). Einschränkend ist hierzu anzumerken, dass in der Vergangenheit auch hGH-V dem aus unterschiedlichen Isoformen (siehe Abbildung 1, S.10) und Genprodukten bestehenden hPL zugerechnet bzw. mitgemessen wurde.

Ob hGH-V ähnliche Effekte auf den Glukosestoffwechsel hat wie hGH-N, ist noch nicht gesichert, nachdem spezifische Messverfahren für hGH-V in der Vergangenheit nicht zur Verfügung standen. Das hypophysäre hGH-N als diabetogenes Hormon bedingt auf der einen Seite eine Hyperinsulinämie und verminderte Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme und Glykogensynthese, auf der anderen Seite beeinflusst es die Insulin-mediierte Suppression der hepatischen Glukoneogenese (Ho KKY et al. 1996).

Da das hypophysäre hGH-N mit Insulinsignalwegen in allen bedeutenden Insulin-sensitiven Geweben interferiert, kann postuliert werden, dass hGH-V mit nachgewiesener vergleichbarer Signaltransduktion eine wichtige Rolle für die Insulinsensitivität in der SS spielt (Barbour LA et al. 2002; Silva CM et al. 2002).

Die basale, hepatische Glukoneogenese ist in der SS um 16–30% erhöht. Bei gesunden Schwangeren findet sich zwar eine verminderte Insulinsensitivität, der Organismus kann durch Stimulation der Insulin-Sekretion den Blutzucker normalerweise aber noch kontrollieren. Bei Patientinnen mit gestörter Glukosetoleranz ist die Sensitivität des hepatischen Gewebes soweit vermindert bzw. die Resistenz so stark erhöht, dass die Suppression der Glukoseproduktion ausbleibt (Fisher PM et al. 1980; Butte NF 2000).

## **1.5 Rolle von Plazentarem Wachstumshormon für die Regulation des Glukosestoffwechsels**

Es wird vermutet, dass hGH-V eine große Bedeutung bei der fetalen Nährstoffbereitstellung zukommt. In-vitro-Versuche mit Glukose haben gezeigt, dass die Ausschüttung von hGH-V konzentrationsabhängig durch Glukose inhibiert wird und bei sehr hohen Glukosekonzentrationen völlig zum Erliegen kommt (Patel N et al. 1995). Der Einfluss der Hypoglykämie auf die hGH-V-Sekretion wurde (in einer ethisch fragwürdigen Studie) bei zehn schwangeren Patientinnen mit DM I unter induzierter Hypoglykämie untersucht. Die Autoren zeigten, dass die Ausschüttung von hGH-V durch niedrige Glukosekonzentrationen stimuliert wird (Bjorklund AO et al. 1998). In dieser Hinsicht ist die Ausschüttung von hGH-V analog zu der von hGH-N geregelt.

Die orale Glukosebelastung, sowohl mit dem 75g-OGTT als auch mit dem 50g-GCT, hat nach bisherigem Kenntnisstand keinen supprimierenden Einfluss auf die hGH-V-Ausschüttung in vivo (McIntyre HD et al. 2002; Verhaeghe J et al. 2002).

Untersuchungen von hGH-V bei DM I und GDM zeigten unterschiedliche Ergebnisse:

McIntyre zeigte bei Patientinnen mit DM I deutlich niedrigere Serum-Spiegel des Wachstumshormon-Bindungsproteins GHBP am Ende der SS als bei Patientinnen mit GDM, bei denen zum Ende der SS GHBP fast doppelt so hohe Konzentrationen erreichte wie in der Kontrollgruppe. Ein modulierender Effekt auf die hGH-V Wirkung des GHBP wird über Regulation des biologisch wirksamen freien Anteils diskutiert, ist aber umstritten und letztlich nicht geklärt. Durch die negative Korrelation zwischen hGH-V und GHBP schlossen die Autoren auf eine Wirkung des hGH-V auf das Wachstum des Feten, da hohe GHBP-Werte mit einem geringeren Geburtsgewicht, häufig entsprechend einer intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR), einhergehen. Diese Schlussfolgerung widerspricht jedoch der Problematik der Makrosomie bei DM I und GDM (Barnard R et al. 1997; McIntyre HD et al. 2000).

Lange ging man von der Plazenta als Insulin-unempfindlichem Organ aus. Dies wird jedoch durch den Nachweis von Glukosetransportern in der Plazenta widerlegt. Hier lassen sich drei Subgruppen unterscheiden. GLUT1 und GLUT3 sind zuständig für Glukoseaufnahme und -abgabe, wobei GLUT1 durch hohe Glukosekonzentrationen in seiner Transportfunktion gehemmt wird. GLUT4 ist ein durch Insulin regulierbarer und dem Insulinrezeptor (IR)

kolokalisierter Transporter in der Plazenta. Letzterem wird ein gewebespezifischer Regulationsmechanismus zugesprochen, der durch den Grad der Insulinresistenz des Gewebes in seiner Expression beeinflusst wird (Xing AY et al. 1998; Baumann MU et al. 2002). Wieweit hGH-V als möglicher Regulator der Insulinsensitivität in der SS die Expression der GLUT auf molekularer Ebene beeinflusst, ist noch nicht untersucht. Gestützt wird diese These jedoch durch eine Arbeit von Lucarelli, der den Zusammenhang zwischen den Genregionen von hGH / hCS und der metabolischen Kontrolle bei DM II untersuchte. Dabei zeigten zwei polymorphe Restriktionsseiten der hGH-Gruppe (BCLIIA und BCLIIB) eine signifikante Korrelation mit Blutglukosespiegeln und HbA1c. Da diese beiden Marker direkt in der Nähe des hGH-V-Gens lokalisiert sind, erstellten sie die Hypothese, dass der BCLIIA- / BCLIIB-Haplotyp ein Regulationsmarker dieses Genortes ist und in möglichem Zusammenhang mit der Manifestation eines GDM steht (Lucarelli P et al. 2000).

Durch die schon oben beschriebene große Homologie zwischen hGH-N und hGH-V und die tonische Ausschüttung von kontinuierlich steigenden hGH-V-Konzentrationen während der SS kann man die SS als akromegaloiden Zustand definieren.

Unterstützt wird diese Aussage einerseits durch die hohe somatogene Aktivität von hGH-V, die am Ende der SS Gewebeschwellungen und gelegentliches Aufflammen akromegaler Züge erklären lässt, wenngleich dies sicher multifaktorieller Genese (Östrogenwirkungen, Vasodilatation) ist (Baumann G et al. 1991). Andererseits entwickeln Patienten mit Akromegalie in 50% im Verlauf ihrer Erkrankung eine Glukosestoffwechselstörung, die wiederum in 25% der Fälle in einen DM II mündet. Auf diese Feststellung aufbauend lässt sich die Vermutung anstellen, dass es in der SS in Folge dauerhaft erhöhter hGH-V-Spiegel zu einer diabetogenen Stoffwechsellage bzw. zu einer Verminderung der Insulinsensitivität kommen kann, die sich in Form eines GDM manifestiert.

Ziel dieser Dissertationsschrift ist die Untersuchung der regulatorischen Rolle von hGH-V auf die Insulinsensitivität und seines Beitrags zur Pathogenese des Gestationsdiabetes.

## **2 Arbeitsplan und Zielsetzung**

Die vorliegende Arbeit hat zwei Schwerpunkte: Der erste ist experimentellen Charakters und befasst sich mit der Entwicklung einer spezifischen Bestimmungsmethode für hGH-V. Der zweite ist klinisch ausgerichtet und umfasst zwei prospektive, longitudinale, klinische Studien, mit denen die Rolle von hGH-V in der SS untersucht wurde.

### **2.1 Experimenteller Teil**

#### **2.1.1 Entwicklung eines immunofluorometrischen Assays zur Bestimmung von hGH-V**

Um der physiologischen Rolle von hGH-V nachzugehen, ist ein spezifischer Nachweis des Hormons unabdingbar. Bisher stand uns eine Subtraktionsmethode zu Verfügung, bei der man mittels zweier Assays die hGH-V-Konzentration errechnen konnte: Ein immunofunktionaler Assay für hGH, der hGH-N und hGH-V gleichermaßen misst (Strasburger CJ et al. 1996), und ein hochspezifischer immunofluorometrischer hGH-N-Assay. Besser ist es jedoch, monoklonale Antikörper (mAb) zu generieren, die keine Kreuzreaktion mit hGH-N und hPL aufweisen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nur ein kommerzieller hGH-V-spezifischer Assay auf dem Markt erhältlich (Evain-Brion D et al. 1994). Die hier verwendeten mAb wurde gegen eine in *Escherichia coli* exprimierte nicht-glykosylierte Form von hGH-V hergestellt (Igout A et al. 1989). Als Assaykalibrator wird dieselbe nicht-glykosylierte Form von hGH-V verwendet. Im Gegensatz dazu besteht das natürlich vorkommende hGH-V sowohl aus nicht-glykosyliertem als auch aus glykosyliertem hGH-V (Cooke NE et al. 1988; Liebhaber SA et al. 1989). Weitere einschränkende Faktoren des kommerziell erhältlichen hGH-V Assays sind Radioaktivität, Über-Nacht-Inkubation und ein benötigtes Probenvolumen von 200 µl. Weiterhin ist die Sensitivität des Assays mit 0,2 µg/l nicht sehr hoch und bedeutet eine deutliche Einschränkung in der Aussagekraft vor allem in der frühen Gravidität.

Ziel dieser Arbeit war es nun, einen nichtisotopischen, hochsensitiven hGH-V-spezifischen Sandwich-Immunoassay zu entwickeln, dessen mAb spezifisch hGH-V binden und möglichst nicht mit den strukturell verwandten Hormonen hGH-N und hPL reagieren.

## 2.2 Klinischer Teil

### 2.2.1 Untersuchung der Bedeutung von hGH-V für den Glukosestoffwechsel

Untersucht werden sollte der Zusammenhang von hGH-V und dem Auftreten des GDM. Hierfür wurde der Verlauf von hGH-V während der SS unter physiologischen und pathologischen Bedingungen untersucht. Im Rahmen der Studie gehörten der pathologischen Gruppe Patientinnen an, die bereits vor ihrer SS an einem DM I erkrankt waren oder im Verlauf der SS einen GDM entwickelten.

In den bereits veröffentlichten Studien gibt es nur unzureichende Angaben über den tatsächlichen Verlauf von hGH-V während der SS. Entweder wurde nur ein bestimmter Zeitraum für die Untersuchung veranschlagt (24h-Profile zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der SS, Zeitraum der Geburt), oder die Anzahl der Proben im Verlauf der SS pro Patientin wurde so gering gewählt (617 Proben auf 286 Probandinnen), dass die Repräsentativität in Frage gestellt werden muss (Eriksson L et al. 1988; Eriksson L et al. 1989; Caufriez A et al. 1993). Ferner differiert die Anzahl der Proben pro Zeitpunkt bei Querschnittuntersuchungen deutlich, und Längsschnittuntersuchungen wurden meist mit sehr kleinen Fallzahlen unternommen (Caufriez A et al. 1990; Caufriez A et al. 1994).

Auch bei pathologischen SS – seien es Grunderkrankungen der Mutter wie beispielsweise DM I oder Störungen der fetoplazentaren Einheit – fehlt eine genaue Definition in der Literatur meist völlig, und es wird eine gemeinsame Betrachtung unterschiedlicher Krankheitsbilder vorgenommen (Caufriez A et al. 1994). Über den Zusammenhang zwischen hGH-V und DM I gibt es nur wenige Daten, und die Publikationen hierzu sind ebenfalls auf Grund ähnlicher Probleme (geringe Fallzahl, Inhomogenität der Gruppen) nur bedingt aussagekräftig (Caufriez A et al. 1993).

Zielsetzung war es, eine prospektive, longitudinale, klinische Studie zu entwickeln, in der Patientinnen bereits in der Früh-SS in die Studie eingeschlossen und diese zu fest definierten Zeitpunkten während der gesamten SS einschließlich der Geburt mit Daten des Kindes und der Plazenta untersucht werden sollten.

Im Folgenden sollen kurz die Fragestellungen dargestellt werden, denen in der Studie nachgegangen wurde:

- Wie verhält sich die hGH-V-Sekretion über die SS innerhalb der Gruppen und im Vergleich der Gruppen zueinander?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des GDM und der hGH-V-Konzentration?
- Wie beeinflusst die Einstellung des Diabetes die Sekretion von hGH-V?
- Besteht eine Korrelation zwischen Wachstumsparametern wie hGH-N, IGF-I und der hGH-V-Konzentration?
- Besteht eine Korrelation zwischen morphologischen Daten der Mutter (BMI, Gewichtszunahme) und dem Verlauf der hGH-V-Konzentration?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen Geburtsgewicht, Geburtsgröße bzw. Kopfumfang und der hGH-V-Konzentration?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Plazentagewicht und der hGH-V-Konzentration?
- Ist in fetalem Nabelschnurblut hGH-V zu finden?

### 2.2.2 Untersuchung der Insulinsensitivität in der Schwangerschaft

Da, wie oben beschrieben, dem hGH-V als Stoffwechselhormon während der SS eine entscheidende Rolle für die Veränderung der Insulinsensitivität des Organismus zugesprochen wird, sollte diese in Verbindung mit hGH-V zu fest definierten Zeitpunkten in der SS mittels 75g-OGTT untersucht werden. Hierin sollten Patientinnen ohne bekannte Glukosestoffwechselstörung eingeschlossen werden.

Die zu beantwortenden Fragen waren:

- Wie verändert sich die Insulinsensitivität in der SS?
- Korreliert der Grad der Insulinsensitivität mit der hGH-V-Konzentration?
- Lässt sich die hGH-V-Konzentration im OGTT durch die Glukosebelastung beeinflussen?
- Wie verhält sich die IGF-I-Konzentration im SS-OGTT?

### **3 Materialien und Methoden**

#### **3.1 Experimenteller Teil**

##### **3.1.1 Geräte und Reagenzien**

###### **3.1.1.1 Referenzreagenzien für Wachstumshormon und plazentares Laktogen**

In Maus-Fibroblasten exprimiertes, rekombinantes hGH-V wurde uns freundlicherweise von Susan E. Kirk, MD, Universität von Virginia, Charlottesville, USA, zur Verfügung gestellt.

HGH-CV, eine rekombinant hergestellte hGH-Mutante, in der von den 13 zwischen hGH-N und hGH-V heterologen As jene 9 mehr C-terminal gelegenen As dem hGH-V identisch sind, während die N-terminal gelegenen 4 heterologen As gemäß der hGH-N-Struktur vorliegen, wurden uns freundlicherweise von Dr. med. Pär Gellerfors, Kabi Pharmacia, Stockholm, zur Verfügung gestellt.

Humanes hypophysäres Wachstumshormon stammt vom National Institute for Biological Standards (NIBSC, Hertfordshire, UK). Rekombinantes humanes N-Gen-Wachstumshormon (IRP 88/624) wurde von Kabi Pharmacia zur Verfügung gestellt. Rekombinantes humanes plazentares Laktogen wurde bei der Firma Sigma, St Louis, Mo, USA, gekauft.

Das rekombinante, nicht glykosilierte Wachstumshormon-Bindungsprotein, strukturell identisch mit der extrazelluläre Domäne des hGH-Rezeptors (rhGHBP, As 1–246), wurde uns von Prof. Dr. med. Arieh Gertler, Rehovot, Israel, überlassen.

###### **3.1.1.2 Reagenzien**

Biotinamidocaproat-N-Hydroxysuccinimid-Ester, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Bovines Gamma-Globulin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Bovines Serumalbumin (BSA), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Carbonatpuffer, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Merck (Darmstadt, Deutschland)

Diethylenetriaminpentaessigsäure (DTPA), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Dimethylformamid (DMF), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Eisessig, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Ethanol, absolut, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Eu-Labeling-Reagent, Wallac Oy (Turku, Finnland)

Glycerol, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Hunter's Titer Max Adjuvants, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Kaliumhydrogenphthalat, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ), Merck (Darmstadt, Deutschland)

Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ), Merck (Darmstadt, Deutschland)

Natronlauge ( $\text{NaOH}$ ), Merck (Darmstadt, Deutschland)

Phosphat buffert saline (PBS), steril, Dulbecco's, GIBCO BRL, Life Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA)

Pferdeserum, GIBCO BRL, Life Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA)

Polyethylenglykol 50% (PEG, MW 1500), Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)

Protein free II Medium, GIBCO BRL, Life Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA)

Salzsäure ( $\text{HCl}$ ), Merck (Darmstadt, Deutschland)

Schafserum, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Sepharose-r-Protein A, Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Bio-Rad Laboratories (Hercules CA, USA)

Streptavidin, Wallac Oy (Turku, Finnland)

Thenoyltrifluoraceton, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Tri-N-octylphosphinoxid, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Tris 50 mM, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Triton X-100, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Tween 20, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Tween 40, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Zitronensäure, Merck (Darmstadt, Deutschland)

### 3.1.1.3 Antikörper

Anti-hGH-N mAb 7B11, 8B11, 7F8, 5D6, 1H6

Anti-hGH-V mAb 3F12, 8A9, 1H2, 9C10

Diese mAb wurden in unserem Labor nach der Methode von Kohler und Milstein etabliert (Kohler G et al. 1975) (siehe Kapitel 3.1.2.3.2, S.35f.).

### 3.1.1.4 Puffer

#### Beschichtungspuffer für Mikrotiterplatten:

Der Beschichtungspuffer Natriumphosphat 50mM, pH 9,6 wurde von der Hausapotheke des Klinikums Innenstadt gebrauchsfertig geliefert. 5 l setzen sich wie folgt zusammen:

44,5 g di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) wird in 2 l  $\text{H}_2\text{O}$  aufgelöst und mit gereinigtem  $\text{H}_2\text{O}$  auf 5 l aufgefüllt. Anschließend wird der pH-Wert mit Natronlauge (NaOH) auf 9,6 eingestellt.

#### Assaypuffer für Immunoassays:

Für 5 l Puffer: 45,0 g Natriumchlorid (NaCl) (0,15 mol/l), 30,0 g Tris-(hydroximethy)-aminomethan (50 mmol/l), 2,5 g Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) (0,05%), 0,5 g Tween 40 (0,01%), werden in 3 l  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. gelöst und der pH mit konz. Salzsäure (HCl) auf 7,75 eingestellt. Dann werden 25,0 g BSA (0,5%), 2,5 g Bovines Gamma-Globulin (0,05%) und 39,35 mg Diethylenetriaminpentaessigsäure (DTPA, 20 $\mu\text{mol/l}$ ) zugegeben und nach dem Lösen auf 5 l aufgefüllt.

#### Waschpuffer für Immunoassays:

Für 2 l Stammlösung: 141,95 g di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 20 g Tween 20 und 1,0 g  $\text{NaN}_3$  werden in 1,5 l  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. gelöst und der pH mit 5 M HCl auf 7,5 eingestellt. Dann wird das Volumen mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest auf 2 l aufgefüllt.

Für die Gebrauchslösung werden 50 ml der Stammlösung mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. auf 2 l verdünnt (1:40).

### Europiummarkiertes Streptavidin (Stav-Eu)

Mehrere Arbeitsschritte sind zur Gewinnung der Markierungssubstanz notwendig:

- Markierungsverfahren:  
2 mg Streptavidin wird in 50 mM Carbonatpuffer, pH 10, gelöst und im Verhältnis 1:30 Molar mit Eu-Labeling-Reagent für 24 Stunden unter Lichtausschluss gekoppelt. Es folgt eine chromatographische Aufreinigung über eine Säule mit Superdex 30-pg-Gel. Die gepoolten Aliquots werden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Glycerol-Tris-Puffer gelagert.
- Glycerol-Tris-Puffer (zur Portionierung von Streptavidin-Europium):  
3,03 g Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan, 200 g Glycerol und 0,72 g  $\text{NaN}_3$  werden in 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. gelöst und auf einen pH von 7,5 mit HCl eingestellt. Anschließend wird auf 500 ml aufgefüllt.
- Gebrauchslösung von Streptavidin-Europium:  
Ein gepooltes Aliquot der Stav-Eu-Stocklösung (100  $\mu\text{g}$  in 31,5  $\mu\text{l}$ ) wird in 50 ml Glycerol-Tris-Puffer gelöst und à 1 ml aliquotiert. Unmittelbar vor Gebrauch wird ein Aliquot mit 19 ml Assaypuffer auf eine Konzentration von 100 ng/ml verdünnt.

### TR-Fluoreszenz-Enhancement-Lösung für die Messung von Europium im zeitaufgelösten Fluoreszenz-Messverfahren:

Er werden zwei Stocklösungen angesetzt:

- Stock A:  
5,55 g (100 mmol/l) Thenoyltrifluoracetone, 966,5 mg (10 mmol/l) Tri-N-octylphosphin-oxid in 100% Ethanol lösen. Dann 50 ml Triton X-100 hinzugeben. Auf 250 ml mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. auffüllen.
- Stock B:  
3,46 g (68 mmol/l) Kaliumhydrogenphthalat, 15,0 ml Eisessig, mischen und mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. auf 250 ml auffüllen.

Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung werden 2,5 ml Stock A mit 25 ml Stock B gemischt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. auf 250 ml aufgefüllt.

### Beladungspuffer für Protein-A-Säule

3 M NaCl, 0,05 M Tris und 0,02%  $\text{NaN}_3$  werden mit 1 M HCl auf einen pH von 8,9 eingestellt.

#### Elutionspuffer für Protein-A-Säule

0,1 M Zitronensäure wird mit 5 M NaOH auf einen pH von 5,0 eingestellt.

#### Waschpuffer für Protein-A Säule

0,1 M Zitronensäure wird mit 5 M NaOH auf einen pH von 3,0 eingestellt.

#### 3.1.1.5 Geräte

1232 DELFIA® -Fluorometer, Wallac Oy (Turku, Finnland)

1296-001 DELFIA®-Plattenschüttler, Wallac Oy (Turku, Finnland)

1296-041 DELFIA®-Plattendispenser, Wallac Oy (Turku, Finnland)

1470 Wizard, automatischer Gamma-Counter, Wallac Oy (Turku, Finnland)

Columbus-Plattenwascher, Tecan (SLT, Crailsheim, Deutschland)

DU®-62 Spektralphotometer, Beckman (Fullertown, CA, USA)

Feinwaage, Sartorius (Göttingen, Deutschland)

FPLC®-System mit 2 Pumpen P-500, Gradientenformer LCC 500 Plus, Monitor UV-M,

Fraktionensammler FRAC-100, Pharmacia (Upsala, Schweden)

Mini PERM®, Heraeus (Hanau, Deutschland)

PH-Meter, WTW (Weilheim (Obb.), Deutschland)

Spektrometer, Tecan (SLT, Crailsheim, Deutschland)

Zentrifuge, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

#### 3.1.1.6 Sonstige Materialien

Dialyseschlauch MWCO 12-14 Kd, 30 Meter Rolle, 10 mm Flachbreite, neoLab (Heidelberg, Deutschland)

Mikrotiterplatten (96 wells, Maxisorp Platten # 442404), Nunc (Roskilde, Dänemark)

Superdex 30 p, Pharmacia (Uppsala, Schweden)

Zellulose-Nitrat-Filter, 0,8 µm und 8 µm, Sartorius (Göttingen, Deutschland)

### 3.1.2 Methoden

#### 3.1.2.1 Subtraktionsverfahren zur Bestimmung der Konzentration

Um die Konzentration von hGH-V abschätzen zu können, stand anfangs eine indirekte Methode zur Verfügung: Mittels zweier Assays, einem alle Rezeptor-bindenden Isoformen von hGH quantifizierenden immunofunktionalen Assay und einem für hGH-N spezifischen Assay. Die Differenz zwischen der Gesamt-hGH-Konzentration und der hGH-N-Konzentration entsprach somit der hGH-V-Konzentration im zu messenden Serum. Im Folgenden sollen die einzelnen Assays näher dargestellt werden:

##### 3.1.2.1.1 Immunofunktionaler hGH-Assay

Der immunofunktionale Assay für hGH (hGH-IFA) ist gegen rekombinantes hGH-N (IRP 88/624) kalibriert. Er erkennt hGH-N und hGH-V gleichermaßen und wird deshalb verwendet, um die Gesamtquantität an hGH (ng/ml) im Medium zu messen (Strasburger CJ et al. 1996). Die Sensitivität des IFA liegt bei 0,05 ng/ml; die Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten waren 8,5%, 7,3%, 6,1% bzw. 12,8%, 9,4%, 7,9% bei GH-Konzentrationen von 0,43, 5,3 and 19,2 ng/ml.

Die Assaydurchführung folgt folgendem Protokoll:

Es werden 500 ng anti-hGH-mAb 7B11 in 200 µl 50 mM Phosphatpuffer pro well für die Beschichtung der Mikrotiterplatten verwendet. Nach einem dreimaligen Waschschrift folgt die Inkubation mit 50 µl Standard bzw. Probe und 50 µl Assaypuffer über drei Stunden bei RT. Es folgt dreimaliges Waschen. Als Tracer dienen 20 ng Biotin-markiertes rGHBP in 100 µl Assaypuffer pro well, der bei 4°C über Nacht inkubiert wird. Die weiteren Schritte werden unter Kapitel 3.1.2.3.7 (siehe S.39) beschrieben.

##### 3.1.2.1.2 hGH-N-spezifischer immunofluorometrischer Assay

Dieser für hGH-N spezifische Assay zeigt keinerlei Kreuzreaktion mit hGH-V. Er ist gegen rekombinantes hGH-N (IRP 88/624) kalibriert. Abgesehen von unterschiedlichen Antikörpern (mAb 5D6 und 1H6) und Kalibratoren wird der Assay wie der hGH-V-spezifische IFMA durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.2.3.7; S.39).

Der Arbeitsbereich dieses Assays liegt zwischen 0,1–100 ng/ml, der mittlere Variationskoeffizient als Indikator für Intra- und Interassayvariationskoeffizienten bei 4,6%.

### 3.1.2.2 Kommerziell erhältlicher immunoradiometrischer Assay für hGH-V

Dieser kommerziell erhältliche immunoradiometrische hGH-V-Assay (IRMA, BC 1017) der Firma Biocode, Liege, Belgien, beruht auf zwei mAb gegen hGH-V. Der erste bindet direkt an die Röhren, während der zweite mAb mit Jod 125 markiert ist und nach Bildung des „Sandwich“-Komplexes die Messung ermöglicht. Hierbei ist die verbliebene Radioaktivität direkt proportional zur beinhaltenen Menge an hGH-V. Der Kalibrator des Assays ist in *Escherichia coli* exprimiertes rekombinantes hGH-V.

Die untere Nachweisgrenze wird mit 0,2 ng/ml angegeben. Der Intraassay Variationskoeffizient war 5,1%, 3,0% bzw. 5,5% bei Konzentrationen von 20,5, 49,7 bzw. 73,4 ng/ml; der Interassay-Variationskoeffizient war bei denselben Konzentrationen 5,5%, 5,0% bzw. 7,9%.

Der Assay wurde gemäß der Gebrauchsanleitung wie folgt durchgeführt:

Schritt A: 100 µl Standard bzw. Probe wurden in die jeweiligen Röhren pipettiert, 200 µl Probenverdünnung zugegeben (außer Totalaktivität) und anschließend drei Stunden bei RT inkubiert.

Schritt B: Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden 2 ml Waschlösung zugegeben und im folgenden erneut dekantiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Schritt C: 300 µl <sup>125</sup>J-mAb-Tracer wurde in jedes Röhren pipettiert (außer Totalaktivität) und über Nacht bei RT inkubiert.

Schritt D: entsprechend Schritt B (siehe oben)

Schritt E: Messung der Radioaktivität mittels Gamma-Counter.

Die Konzentration von hGH-V wird in ng/ml angegeben.

### 3.1.2.3 hGH-V-spezifischer immunofluorometrischer Assay

#### 3.1.2.3.1 Herstellung und Aufreinigung von rekombinantem hGH-V

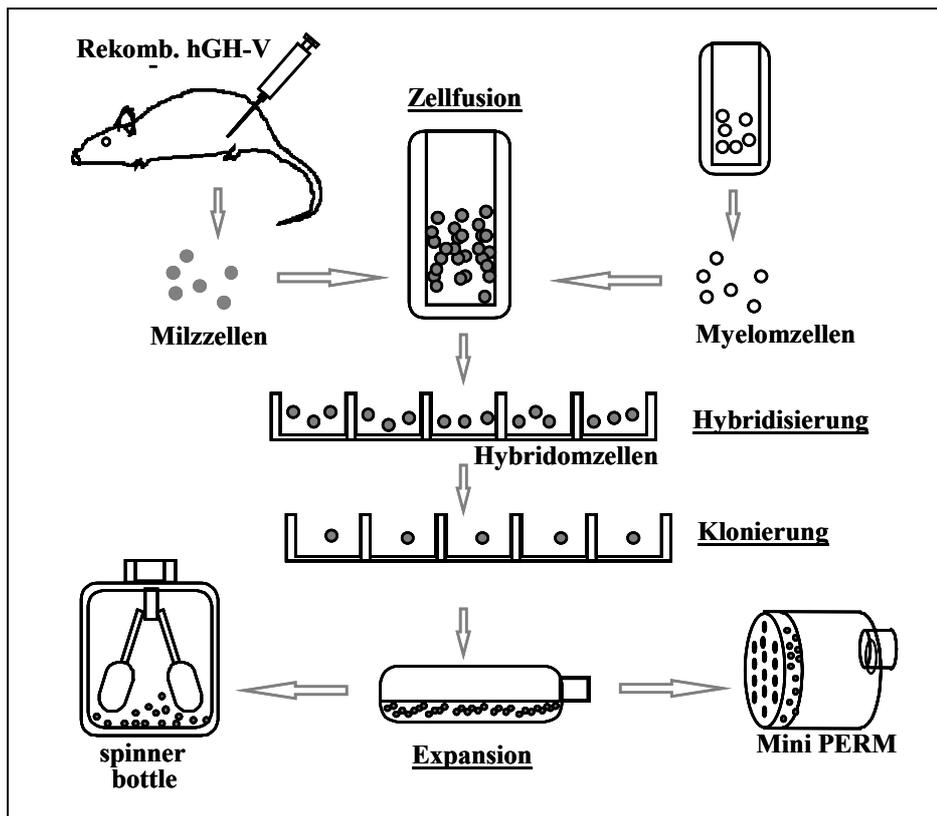
Rekombinantes hGH-V wurde wie zuvor beschrieben in Mausfibroblasten exprimiert (Ray J et al. 1990). Um die Konzentration von hGH-V im Medium zu erhöhen, ließ man die Zellen in einer Cellmax Artificial Capillary Cell Culture Patrone, Cellco Incorporated (Germantown, MD, USA) wachsen. Dieses System unterstützt bis zu  $1 \times 10^{11}$  Zellen und ermöglicht eine hohe Produktion von Protein, das dann in das Medium sezerniert wird. Dieses Medium schließlich wurde mittels Immuno-Affinitätschromatographie unter Verwendung einer mit dem monoklonalen Antikörper 6F1 mit gleicher Affinität zu hGH-N und hGH-V beladenen Säule aufgereinigt. Die Säulen enthielten cyanogen-bromide-sepharose Partikel, an die die anti-hGH-Antikörper gebunden waren. 20 µg Antikörper wurden zu 100 µl Pufferlösung mit 1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,3), 0,5 M NaCl und 40 µl der aktivierten Sepharose-Partikel zugegeben. Um hGH-V freizusetzen, wurde 0,5 M Glycin zugegeben und nach Abzentrifugieren der Partikel der hGH-V-enthaltende Überstand mit Tris-Puffer neutralisiert. Die Identität von hGH-V wurde mittels Massenspektrometrie bestätigt (durch Jay Fox, MD, Biomolecular Core Laboratory, Universität von Virginia, Charlottesville, USA).

Schließlich wurde der Grad der Aufreinigung noch mit einer SDS-PAGE-Gelelektrophorese untersucht.

#### 3.1.2.3.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

Die Gewinnung monoklonaler Antikörper basiert auf einer 1975 veröffentlichten Arbeit von Kohler und Milstein (Kohler G et al. 1975). Dieses Verfahren ermöglicht es, Zellen mit identischer genetischer Information zu generieren, die dementsprechend ein Protein – den monoklonalen Antikörper – sezernieren. Diese monoklonalen Antikörper (mAb) sind gegen eine einzige antigene Determinante, das Epitop, gerichtet.

Schematisch ist die Produktion monoklonaler Antikörper in Abbildung 4 wiedergegeben.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Produktion monoklonaler Antikörper nach Kohler und Milstein (Kohler G et al. 1975).

Zwei Monate alte, weibliche Balb/c-Mäuse wurden mit rekombinantem hGH-V immunisiert. Dafür wurde 10 µg hGH-V pro Maus in Hunter's Titer Max Adjuvants aufgelöst und anschließend intradermal injiziert. Nach wiederholten Immunisierungen innerhalb der folgenden vier bis sechs Monate wurde die Maus mit dem höchsten Antikörpertiter getötet. Die gewonnenen Milzzellen wurden in Anwesenheit von PEG nach der Hybridom-Methode mit NSO-Myelomzellen fusioniert. Das Nährmedium für die Zellen beinhaltete 20 % Pferdeserum. Nach 10–12 Tagen Kultivierung wurde der Hybridom-Zellüberstand mittels biotinyliertem hGH-V nach hGH-V-Bindungsaktivität gescreent. Die Hybridomzellen, die bezogen auf ihren Überstand die meisten Signale abgaben, wurden mindestens dreimal mittels limitierender Verdünnung subkloniert. Die IgG-Subklasse der monoklonalen Antikörper wurde bestimmt und eine große Produktion dieser in Mini-PERM®-Systemen mit proteinfreiem Medium angestrebt. Im Überstand fand sich eine IgG-Konzentration von 1–5 g/l. Die mAb wurden mittels einer r-Protein-A-FPLC®-Säule affinitätsaufgereinigt. Die so hochkonzentrierten IgG-Fractionen wurden gegen PBS dialysiert, in Aliquots aufgeteilt und bei –20°C bis zum Gebrauch tiefgefroren.

### 3.1.2.3.3 Biotin-Markierung von Antikörpern und anderen Proteinen

Die Biotinylierung der aufgereinigten mAb erfolgte wie zuvor beschreiben (Strasburger CJ et al. 1989): Dabei wurden diese mAb in PBS (pH 7,4) auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. Da für die Biotinylierungsreaktion ein pH-Wert von 8,2-8,6 erforderlich ist, wurden pro ml Antikörper 50 µl 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 9,0) zugegeben. Biotinamidocaproat-N-Hydroxysuccinimid-Ester (Sigma B2643, MG 454,4) wurde in DMF aufgelöst und in 75-fachen Molaren Überschuss mit dem mAb gemischt und anschließend bei RT für 2,5-6 Stunden, alternativ bei 4°C über Nacht, inkubiert. Biotin-markiertes IgG wurde über eine Superdex-30 pg-Säule (Pharmacia) nach dem Prinzip der „Size-Exclusion-Chromatographie“ über die FPLC® von Biotin getrennt. Den so gewonnenen biotinylierten mAb wurden 2 µl 10% NaN<sub>3</sub> und 5 µl 20% BSA zugesetzt und bei -20°C bis zu Verwendung gelagert. HGH-N und hGH-V wurden nach derselben Methode biotinyliert mit jedoch nur 25-fachem Überschuss von Biotinamidocaproat-N-Hydroxysuccinimid-Ester.

### 3.1.2.3.4 Selektion der monoklonalen Antikörper

Um mAb gegen hGH-V zu selektionieren, die keine Kreuzreaktion zu hGH-N aufweisen, wurden über 100 mAb, die gegen hGH-V hergestellt wurden, mit biotinyliertem hGH-N und hGH-V gescreent. Nur die mAb mit einer hohen Affinität zu hGH-V und keiner bzw. sehr geringer Affinität zu hGH-N wurden für weitere Untersuchungen und das Epitop-Mapping ausgewählt. Die genaue Kreuzreaktion der mAb wurde mittels kompetitiver Bindungsassays untersucht. Der Grad der Kreuzreaktivität wurde bestimmt durch die Menge an Kompetitor, die benötigt wurde, um 50% der Bindung von biotinyliertem hGH-V durch den jeweiligen mAb zu verhindern.

### 3.1.2.3.5 Charakterisierung der monoklonalen Anti-hGH-Antikörper

Die Epitope der hGH-V-spezifischen mAb wurden zunächst grob durch ihre Kreuzreaktivität zu hGH-CV untersucht. Diese hGH-V-Mutante unterscheidet sich hinsichtlich der 9 am C-terminalen Ende des Moleküls liegenden, zwischen hGH-N und hGH-V heterologen As nicht von hGH-V. Am N-terminalen Ende entsprechen die 4 zwischen hGH-V und hGH-N

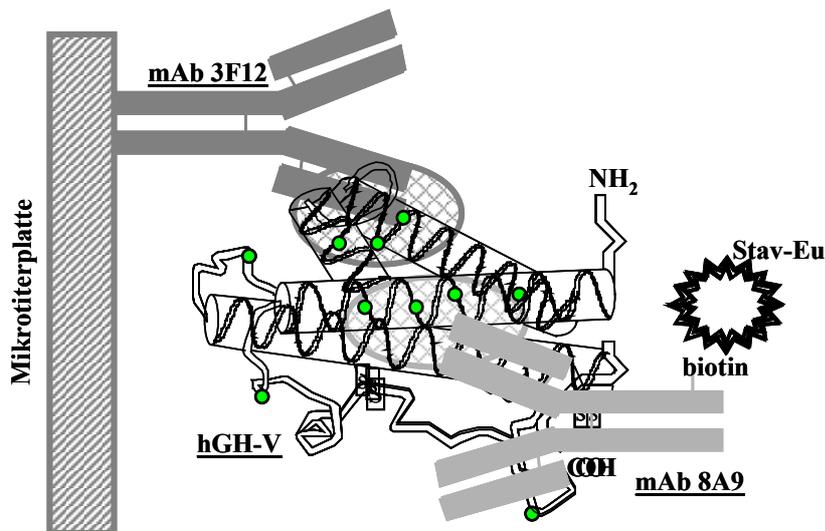
heterologen As dem hGH-N. Bindet ein mAb nun hGH-V und hGH-CV, nicht aber hGH-N, so befindet sich das Epitop am C-terminalen Ende und damit auf der „Rückseite des Moleküls“. Wird jedoch nur hGH-V, nicht jedoch hGH-CV gebunden, liegt das Epitop am N-terminalen Ende und somit auf der „Vorderseite des hGH-V-Moleküls“.

Daneben wurde die Beziehung zwischen den möglichen Epitopen und der Rezeptor-Bindungsstelle 1 untersucht. Hierfür wurden die Anti-hGH-V-mAb an die Mikrotiterplatte gebunden und mit rekombinantem hGH-V aufgesättigt. Anschließend wurde die biotinylierte rekombinante hGH-Rezeptor-Ektodomäne (rhGHBP) zugegeben. Die Menge an gebildeten hGH-V / rhGHBP-Komplexen wurde nach Zugabe von Europium-markiertem Streptavidin mittels Fluorometer quantifiziert. Die mAb, die hGH-V an oder in naher Umgebung der Rezeptor-Bindungsstelle 1 binden, können keinen Komplex mit rhGHBP bilden und zeigen somit niedrigere Signale als solche, bei denen eine Komplexbildung uneingeschränkt möglich ist.

#### 3.1.2.3.6 Assayaufbau

Der immunofluorometrische hGH-V-Assay ist ein „Sandwich“-Immunoassay. Hierbei wird ein mAb als Festphasenantikörper auf einer Polystyrol-Mikrotiterplatte durch hydrophobe Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte immobilisiert. Nach Zugabe des Antigens, hier hGH-V, wird dieses von dem immobilisierten Antikörper an seinem spezifischen Epitop erkannt und gebunden. Zur Detektion wird ein zweiter mAb, der mit Biotin markiert ist, zugegeben. Dieser bindet an ein anderes, für diesen spezifisches Epitop. In einem weiteren Schritt wird an das Biotin Streptavidin gebunden, das mit Europium markiert ist und anschließend mit dem DELFIA®-Fluorometer detektiert werden kann. Die Signalintensität (Fluoreszenz) steigt direkt proportional mit der Konzentration von hGH-V.

Abbildung 5 gibt den Assayaufbau schematisch wieder:



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des hGH-V-spezifischen Sandwich-Immunoassays.

### 3.1.2.3.7 Assaydurchführung

Nach dem oben beschriebenen Schema wurde mit einem Paar der selektierten hGH-V-spezifischen mAb ein hoch sensibler Sandwich-Immunofluorometrischer Assay (IFMA) etabliert. Die Durchführung ist im Folgenden beschrieben:

Mikrotiterplatten mit 96 wells (Vertiefungen) werden mit 500 ng mAb 3F12 in 0,2 ml Phosphatpuffer (50 mM, pH 9,6) über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen werden 25 µl Standard bzw. Probe in jedes well pipettiert, gefolgt von 50 ng biotinyliertem Anti-hGH-V-mAb 8A9 in 175 µl Assaypuffer. Die Mikrotiterplatten werden abgedeckt und zwei Stunden bei RT auf einem DELFIA®-Plattenschüttler inkubiert. Anschließend werden die Platten der nachfolgenden Beschreibung – geltend für alle zeitlich begrenzten Fluoreszenz-Immunoassays – folgend bis zur Messung behandelt:

- Nach Inkubation mit einem biotinylierten mAb bei RT werden die Mikrotiterplatten dreimal mit je 0,3 ml Waschpuffer (siehe Kapitel 3.1.1.4, S.30) pro well gewaschen.
- 10 ng Europium-markiertes Streptavidin (Stav-Eu; siehe Kapitel 3.1.1.4, S.31) wird in jedes well gegeben und 30 Minuten bei RT inkubiert.
- Nach sechsmaligem Waschen wird allen wells 0,2 ml TR-Fluoreszenz-Enhancement-Lösung (siehe Kapitel 3.1.1.4, S.31) zugegeben, nochmals 15 Minuten bei RT inkubiert und schließlich das Signal mittels DELFIA®-Fluorometer gemessen.

Als Assaykalibratoren für den spezifischen hGH-V-IFMA verwendeten wir in Maus-Fibroblasten hergestelltes rekombinantes hGH-V. Diese wurden mittels Serienverdünnung in Schafserum hergestellt. Die Standardkurve umfasst folgende Konzentrationen: 0-0,05-0,1-0,2-0,5-2-5-10-20-50 ng/ml. Die Kontrollen – eine niedrige (2 ng/ml) und eine hohe Konzentration (12 ng/ml) – entnahmen wir einem Pool von Seren schwangerer Patientinnen. Die Konzentration von hGH-V wird in ng/ml angegeben.

#### 3.1.2.4 Kommerzieller Chemilumineszenz-Assay für hGH-N

Nach Ausschluss einer Kreuzreaktion von hGH-V und hPL mittels ausführlicher Versuchsreihen im Nichols Advantage™ Chemilumineszenz hGH-N Immunoassay (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA) wurde dieser zur Bestimmung der hGH-N-Konzentrationen genutzt. Dieser Assay ist ein „Sandwich“-Assay, der mittels zweier Antikörper, einem monoklonalen, mit Biotin markierten Mausantikörper und einem polyklonalen, mit Acridiumester markierten Ziegenantikörper, hGH-N (ng/ml) in humanem Serum detektiert. Der lineare Arbeitsbereich war mit 0–53 ng/ml angegeben; die untere Nachweisgrenze war 0,1 ng/ml. Der Intraassay-Variationskoeffizient war 4,2%, 4,8% bzw. 8,0% bei Konzentrationen von 0,86, 2,42 bzw. 23,6 ng/ml; der Interassay-Variationskoeffizient war 4,1%, 5,8% bzw. 12,1% bei Konzentrationen von 0,92, 2,40 bzw. 23,7 ng/ml.

#### 3.1.2.5 Kommerzieller Chemilumineszenz-Assay für IGF-I

Zur Bestimmung von IGF-I wurde der Nichols Advantage™ Chemilumineszenz IGF-I Immunoassay (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA) verwendet. Dieser Assay ist ein „Sandwich“-Assay, welcher mittels zweier Antikörper IGF-I in humanem Serum detektiert. Der Festphasenantikörper ist ein mit Biotin markierter polyklonaler Ziegenantikörper, der Detektionsantikörper ein polyklonaler mit Acridiumester markierter Ziegenantikörper. Zu Beginn muss im Patientenserum IGF-I durch sauren Puffer von IGFBP getrennt werden. Dann blockiert im Überschuss zugegebenes IGF-II die erneute Bindung zwischen IGF-I und IGFBP. Der Intraassay-Variationskoeffizient war 4,8%, 5,2% bzw. 4,4% bei Konzentrationen von 63, 208 bzw. 766 ng/ml. Bei Konzentrationen von 62, 215 bzw.

811 ng/ml lag der Interassay-Variationskoeffizient bei 7,1%, 5,7% bzw. 7,4%. Die untere Nachweisgrenze war 6 ng/ml. Der lineare Bereich war mit 0–1000 ng/ml angegeben.

Die IGF-I-Konzentrationen (ng/ml) wurden auch mit den vom Hersteller angegebenen alters- und geschlechtsspezifischen Normbereichen nichtschwangerer Frauen verglichen. Dabei erfolgte die Darstellung als Vielfaches des „upper limit of normal (ULN)“, das als die 95. Perzentile des altersbezogenen Referenzbereiches definiert wurde (Wilde 2001).

### 3.1.2.6 Kommerzieller Immunoenzymometrischer Assay für hPL

Dieser immunoenzymometrischer Assay (IEMA) für die Bestimmung von hPL von der Firma RADIM S.p.A. (Rom, Italien) wurde über den Vertrieb von Diagnostic Systems Laboratories (Sinsheim, Deutschland) erworben. Dieser Assay ermöglicht durch eine mit einem Enzym verbundene „Sandwich“-Bildung die Quantifizierung von hPL in humanem Serum. Er basiert auf zwei mAb gegen unterschiedliche Epitope am hPL-Molekül. Der erste mAb ist als Festphasenantikörper mit der Mikrotiterplatte verbunden, der zweite mAb ist mit Meerrettichperoxidase markiert und dient der Detektion von hPL. Der Assay-Ansatz folgt folgendem Protokoll:

Schritt A: 1:50-Verdünnung der Kalibratoren, Kontrollen und Serumproben. Hierfür werden 20 µl Probe zu 980 µl Verdünnungslösung pipettiert und anschließend geschüttelt.

Schritt B: Es werden 50 µl der verdünnten Proben als Duplikate in die wells pipettiert, mit 200 µl Enzym-Antikörper-Konjugat (außer der Nullwert) versetzt und bei 37°C 60 Minuten inkubiert.

Schritt C: Viermaliges Waschen der Mikrotiterplatte mit je 300 µl Waschlösung.

Schritt D: Es werden 100 µl Substrat-Chromogen (Tetramethylbenzidine, Zitratpuffer und DMSO) und 100 µl Substratpuffer pipettiert, geschüttelt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

Schritt E: Die Blaufärbung wird durch 100 µl Stopplösung (NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) beendet und die Absorption bei 450 und 405 nm mittels DU®-62 Spektralphotometer gemessen.

Die Farbintensität des Enzym-Substrat-Komplexes ist direkt proportional zur Menge an hPL im Serum. Die Konzentration wird in µg/ml angegeben.

Dieser Assay zeigt keine Kreuzreaktivität mit hGH und PRL. Die Sensitivität wird mit 0,15 µg/ml angegeben, der Intraassay-Variationskoeffizient war 5,7%, 4,9% bzw. 7,0% bei Konzentrationen von 0,88, 3,89 bzw. 9,37 µg/ml; der Interassay-Variationskoeffizient 7,4%, 5,7% bzw. 8,9% bei Konzentrationen von 0,94, 3,71 bzw. 9,96 µg/ml.

### 3.1.2.7 Insulin- und C-Peptid-Radioimmunoassay

Der Insulin- wie auch der C-Peptid-Radioimmunoassay (RIA) wurden bei der Firma BioChem ImmunoSystems Italia S.P.A. (Bologna, Italien) gekauft. Sie folgen beide demselben Assayaufbau eines kompetitiven Immunoassays, der im folgenden kurz beschrieben werden soll:

50 µl Standard / Probe werden pipettiert, anschließend 50 µl <sup>125</sup>J-Insulin- bzw. <sup>125</sup>J-C-Peptid-Tracer und 50 µl Insulin- bzw. C-Peptid-Antiserum. Der letzte Schritt gilt nicht für die Röhren Totalaktivität und Nicht-Spezifische-Bindung. Es folgt nun die Inkubation: Für Insulin zwei Stunden, für C-Peptid eine Stunde. Anschließend gibt man allen Röhren außer der Totalaktivität 20% PEG zu, zentrifugiert und misst dann nach Absaugen des Überstandes die Radioaktivität im Präzipitat mittels Gamma-Counter.

Die Insulinkonzentration wird in µIU/ml, die C-Peptid-Konzentration in ng/ml angegeben. Die Sensitivität des Insulin-RIA war mit 1 µIU/ml beschrieben. Der Intraassay-Variationskoeffizient war 4,5%, 4,2% bzw. 7,4% bei Konzentrationen von 94,18, 28,15 bzw. 9,15 µIU/ml; der Interassay-Variationskoeffizient war 4,5%, 4,1% bzw. 8,0% bei Konzentrationen von 95,20, 30,05 bzw. 8,75 µIU/ml.

Der Messbereich des C-Peptid RIA ist 0,1–20 ng/ml. Der Intraassay-Variationskoeffizient war mit 3,62%, 3,34% bzw. 6,98% bei Konzentrationen von 0,64, 3,77 bzw. 8,78 ng/ml beschrieben; der Interassay-Variationskoeffizient bei denselben Konzentrationen mit 3,54%, 3,23% bzw. 6,23%.

### 3.1.2.8 Blutglukose- und HbA1c-Bestimmung

Die HbA1c- und Blutglukose-Bestimmungen erfolgten im Zentrallabor der Medizinischen Klinik. Diese verwendeten COBAS® INTEGRA 700 der Firma Roche Diagnostic Systems, Inc., (Somerville, NJ, USA) zur Quantifizierung des glykosylierten Hämoglobins in Prozent (%), sowie SUPER GL Ambulance der Firma RLT (Möhnesee, Deutschland) zur Bestimmung der Blutglukose in mg/dl.

Die untere Nachweisgrenze von HbA1c ist abhängig von der Hb-Konzentration und liegt bei einem typischen Hb von 13,2 g/dl bei 3%. Der Referenzbereich für Erwachsene wird mit 4,5% bis 5,7% angegeben. Der Intraassay-Variationskoeffizient war 2,3% bzw. 2,2% bei

Konzentrationen von 4,7% bzw. 10,3%; der Interassay-Variationskoeffizient war jeweils 2,4% bei den oben beschriebenen Konzentrationen

Für Blutglukose liegt der Messbereich zwischen 11–910 mg/dl. Der Variationskoeffizient ist mit < 1,5% angegeben.

## **3.2 Klinische Studien**

### **3.2.1 Materialien und Geräte**

Accutrend Sensor, Blutzuckermessgerät, Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)

Accutrend Sensor Comfort, Blutzuckerteststreifen, Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)

Dextro OGT (75 g Glukose, 300 ml), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)

Glucocapil (Hämolyatlösung), Ruhrthal Labortechnik (Mühnesee-Delecke, Deutschland)

Glukose-Lösung 20 Prozent Delta-Pharma (250 ml), Delta Pharma GmbH (Pfullingen, Deutschland)

Kurzzeituhr, Labor Schubert & Weiss GmbH (München, Deutschland)

Mikrokapillarpipetten 20 µl, KABE (Nümbrecht-Eisenroth, Deutschland)

NaCl 0,9% Infusionslösung, Braun (Melsungen, Deutschland)

PS-Röhrchen, Böll (München, Deutschland)

S-Monovette 2,7 ml EK (rot), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

S-Monovette 1,1 ml Z-Gel (braun), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

S-Monovette 4,7 ml Z-Gel (braun), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

S-Monovette 7,5 ml Z-Gel (braun), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Soehnle-Waage, Kustermann (München, Deutschland)

### **3.2.2 Methoden**

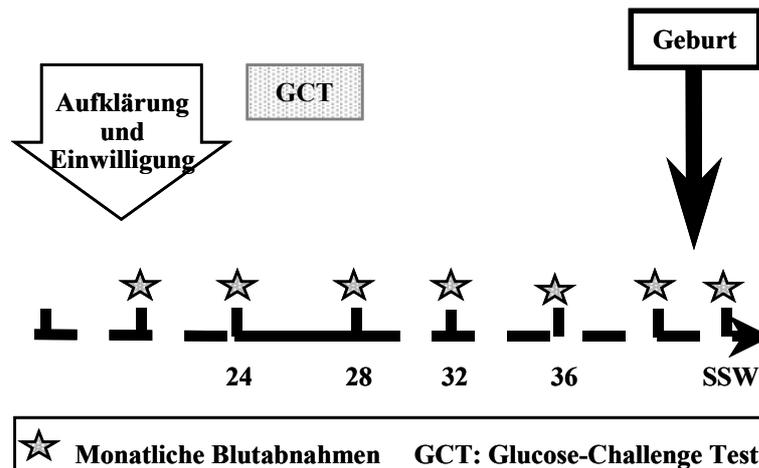
#### **3.2.2.1 Studie: Plazentares Wachstumshormon und Glukosestoffwechselstörung**

##### **3.2.2.1.1 Studienprotokoll**

In einer prospektiv longitudinalen, klinischen Studie untersuchten wir Patientinnen ohne und mit Glukosestoffwechselstörungen während der SS. Hierfür sammelten wir Serumproben von 69 Patientinnen, die keine diabetische Stoffwechselstörung hatten und im Laufe der SS nicht entwickelten (Kontrollgruppe, NORM), von 27 Patientinnen, bei denen schon vor der SS ein Diabetes mellitus Typ I diagnostiziert wurde (DM I), und von 43 Patientinnen, die im Laufe der SS einen Gestationsdiabetes entwickelten (GDM).

Nach ausführlicher Aufklärung und Unterzeichnung der Einverständniserklärung wurde auf der Akte die Teilnahme der Patientin an der Studie vermerkt und ein Studienlaufzettel

(siehe Anhang 1, S.113) eingeeftet. Der Patientin wurde nun bis zur Geburt in vierwöchigen Abständen Blutproben entnommen. Die letzte Abnahme erfolgte einen Tag nach der Entbindung auf der Wochenstation. Zusätzlich wurde bei 69 Patientinnen unmittelbar nach der Geburt Nabelschnurblut aus Arterie und Vene gewonnen. Bei zwei Patientinnen wurde die Kinetik von hGH-V während der Geburt untersucht. Diesen wurde hierfür vor, während und nach der Geburt in engen Zeitabständen Blutproben entnommen.



**Abbildung 6:** Studienprotokoll der Studie: Plazentares Wachstumshormon und Glukosestoffwechselstörung.

Eine Blutabnahme umfasste eine 7,5ml-Serummonovette und eine 2,7ml-EDTA-Monovette. Das Nabelschnurblut wurde in 4,7ml-Serummonovetten abgenommen. Die gewonnenen Serumproben wurden bei 3000 Umdrehungen (+4°C) 10 Minuten lang zentrifugiert und bei -20°C bis zur Messung gelagert. Bestimmt wurde neben hGH-V, hGH-N und IGF-I (Methodik siehe Kapitel 3.1.2; S.33ff.). Das EDTA-Plasma wurde im Zentrallabor der Medizinischen Klinik unmittelbar für die Bestimmung des HbA1c verwendet.

Insgesamt erfasst die Studie ein Probenaufkommen von 762 Serumproben, die zwischen der 7. und 43. SSW gesammelt wurden. Durchschnittlich repräsentieren  $6 \pm 2$  Proben eine SS.

Um sicher zu gehen, dass Patientinnen der Kontrollgruppe in der SS keine Glukosestoffwechselstörung entwickelten, unternahmen wir bei 40 der 69 Patientinnen, wie von der Deutschen Diabetes Gesellschaft zum Screening auf GDM empfohlen, zwischen der 24. und 28. SSW einen GCT. Da zum Zeitpunkt der Studie der GCT an der I. Universitätsfrauenklinik der LMU München erst eingeführt wurde, wurde er bei den übrigen Patientinnen aus logistischen Gründen noch unterlassen. Bei diesem Test musste die Patientin im Rahmen einer SS-Vorsorgeuntersuchung eine Fertigflasche 25% Glukose (50g) innerhalb von fünf

Minuten trinken. Die Patientin musste für diesen Test nicht nüchtern sein und sollte sich innerhalb der folgenden 60 Minuten nicht übermäßig bewegen. Nach einer Stunde wurde über einen Lanzettenstich in die Fingerbeere ein Blutropfen gewonnen, aus dem dann mit dem Blutzuckermessgerät Accutrend Sensor der aktuelle Blutglukosewert ermittelt wurde. Zeigte dieser eine Glukosekonzentration von über 140 mg/dl, wurde die Patientin für einen standardisierten 75g-OGTT an die Medizinische Klinik weiterverwiesen. Dies war bei 5 Patientinnen unserer Studie der Fall. Nach dem anschließenden OGTT wurde in 4 Fällen eine pathologische Glukosetoleranz diagnostiziert. Angemerkt werden muss jedoch, dass 2 Patientinnen trotz negativem GCT in der 28. SSW eine pathologische Glukosetoleranz entwickelten, die auch in beiden Fällen zu einem GDM führte.

Beim Eintritt der Patientin in die Studie wurde eine genaue Anamnese erhoben. Hier war speziell die Familienanamnese und Eigenanamnese bzgl. Glukosestoffwechselstörungen von Interesse, aber auch frühere SS, Gewicht vor der SS, Körpergröße, sowie die Medikamenten- und Nikotinanamnese. An jedem Abnahmezeitpunkt wurden dann für den Stoffwechsel relevante Daten erfasst. Hierzu gehören: Gewicht, Urinuntersuchungen, Ödembildung und ggf. Sonographie. Bei Patientinnen mit Glukosestoffwechselstörung wurde das Blutzuckertagesprofil, das täglich erfasst werden musste, eingesehen und zusammen mit dem aktuellen Insulinbedarf in die Akte eingetragen. Hypoglykämien wurden ebenfalls aufgezeichnet. Nach der Geburt wurden die Daten des Kindes aufgenommen: Geburtsgewicht, Geburtsgröße, Kopfumfang, Geschlecht, pH-Wert der Nabelgefäße, Apgar und das Plazentagewicht. Es folgte eine genaue Aufnahme des Geburtsmodus.

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München geprüft und für ethisch-rechtlich unbedenklich erklärt.

#### 3.2.2.1.2 Einschlusskriterien

Es wurden folgende Einschlusskriterien definiert:

- Vollendetes 18. Lebensjahr
- SS, je nach Gruppe ohne oder mit Glukosestoffwechselstörung (Diabetes mellitus Typ I oder Gestationsdiabetes, bei letzterem gilt ein einziger positiver OGTT)

- Bereitschaft der Patientin an der Studie teilzunehmen sowie die Einverständniserklärung zu unterzeichnen

#### 3.2.2.1.3 Ausschlusskriterien

Es wurden folgende Ausschlusskriterien definiert:

- Lebensalter unter 18 Jahre
- Sprachbarriere, eingeschränkte Aufklärungs- und Zustimmungsfähigkeit (Bewusstseins-  
trübung, geistige Behinderung, psychische Erkrankung oder andere Gründe, die eine volle  
Einsicht in das Protokoll verhindern)
- Schwere Anämie (Hb < 9 g/dl)
- Vorangegangene Transplantationen, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, schwere  
chronische Leber- und Nierenerkrankungen

#### 3.2.2.1.4 Aufklärungsbogen und Einverständniserklärung

Der Aufklärungsbogen mitsamt Einverständniserklärung lag ebenfalls der Ethikkommission vor und ist als Anhang 2 (siehe S.114ff.) dieser Arbeit beigelegt.

### 3.2.2.2 Studie: Plazentares Wachstumshormon und Insulinsensitivität

Diese Studie wurde ergänzend zu der oben beschriebenen Studie entwickelt, um die Rolle von hGH-V für die Veränderung der Insulinsensitivität in der SS zu untersuchen.

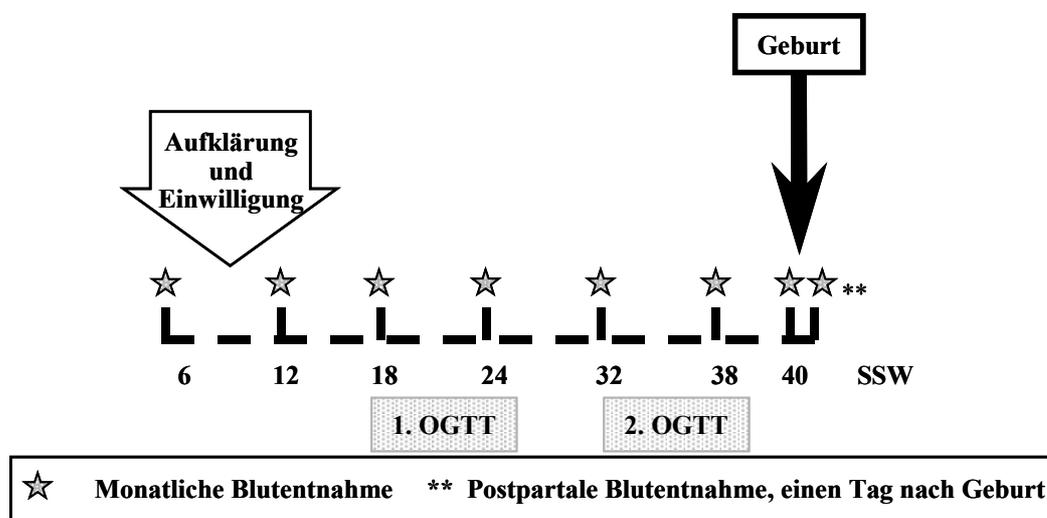
#### 3.2.2.2.1 Studienprotokoll

In einer prospektiv longitudinalen, klinischen Studie untersuchten wir 13 Patientinnen ohne Glukosestoffwechselstörungen während der SS. Die Patientinnen wurden primär aus der Kontrollgruppe der oben beschriebenen Studie rekrutiert.

Nach ausführlicher Aufklärung und Unterzeichnung der Einverständniserklärung wurde die Patientin in die Studie: „Plazentares Wachstumshormon und Insulinsensitivität“ eingeschlossen. Die Teilnahme wurde auf der SS-Akte der Patientin vermerkt.

In Absprache mit der Patientin vereinbarten wir innerhalb fest definierter Zeitfenster Termine für zwei 75g-OGTT. Der erste Test fand zwischen der 18. und 24. SSW (n=13) und der zweite Test zwischen der 32. und 38. SSW (n=13) statt. Bei diesem Test wurde zu fest definierten Zeitpunkten Blut entnommen: 0-30-60-90-120 Minuten, wobei der Zeitpunkt 0 der Abnahme vor Ingestion der 75g-Glukoselösung entsprach. Der Test fand im Funktionsraum der Medizinischen Klinik Innenstadt unter standardisierten Bedingungen (Ruhestuhl, venöser Zugang, NaCl-Infusion zum Offenhalten des venösen Zugangs (sehr langsam laufend), genaues Einhalten der Abnahmezeitpunkte, im Test routinierte MTAs) statt.

Abbildung 7 gibt schematisch das Protokoll dieser Studie wieder:



**Abbildung 7:** Studienprotokoll Studie: Plazentares Wachstumshormon und Insulinsensitivität.

Abgenommen wurden je Abnahmezeitpunkt eine 1,2ml-Serummonovette, sowie mittels Mikrokapillarpipette 20 µl Vollblut. Letzteres wurde in Hämolyatlösung pipettiert und an das Zentrallabor der Medizinischen Klinik weitergeleitet, das dann die Bestimmung der Blutglukose vornahm. Die gewonnenen Serumproben wurden bei 3000 Umdrehungen (+4°C) 10 Minuten zentrifugiert und bei -20°C bis zur Messung gelagert. Bestimmt wurden neben hGH-V, hGH-N, IGF-I, Insulin und C-Peptid (Methodik siehe Kapitel 3.1.2, S.33ff.).

Die Patientinnen wurden nach jedem OGTT über das Testergebnis informiert und im Falle einer grenzwertigen Glukosekonzentration (n=1) in der I. Frauenklinik engmaschiger kontrolliert. Ein pathologischer Test kam in dieser Studie nicht vor.

Daneben wurden, dem obigen Protokoll folgend, anamnestische und morphologische Daten der Mutter und des Kindes erhoben.

Diese Studie wurde der Ethikkommission als Amendment zu der oben beschriebenen Studie vorgelegt. Ihr wurde nach Prüfung ebenfalls die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zugesprochen.

#### 3.2.2.2.2 Einschlusskriterien

Es wurden folgende Einschlusskriterien definiert:

- Vollendetes 18. Lebensjahr
- SS
- Bereitschaft der Patientin an der Studie teilzunehmen sowie die Einverständniserklärung zu unterzeichnen

#### 3.2.2.2.3 Ausschlusskriterien

Es wurden folgende Ausschlusskriterien definiert:

- Lebensalter unter 18 Jahre

- Sprachbarriere, eingeschränkte Aufklärungs- und Zustimmungsfähigkeit (Bewusstseins-  
trübung, geistige Behinderung, psychische Erkrankung oder andere Gründe, die eine volle  
Einsicht in das Protokoll verhindern)
- Schwere Anämie (Hb < 9 g/dl)
- Vorangegangene Transplantationen, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, schwere  
chronische Leber- und Nierenerkrankungen
- Bekannte Glukosestoffwechselstörung: Diabetes mellitus Typ I und II
- Insulinpflichtiger Gestationsdiabetes

#### 3.2.2.2.4 Aufklärungsbogen und Einverständniserklärung

Der Aufklärungsbogen mitsamt Einverständniserklärung lag ebenfalls der Ethikkommission vor und ist als Anhang 3 (siehe S. 117ff.) dieser Arbeit beigelegt.

#### 3.2.2.2.5 Berechnung der Insulinsensitivität

Die Berechnung der Insulinsensitivität erfolgte nach der 1999 veröffentlichten Formel von DeFronzo (Matsuda M et al. 1999):

$$IS_{(DEFRONZO)} = \frac{10,000}{\sqrt{(FPG \times FPI) \times (\text{mittlere OGTT Glukosekonzentration} \times \text{mittlere OGTT Insulinkonzentration})}}$$

**Abbildung 8:** Formel nach DeFronzo zur Bestimmung der Insulinsensitivität (IS) (Matsuda M et al. 1999).  
FPG: Nüchtern-Plasmaglukose Konzentration; FPI: Nüchtern-Plasmainsulin-Konzentration  
Einheit:  $[10^{-4} \text{t}^2 / (\text{mg} \times \mu\text{IU})]$

Er konnte in seiner Arbeit (Matsuda M et al. 1999) zeigen, dass sich die Insulinsensitivität während eines euglykämischen Insulin Clamp – berechnet durch das Verhältnis von Gesamtkörper Glukoseaufnahme und der dauerhaften Plasmainsulinkonzentration innerhalb

der letzten 60 Minuten des 120 Minuten langen Tests – nicht von der während eines OGTT mit der von ihm erstellten Formel unterscheidet.

Hohe Insulinspiegel in Verbindung mit normalen oder erhöhten Glukosekonzentrationen weisen auf eine Insulinresistenz des Organismus hin (FPG x FPI). Je höher die Insulinantwort und je höher die Glukosekonzentration, desto ernster ist der Grad der Insulinresistenz (mittlere Glukosekonzentration x mittlere Insulinkonzentration). Mit dieser Formel gelang es ihm auf einfache Weise eine Methode zu etablieren, die es ermöglicht, die Gesamt-Insulinsensitivität des Körpers zu beschreiben.

Die Insulinsensitivität wird demnach mit Werten von 0 bis 12 [ $10^{-4} \text{l}^2 / (\text{mg} \times \mu\text{IU})$ ] angegeben, wobei niedrige Werte auf eine Insulinresistenz hinweisen.

Zum Vergleich nutzten wir eine weitere anerkannte Methode zur Bestimmung der Insulinsensitivität: Das Homeostasis Model Assessment (HOMA). Dieses wurde im Jahre 1985 von Hosker et al. publiziert und ermöglicht ebenfalls eine Schätzung der Insulinsensitivität des Organismus mittels OGTT (Matthews DR et al. 1985).

$$\text{IR}_{(\text{HOMA})} = \frac{\text{FPI} \times \text{FGP}}{22,5} \qquad \text{IS}_{(\text{HOMA})} = \frac{1}{\text{IR}_{(\text{HOMA})}}$$

**Abbildung 9:** Homeostatis Model Assessment (HOMA) nach Matthews (Matthews DR et al. 1985).  
IR: Insulinresistenz; IS: Insulinsensitivität; FGP: Nüchtern-Plasmaglukose Konzentration; FPI: Nüchtern-Plasmainsulin-Konzentration. Einheit (IR): [ $\mu\text{IU}/\text{ml} \times \text{mmol}/\text{l}$ ]

### 3.3 Statistik

Die Daten wurden mit dem Microsoft-Programm Excel erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte mit der nichtparametrischen Repeated Measures Analyse (Brunner E 2002) sowie dem Software Programm StatView (SAS Institute Inc., Version 5,0). Hiermit wurden lineare Regressionsanalysen und nichtparametrische Tests (Spearman-Korrelation, Wilcoxon-Vorzeichen-Rank-Test, gepaarter Vorzeichentest, Mann-Whitney-U-Test), wenn angebracht, erstellt. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  1 Standardabweichung (SD), falls nicht anders bezeichnet, angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Experimenteller Teil

#### 4.1.1 Charakterisierung von in Maus-Fibroblasten exprimiertem rekombinanten hGH-V

Wie zuvor beschrieben wurde rekombinantes hGH-V in Mausfibroblasten exprimiert (Ray J et al. 1990). Im Zellkultur-Überstand war kein hGH-N messbar. Der Reinheitsgrad des gewonnenen hGH-V wurde nach Aufreinigung mittels einer mit dem Anti-hGH-mAb 6F1 (vergleichbare Affinität zu hGH-N und hGH-V) markierten Affinitätssäule mit über 90% angegeben. Es wurden zwei hGH-V-Isoformen gefunden. Eine mit einem Molekulargewicht von 22 kDa und eine weitere mit einem Molekulargewicht von 25 kDa. Letztere entspricht der glykosylierten Form von hGH-V.

#### 4.1.2 Herstellung und Charakterisierung der hGH-V-spezifischen Antikörper

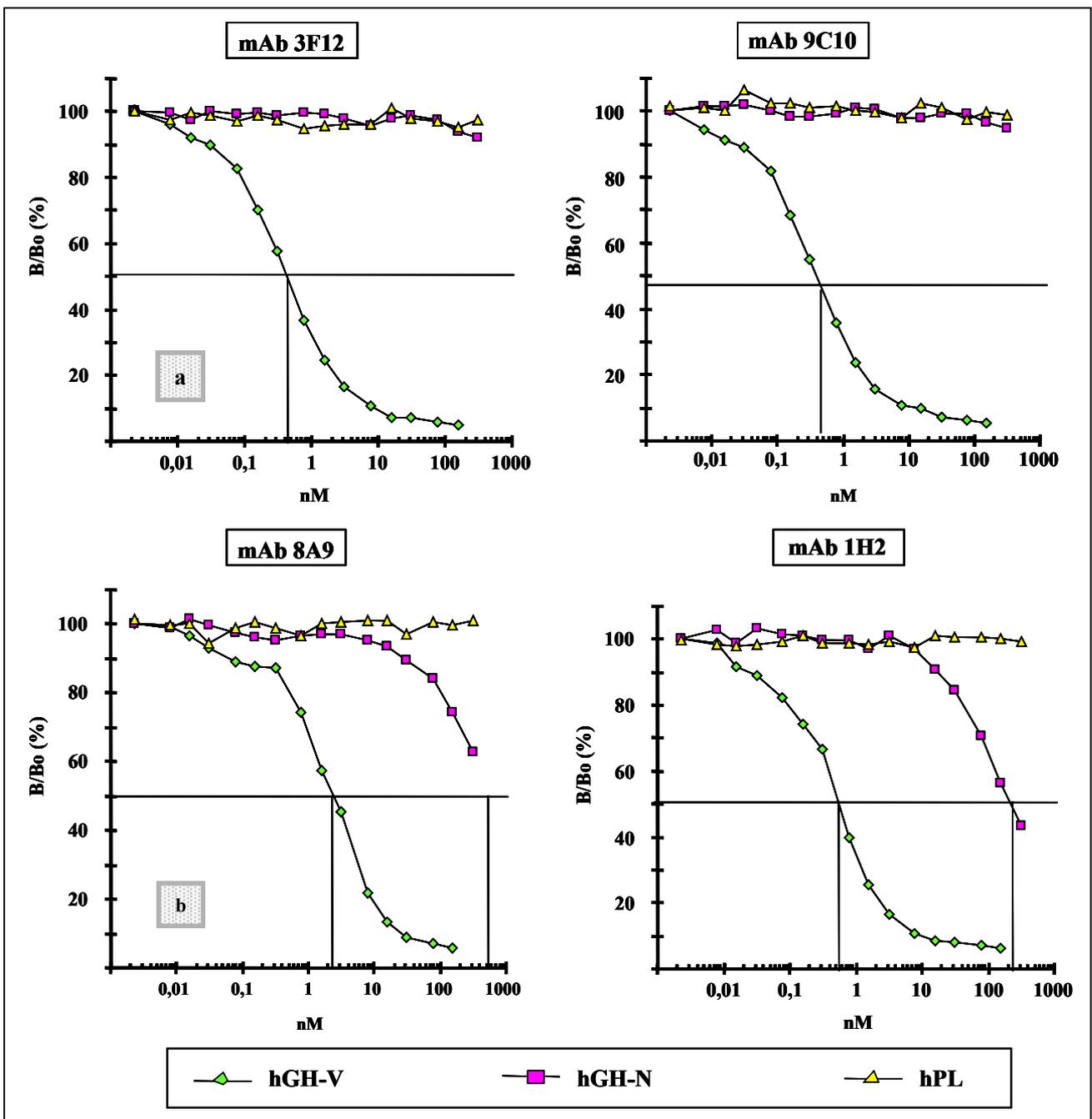
Unter den 25 Klonen, die eine hohe Affinität zu hGH-V zeigten, gab es vier Klone, die keine oder eine sehr geringe Affinität zu hGH-N hatten. Diese vier Klone, die je einen der mAb 3F12, 9C10, 8A9 und 1H2 exprimierten, wurden subkloniert, expandiert und anschließend charakterisiert. Tabelle 4 gibt die Subklassen der Antikörper sowie die gewonnene mAb-Menge wieder:

**Tabelle 4:** Monoklonale Antikörper mit hoher Affinität zu hGH-V und geringer zu hGH-N; Angabe der Ab-Subklassen-Zugehörigkeit und der gewonnenen mAb-Menge.

mAb	Ab-Subklasse	Menge an mAb
3F12	Ig G2b	37,5 mg
9C10	Ig G2a	16,0 mg
8A9	Ig G1	23,0 mg
1H2	Ig G1	1,0 mg

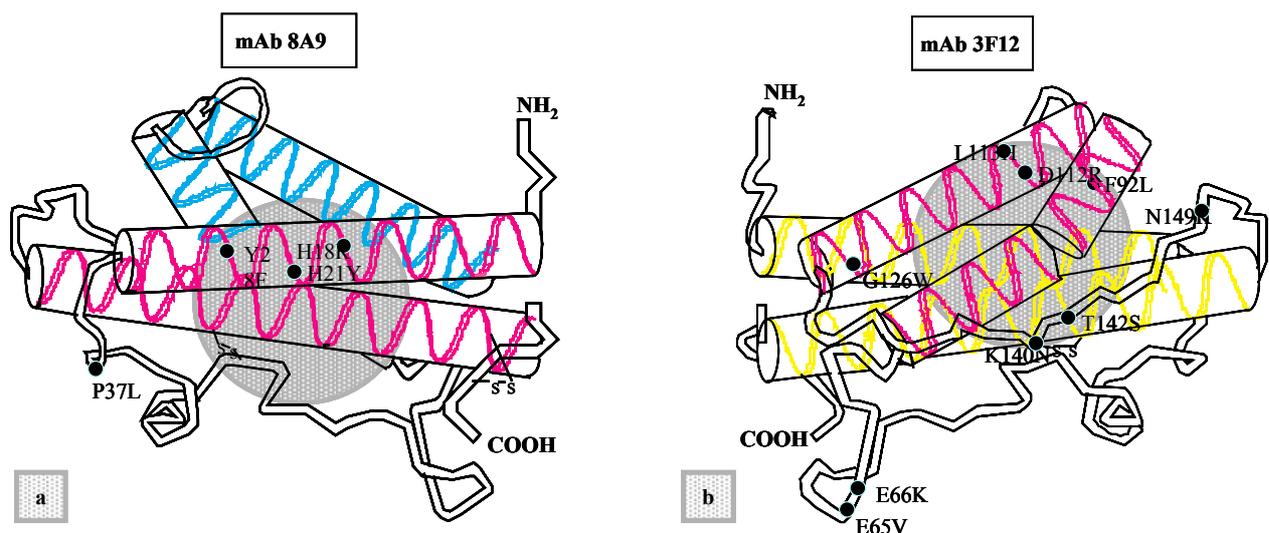
(Je 0,5 ml der neu gewonnenen mAb wurden nach dem unter Kapitel 3.1.2.3.3 (siehe S.37) beschriebenen Vorgang mit Biotin markiert.)

Verdrängungsversuche ergaben, dass die mAb 3F12 und 9C10 keine messbare Kreuzreaktivität ( $< 0,01\%$ ) mit hGH-N oder hPL bis zu einer Konzentration von 300 nM haben (Abbildung 10a: Klone 3F12, 9C10). Die mAb 8A9 und 1H2 zeigten eine geringe Kreuzreaktivität mit hGH-N bei hohen Konzentrationen ( $< 0,4\%$ ), jedoch nicht mit hPL (Abbildung 10b: Klone 8A9, 1H2).



**Abbildung 10:** Kreuzreaktion der mAb 3F12 / 9C10 (a) sowie 8A9 / 1H2 (b) mit hGH-V, hGH-N und hPL.

Hinsichtlich ihrer Epitope können die mAb in zwei Gruppen eingeteilt werden: Da die mAb 8A9 und 1H2 mit hGH-V um die Bindung an rhGHBP konkurrieren, ist anzunehmen, dass die Epitope innerhalb der Rezeptor-Bindungsstelle 1 am hGH-V-Molekül liegen. Im Gegensatz dazu ist die Bildung des hGH-V / rhGHBP-Komplexes durch die Anwesenheit der mAb 3F12 und 9C10 nicht gestört, was darauf hinweist, dass diese auf Epitope außerhalb der Rezeptor-Bindungsstelle 1 zielen. Ergänzend gehen die mAb 1H2 und 8A9 keine Bindung mit der Mutante hGH-CV ein. Dieses Molekül unterscheidet sich von hGH-V nur in vier As am N-terminalen Ende. Dies zeigt, dass die mAb 1H2 und 8A9 ihre Epitope in dieser Region – entsprechend der Helix 1 des hGH-V-Moleküls (H18R, H21Y, Y28F) und der Verbindung zwischen Helix 1 und Helix 2 (P37L) – haben (Abbildung 11a: Epitop mAb 8A9). Dagegen binden die mAb 3F12 und 9C10 sowohl hGH-V als auch hGH-CV. Zusammen mit der fehlenden Interferenz des hGH-V / rhGHBP Komplexes deutet dies auf Epitope außerhalb von Helix 1, Helix 2 und der Verbindung zwischen Helix 1 und 2 hin. Betrachtet man nun die dreidimensionale Struktur des hGH-V-Moleküls, so verbleiben nur die hGH-V-spezifischen As der Helix 2 (F92L), Helix 3 (D112R, L113H, G126W) und der Verbindung zwischen Helix 3 und 4 (K140N, T142S, N149K) als mögliche Ziele für die mAb 3F12 und 9C10. Innerhalb des dreidimensionalen hGH-V-Moleküls sind diese As nahe beieinander lokalisiert und formieren eine Stelle, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die Epitope der mAb 3F12 und 9C10 darstellt (Abbildung 11b: Epitop mAb 3F12).



**Abbildung 11:** Epitope der mAb 8A9 (a) und 3F12 (b) am hGH-V-Molekül.

Die schwarzen Punkte stellen die zwischen hGH-N und hGH-V unterschiedlichen As dar.

Die Charakterisierung der mAb ist zusammenfassend in Tabelle 5 dargestellt:

**Tabelle 5:** Charakterisierung der Bindungsstellen der mAb entsprechend ihrer Affinität zu hGH-CV bzw. zur Rezeptorbindungsstelle 1.  
(hGH-CV unterscheidet sich von hGH-V in vier As am N-terminalen Ende.)

	<b>mAb 8A9 / 1H2</b>	<b>mAb 3F12 / 9C10</b>
<b>hGH-N</b>	-	-
<b>hGH-V</b>	+	+
<b>hGH-CV</b>	-	+
<b>Rezeptor-Bindungsstelle 1</b>	+	-

+ Bindung      - keine Bindung

### 4.1.3 hGH-V-spezifischer immunofluorometrischer Assay

#### 4.1.3.1 Auswahl der anti-hGH-V-Antikörper

Die Auswahl der mAb für den IFMA erfolgte anhand ihrer Testung jeweils als Immobilisationsantikörper und als biotinylierter Detektionsantikörper, auch Tracer genannt. Nur die vier bereits oben erwähnten, für hGH-V spezifischen mAb – 3F12, 9C10, 8A9 und 1H2 – wurden verwendet. Jeder dieser Antikörper lag sowohl als Immobilisationsantikörper als auch als mit Biotin markierter Antikörper vor, so dass jeder mAb mit jedem mAb in beiden Funktionen, d. h. als Festphase bzw. als Tracer, getestet werden konnte. Ziel war es, eine Kombination von zwei mAb zu finden, die mit niedrigem Hintergrundsignal ohne Kreuzreaktion mit hGH-N hochsensitiv hGH-V messen kann.

Hierfür wurde auf einer Mikrotiterplatte jeder Festphasenantikörper mit jedem Detektionsantikörper getestet:

Auf einer Mikrotiterplatte wurden je zwei der insgesamt acht Reihen (A–G) mit einem der vier mAb (500 ng/w in 200 µl/w Phosphatpuffer) über Nacht bei 4°C zur adsorptiven Beschichtung inkubiert und dreimal gewaschen. Anschließend wurde in well 1,2 und 7,8

200 µl Assaypuffer, in well 3,4 und 9,10 1 ng/200 µl Assaypuffer pro well hGH-V und in well 5,6 und 11,12 1 ng/200 µl Assaypuffer pro well hGH-N pipettiert und bei RT zwei Stunden inkubiert. Es folgte ein dreifacher Waschschrift, anschließend wurden 50 µg der biotinylierten mAb – 3F12-b, 9C10-b, 8A9-b und 1H2-b – in 200 µl Assaypuffer zugegeben und zwei Stunden bei RT inkubiert wurden. Dabei wurde der Tracer in je sechs wells der paarigen Reihen pipettiert. Nach Inkubation mit 200 µl Stav-Eu-Lösung (30 Minuten bei RT), sechsmaligem Waschen und erneuter Inkubation von 200 µl/w TR-Fluoreszenz-Enhancement-Lösung wurde mittels DELFIA®-Fluorometer gemessen. Die counts der einzelnen Paare mit Assaypuffer, hGH-V und hGH-N sind in Tabelle 6 dargestellt. (Fettgedruckt die Paare von mAb, die auf Grund des niedrigen Hintergrundsignals, der nicht vorhandenen Kreuzreaktion mit hGH-N und der guten Detektion von hGH-V im Folgenden näher untersucht wurden.)

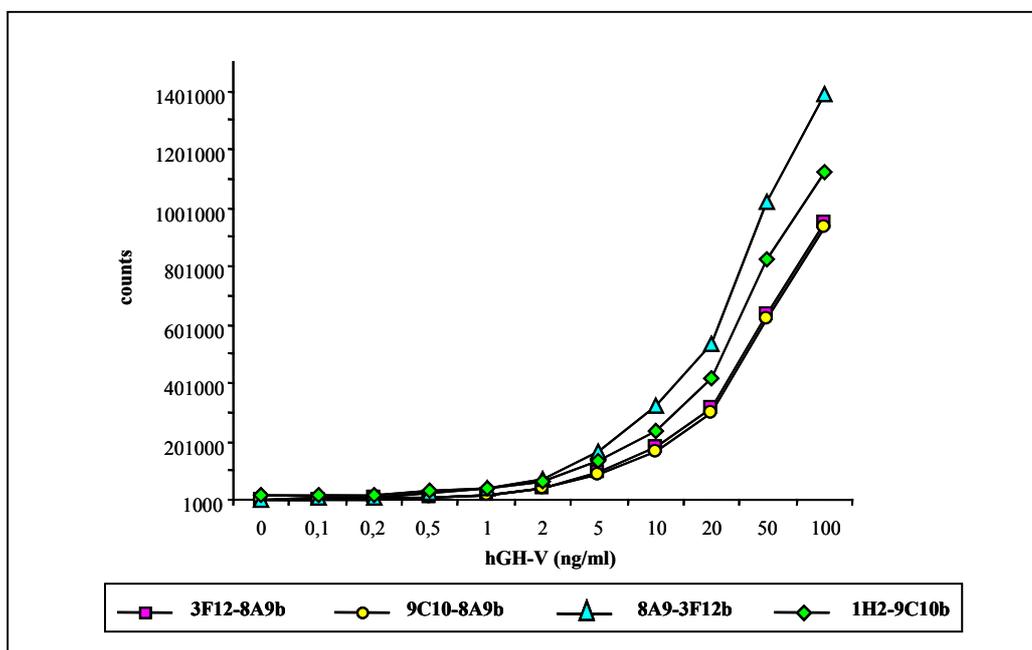
**Tabelle 6:** Austestung der Kombinationspartner für die hGH-V-Assayentwicklung. Jeder mAb wurde als Festphasen-mAb und biotinylierter Tracer-mAb-b gegeneinander ausgetestet – in Assaypuffer (Hintergrundsignal), mit 1 ng hGH-V/well (Detektion) und mit 1 ng hGH-N/well (Kreuzreaktion); angegeben ist das Mess-Signal in counts. Schwarz hervorgehoben die bevorzugten Paare, grau umrandet das im Assay verwendete Paar.

mAb- mAb-b	Meßsignal (counts)		
	Assay- puffer	hGH-V	hGH-N
1H2-1H2b	19038	20853	17372
1H2-3F12b	9218	666128	9842
1H2-8A9b	2246	3321	2467
<b>1H2-9C10b</b>	<b>9990</b>	<b>675782</b>	<b>9574</b>
3F12-1H2b	12138	546650	13284
3F12-3F12b	11222	14249	10902
<b>3F12-8A9b</b>	<b>1476</b>	<b>560076</b>	<b>1336</b>
3F12-9C10b	8475	9633	8528
8A9-1H2b	1266	1481	1082
<b>8A9-3F12b</b>	<b>3230</b>	<b>925006</b>	<b>5184</b>
8A9-8A9b	844	1978	718
8A9-9C10b	1362	879766	1424
9C10-1H2b	14034	491914	14073
9C10-3F12b	9026	12903	9268
<b>9C10-8A9b</b>	<b>758</b>	<b>503902</b>	<b>776</b>
9C10-9C10b	9506	10826	9074

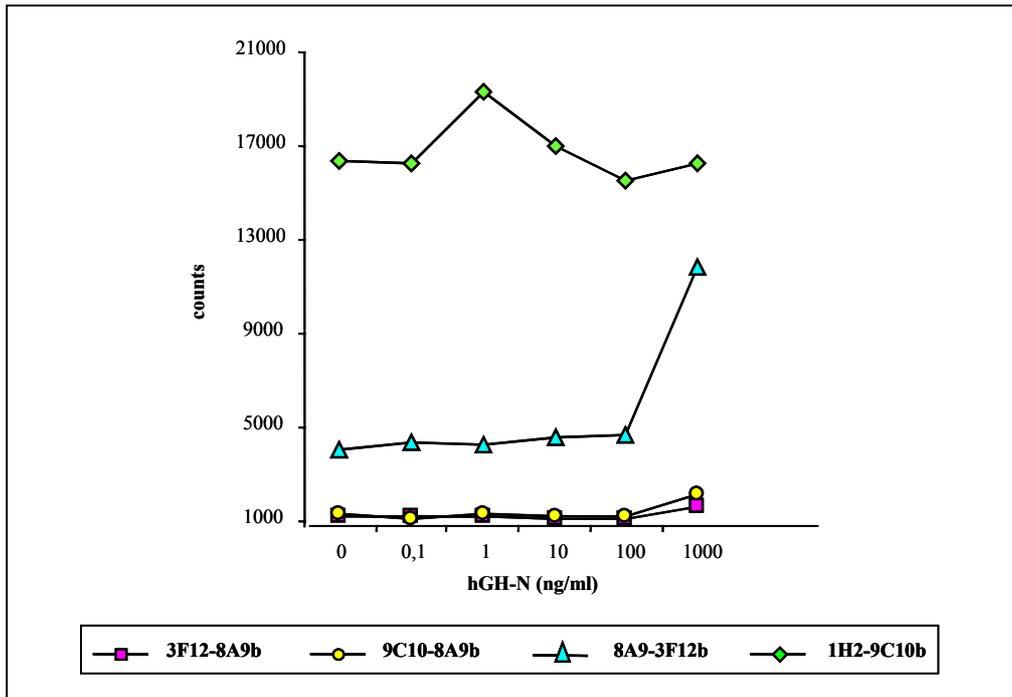
Um das Paar zu definieren, das am geeignetsten für einen hGH-V-IFMA ist, wurden die oben gewonnenen vier Kombinationen nun bezüglich ihrer Kreuzreaktion mit hGH-V, hGH-N und hPL untersucht. Ziel war es, das eine Paar zu selektieren, das bei niedrigem Hintergrundsignal keine Kreuzreaktivitäten aufweist und hochsensitiv hGH-V detektiert.

Um dieses zu bestimmen wurde jeder mAb mit 500 ng/w in 200 µl Phosphatpuffer auf einer Mikrotiterplatte über Nacht bei 4°C inkubiert, dreimal gewaschen und anschließend 175 µl Assaypuffer pro well vorgelegt. In diesen wurden dann 25 µl der einzelnen Standardverdünnungen von hGH-V, hGH-N und hPL pipettiert und bei RT zwei Stunden inkubiert. Es folgte ein dreifacher Waschschrift. Anschließend gab man 50 ng biotinylierten Antikörper in 200 µl Assaypuffer pro well zu und inkubierte wieder zwei Stunden bei RT. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit Stav-Eu-Lösung für eine halbe Stunde, sechsmaliges Waschen, Inkubation mit Enhancement-Lösung für 15 Minuten und dann die Messung mittels DELFIA®-Fluorometer.

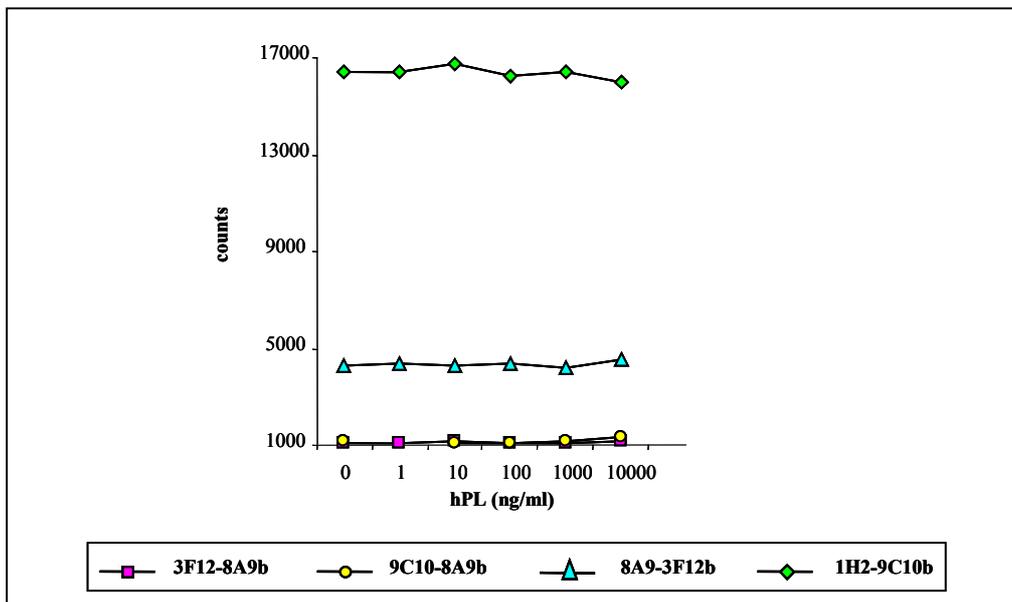
Die Abbildungen 12 bis 14 geben die Kreuzreaktion der Antikörperpaare mit hGH-V, hGH-N und hPL wieder:



**Abbildung 12:** hGH-V-Detektionsvergleich der mAb-Paare bezogen auf die hGH-V-Standardverdünnungen.



**Abbildung 13:** Kreuzreaktion der mAb-Paare mit hGH-N. Vergleichspunkte: hGH-N-Standardverdünungen.



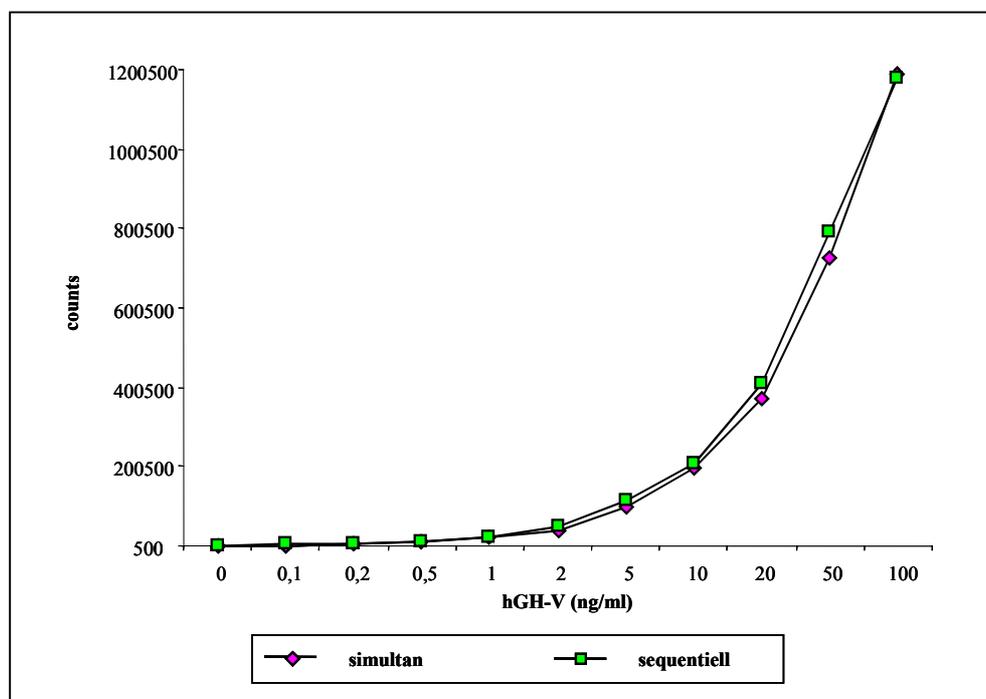
**Abbildung 14:** Kreuzreaktion der mAb-Paare mit hPL. Vergleichspunkte: hPL-Standardverdünungen.

Es ist erkennbar, dass sowohl 1H2-9C10-b, als auch 8A9-3F12-b ein höheres Hintergrundsignal aufweisen. Somit sind diese beiden Paare nicht für eine Messung von hGH-V im IFMA geeignet. Das Paar 9C10-8A9-b ist bezüglich Hintergrundsignal und Kreuzreaktionen mit der Kombination 3F12-8A9-b grob vergleichbar. Jedoch gestaltet sich das Verhältnis von

spezifischem hGH-V-Signal zu unspezifischem Signal im Assaypuffer für das Paar 3F12–8A9-b besser, im Vergleich zu dem Paar 9C10–8A9-b. Zudem ist in 9C10–8A9-b eine geringe Kreuzreaktion zu hGH-N erkennbar, die in 3F12–8A9-b nicht detektierbar ist und zu der Entscheidung führte, 3F12–8A9-b als mAb-Kombination für den IFMA zu verwenden.

#### 4.1.3.2 Optimierung der Inkubation

Um einen Assay zu vereinfachen oder einen Arbeitsschritt einzusparen, ist es möglich, den Standard bzw. die Serumproben mit dem Tracer simultan zu inkubieren. Auf der anderen Seite ist es aufgrund von spezifischem Bindungsverhalten der mAb gelegentlich von Vorteil, diese in getrennten, d. h. sequentiellen Schritten zu inkubieren. Für den mAb 8A9-b wurde nun ein Vergleich zwischen simultaner und sequentieller Inkubation vorgenommen. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden für die simultane Inkubation und zweimal zwei Stunden für die sequentielle Inkubation. In Abbildung 15 sind die Standardkurven im Vergleich dargestellt:

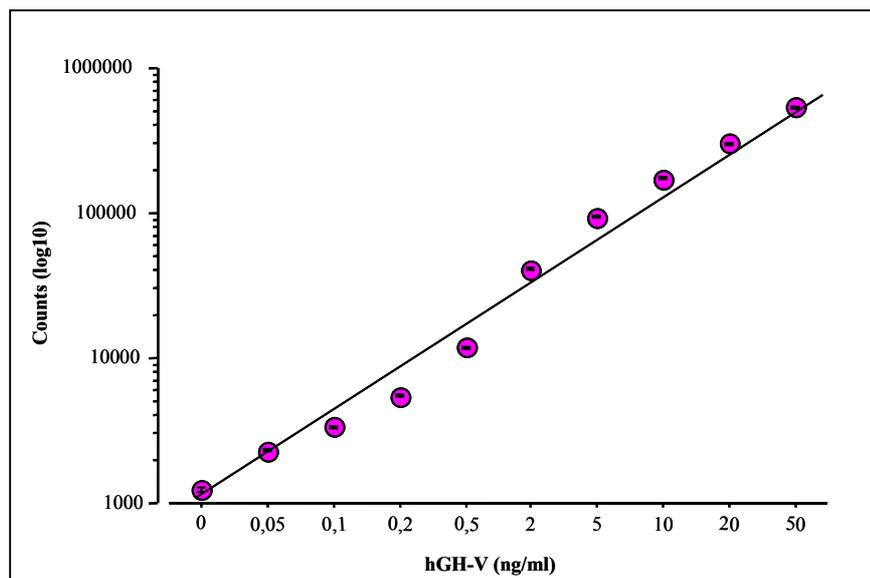


**Abbildung 15:** Simultane und sequentielle Inkubation des mAb-Paares 3F12–8A9-b zur Optimierung der Inkubationszeit.

Es ist deutlich zu erkennen, dass kein Unterschied zwischen einer simultanen und einer sequentiellen Inkubation besteht. Deshalb wurde eine simultane Inkubation von Standard bzw. Serumprobe mit dem Tracer 8A9-b über zwei Stunden in das Assayprotokoll übernommen.

#### 4.1.3.3 Optimierung der Standardkurve

Für die Herstellung der hGH-V-Standardkurve wurde das von Susan E. Kirk, MD, hergestellte rekombinante hGH-V verwendet (siehe Kapitel 3.1.2.3.1, S.35). Basierend auf einer Verdünnungsreihe wurden Standardpunkte von 0-0,05-0,1-0,2-0,5-(1)-2-5-10-20-50 ng/ml hGH-V in Schafserum erstellt. Der Standardpunkt 1 wurde der besseren Übersicht wegen (Reihe A & B der Mikrotiterplatte reserviert für Standardkurve und Kontrollen) aus der Standardkurve entfernt.



**Abbildung 16:** Standardkurve des hGH-V-IFMA. (Die Punkte entsprechen dem Mittelwert von acht Standardmessungen  $\pm$  1 Standardfehler pro Messzeitpunkt.)

#### 4.1.3.4 Protokoll des hGH-V-spezifischen immunofluorometrischen Assays

Unter Berücksichtigung der oben genannten Optimierungsversuche ergab sich ein Assayprotokoll, welches im Folgenden ausführlich beschrieben werden soll:

1. 500 ng/w des mAb 3F12 werden in 200 µl/w Phosphatpuffer, pH 9,6, in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert, mit einer selbstklebenden Folie verschlossen und bei 4°C für mindestens 12 Stunden gelagert.
2. Nun wird die Mikrotiterplatte dreimal mit dem Columbus-Plattenwascher gewaschen und anschließend auf Papiertüchern ausgeschlagen.
3. 50 ng/w des biotinylierten mAb 8A9 werden in 175 µl/w Assaypuffer in die Mikrotiterplatte pipettiert.
4. Je 25 µl/w Standard, Kontrollen und Serumproben werden zu dem Tracer mAb in die Mikrotiterplatte pipettiert.
5. Die Platten werden erneut mit Folie verschlossen und bei RT zwei Stunden inkubiert. Hierfür werden die Platten auf den DELFIA®-Plattenschüttler gestellt.
6. Die Mikrotiterplatten werden dreimal gewaschen. (siehe Nr. 2)
7. Für 200 µl/w Streptavidin-Europium wird 1 ml des in Glycerolpuffer gelagerten Streptavidin-Europiums in 20 ml Assaypuffer verdünnt, um eine Endkonzentration von 20 ng/well Streptavidin-Europium zu erreichen. Nach dem Pipettieren der 200 µl/w wird die Platte wieder mit Folie bedeckt und 30 Minuten bei RT auf dem DELFIA®-Plattenschüttler inkubiert.
8. Es folgt ein sechsfacher Waschschrift (siehe Nr. 2)
9. 200 µl/w TR-Fluoreszenz-Enhancement-Lösung werden mit Hilfe des 1296-041 DELFIA®-Plattendispenser auf die Mikrotiterplatten aufgetragen und 15 Minuten unverschlossen bei RT auf dem DELFIA®-Plattenschüttler inkubiert.
10. Messung des Signals durch zeitaufgelöste Immunofluoreszenz im DELFIA® – Fluorometer.

Die Bestimmung der hGH-V-Konzentration dauert mit diesem Ansatz etwa drei Stunden.

#### 4.1.3.5 Sensitivität und Messbereich

Die unterste Detektionsgrenze (lower limit of detection, LLD) ist der kleinste von 0 unterscheidbare Wert und wurde errechnet als Mittelwert aus der 20-fachen Bestimmung des hGH-V-Nullstandards minus zwei Standardabweichungen. Sie liegt für diesen Assay bei 0,01 ng/ml. Die unterste Grenze für die Quantifizierung (lower limit of quantification, LLQ) von hGH-V, definiert als der niedrigste Wert, der sich mit einer Intraassay-Varianz von weniger als 15% messen lässt, ist 0,02 ng/ml. Hierfür wurden Proben aus der frühen SS ausgewählt und 24-mal in ein und demselben Assay hGH-V bestimmt. Der Arbeitsbereich des hGH-V-IFMA lässt sich somit mit 0,02 bis 25 ng/ml angeben.

#### 4.1.3.6 Linearität und Wiederfindung

##### Linearität

Die Linearität des Messverfahrens wurde anhand von sechs Seren – gewonnen von unterschiedlichen Patientinnen während der SS – bestimmt, indem eine Verdünnungsreihe der Seren mit Schafserum erstellt wurde: In das Aliquot der Verdünnung 1:1 gab man 100 µl Schafserum und 100 µl der jeweiligen Probe und verdünnte dann bis 1:32 weiter. Die Messung der Konzentration in ng/ml erfolgte im IFMA. Die tatsächlich gemessenen Werte wurden mit den zu erwartenden Werten verglichen. Die Linearität wurde in Prozent von den zu erwartenden Werten errechnet.

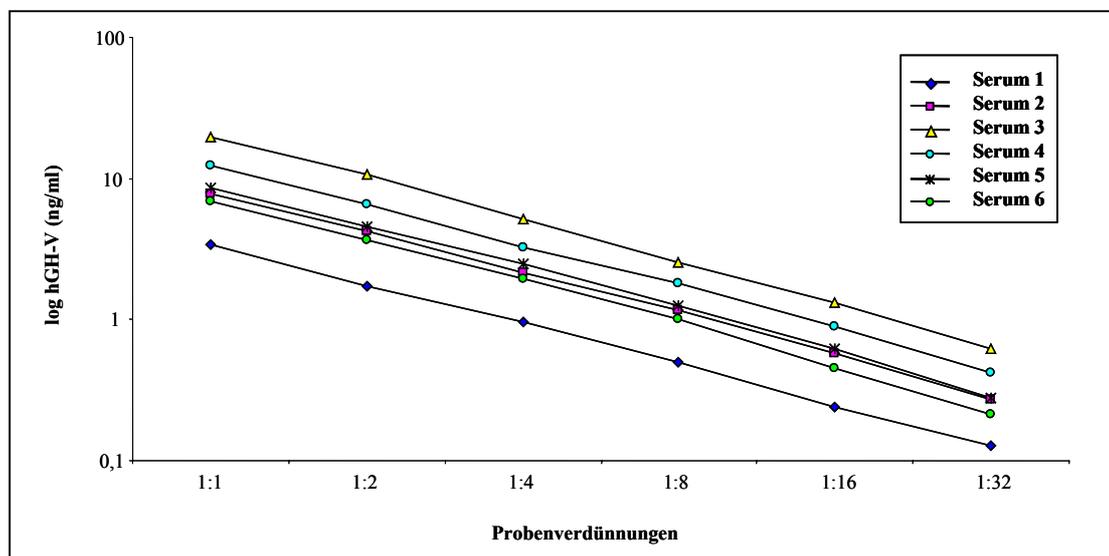
Aus den in Tabelle 7 gezeigten Serumverdünnungsreihen ergibt sich für den hGH-V-IFMA eine Linearität von  $109 \pm 7\%$ . Die lineare Regressionsanalyse ergibt einen Korrelationskoeffizienten von über 0,99. Dies verdeutlicht, dass der Assay eine gute Linearität innerhalb seines Messbereiches aufweist.

**Tabelle 7:** Linearität von sechs Serumverdünnungsreihen gemessen im hGH-V-IFMA. Die Verdünnung 1:1 wurde 100% gesetzt.

Verdünnung	Serum 1			Serum 2			Serum 3		
	gemessen (ng/ml)	erwartet (ng/ml)	% erwartet	gemessen (ng/ml)	erwartet (ng/ml)	% erwartet	gemessen (ng/ml)	erwartet (ng/ml)	% erwartet
<b>1:1</b>	3,376			7,865			19,654		
<b>1:2</b>	1,733	1,688	103	4,255	3,933	108	10,551	9,827	107
<b>1:4</b>	0,954	0,844	113	2,152	1,967	109	5,167	4,914	105
<b>1:8</b>	0,499	0,422	118	1,156	0,983	118	2,551	2,457	104
<b>1:16</b>	0,239	0,211	113	0,574	0,492	117	1,327	1,228	108
<b>1:32</b>	0,129	0,106	122	0,268	0,246	109	0,613	0,614	100
Mittel			112			110			104

Verdünnung	Serum 4			Serum 5			Serum 6		
	gemessen (ng/ml)	erwartet (ng/ml)	% erwartet	gemessen (ng/ml)	erwartet (ng/ml)	% erwartet	gemessen (ng/ml)	erwartet (ng/ml)	% erwartet
<b>1:1</b>	12,241			8,562			6,935		
<b>1:2</b>	6,492	6,492	106	4,601	4,601	107	3,701	3,701	107
<b>1:4</b>	3,236	3,236	106	2,495	2,495	117	1,952	1,952	113
<b>1:8</b>	1,786	1,786	117	1,265	1,265	118	0,998	0,998	115
<b>1:16</b>	0,901	0,901	118	0,622	0,622	116	0,451	0,451	104
<b>1:32</b>	0,415	0,415	108	0,277	0,277	104	0,215	0,215	99
Mittel			109			110			106



**Abbildung 17:** Linearität von sechs Serumproben in der Verdünnungsreihe gemessen im hGH-V-IFMA.

### Wiederfindung

Für die Wiederfindung wurden sechs Serumproben von schwangeren Patientinnen mit hGH-V-Standard inkubiert. 40 µl des hGH-V-Standards 0-0,2-1-5-10-50 ng/ml wurden mit 40 µl Serum versetzt. Die Messung der Konzentration erfolgte mittels IFMA. Die tatsächlich

gemessenen Werte wurden mit den zu erwartenden Werten – errechnet aus der Probenkonzentration Verdünnung mit Nullserum plus Standardkonzentration – verglichen. Die Wiederfindung wurde in Prozent von den zu erwartenden Werten errechnet.

Entsprechend der Tabelle 8 ergibt sich für den hGH-V-IFMA eine mittlere Wiederfindung von  $103 \pm 7 \%$ .

**Tabelle 8:** Wiederfindung von Serumanteilen in hGH-V-Standardpunkten. Die Verdünnung Serum mit Nullstandard wurde 100 % gesetzt.

hGH-V Standardver- dünnungen (ng/ml)	Serum 1 (2,886ng/ml)			Serum 2 (5,598 ng/ml)			Serum 3 (16,547 ng/ml)		
	gemessen (ng/ml)	erwartet (ng/ml)	% erwartet	gemessen (ng/ml)	erwartet (ng/ml)	% erwartet	gemessen (ng/ml)	erwartet (ng/ml)	% erwartet
<b>0</b>	1,539			3,709			9,308		
<b>0,2</b>	1,68	1,639	103	3,925	3,809	103	9,431	9,408	100
<b>1</b>	1,924	2,039	94	4,403	4,209	105	9,786	9,808	100
<b>5</b>	3,806	4,039	94	6,325	6,209	102	12,431	11,808	105
<b>10</b>	6,434	6,539	98	8,602	8,709	99	14,324	14,308	100
<b>50</b>	24,772	26,539	93	26,691	28,709	93	31,539	34,308	92
Mittel			96			100			99
hGH-V Standardver- dünnungen (ng/ml)	Serum 4 (9,369 ng/ml)			Serum 5 (6,325 ng/ml)			Serum 6 (5,299 ng/ml)		
	gemessen (ng/ml)	erwartet (ng/ml)	% erwartet	gemessen (ng/ml)	erwartet (ng/ml)	% erwartet	gemessen (ng/ml)	erwartet (ng/ml)	% erwartet
<b>0</b>	6,000			5,268			4,017		
<b>0,2</b>	6,364	6,100	104	5,609	5,368	104	4,212	4,117	102
<b>1</b>	7,328	6,500	113	5,894	5,768	102	4,659	4,517	103
<b>5</b>	8,925	8,500	105	8,678	7,768	112	7,275	6,211	117
<b>10</b>	11,382	11,000	103	10,611	10,268	103	10,286	9,017	114
<b>50</b>	30,432	31,000	98	33,981	30,268	112	33,579	29,017	116
Mittel			105			107			110

#### 4.1.3.7 Intra- und Interassayvarianz

Die Intra- und Interassayvarianz wurde bestimmt durch mehrfache Messung von Serumproben im gleichen Assayansatz (= Intraassayvarianz) oder in mehreren Assayansätzen an unterschiedlichen Tagen (= Interassayvarianz). Die Intraassay-Variationskoeffizienten waren 2,8% bzw. 4,0% für Seren mit den Konzentrationen von 5 ng/ml bzw. 0,5 ng/ml bei 20-facher Bestimmung. Die Interassay-Variationskoeffizienten lagen bei 5,5% bzw. 9,3% für Seren mit o. g. Konzentrationen, gemessen in acht aufeinander folgenden Assays.

#### 4.1.3.8 Einfrier- und Auftauzyklen

Um die Stabilität von hGH-V in Serumproben zu testen, wurden Einfrier-Auftauzyklen vorgenommen. Dafür wurden von sechs Seren schwangerer Patientinnen mit Konzentrationen von 0,5-5-10 ng/ml je acht Aliquots erstellt und nach einem festen Schema aufgetaut bzw. aufgetaut und wieder eingefroren:

Je ein Aliquot des Patientenserums – insgesamt vier – wurde 72, 48, 24 Stunden und direkt vor der Messung aufgetaut und bei RT gelagert. Die restlichen vier Aliquots wurden stufenweise täglich für zwei Stunden aufgetaut und anschließend wieder eingefroren. Mit dieser Reihe wurde vier Tage vor der Messung begonnen, täglich kam ein weiteres Aliquot dazu.

Die Messung der Aliquots ergab, dass es zu keiner signifikanten Veränderung der hGH-V-Konzentration durch das unterschiedliche Ein- und Auffrieren kam. Dennoch lässt sich aus dem Test schließen, dass eine geringe Auftauffrequenz für die Proben von Vorteil ist.

#### 4.1.3.9 Spezifität des hGH-V-spezifischen immunofluorometrischen Assays

Um eine mögliche Beeinflussung durch hGH-N und hPL in diesem Assay zu untersuchen, wurden Serumproben schwangerer Patientinnen mit rekombinantem hGH-N (0,1-1-10-100 ng/ml) und hPL (1-10-100-1.000-10.000 ng/ml) 1:1 verdünnt. Nach einer Über-Nacht-Inkubation im Kühlschrank wurden die einzelnen Verdünnungen im hGH-V-IFMA gemessen. Hier zeigte sich selbst bei höchsten Konzentrationen von zugegebenem hGH-N bzw. hPL keine Beeinträchtigung der hGH-V-Konzentration.

Der hGH-V-IFMA stellt somit einen für hGH-V hochspezifischen Assay dar.

#### 4.1.3.10 Interferenz von hGHBP

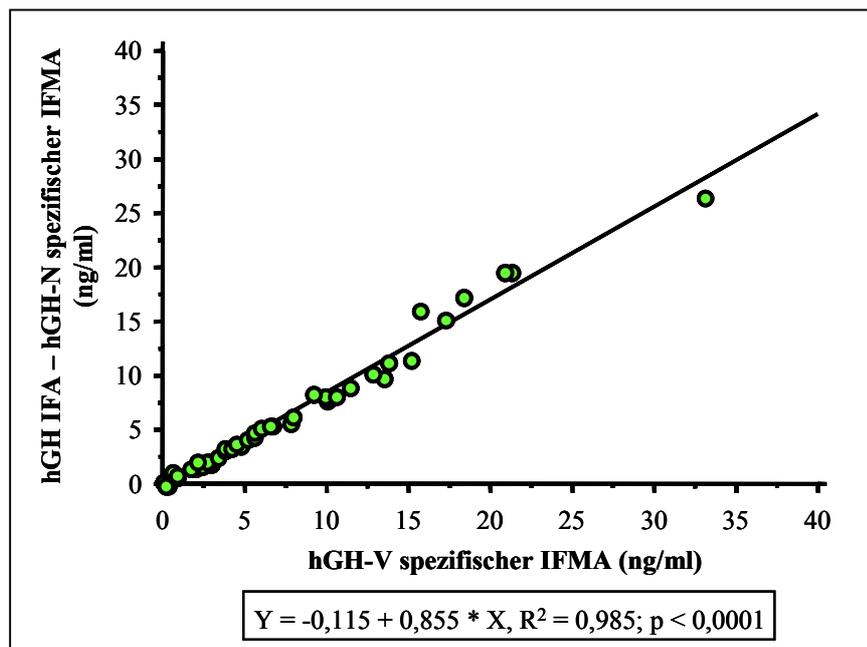
Da hGHBP in vielen Assays die Messung von hGH-N beeinflusst und Bindungsproteine in ihrer Konzentration während der SS häufig variieren, wurde untersucht, wie anfällig der hGH-V-spezifische IFMA auf die Zugabe von rhGHBP reagiert. Drei Serumproben mit Konzentrationen von 0,5, 5 und 10 ng/ml, die mit rhGHBP unterschiedlicher Konzentrationen (1.000-2.000-5.000-10.000-20.000 pM) versetzt waren, wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

Diese Zeit wird benötigt, um hGH-V – rhGHBP-Komplexe auszubilden. Die anschließende Messung ergab keine Beeinflussung der hGH-V-Konzentration bis 20.000 pM rhGHBP, was deutlich oberhalb der normalen Serumkonzentrationen liegt.

#### 4.1.4 Vergleich des hGH-V-spezifischen immunofluorometrischen Assays mit einem Subtraktionsverfahren

Bevor spezifische mAb für die Messung von hGH-V verfügbar waren, bediente man sich des Subtraktionsverfahrens, um hGH-V zu quantifizieren. Hierzu verwendete man einen Assay, der gleichermaßen hGH-N und hGH-V misst, und einen hGH-N-spezifischen Assay. Die Differenz aus beiden ergab schließlich eine Schätzung der aktuellen hGH-V-Konzentration im Serum.

Für diesen Messansatz wurde der hGH-IFA, welcher gleichermaßen hGH-N und hGH-V misst, zusammen mit dem hGH-N-spezifischen IFMA – wie oben beschrieben (siehe Kapitel 3.1.2.1.1 und 3.1.2.1.2, S.33) – genutzt. Der Vergleich der Ergebnisse zwischen der indirekten Methode und dem hGH-V-spezifischen IFMA zeigt eine enge Korrelation ( $R^2 = 0,99$ ;  $p < 0,0001$ ), allerdings ergab die Subtraktionsmethode, deren beide Messverfahren mit hGH-N kalibriert waren, im Mittel 15% niedrigere Messergebnisse.

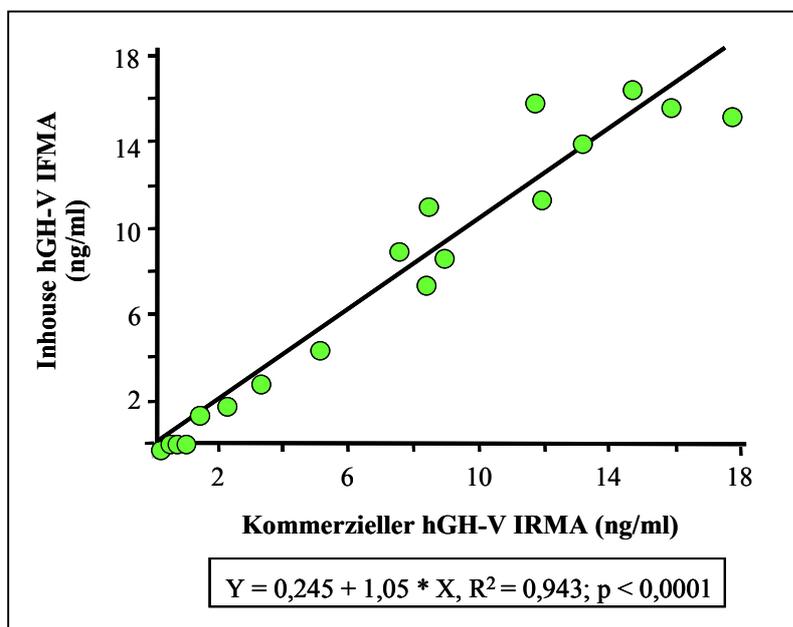


**Abbildung 18:** Vergleich des Subtraktionsverfahrens mit dem hGH-V-spezifischen IFMA.

#### 4.1.5 Vergleich: inhouse hGH-V-spezifischer immunofluorometrischer Assay mit kommerziell erhältlichem immunoradiometrischen Assay für hGH-V

Da alle bisher publizierten Daten auf dem kommerziell erhältlichen hGH-V-IRMA beruhen, verglichen wir diesen mit dem von uns entwickelten Assay (siehe Kapitel 3.1.2.2, S.34). Hierfür wurde in Patientinnenproben hGH-V gemessen.

Trotz der unterschiedlichen Assaykalibratoren zeigten beide Assays zumindest in dem Messbereich, in dem beide sicher hGH-V quantifizieren können, eine große Übereinstimmung ( $R^2 = 0,943$ ;  $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 19:** Vergleich des kommerziellen hGH-V-IRMA mit dem inhouse hGH-V-IFMA.

Dennoch ist die Sensitivität des kommerziellen hGH-V-IRMA mit 0,2 ng/ml deutlich niedriger als die des hGH-V-IFMA mit 0,02 ng/ml.

## **4.2 Klinischer Teil**

### **4.2.1 Studie: Plazentares Wachstumshormon und Glukosestoffwechsel**

#### **4.2.1.1 Morphologische Daten**

An der Studie „Plazentares Wachstumshormon und Glukosestoffwechsel“ nahmen 139 Patientinnen teil. 69 Patientinnen ohne Glukosestoffwechselstörung (NORM), 27 Patientinnen mit Diabetes mellitus Typ I (DM I) und 43 Patientinnen, die in der Schwangerschaft einen Gestationsdiabetes (GDM) entwickelten. Die Patientinnen waren im Durchschnitt  $32 \pm 5$  Jahre alt,  $167 \pm 6$  cm groß und hatten einen BMI von  $24 \pm 5$  kg/m<sup>2</sup> vor der Schwangerschaft. Die durchschnittliche Gewichtszunahme lag bei  $15 \pm 6$  kg. Unter den 139 Entbindungen war eine Totgeburt in der 31. SSW bei Nabelschnurumschlingung aus dem Vergleichskollektiv sowie 8 Frühgeburten zwischen der 34. und 37. SSW. Im Mittel lag die Geburt in der  $40. \pm 2$ . SSW. Das Geschlechtsverhältnis war bei 63 Mädchen zu 71 Knaben ausgeglichen. In 5 Fällen ist kein Geschlecht bekannt, da die Geburt außerhalb des Zentrums erfolgte und die Patientinnen post partum für eine Nachbefragung nicht zu ermitteln waren. Das Geburtsgewicht der Kinder war im Durchschnitt  $3370 \pm 520$  g, das Plazentagewicht  $615 \pm 150$  g.

Tabellen 9 und 10 zeigen eine Zusammenstellung der morphologischen Daten der Patientinnen, getrennt nach Gruppe einschließlich Daten der Kinder, Plazenta und Aussagen zum Geburtsmodus.

Besonders ist auf den signifikanten Unterschied zwischen dem Plazentagewicht der Patientinnen mit GDM ( $673 \pm 192$  g) versus dem Normalkollektiv (NORM,  $563 \pm 100$  g) hinzuweisen ( $p = 0,035$ ).

**Tabelle 9:** Maternale und fetale morphologische Daten der Studie: Plazentares Wachstumshormon und Glukosestoffwechsel unterschieden zwischen den drei Gruppen: NORM – Normalkollektiv (= Kontrollgruppe), GDM – Patientinnen mit Gestationsdiabetes, DM I – Patientinnen mit Diabetes mellitus Typ I.

	NORM* n = 69		GDM* n = 43		DM I* n = 27	
<b>Alter (Jahren)</b>	31 ± 6	(20 – 42)	32 ± 5	(22 – 43)	32 ± 4	(22 – 40)
<b>Körpergröße (cm)</b>	167 ± 6	(156 – 184)	166 ± 6	(145 – 178)	168 ± 4	(155 – 177)
<b>BMI vor SS (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23 ± 4	(18 – 40)	26 ± 5	(18 – 42)	24 ± 3	(20 – 30)
<b>Gewichtszunahme (kg)</b>	16 ± 6	(6 – 33)	12 ± 6	(5 – 23)	17 ± 5	(8 – 30)
<b>Geburt in SSW</b>	40 ± 2	(31 – 43)	40 ± 1	(38 – 42)	39 ± 2	(35 – 42)
<b>Geburtsgewicht (g)</b>	3282 ± 555	(1425 – 4315)	3443 ± 487	(2160 – 4450)	3484 ± 440	(2810 – 4420)
<b>Geburtsgröße (cm)</b>	51 ± 3	(44 – 56)	52 ± 3	(45 – 56)	52 ± 3	(47 – 57)
<b>Kopfumfang (cm)</b>	35 ± 2	(28 – 38)	35 ± 1	(32 – 38)	35 ± 1	(33 – 38)
<b>Plazentagewicht (g)</b>	563 ± 100	(410 – 750)	673 ± 192♦	(380 – 1200)	608 ± 130	(340 – 790)

\* dargestellt sind jeweils Mittelwerte ± SD und der Bereich.

♦ kennzeichnet den signifikanten Unterschied zwischen NORM und GDM (p = 0,035).

**Tabelle 10:** Geschlechtsverhältnis, fetale Hypoglykämie und Geburtsmodi in der Studie: Plazentares Wachstumshormon und Glukosestoffwechsel unterschieden zwischen den drei Gruppen: NORM – Normalkollektiv (= Kontrollgruppe), GDM – Patientinnen mit Gestationsdiabetes, DM I – Patientinnen mit Diabetes mellitus Typ I.

	NORM n = 69	GDM n = 43	DM I n = 27
<b>Geschlecht (n)</b> weiblich	31	23	9
männlich	35	18	18
nicht bekannt	3	2	0
<b>Kindliche Hypoglykämie nach Geburt (%)</b>	10	47	81
<b>Entbindungsmodus (%)</b>			
Spontangeburt	51	51	41
Sectio caesarea	29	30	52
Vakuumextraktion	13	12	7
Forceps	1	2	0
nicht bekannt	6	5	0
<b>Frühgeburt (%)</b>	7	0	11
<b>Totgeburt (%)</b>	1	0	0

Um sicher zu stellen, dass keine der Patientinnen im Vergleichskollektiv eine pathologische Glukosetoleranz hat, wurde bei diesen Patientinnen ein GCT vorgenommen. Da zum Zeitpunkt der Studie der GCT an der I. UFK München erst eingeführt wurde, konnte dieser aus logistischen Gründen nicht bei allen Patientinnen durchgeführt werden.

5 der 40 Patientinnen zeigten einen pathologischen Test mit Blutzuckerwerten > 140 mg/dl eine Stunde postprandial. Bei dem nachfolgenden OGTT lies sich in 4 Fällen ein GDM bestätigen. Der GCT einer Patientin war falsch positiv. Zwei weitere Patientinnen entwickelten trotz negativem GCT im weiteren SS-Verlauf einen GDM. Die pathologische Glukosetoleranz manifestierte sich zwischen der 14. und 35. SSW.

Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse der GCT im Überblick.

**Tabelle 11:** GCT zum Screening für GDM. Vergleich zwischen dem Normalkollektiv (NORM) und den Patientinnen mit GDM. Ein Test war falsch positiv (146 mg/dl), zwei Test waren falsch negativ.

	<b>NORM</b> n = 34	<b>GDM</b> n = 6
<b>Glukose (mg/dl)</b>		
<b>60 min postprandial*</b>	116 ± 18 (74 – 146)	155 ± 29 (115 – 190)
<b>Zeitpunkt des GCT (SSW)</b>	31 ± 4	29 ± 1

\* dargestellt sind jeweils Mittelwerte ± SD und der Bereich.

Um die Diagnose eines GDM stellen zu können muss ein pathologischer OGTT (siehe Kapitel 1.3.3, S.19ff.) vorliegen. Im folgenden eine Übersicht über die in der Gruppe GDM ermittelten Glukosekonzentrationen während des OGTT:

**Tabelle 12:** OGTT zum Ausschluss bzw. zur Bestätigung einer pathologischen Glukosetoleranz bzw. eines GDM. Vergleich zwischen dem Normalkollektiv (NORM) und den Patientinnen mit GDM. (p.p. post prandial)

	<b>NORM</b> n = 7		<b>GDM</b> n = 32	
<b>Glukose (mg/dl)*</b>				
nüchtern	77 ± 5	(70 – 83)	89 ± 11	(70 – 115)
60 min postprandial	125 ± 27	(81 – 156)	201 ± 22	(165 – 267)
120 min postprandial	92 ± 24	(50 – 127)	147 ± 30	(84 – 210)
<b>Zeitpunkt des OGTT (SSW)</b>	27 ± 7		29 ± 5	

\* dargestellt sind jeweils Mittelwerte ± SD und der Bereich.

Bei 21 Patientinnen reichte eine kohlenhydratarme Diät aus, um die BZ-Werte im normoglykämischen Bereich zu halten. 22 Patientinnen mussten im Verlauf der SS auf eine Insulin-Therapie mit Alt-Insulin, teilweise zusätzlich Verzögerungsinsulin, umgestellt werden. Dies erfolgte im Mittel in der 31. SSW.

Die 27 Patientinnen mit DM I gliedern sich auf in 9 Patientinnen mit einer Diabetesdauer < 10 Jahren (White B; siehe Kapitel 1.3, S.16), 9 Patientinnen mit einer Diabetesdauer von 10–19 Jahren (White C) und 7 Patientinnen mit Diabetes seit > 20 Jahren (White D). Eine Patientin war an MODY (maturity onset diabetes of the young) erkrankt. Alle Patientinnen waren bereits vor der SS mit Insulin behandelt: 17 Patientinnen mittels Insulinpumpe, 5 Patientinnen mit Hilfe eines Insulinpens, bei 5 Patientinnen fehlen die Angaben. Der HbA1c-Wert vor der SS lag im Mittel bei  $7,0 \pm 1,3\%$ .

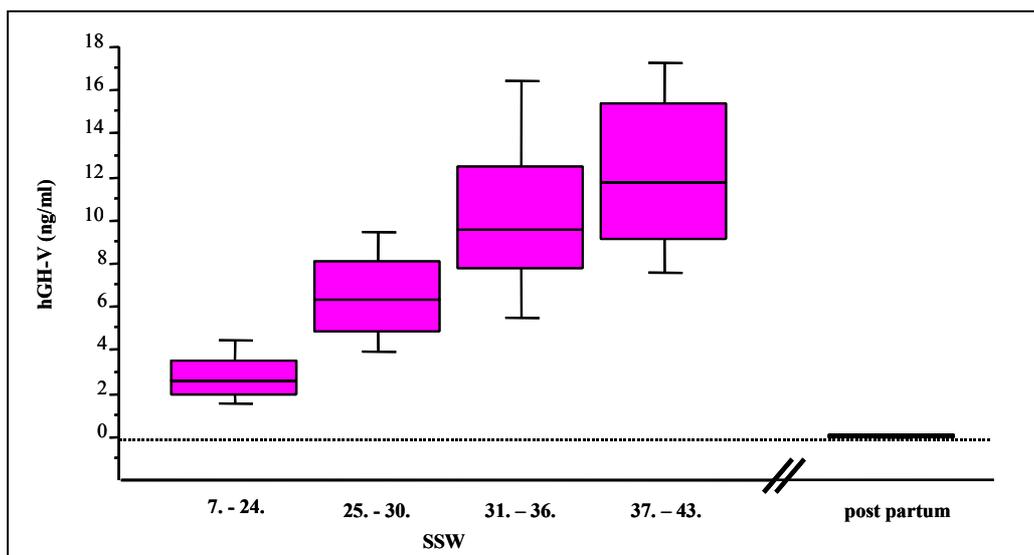
#### 4.2.1.2 Sekretion von hGH-V in normalen Schwangerschaften

Nach Einschluss in die Studie wurde allen Patientinnen in vier-wöchentlichen Abständen Blut entnommen, das für die Bestimmung von hGH-V verwendet wurde. Um die Konzentrationsänderungen während der SS besser beschreiben zu können, wurde die SS in vier Abschnitte eingeteilt: SSW 1–24, SSW 25–30, SSW 31–36, SSW 37–43. Dieser Einteilung liegt die Feststellung bereits veröffentlichter Studien zu Grunde, dass hGH-V kontinuierlich ausgeschüttet wird, zwischen der 25.–30. SSW einen deutlichen Anstieg zeigt und sich dann

bis zur Geburt plateauartig hält, um anschließend rasch abzufallen (Alsat E et al. 1997). Wies eine Patientin mehr als eine Serumprobe in einem der oben genannten Zeiträume auf, wurde der Mittelwert aus den Konzentrationen pro Zeitraum gebildet und für den Vergleich verwendet.

#### 4.2.1.2.1 hGH-V-Konzentrationen im Verlauf der Schwangerschaft

Im Normalkollektiv wurde zwischen der 7. und 43. SSW hGH-V im Serum bestimmt. Bis auf wenige Ausnahmen zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg der hGH-V-Konzentration bis zur Geburt. Bereits einen Tag nach der Entbindung war bei nahezu allen Patientinnen kein hGH-V mehr im Serum nachweisbar:



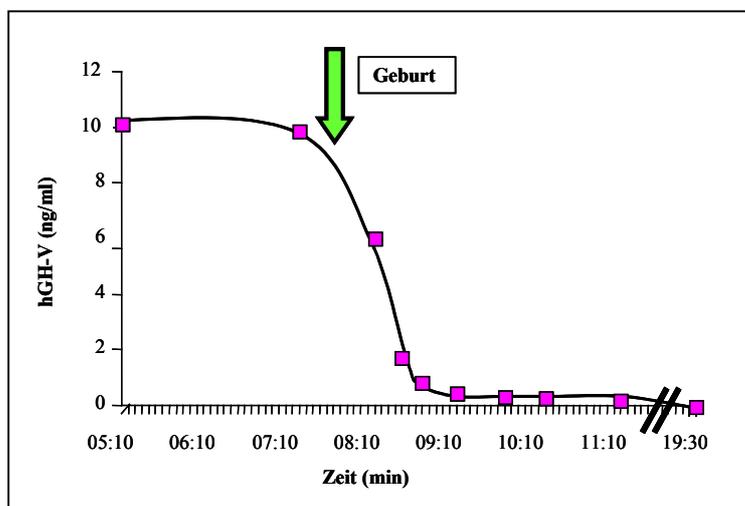
**Abbildung 20:** Mittlere hGH-V-Konzentrationen des Normalkollektivs während der SS – eingeteilt in fünf Zeiträume.

Die mittlere hGH-V-Konzentration betrug  $2,8 \pm 1,2$  ng/ml zwischen der 7.–24. SSW,  $6,6 \pm 2,4$  ng/ml zwischen der 25.–30. SSW,  $10,9 \pm 5,5$  ng/ml in den SSW 31.–36. und  $13,9 \pm 10,3$  ng/ml zwischen der 37.–43. SSW. Bei der postpartalen Blutentnahme einen Tag nach Entbindung lag die mittlere hGH-V-Konzentration bei  $0,07 \pm 0,09$  ng/ml.

Von insgesamt 26 postpartal gewonnenen Proben war hGH-V bei 17 Patientinnen am ersten postpartalen Tag nicht messbar, bei den 9 Patientinnen mit noch gering messbaren hGH-V-Konzentrationen lag die Geburt nur wenige Stunden zurück.

#### 4.2.1.2.2 Peripartale Kinetik

Um den Verlauf der hGH-V-Konzentration unter der Geburt zu beurteilen, wurden bei zwei Patientinnen des Normalkollektivs in engen Zeitabständen um die Geburt Blutproben gewonnen. Es zeigte sich eine rasche Elimination von hGH-V direkt nach Lösung der Plazenta, so dass bereits zwei Stunden nach der Entbindung kaum noch hGH-V im maternalen Serum nachweisbar war. Abbildung 21 zeigt die Kinetik von hGH-V unter der Geburt am Beispiel einer Patientin des Normalkollektivs:



**Abbildung 21:** Eliminationskinetik von hGH-V unter der Geburt am Beispiel einer Patientin.

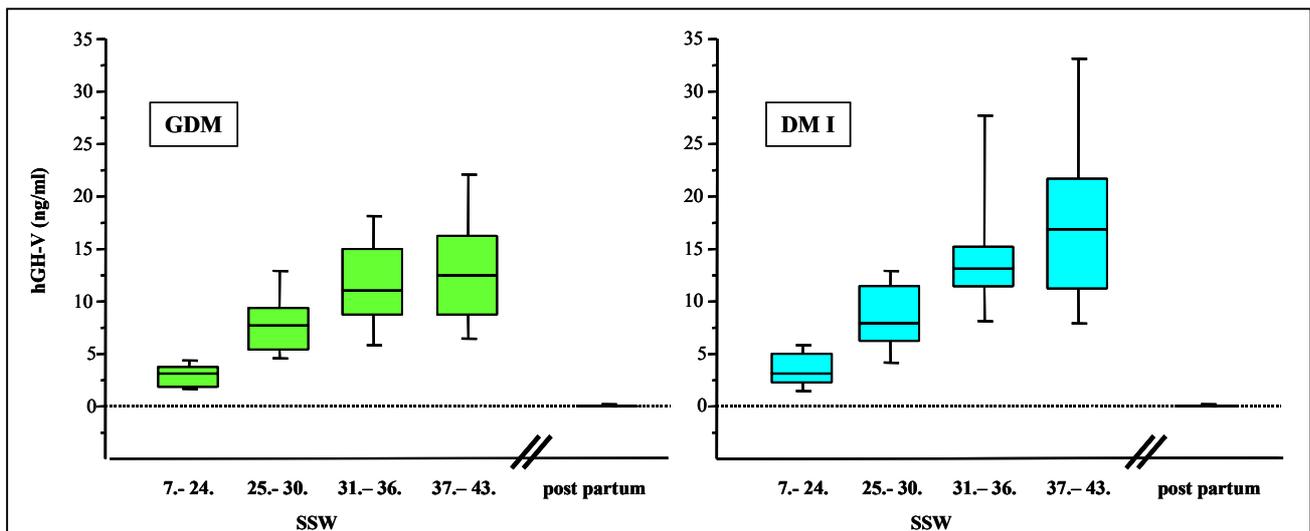
In Übereinstimmung mit der Literatur (Lonberg U et al. 2003) ergibt sich eine Halbwertszeit von 15 Minuten anhand der hier erhobenen Eliminationskinetik. Dies ist mit der Eliminationskinetik von hGH-N vergleichbar (Veldhuis JD et al. 2002).

#### 4.2.1.3 hGH-V-Konzentrationen in Schwangerschaften mit Glukosestoffwechselstörungen

In der Gruppe der GDM wurde Serum ab der 12. SSW bis einschließlich 42. SSW gesammelt und der hGH-V-Bestimmung zugeführt. Patientinnen mit DM I waren bereits ab der Früh-SS in Betreuung, daher war hier eine Probengewinnung bereits ab der 7. SSW bis zur 42. SSW möglich. Für die Einteilung von hGH-V in der SS gelten für die Patientinnengruppen DM I

und GDM dieselben SSW-Zeitintervalle wie für das Normalkollektiv (siehe Kapitel 4.2.1.2, S.71).

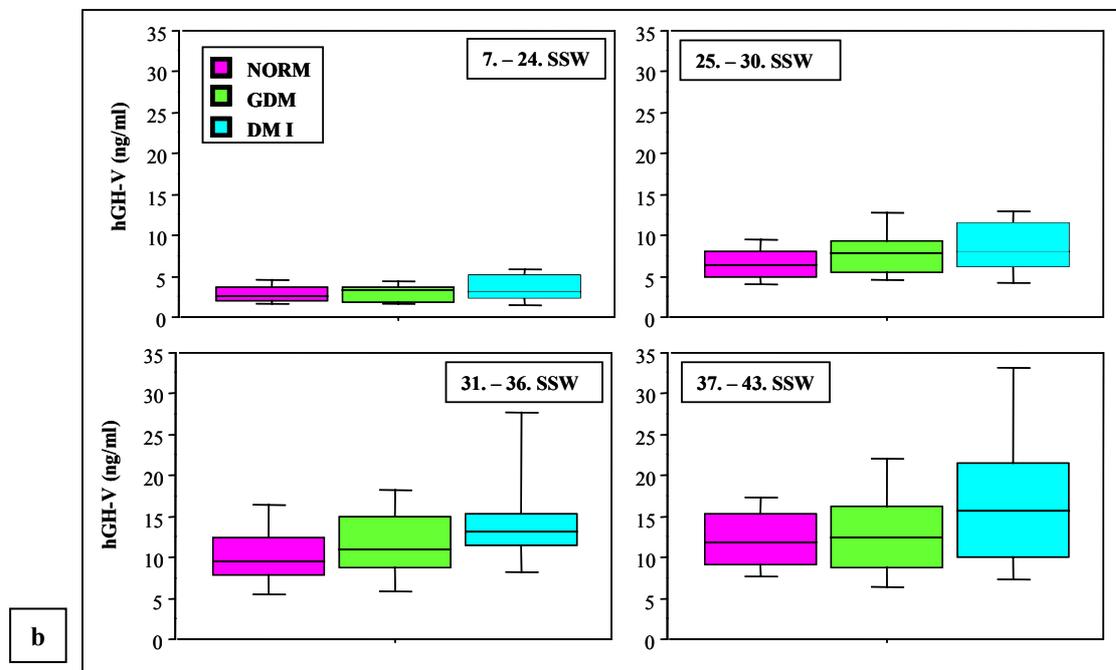
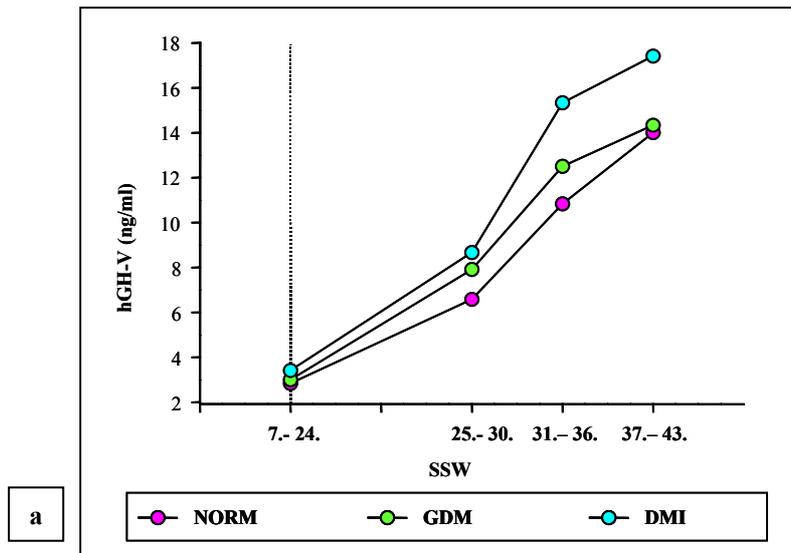
Abbildung 22 zeigt die hGH-V-Konzentrationen während der SS bei Patientinnen mit DM I und GDM:



**Abbildung 22:** Mittlere hGH-V-Konzentrationen von Patientinnen mit Glukosestoffwechselstörungen während der SS – eingeteilt in fünf Zeiträume.

Zwischen der 7.–24. SSW betrug die mittlere hGH-V-Konzentration  $3,0 \pm 1,1$  ng/ml (GDM) versus  $3,4 \pm 1,7$  ng/ml (DM I), zwischen der 25.–30. SSW  $7,9 \pm 2,9$  ng/ml (GDM) versus  $8,6 \pm 3,6$  ng/ml (DM I), in den 31.–36. SSW  $12,5 \pm 6,3$  ng/ml (GDM) versus  $15,3 \pm 8,2$  ng/ml (DM I) und  $14,3 \pm 9,4$  ng/ml (GDM) versus  $17,4 \pm 8,4$  ng/ml (DM I) zwischen der 37.–42. SSW. Bei der postpartalen Blutentnahme einen Tag nach Entbindung lag die mittlere hGH-V-Konzentration bei  $0,04 \pm 0,1$  ng/ml (GDM) versus  $0,04 \pm 0,04$  ng/ml (DM I). Von den hier insgesamt 48 postpartal gewonnenen Proben war hGH-V bei 38 Patientinnen am ersten postpartalen Tag nicht messbar, bei den 10 Patientinnen mit noch gering messbaren hGH-V-Konzentrationen lag die Geburt nur wenige Stunden zurück.

Vergleicht man nun die Gruppen bezüglich ihrer hGH-V-Konzentrationen pro Zeitraum mittels Varianzanalyse, ist festzustellen, dass kein signifikanter Gruppenunterschied besteht ( $p = 0,0919$ ).



**Abbildung 23:** Vergleich der mittleren hGH-V-Konzentrationen der drei Vergleichsgruppen zu fest definierten Zeitintervallen in der SS ( $p = n.s.$ ). (NORM – Normalkollektiv, GDM – Patientinnen mit Gestationsdiabetes, DM I – Patientinnen mit Diabetes mellitus Typ I)

**a** bezogen auf den Mittelwert der hGH-V-Konzentration im Laufe der SS

**b** bezogen auf die mittlere hGH-V-Konzentration pro Zeiteinheit

Bei einem Trend hin zu höheren hGH-V-Konzentrationen in der GDM- und vor allem in der DM I-Gruppe ist die fehlende Signifikanz am ehesten auf die geringe Fallzahl in den Gruppen GDM und DM I zurückzuführen.

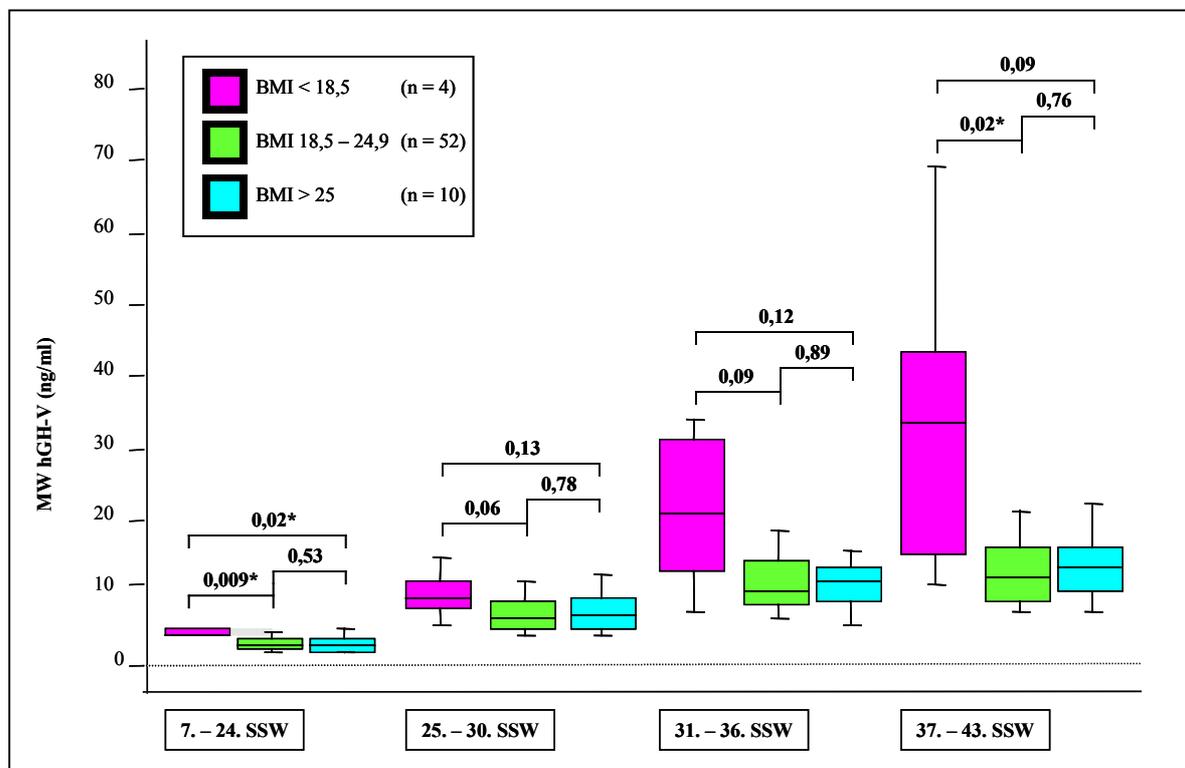
#### 4.2.1.4 Beeinflussung der hGH-V-Konzentration durch den Body Mass Index (BMI) vor der Schwangerschaft

Um zu untersuchen, wie weit die hGH-V-Sekretion vom BMI beeinflusst ist, wurde der BMI vor der SS (Ausgangs-BMI) errechnet. Dieser wurde anschließend in 3 Untergruppen unterteilt:

BMI < 18,5 kg/m <sup>2</sup>	untergewichtig
BMI 18,5 – 24,9	normalgewichtig
BMI > 25,0	übergewichtig

##### 4.2.1.4.1 hGH-V-Konzentration und Body Mass Index vor der Schwangerschaft im Normalkollektiv

Ausgehend von der oben beschriebenen Einteilung wurde innerhalb des Normalkollektivs untersucht, ob der BMI vor der SS einen Einfluss auf die hGH-V-Sekretion in der SS hat. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt:



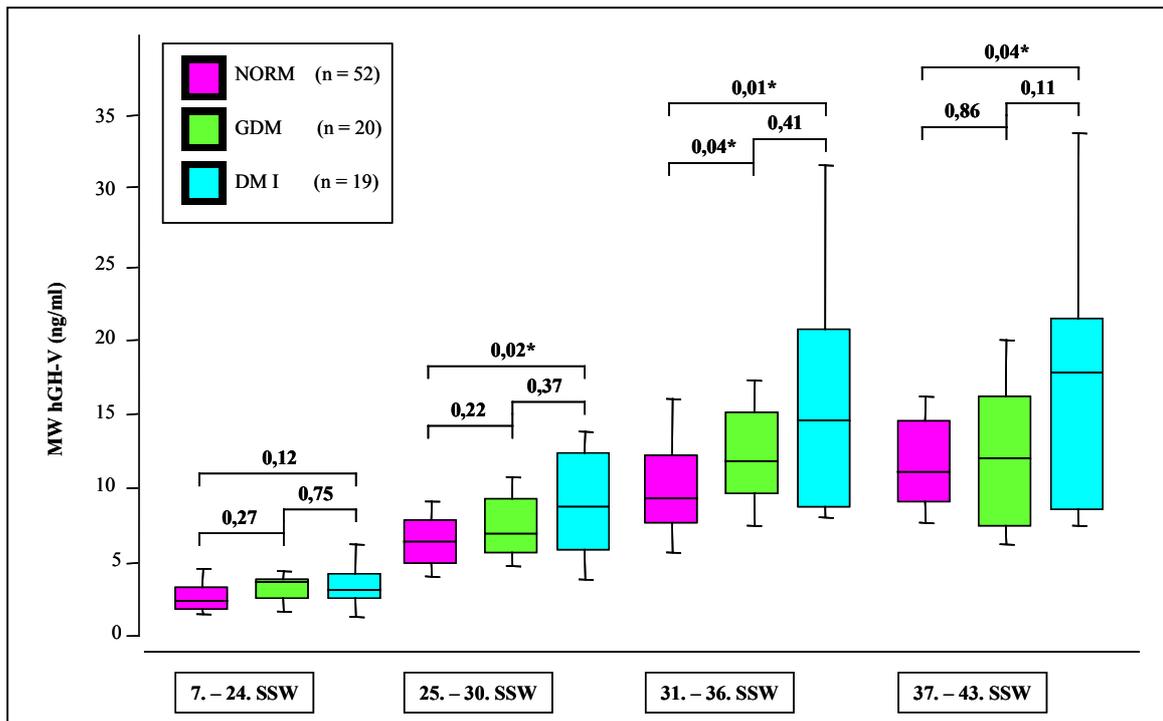
**Abbildung 24:** Vergleich der mittleren hGH-V-Konzentration im Normalkollektiv zu fest definierten Zeitpunkten in der SS, unterteilt nach dem BMI vor der SS. Der Zahlenwert entspricht dem p-Wert errechnet nach Mann-Whitney U; \* ist angegeben, wenn p signifikant ist ( $p < 0,05$ ).

Aus der Darstellung wird ersichtlich, dass die maternale hGH-V-Konzentration sich invers proportional zu dem BMI vor der SS verhält. Die Varianzanalyse ergibt einen Einfluss sowohl des Gestationsalters ( $p < 0,0001$ ) als auch des BMI ( $p = 0,011$ ) auf die hGH-V-Konzentration. Die Konzentration von hGH-V in untergewichtigen Patientinnen ( $n=4$ ) war signifikant höher als die der normal- ( $n = 52$ ;  $p = 0,014$ ) und übergewichtigen Patientinnen ( $n = 10$ ;  $p = 0,018$ ), während sich die übergewichtigen Frauen in der hGH-V-Sekretion nicht vom Normalkollektiv unterscheiden ( $p = 0,70$ ).

Untergewichtige Patientinnen hatten einen BMI vor der SS von im Mittel  $18,1 \pm 0,3 \text{ kg/m}^2$ , Normalgewichtige von  $21,3 \pm 1,7 \text{ kg/m}^2$  und übergewichtige Patientinnen von  $30,5 \pm 4,8 \text{ kg/m}^2$ . Die mittlere hGH-V-Konzentration war zwischen der 7.–24. SSW  $4,5 \pm 1,0 \text{ ng/ml}$  (untergewichtig) versus  $2,7 \pm 1,1 \text{ ng/ml}$  (normalgewichtig), zwischen der 25.–30. SSW  $9,9 \pm 3,9 \text{ ng/ml}$  (untergewichtig) versus  $6,4 \pm 2,0 \text{ ng/ml}$  (normalgewichtig), in den 31.–36. SSW  $21,5 \pm 12,7 \text{ ng/ml}$  (untergewichtig) versus  $10,2 \pm 3,8 \text{ ng/ml}$  (normalgewichtig) und 37.–43. SSW. Die hGH-V-Konzentrationen der übergewichtigen Patientinnen unterschieden sich nur unwesentlich von denen der normalgewichtigen Frauen.

#### 4.2.1.4.2 hGH-V-Konzentration normalgewichtiger Patientinnen im Gruppenvergleich

Da die unter Kapitel 4.2.1.4.1 (S.76f.) beschriebenen Ergebnisse eine Beeinflussung der hGH-V-Ausschüttung durch den BMI vor der SS zeigen, liegt es nahe, die Daten BMI-korrigiert zu betrachten. Dies wurde erreicht, indem – ausgehend vom BMI vor der SS – ausschließlich die normalgewichtigen Personen im Gruppenvergleich betrachtet wurden:



**Abbildung 25:** Vergleich der mittleren hGH-V-Konzentration unter normalgewichtigen Personen (BMI 18,5–24,9 kg/m<sup>2</sup>) der einzelnen Gruppen zu fest definierten Zeitpunkten in der SS. Der Zahlenwert entspricht dem p-Wert errechnet nach Mann-Whitney U; \* ist angegeben, wenn p signifikant ist (p < 0,05).

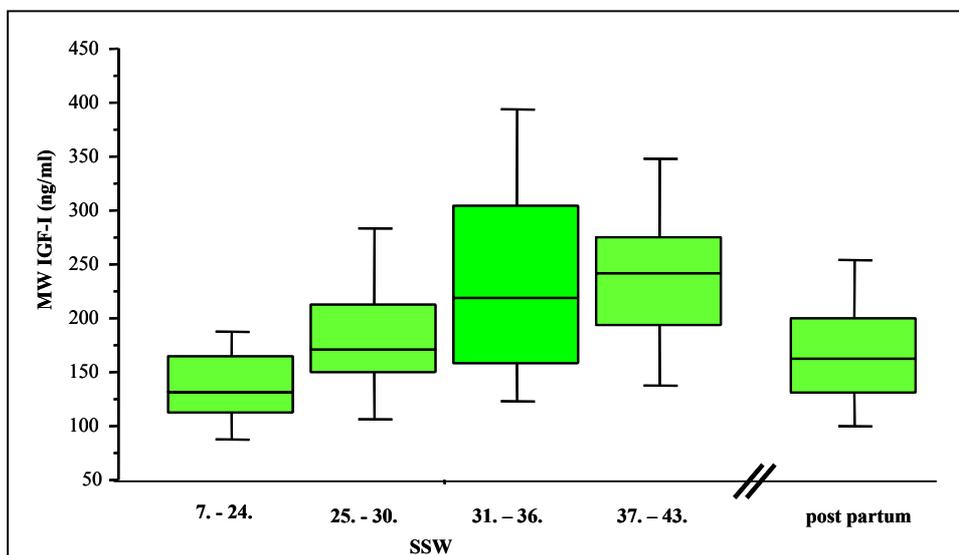
Die Abbildung 25 zeigt einen signifikanten Unterschied in der mittleren hGH-V-Konzentration zwischen den normalgewichtigen Patientinnen der Normalgruppe (n = 52) und den Patientinnen mit DM I (n = 19) in 3 von 4 Zeitintervallen, errechnet mittels Mann-Whitney-U-Test: Zeitintervall 25.–30. SSW p = 0,02, Zeitintervall 31.–36. SSW p = 0,01, Zeitintervall 37.–43. SSW p = 0,04. Der Vergleich zwischen Normalkollektiv und Patientinnen mit GDM (n = 20) erreichte nur einmalig (Zeitintervall 31.–36. SSW) das 5%-Signifikanzniveau (p = 0,04).

Im Folgenden sind die Parameter im Vergleich dargestellt: Zwischen der 7.–24. SSW betrug die hGH-V-Konzentration  $2,7 \pm 1,1$  ng/ml (NORM) versus  $3,3 \pm 1,1$  ng/ml (GDM) und  $3,4 \pm 1,8$  ng/ml (DM I), zwischen der 25.–30. SSW  $6,4 \pm 2,0$  ng/ml (NORM) versus  $7,5 \pm 2,3$  ng/ml (GDM) und  $9,2 \pm 4,1$  ng/ml (DM I), in den 31.–36. SSW  $10,2 \pm 3,8$  ng/ml (NORM) versus  $13,5 \pm 7,7$  ng/ml (GDM) und  $16,5 \pm 9,8$  ng/ml (DM I) und  $12,0 \pm 4,6$  ng/ml (NORM) versus  $14,5 \pm 12,4$  ng/ml (GDM) und  $17,8 \pm 9,6$  ng/ml (DM I) zwischen der 37.–43. SSW.

#### 4.2.1.5 Korrelation der hGH-V-Konzentration mit Stoffwechselfparametern

##### 4.2.1.5.1 Insulin-like-growth-factor I (IGF-I)

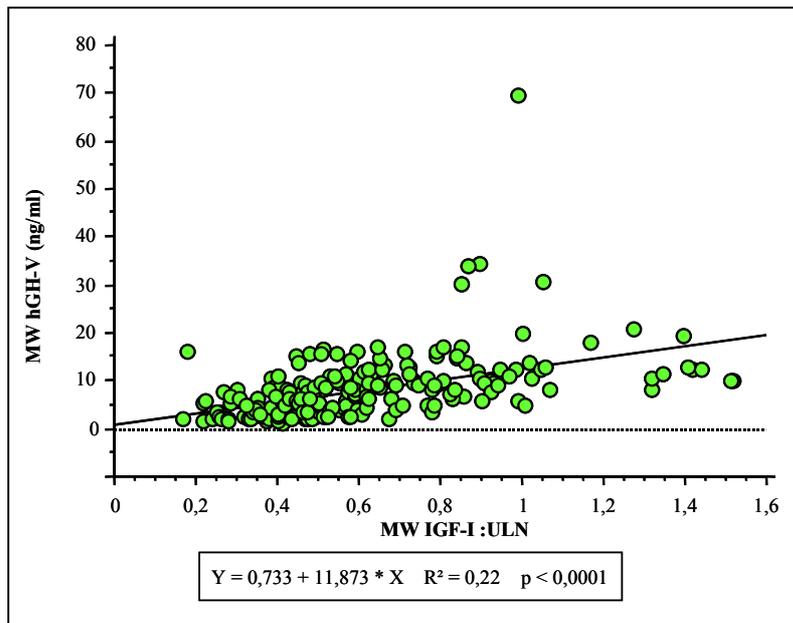
IGF-I ist der Mediator der meisten Funktionen des Wachstumshormons im Organismus. In Abbildung 26 sind die mittleren IGF-I-Konzentrationen im Laufe der SS im Normalkollektiv aufgezeigt – es wurde jeweils der Mittelwert aus den pro Zeitintervall für eine Patientin vorhandenen Proben zur Analyse verwendet. Wie bei hGH-V ist ein Anstieg der IGF-I-Konzentration innerhalb des Patientinnenkollektivs bis hin zur Geburt erkennbar. Postpartal kommt es zu einer schnellen Reduktion auf nahezu den Ausgangswert vor der SS.



**Abbildung 26:** Mittlere Gesamt-IGF-I-Konzentrationen von Patientinnen des Normalkollektivs während der SS – eingeteilt in fünf Zeiträume.

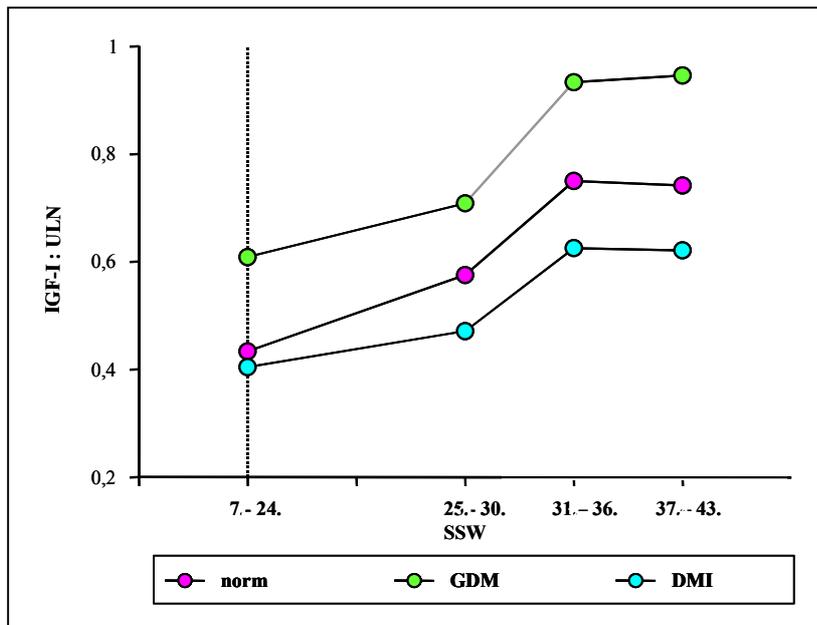
Ein Vergleich der IGF-I-Konzentrationen prä- und postpartal ergibt folgende Ergebnisse: Die durchschnittliche IGF-I-Konzentration lag bei der letzten Blutabnahme vor Geburt im Normalkollektiv bei  $228,6 \pm 86,0$  ng/ml. Bei der Blutabnahme am ersten postpartalen Tag war die IGF-I-Konzentration bereits auf  $161,8 \pm 73,6$  ng/ml abgefallen.

Die Ausschüttung von IGF-I ist altersabhängig, weshalb im Folgenden die Korrelation zwischen hGH-V und der alterskorrigierten 95. Perzentile für IGF-I (IGF-I als Vielfaches des ULN; IGF-I:ULN) in der Vergleichsgruppe angegeben wird.



**Abbildung 27:** Korrelation zwischen hGH-V und der alterskorrigierten 95. Perzentile für IGF-I (IGF-I:ULN) im Normalkollektiv. (Es wurden jeweils die mittleren Konzentrationen pro Zeitintervall verwendet, um auszuschließen, dass pro Patientin mehrere Messzeitpunkte in die Analyse eingehen.)

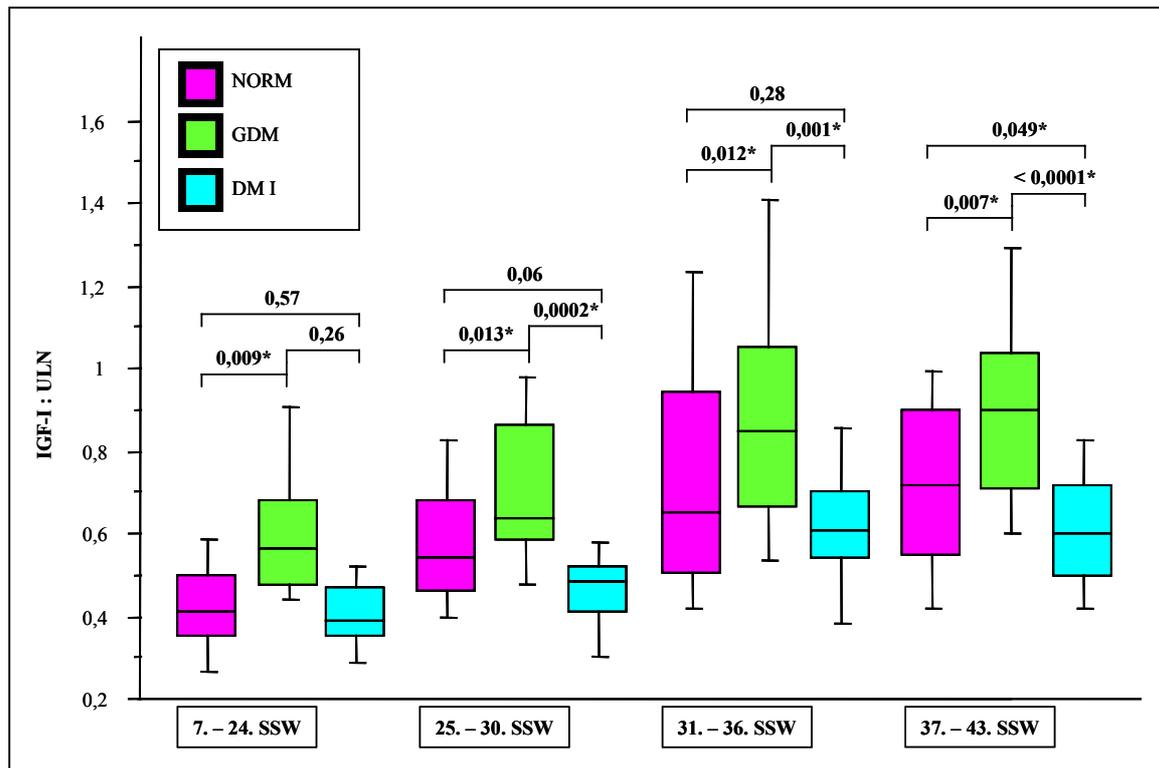
Betrachtet man nun die Veränderung der IGF-I-Werte im Verlauf der SS innerhalb der einzelnen Gruppen zueinander, so zeigen sich signifikante Unterschiede (Varianzanalyse  $p = 0,0003$ ). Dasselbe gilt auch für die alterskorrigierten IGF-I-Konzentrationen (IGF-I : ULN; Varianzanalyse  $p < 0,0001$ ). Der Schwerpunkt liegt hier auf dem Vergleich zwischen GDM und der Kontrollgruppe, da eine verminderte IGF-I-Konzentration für Patienten mit DM I pathognomonisch ist.



**Abbildung 28:** Vergleich der Mittelwerte der alterskorrigierten 95. Perzentile für IGF-I (IGF-I : ULN) zwischen der Vergleichsgruppen zu fest definierten Zeitintervallen in der SS. (Varianzanalyse  $p < 0,0001$ ).

Im Folgenden die IGF-I-Konzentrationen in ng/ml getrennt nach Gruppe und Zeitraum: Zwischen der 7.–24. SSW betrug die IGF-I-Konzentration  $137,6 \pm 44,6$  ng/ml (NORM) versus  $166,4 \pm 34,5$  ng/ml (GDM) und  $124,6 \pm 33,9$  ng/ml (DM I), zwischen der 25.–30. SSW  $186,0 \pm 68,1$  ng/ml (NORM) versus  $209,8 \pm 46,1$  ng/ml (GDM) und  $145,9 \pm 47,9$  ng/ml (DM I), in den 31.–36. SSW  $238,2 \pm 103,5$  ng/ml (NORM) versus  $279,9 \pm 99,1$  ng/ml (GDM) und  $196,8 \pm 60,9$  ng/ml (DM I) und zwischen der 37.–43. SSW  $236,7 \pm 77,0$  ng/ml (NORM) versus  $281,5 \pm 107,6$  ng/ml (GDM) und  $193,4 \pm 55,0$  ng/ml (DM I). Bei der postpartalen Blutentnahme einen Tag nach Entbindung lag die IGF-I-Konzentration bei  $161,8 \pm 73,6$  ng/ml (NORM) versus  $144,8 \pm 52,9$  ng/ml (GDM) und  $112,5 \pm 45,3$  ng/ml (DM I).

Abbildung 29 zeigt die Unterschiede zwischen der alterskorrigierten 95. Perzentile für IGF-I (IGF-I : ULN) im Gruppenvergleich, getrennt nach den vorbeschriebenen Zeitintervallen während der SS:

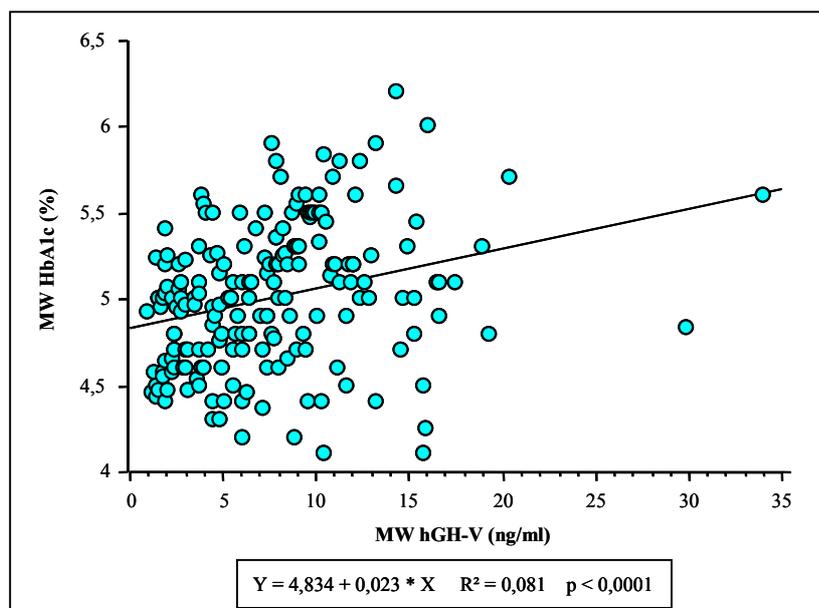


**Abbildung 29:** Vergleich der alterskorrigierten 95. Perzentile für IGF-I (IGF-I : ULN) unter den einzelnen Gruppen zu fest definierten Zeitpunkten in der SS. Der Zahlenwert entspricht dem p-Wert errechnet nach Mann-Whitney U; \* ist angegeben, wenn p signifikant ist ( $p < 0,05$ ).

Hier wird deutlich, dass sich die IGF-I-Konzentration der Patientinnen mit GDM bereits zu Beginn der SS signifikant von der Kontrollgruppe unterscheidet (Zeitintervall 7.–24. SSW  $p = 0,0009$ ) und diese Differenz bis zum Ende der SS bestehen bleibt (t-test:  $p = 0,0019$ ). Zudem unterscheidet sich – wie zuvor beschrieben und allgemein angenommen – auch die IGF-I-Konzentration der Patientinnen mit DM I signifikant von der Kontrollgruppe: Zeitintervall 37.–43. SSW  $p = 0,049$ .

#### 4.2.1.5.2 Glykosyliertes Hämoglobin (HbA1c)

Abbildung 30 zeigt die Korrelation zwischen hGH-V und HbA1c während der SS im Normalkollektiv:

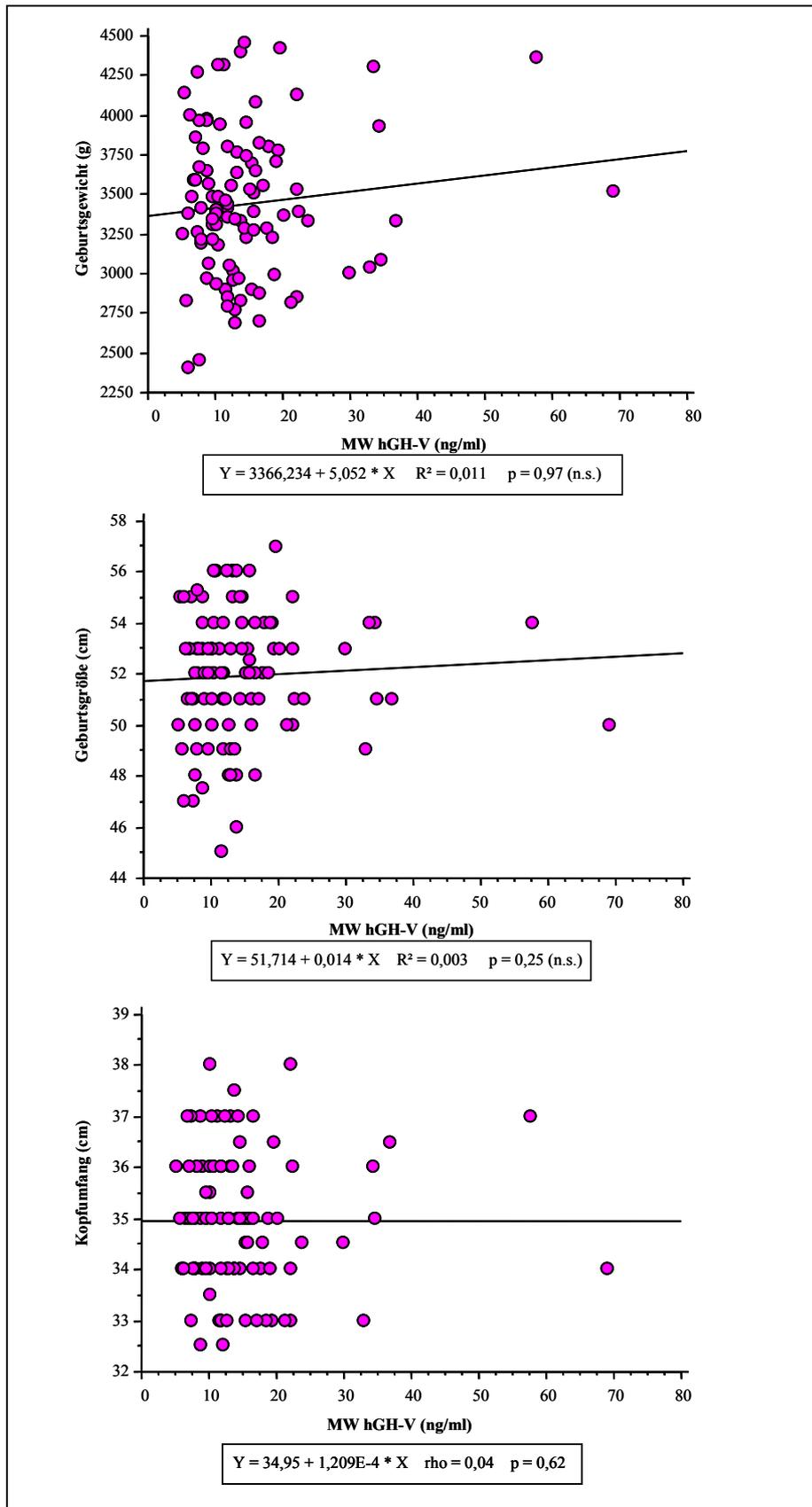


**Abbildung 30:** Korrelation zwischen hGH-V und HbA1c im Normalkollektiv während der SS. (Es wurden jeweils die mittleren Konzentrationen pro Zeitintervall verwendet, um auszuschließen, dass pro Patientin mehrere Messzeitpunkte in die Analyse eingehen.)

Es zeigt sich eine positive Korrelation zwischen HbA1c und hGH-V in der SS ( $R^2 = 0,081$ ,  $p < 0,0001$ ).

#### 4.2.1.6 Korrelation der hGH-V-Konzentration mit Parametern des Kindes

HGH-V als potentielles Wachstumshormon suggeriert die Vorstellung, dass es direkt mit dem Wachstum und der Entwicklung des Kindes in Verbindung steht. Daher sollte die Korrelation zwischen dem Mittelwert der hGH-V-Konzentration zwischen der 37.–43. SSW mit morphologischen Größen des Kindes wie Geburtsgewicht, Geburtsgröße und Kopfumfang untersucht werden:

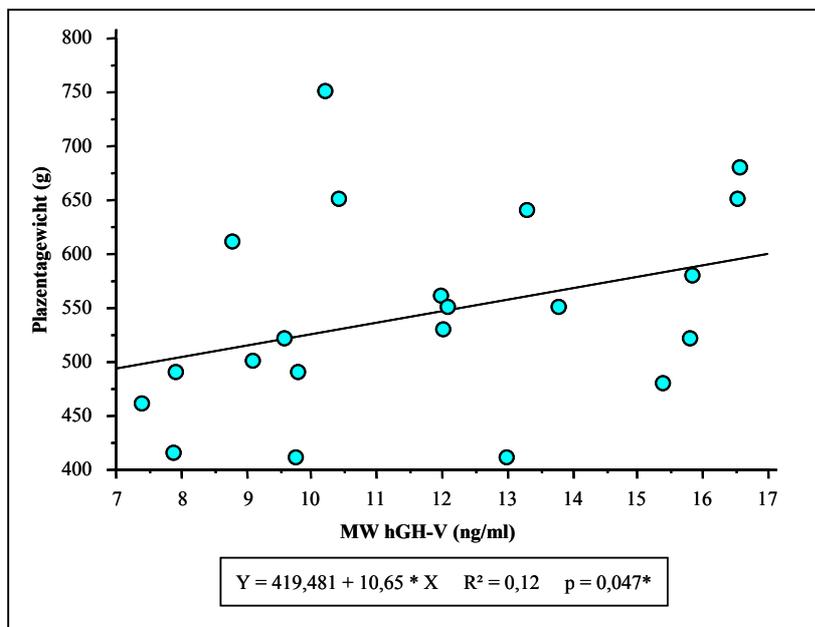


**Abbildung 31:** Korrelation der mittleren hGH-V-Konzentration zwischen der 37. und 43. SSW mit dem kindlichen Geburtsgewicht, der Geburtsgröße und dem Kopfumfang. (Es wurden jeweils die mittleren Konzentrationen pro Zeitintervall verwendet, um auszuschließen, dass pro Patientin mehrere Messzeitpunkte in die Analyse eingehen.)

In Abbildung 31 zeigt sich keine Beeinflussung der mütterlichen hGH-V-Konzentration durch die morphologischen Daten des Neugeborenen.

#### 4.2.1.7 Korrelation der hGH-V-Konzentration mit dem Plazentagewicht

Es ist anzunehmen, dass mit der Masse an Synzytiotrophoblasten auch die Konzentration von hGH-V ansteigen muss. Abbildung 32 zeigt die Korrelation zwischen dem Mittelwert der hGH-V-Konzentration im Normalkollektiv zwischen der 37.–43. SSW, hGH-V entsprechend der Blutentnahme kurz vor der Entbindung, mit dem Plazentagewicht, welches unmittelbar postpartal bestimmt wurde.



**Abbildung 32:** Korrelation der mittleren hGH-V-Konzentration im Normalkollektiv zwischen der 37. und 43. SSW mit dem Plazentagewicht. \* ist angegeben, wenn p signifikant ist ( $p < 0,05$ ).

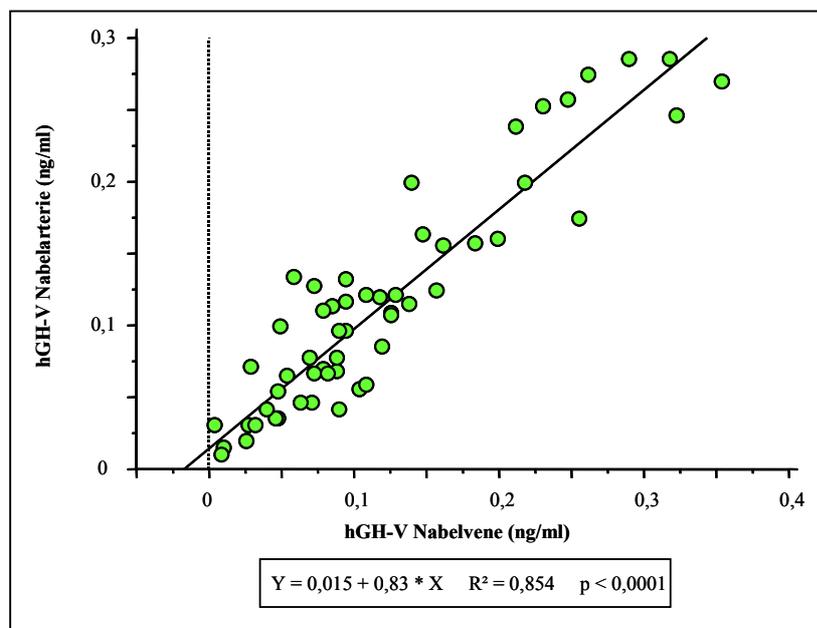
(Es wurden jeweils die mittleren Konzentrationen pro Zeitintervall verwendet, um auszuschließen, dass pro Patientin mehrere Messzeitpunkte in die Analyse eingehen.)

Im Normalkollektiv bestätigt sich die oben angegebene These: Die hGH-V-Konzentration vor der Entbindung korreliert positiv mit dem Plazentagewicht ( $p = 0,047$ ). hGH-V könnte demnach als Marker für die Plazentafunktion herangezogen werden.

#### 4.2.1.8 hGH-V-Konzentration im Nabelschnurblut

Bisher war in der Literatur davon ausgegangen worden, dass sich im fetalen Kreislauf kein hGH-V befindet (Alsat E et al. 1997). Der neue hochsensitive und spezifische hGH-V-Assay macht nun einen Nachweis von hGH-V auch im Nabelschnurblut möglich.

Es kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die geringe Konzentration von hGH-V im Nabelschnurblut von im Mittel 1% der maternalen hGH-V-Konzentration auf peripartal entstandene, strukturelle Defekte der Plazentaschranke zurückzuführen ist. Bemerkenswert ist, dass die in den Probenpaaren gefundene Konzentration von hGH-V in der Nabelarterie im Mittel 17% geringer ist als in der Nabelvene. Dies lässt den Schluss zu, dass der Fetus hGH-V entweder verbraucht oder seine Konzentration verdünnt.



**Abbildung 33:** Korrelation der hGH-V-Konzentrationen im postpartal gewonnenen Nabelschnurblut. Vergleich: Nabelarterie zu Nabelvene.

Im Mittel lag die hGH-V-Konzentration in der Nabelarterie (n = 56) bei  $0,113 \pm 0,077$  ng/ml, in der Nabelvene (n = 64) bei  $0,117 \pm 0,086$  ng/ml ( $p < 0,0001$ ).

## 4.2.2 Studie: Plazentares Wachstumshormon und Insulinsensitivität

### 4.2.2.1 Morphologische Daten

In der Studie „Plazentares Wachstumshormon und Insulinsensitivität“ wurden 13 Patientinnen ohne Glukosestoffwechselstörung während der SS untersucht. Es wurde zu fest definierten Zeitpunkten – zwischen der 18. und 27. SSW und zwischen der 33. und 35. SSW – ein OGTT durchgeführt wurde. Allen Patientinnen war gemein, dass sie ebenfalls an der Studie „Plazentares Wachstumshormon und Glukosestoffwechsel“ teilnahmen. Tabelle 13 gibt die morphologischen Daten der Mutter wie auch der anschließend geborenen Kinder wieder:

**Tabelle 13:** Maternale und fetale morphologische Daten der Studie: Plazentares Wachstumshormon und Insulinsensitivität.

<b>Alter (Jahren)</b>	33 ± 5	(25 – 39)
<b>Körpergröße (cm)</b>	169 ± 7	(159 – 180)
<b>Gewichtszunahme (kg)</b>	17 ± 4	(11 – 24)
<b>Geburt in SSW</b>	42 ± 1	(41 – 43)
<b>Geburtsgewicht (g)</b>	3481 ± 367	(2995 – 4315)
<b>Geburtsgröße (cm)</b>	52 ± 1	(50 – 54)
<b>Kopfumfang (cm)</b>	35 ± 1	(33 – 37)

(dargestellt sind jeweils Mittelwerte ± SD und der Bereich)

**Tabelle 14:** Geschlechtsverhältnis und fetale Hypoglykämie in der Studie: Plazentares Wachstumshormon und Insulinsensitivität (n = 13).

<b>Geschlecht (n)</b>		
weiblich		7
männlich		6
<b>Kindliche Hypoglykämie nach Geburt (%)</b>		8

### 4.2.2.2 Vergleich der Stoffwechselfparameter zwischen erstem und zweitem OGTT

Um die Stoffwechselsituation während der beiden OGTT vergleichen zu können, wurde während der Tests alle 30 Minuten Blut entnommen. Die Abnahmezeitpunkte entsprachen 0-30-60-90-120 Minuten nach Ingestion der Glukoselösung. Hier zeigte sich beim Vergleich

der Nüchternwerte von Glukose und Insulin bereits ein signifikanter Unterschied zwischen dem OGTT in der 18. bis 27. SSW und dem OGTT in der 33. bis 35. SSW ( $p = 0,0005$ ). Die maximale Glukosekonzentration innerhalb eines OGTT war zwischen SSW 18 bis 27 mit  $103 \pm 20$  mg/dl nach 30 Minuten erreicht, während in dem OGTT zwischen SSW 33 bis 35 der Peak von  $126 \pm 20$  mg/dl erst nach 60 Minuten festzustellen war. Tabelle 15 verdeutlichen das eben Beschriebene:

**Tabelle 15:** Vergleich der mittleren Glukose- bzw. mittleren Insulinkonzentrationen im OGTT zu den beiden Testzeitpunkten. Maximale mittlere Glukosekonzentration im OGTT mit Angabe des Zeitpunktes im OGTT.

<b>Zeitpunkt des OGTT (SSW)</b>	<b>18 - 27</b>		<b>33 - 35</b>		
<b>Glukose (mg/dl)*</b>					
nüchtern	$69 \pm 5$	(62 – 79)	$76 \pm 7$	(65 – 92)	( $p = 0,0005$ )♦
AUC	$9946 \pm 1789$	(7425 – 13125)	$13052 \pm 1278$	(11190 – 15795)	( $p = 0,0002$ )♦
Maximalkonzentration	$103 \pm 20$	(71 – 140)	$126 \pm 20$	(99 – 157)	
<b>Zeitpunkt der maximalen Glukose-Konzentration (min)</b>	30		60		
<b>Insulin (<math>\mu</math>U/ml)*</b>					
nüchtern	$11 \pm 4$	(6 – 22)	$14 \pm 6$	(6 – 26)	( $p = 0,0005$ )♦
AUC	$9626 \pm 4742$	(4016 – 20866)	$16346 \pm 10863$	(4178 – 48347)	( $p = 0,0005$ )♦

\* dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SD und der Bereich. AUC: Fläche unter der Kurve.

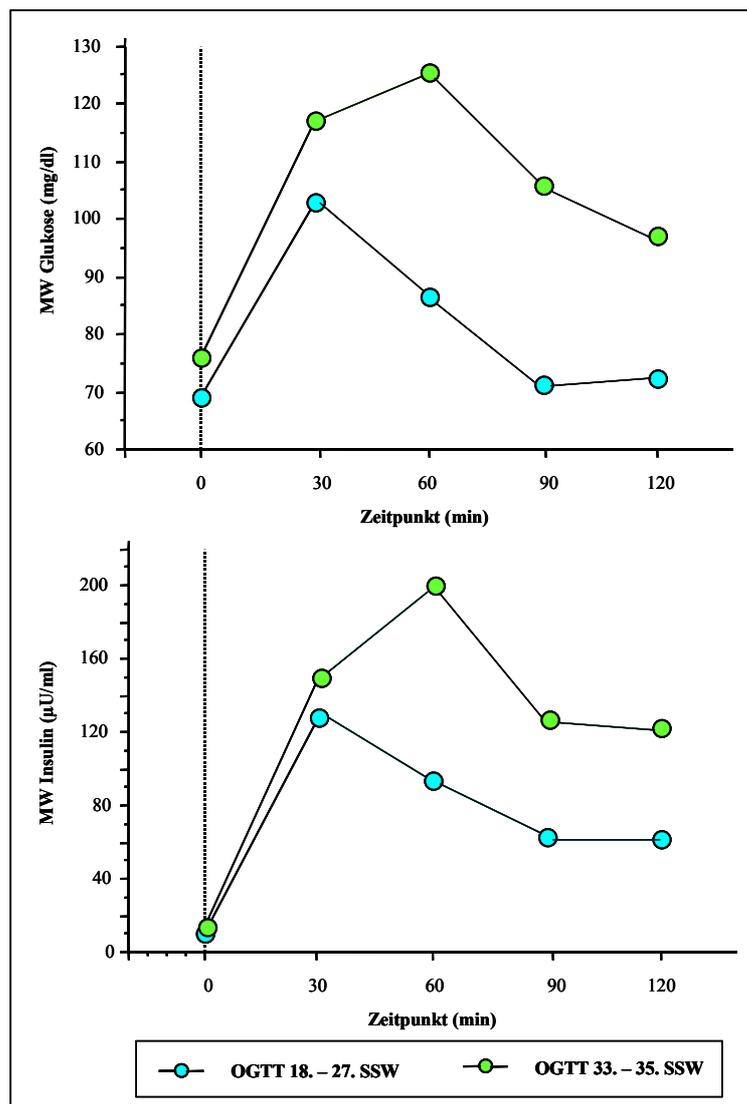
♦ kennzeichnet den signifikanten Unterschied zwischen den beiden Testzeitpunkten.

Vergleicht man nun die mittlere Glukosekonzentration zwischen dem OGTT in der 18. bis 27. SSW mit der zwischen der 33. und 35. SSW, so ist ein signifikanter Unterschied zu jedem Messzeitpunkt erkennbar. Dies ist darauf zurück zu führen, dass es – bedingt durch die verminderte Insulinsensitivität in der SSW – zu einem Anstieg der Glukosekonzentration im Serum kommt.

Zum Zeitpunkt 0 lag die Glukosekonzentration im OGTT zwischen der 18.–27. SSW bei  $69 \pm 5$  mg/dl versus  $76 \pm 7$  mg/dl zwischen der 33.–35. SSW, zum Zeitpunkt 30 bei  $103 \pm 20$  mg/dl versus  $117 \pm 16$  mg/dl, zum Zeitpunkt 60 bei  $86 \pm 24$  mg/dl versus  $126 \pm 20$  mg/dl, zum Zeitpunkt 90 bei  $71 \pm 13$  mg/dl versus  $106 \pm 15$  mg/dl und zum Zeitpunkt 120 bei  $72 \pm 13$  mg/dl versus  $97 \pm 18$  mg/dl. Die Insulinkonzentration im OGTT zwischen der

18.–27. SSW war zum Zeitpunkt 0  $10,9 \pm 4,0 \mu\text{U/ml}$  versus  $13,9 \pm 5,6 \mu\text{U/ml}$  zwischen der 33.–35. SSW, zum Zeitpunkt 30  $128,5 \pm 77,0 \mu\text{U/ml}$  versus  $149,9 \pm 135,5 \mu\text{U/ml}$ , zum Zeitpunkt 60  $93,6 \pm 56,8 \mu\text{U/ml}$  versus  $200,3 \pm 154,5 \mu\text{U/ml}$ , zum Zeitpunkt 90  $62,6 \pm 32,5 \mu\text{U/ml}$  versus  $126,6 \pm 80,7 \mu\text{U/ml}$  und zum Zeitpunkt 120  $61,4 \pm 36,3 \mu\text{U/ml}$  versus  $122,2 \pm 56,7 \mu\text{U/ml}$ .

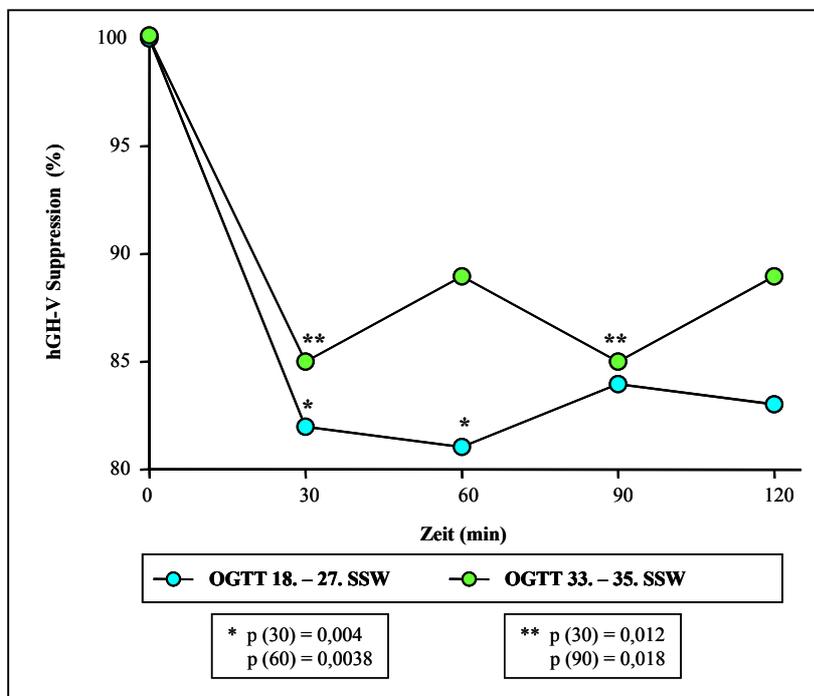
Abbildung 34 zeigt den Verlauf der Glukose- und Insulinkonzentration während der beiden OGTT:



**Abbildung 34:** Mittelwerte der Glukose- bzw. Insulinkonzentration zu den einzelnen Messzeitpunkte im OGTT getrennt nach den beiden Testzeitpunkten in der SS (SSW 18–27 versus SSW 33–35).

#### 4.2.2.3 Beeinflussung der hGH-V-Sekretion durch die Gabe von Glukose

Bisher wird in der Literatur kontrovers über die Beeinflussung von hGH-V durch Glukose berichtet: Erste in-vitro-Versuche zeigten eine Suppression der hGH-V-Ausschüttung nach Zugabe von Glukose (Patel N et al. 1995). Andere Arbeiten zeigten unter Verwendung der bisherig zugänglichen Messmethode keine Beeinflussung der hGH-V-Konzentration im OGTT und GCT (McIntyre HD et al. 2002; Verhaeghe J et al. 2002). In dieser Arbeit sollte nun während der oben beschriebenen Zeitpunkte die Wechselwirkung zwischen hGH-V und Glukose in vivo untersucht werden. Eine zuvor orientierend durchgeführte Varianzanalyse zeigte eine Suppression von hGH-V durch Glukose in beiden Tests (SSW 18–27:  $p = 0,013$ ; SSW 33–35:  $p = 0,023$ ). Es zeigte sich zu beiden Zeitpunkten in der SS eine signifikante Suppression der hGH-V-Konzentration nach 30 Minuten:  $p$  (18.–27. SSW) = 0,004;  $p$  (33.–35. SSW) = 0,012. Der prozentuelle Abfall der hGH-V-Konzentration während der OGTT ist in Abbildung 35 veranschaulicht. Der im OGTT zwischen der 33.–35. SSW angedeutete zweite Abfall der hGH-V-Konzentration lässt sich durch die postprandiale Gegenregulation erklären.



**Abbildung 35:** Suppression der hGH-V-Konzentration durch Glukose in %; verglichen zwischen den beiden OGTT-Zeitpunkten. (\* ist angegeben, wenn  $p$  im OGTT 18.–27. SSW signifikant; \*\*, wenn  $p$  im OGTT 33.–35. SSW signifikant ist ( $p < 0,05$ )).

Tabelle 16 zeigt die hGH-V-Konzentrationen vor und 30 Minuten nach Trinken der Glukoselösung. Dabei sei auf den physiologischen Konzentrationsunterschied zwischen dem ersten und zweiten Test hingewiesen (gepaarter Vorzeichentest: 0,0025), der aufgrund der kontinuierlichen Sekretion der sich vermehrenden Synzytiotrophoblasten zustande kommt.

**Tabelle 16:** Gegenüberstellung der hGH-V-Konzentrationen zum Zeitpunkt 0 (nüchtern) und 30 Minuten, unterschieden zwischen den beiden OGTT in der SS.

<b>Zeitpunkt des OGTT (SSW)</b>	<b>18 - 27</b>	<b>33 - 35</b>
<b>hGH-V (ng/ml)*</b>		
nüchtern	3,2 ± 1,4 (1,2 – 5,4)	10,1 ± 4,8 (2,7 – 19,6)
30 Minuten nach oraler Glukosegabe	2,6 ± 1,2♦(1,0 – 4,8)	8,5 ± 4,2♦♦(2,4 – 17,9)

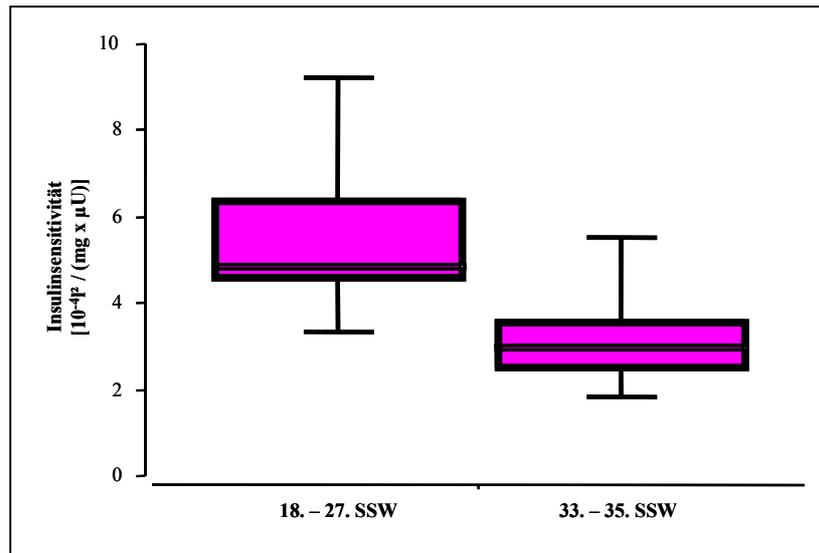
\* dargestellt sind jeweils Mittelwerte ± SD und der Bereich.

♦ / ♦♦ kennzeichnet die signifikante Suppression der hGH-V-Konzentration 30 Minuten nach Ingestion der Glukoselösung (♦ p = 0,004; ♦♦ p = 0,012).

#### 4.2.2.4 Bestimmung der Insulinsensitivität in der Schwangerschaft

Für die Bestimmung der Insulinsensitivität eines Organismus stehen heute eine Vielzahl von Formeln zur Verfügung. International anerkannt sind die Bestimmung nach HOMA, der QUICKI-Index sowie neuerdings auch die Bestimmung nach DeFronzo (siehe Kapitel 3.2.2.2.5, S.50). In einer Regressionsanalyse der einzelnen Bestimmungsmethoden untereinander zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen: Der Korrelationskoeffizient zwischen den oben genannten Methoden lag zwischen 0,59 und 0,67. Im folgenden soll die Formel nach DeFronzo für die Bestimmung der Insulinsensitivität verwendet werden (Matsuda M et al. 1999).

Wie zu erwarten sank die Insulinsensitivität bei allen Patientinnen in der Studie von im Mittel  $5,6 \pm 2,2 [10^{-4} \text{I}^2 / (\text{mg} \times \mu\text{IU})]$  auf  $3,4 \pm 1,9 [10^{-4} \text{I}^2 / (\text{mg} \times \mu\text{IU})]$  (p = 0,0094).



**Abbildung 36:** Veränderung der Insulinsensitivität im Laufe der SS. Die Insulinsensitivität wurde zu den Messzeitpunkten 18.–27. SSW, bzw. 33.–35. SSW nach DeFronzo errechnet (gepaarter Vorzeichentest:  $p = 0,0094$ ) (Matsuda M et al. 1999).

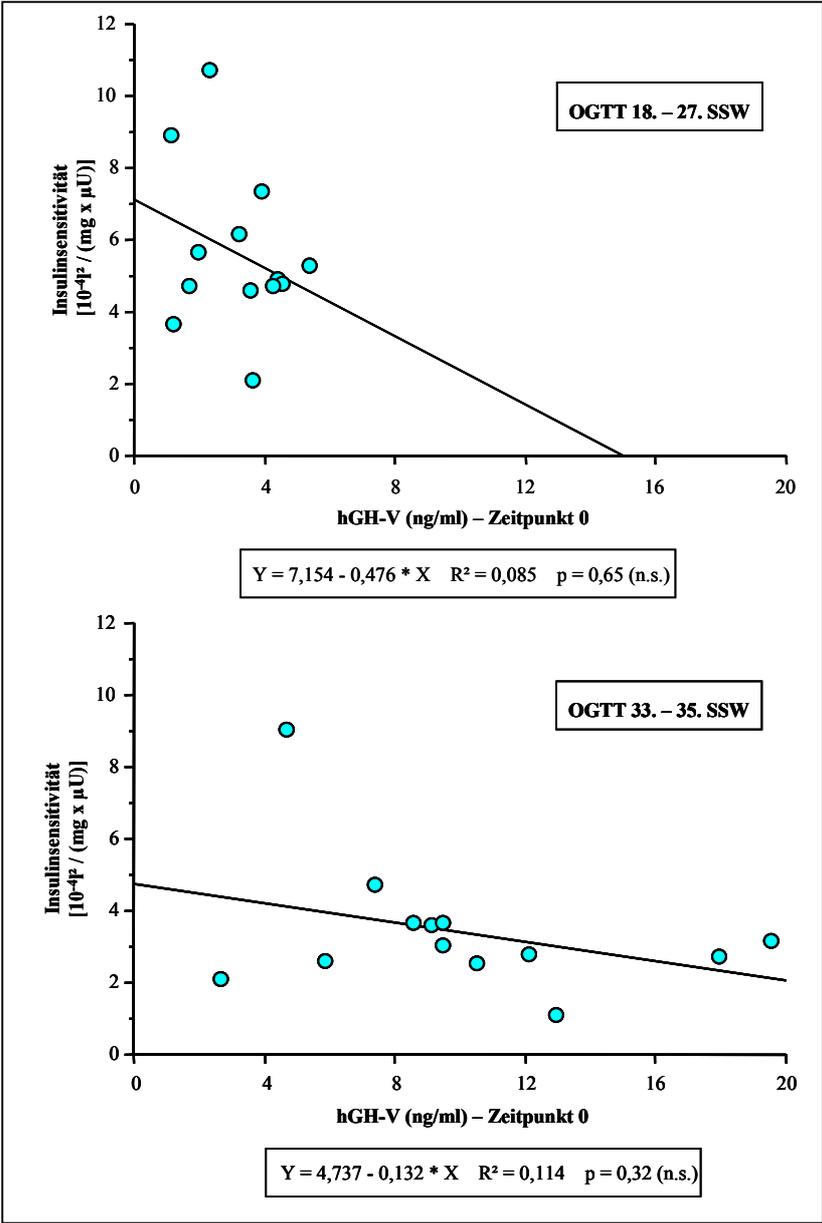
Die Entwicklung einer Insulinresistenz im Laufe einer SS begünstigt die Kohlenhydrat-Substrat-Bereitstellung für die fetoplazentare Einheit und sichert damit die Nährstoff-zustellung des Kindes.

#### 4.2.2.5 Korrelation der hGH-V-Konzentration mit der Insulinsensitivität

Um den Zusammenhang zwischen hGH-V und Insulinsensitivität zu beschreiben, wurde die hGH-V-Konzentration zum Zeitpunkt 0 mit der Insulinsensitivität verglichen (Varianz-analyse:  $p = 0,094$ ). Getrennt für die beiden Zeitpunkte 18.–27. SSW und 33.–35. SSW zeigte sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt eine signifikante Korrelation zwischen dem Grad der Insulinresistenz und der hGH-V-Konzentration. Dies scheint aber durch die geringe Fallzahl bedingt zu sein.

Bezieht man den Faktor Zeit mit in die Analyse ein, so zeigt sich kein Unterschied der hGH-V-Konzentration in der SS. Dies scheint nach den unter Kapitel 4.2.2.3 (S.90) und 4.2.2.4 (S.91) beschriebenen Untersuchungen nicht richtig, da isoliert betrachtet sich sowohl für hGH-V als auch für die Insulinsensitivität ein signifikanter Unterschied zwischen den Tests findet. Erklärt werden kann dies durch eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Parameter, die statistisch nicht quantifizierbar ist. Zusammenfassend kann von einer starken

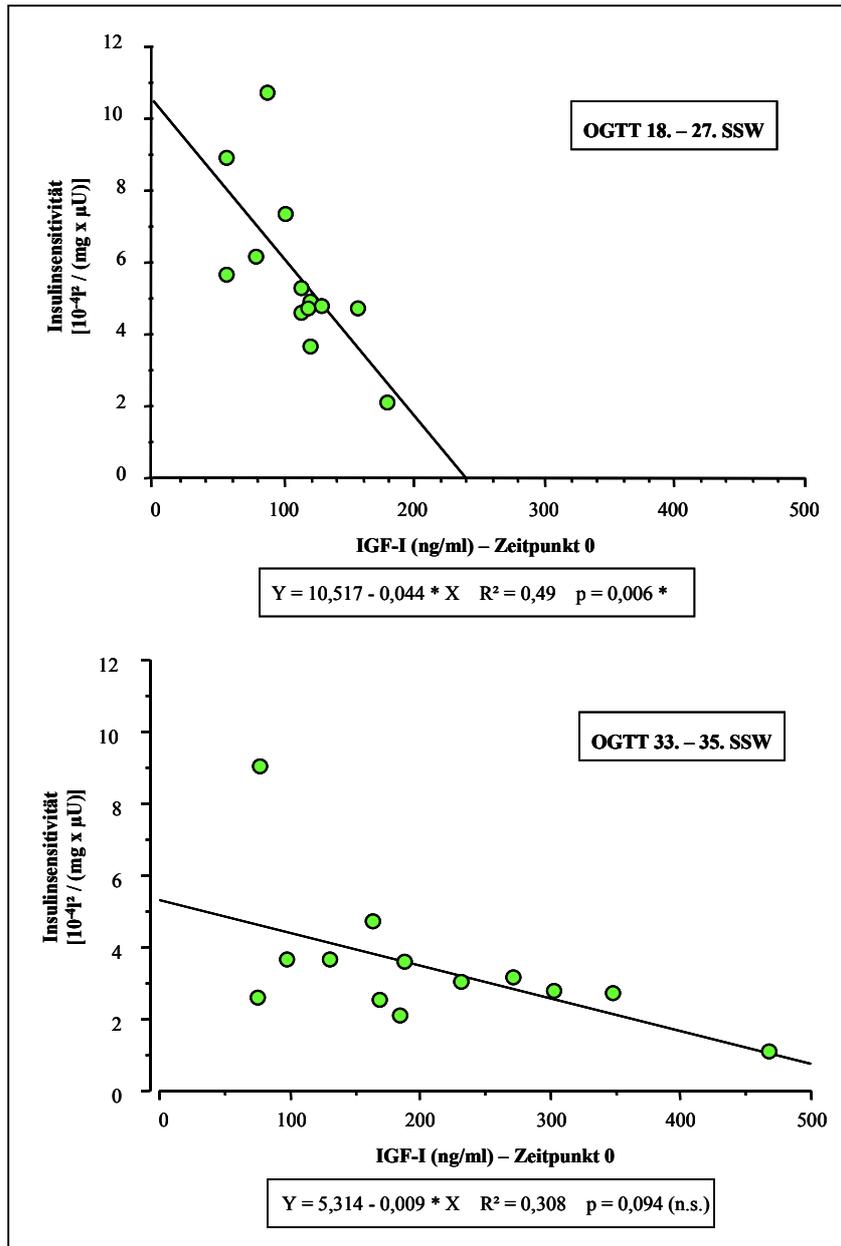
Abhängigkeit zwischen der hGH-V-Konzentration und der Insulinsensitivität in der SS ausgegangen werden, die statistisch anhand der hier untersuchten kleinen Kohorte nicht darstellbar ist.



**Abbildung 37:** Korrelation zwischen der hGH-V-Konzentration zum Zeitpunkt 0 des OGTT und der Insulinsensitivität, errechnet nach DeFronzo, in der mittleren (18.–27. SSW) und späten (33.–35. SSW) SS.

#### 4.2.2.6 Korrelation der IGF-I-Konzentration mit der Insulinsensitivität

Der Zusammenhang zwischen IGF-I und Insulinsensitivität wurde untersucht, indem die IGF-I-Konzentration zum Zeitpunkt 0 mit der Insulinsensitivität getrennt für die beiden Zeitpunkte 18.–27. SSW und 33.–35. SSW verglichen wurde. Hier zeigte sich während der 18.–27. SSW eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Insulinsensitivität und der IGF-I-Konzentration ( $p = 0,006$ ). Im Untersuchungszeitraum 33.–35. SSW zeigte sich hingegen keine signifikante Korrelation zwischen der Insulinsensitivität und der Konzentration an maternalem IGF-I vor Beginn des OGTT ( $p = 0,094$ ).



**Abbildung 38:** Korrelation zwischen der IGF-I-Konzentration zum Zeitpunkt 0 des OGTT und der Insulinsensitivität, errechnet nach DeFronzo, in der mittleren (18.–27. SSW) und späten (33.–35. SSW) SS.

## 5 Diskussion

### 5.1 Experimenteller Teil – Assay

Die Immunisierung von Mäusen mit in Säugetierzellen hergestelltem hGH-V zusammen mit einem sorgfältigen Screeningverfahren führte zur Identifikation von zwei hochaffinen mAb, die für hGH-V spezifisch sind. Das Epitop-Mapping zeigte, dass ein mAb (8A9) an ein Epitop der Helix 1 bindet, während der andere mAb (3F12) auf ein Epitop der Helix 3 zielt. Der mAb, der an Helix 1 bindet, interferiert mit der Bindung von hGH-V an den hGH-Rezeptor und rhGHBP. Daher könnte dieser mAb 8A9 einen interessanten Kandidaten für die Blockierung der hGH-V-Aktion in Zellkulturen oder Tierversuchen darstellen.

Ausgehend von der AS-Sequenz des hGH-V-Moleküls hat hGH-V eine potentielle N-Glykosylierungsstelle an Position 140-142 (Ray J et al. 1989). Da sich die enzymatische Ausstattung der Bakterienzelle von der einer eukaryoten Zelle unterscheidet (Schaffer C et al. 2001), kann angenommen werden, dass rekombinantem hGH-V – exprimiert in *E. coli* – das N-Glykosylierungsmuster fehlt, das für das hGH-V-Molekül aus Säugetierzellen charakteristisch ist und auch in der SS vorkommt. Deshalb wurde als Antigengrundlage für die Produktion der mAb rekombinantes hGH-V verwendet, das in Maus-Fibroblasten exprimiert wurde. Wie oben beschrieben besteht die Präparation aus zwei molekularen Isoformen, entsprechend einer glykosylierten (25 kDa) und einer nicht-glykosylierten (22 kDa) Isoform von hGH-V (Frankenne F et al. 1990). Die gleiche Präparation wurde als Kalibrator für den neuen hGH-V-spezifischen Assay genutzt. Die Unterschiede in den mAb wie auch die Standardpräparation erklären, weshalb sich die absoluten hGH-V-Konzentrationen dieser Arbeit von den in der Literatur beschriebenen leicht unterscheiden. Natürlich wäre eine internationale Standardpräparation von hGH-V sehr wünschenswert, um vergleichbare Messungen von hGH-V zu gewährleisten. Dies würde aber voraussetzen, dass hinreichend große Mengen des Materials vorlägen.

Der neu entwickelte hGH-V-IFMA mit den neuen spezifischen plazentaren hGH-V-mAb (3F12, 8A9) – ohne Kreuzreaktion mit hypophysärem hGH-N und hPL – ist hochsensitiv (0,02 ng/ml) und macht es zum ersten Mal möglich hGH-V bereits in der frühen SS nachzuweisen (Wu Z et al. 2003). Unsere Untersuchungen lassen die Behauptung zu, dass hGH-V bereits ab der 7. SSW in der mütterlichen Zirkulation nachweisbar ist. Obwohl diese geringen Konzentrationen sicherlich keinen bedeutenden Einfluss auf den mütterlichen Metabolismus haben, könnte hGH-V über autokrine oder parakrine Sekretionsmechanismen

eine Rolle bei der frühen Plazentaentwicklung haben. Zusätzlich ermöglicht die hohe Sensitivität des Assays, die hGH-V-Konzentration auch unter pathologischen Umständen in der Früh-SS wie extrauteriner SS oder bei Blasenmolen zu untersuchen.

Ferner war es uns mit Hilfe des eben beschriebenen Assays möglich – anders als bisher publizierte Untersuchungen erkennen ließen – hGH-V sowohl in der Nabelarterie als auch in der Nabelvene, wenn auch in sehr niedrigen Konzentrationen, nachzuweisen (Alsat E et al. 1997). Ob dies jedoch physiologisch ist, auf eine strukturelle Störung der Plazentaschranke hinweist oder gar Folge einer Kontamination während der Entnahme ist, lohnt weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend sollen nochmals die Vorteile des neuen hGH-V-Assays (Inhouse Assay) im Vergleich zum einzigen bisher kommerziell erhältlichen Assay dargestellt werden:

**Tabelle 17:** Vergleich des kommerziell erhältlichen hGH-V-Assays mit dem neuen hGH-V-Inhouse Assay.

	<b>Kommerzeller Assay</b>	<b>Inhouse Assay</b>
	IRMA - radioaktiv	IFMA - Fluoreszenz
<b>Inkubation</b>	über Nacht	2 Stunden
<b>Untere Nachweisgrenze (ng/ml)</b>	0,2	0,02
<b>Verwendetes Volumen (µl)</b>	100	25
<b>hGH-N Kreuzreaktion (%)</b>	0,3	< 0,001
<b>Standardmatrix</b>	Pferdeserum	Schafserum

## **5.2 Klinischer Teil**

### **5.2.1 Studie: Plazentares Wachstumshormon und Glukosestoffwechsel**

Der Hauptanstieg der hGH-V-Konzentration findet zwischen der 20. und 30. SSW statt. Maximalkonzentrationen lassen sich um die 36. SSW nachweisen, anschließend bleibt die Konzentration konstant, erhöht sich noch geringfügig oder beginnt bis zur Geburt leicht abzufallen. Die Veränderungen von hGH-V über die Zeit gehen einher mit einer Veränderung des Glukosemetabolismus in der SS. Diese ist gekennzeichnet durch eine Verringerung der Insulinsensitivität in normalen SS und einem erhöhten Insulinbedarf bei Patientinnen mit diabetischer Stoffwechsellaage (Catalano PM et al. 1998; Butte NF 2000).

Bisher veröffentlichte Studien über hGH-V und Glukosestoffwechsel schlossen meist ausschließlich festdefinierte Zeitpunkte in der SS ein und ließen einen Vergleich der verschiedenen Gruppen nicht zu (McIntyre HD et al. 2000). Mit Hilfe der oben beschriebenen Studie ist es nun möglich, die hGH-V-Konzentrationen bei Patientinnen mit DM I oder GDM im Vergleich zum Normalkollektiv darzustellen. Entgegen unserer Erwartungen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den hGH-V-Konzentrationen der einzelnen Gruppen. Tendenziell zeigen jedoch Patientinnen mit DM I höhere hGH-V-Konzentrationen. Sicherlich ist aufgrund der intensiven Betreuung in spezialisierten Diabetesambulanzen der Glukosestoffwechsel intensiver kontrolliert. Auch scheint die geringe Fallzahl von 27 Patientinnen mit DM I und 43 Patientinnen mit GDM zu gering, um eine endgültige Aussage zu treffen.

HGH-V-Konzentrationen zeigen eine enge Korrelation mit maternalen IGF-I-Konzentrationen während der SS. Auch der Zuwachs der hGH-V-Konzentration in der mittleren und späten SS korreliert mit dem Anstieg von IGF-I im selben Zeitraum. Dies untermauert die Aussage früherer Veröffentlichungen, die behaupteten, dass hGH-V ein wichtiger Regulator der mütterlichen IGF-I-Konzentration in der SS ist (Caufriez A et al. 1990; McIntyre HD et al. 2000).

In unserer Studie zeigten 8 von 69 Normalpersonen am Ende der SS IGF-I-Maximalwerte oberhalb der alters- und methodenangepassten Referenzwerte für nicht-schwangere Frauen. Wir schließen daraus, dass hohe IGF-I-Konzentrationen in der SS nicht notwendigerweise pathologisch sind. Kontrollen dieser Patientinnen mehrere Wochen nach der SS ergaben normale IGF-I-Werte.

Im Gegensatz zur hGH-V-Konzentration besteht ein signifikanter Unterschied in der IGF-I-Konzentration des Normalkollektivs im Vergleich zu den diabetischen Gruppen. Bei Patientinnen mit DM I ist dies sicher pathognomonisch, da sich hier von Beginn an sehr niedrige IGF-I-Werte nachweisen lassen. Patientinnen mit GDM hingegen zeigen bereits zu Beginn der SS höhere IGF-I-Konzentrationen als das Normalkollektiv. Ein gezieltes follow-up mit Bestimmung der IGF-I-Konzentrationen nach der SS erscheint hier sinnvoll, um mögliche präexistente Stoffwechseleränderungen, wie sie beispielsweise mit dem PCO-Syndrom einhergehen, zu erkennen und zu therapieren.

Interessanterweise konnten wir mit unserem Kollektiv nachweisen, dass der BMI vor der SS einen Einfluss auf die hGH-V-Konzentration während der SS hat. So zeigen innerhalb des Normalkollektivs Patientinnen mit niedrigem Ausgangs-BMI signifikant höhere hGH-V-Konzentrationen im Verlauf der SS, während übergewichtige Patientinnen sich in den hGH-V-Konzentration nicht von Normalgewichtigen unterscheiden. Dies unterstützt die These, dass hGH-V, dem hGH-N in nicht-schwangeren Personen vergleichbar, durch die Masse an Fettgewebe negativ reguliert wird. Zudem unterstützt es die Vorstellung, dass hGH-V bei der fetalen Nährstoffzustellung eine bedeutende Rolle zukommt (Wu Z et al. 2003): Durch den Anstieg der hGH-V-Konzentration im mütterlichen Organismus kommt es stetig zur Abnahme der maternalen Insulinsensitivität. Diese Insulinresistenz begünstigt die Kohlenhydrat-Substrat-Bereitstellung für die fetoplazentare Einheit. Bei adipösen Patientinnen stellt dies ein geringeres Problem dar, da diese meist bereits insulinresistent sind. Bei schlanken Patientinnen sind jedoch höhere hGH-V-Konzentrationen notwendig, um den Substrat-Flux zu gewährleisten.

Unter normalgewichtigen Personen lässt sich ein signifikanter Unterschied in der hGH-V-Konzentration zwischen Patientinnen mit DM I und dem Normalkollektiv feststellen, während Patientinnen mit GDM nur zu einem Untersuchungszeitpunkt (31.–36. SSW) einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe zeigten. Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass bei Patientinnen mit DM I selten eine Insulinresistenz als Ursache ihrer Erkrankung vorliegt und daher hGH-V als Regulator für die Nährstoffzustellung eine große Rolle spielt. Bei Patientinnen mit GDM hingegen ist die Insulinsensitivität meist schon vor der SS eingeschränkt, so dass der Glukose-Flux bereits gewährleistet ist. Sicherlich lässt auch hier die begrenzte Fallzahl eine endgültige Beurteilung nicht zu.

Anhand unserer Daten zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der hGH-V-Konzentration und den morphologischen Daten des Kindes: Geburtsgewicht, Geburtsgröße und Kopfumfang. Jedoch besteht eine signifikante Korrelation zwischen dem Plazentagewicht und der hGH-V-Konzentration vor Entbindung ( $p = 0,047$ ). Somit ist die hGH-V-Ausschüttung abhängig von der Masse an Synzytiotrophoblasten und könnte als Marker für die Plazentafunktion agieren. Hierfür benötigt es jedoch noch weiterer intensiver Untersuchungen.

Unsere klinischen Daten unterstützen insgesamt die Hypothese, dass hGH-V ein bedeutender Regulator des maternalen Stoffwechsels ist und damit verbunden auch des fetalen Wachstums.

## 5.2.2 Studie: Plazentares Wachstumshormon und Insulinsensitivität

Dass sich die Insulinsensitivität im Verlauf der SS verringert, ist ein häufig zitiertes Phänomen. Argumentiert wird mit der Ausschüttung plazentarer Hormone, die auf den Glukosestoffwechsel während der SS einwirken (Catalano PM et al. 1999; Yamashita H et al. 2000). hGH-V ist eines dieser Peptidhormone, bei denen man eine bedeutende Rolle im Glukosestoffwechsel vermutet. Da die Insulinsensitivität in der SS sinkt, parallel die Resistenz steigt, und dies einhergeht mit einem kontinuierlichen Anstieg von hGH-V, lag die Hypothese nahe, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen hGH-V und der Insulinresistenz gibt (Barbour LA et al. 2002).

Unsere Untersuchungen bestätigen die Reduktion der Insulinsensitivität mit zunehmendem Fortschreiten der SS ebenso wie den signifikanten Anstieg der hGH-V-Konzentration. Statistisch lässt sich jedoch ein kausaler Zusammenhang zwischen der Insulinsensitivität und der hGH-V-Konzentration nicht darstellen, da eine Koinzidenz nicht ausgeschlossen werden kann. Es kann von einer deutlichen inversen Korrelation zwischen der hGH-V-Konzentration und der Insulinsensitivität in der SS ausgegangen werden. Diese Feststellung betont die metabolische Rolle von hGH-V und damit auch die Bedeutung für die Nährstoffzustellung zum Kind.

Eindrucksvollerweise besteht zwischen der 18.–27. SSW eine hohe negative Korrelation zwischen der IGF-I-Konzentration und der Insulinsensitivität ( $p = 0,006$ ), die sich mit weiterem Fortschreiten der SS jedoch verliert (33.–35. SSW:  $p = 0,094$ ).

Daneben scheint nicht verständlich, weshalb zu einem späteren Zeitpunkt der SS (33.–35. SSW) auch IGF-I keinen Einfluss mehr auf die Insulinsensitivität hat. Möglicherweise besteht auch hier eine Koinzidenz der Parameter oder es werden die Grundsteine einer pathologischen Glukosetoleranz in der Früh-SS bis hin zur 28. SSW gelegt. Dieser These sollte in einer weiterführenden Studie mit größerer Fallzahl nochmals nachgegangen werden.

Die Regulation von hGH-V in vivo ist bis heute nicht endgültig geklärt. In-vitro-Versuche mit Glukose zeigten, dass es bei hohen Glukosekonzentrationen im Medium zu einem Erliegen der hGH-V-Ausschüttung kommt (Patel N et al. 1995). Bisherige Veröffentlichungen beschreiben keine Beeinflussung der hGH-V-Sekretion durch Gabe von Glukose in vivo – untersucht mittels GCT oder OGTT (McIntyre HD et al. 2002; Verhaeghe J et al. 2002). Im Rahmen dieser Arbeit ist es nun erstmals gelungen, in vivo eine Suppression von plazentarem

hGH-V durch orale Zugabe von 75g Glukose nach 30 Minuten nachzuweisen. Dies lässt den Schluss zu, dass hGH-V ähnlich wie das hypophysäre hGH-N reguliert wird, indem die Ausschüttung durch hohe Glukosekonzentrationen inhibiert wird (Ho KKY et al. 1996). Anzumerken ist jedoch, dass es im Verlauf der SS zu keiner prinzipiellen Veränderung in der Regulation von hGH-V kommt, da der prozentuelle Abfall der hGH-V-Konzentration nach Gabe von Glukose sich nicht signifikant zwischen den beiden Zeitpunkten der vorgenommen OGTT unterscheidet (siehe Abbildung 35, S.90).

## 6 Zusammenfassung

Das Plazentare Wachstumshormon (hGH-V) gehört der Wachstumshormonfamilie an und unterscheidet sich nur in 13 AS von hGH-N. Es wird ab der Früh-SS von den Synzytiotrophoblasten der Plazenta exprimiert und kontinuierlich in die maternale Zirkulation ausgeschüttet. Schon kurze Zeit nach der Entbindung ist hGH-V nicht mehr nachweisbar.

HGH-V korreliert positiv mit der maternalen IGF-I-Konzentration und hat eine dem hGH-N vergleichbare somatogene Aktivität. Über die Funktion von hGH-V während der SS herrscht bis heute Unklarheit. Es wird angenommen, dass es eine wichtige regulatorische Rolle im Glukosestoffwechsel während der SS spielt.

Der in dieser Arbeit beschriebene immunofluorometrische Assay, basierend auf spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen hGH-V, stellt eine hochempfindliche Messmethode für hGH-V im menschlichen Serum dar. Bereits ab der 7. SSW ist ein Nachweis von hGH-V möglich. Seine kurze Inkubationszeit von zwei Stunden, das geringe Probenvolumen und das gefahrlose Arbeiten ohne Radioaktivität stellen wichtige praktische Aspekte für die weitere Erforschung der physiologischen und pathophysiologischen Rolle von hGH-V dar.

In einer ersten prospektiv longitudinalen, klinischen Studie wurde der Hypothese nachgegangen, ob hGH-V den Glukosemetabolismus während der SS beeinflusst. Hierfür wurden 69 Patientinnen ohne Glukosestoffwechselstörung (NORM), 27 Patientinnen mit Diabetes mellitus Typ I (DM I) und 43 Patientinnen mit Gestationsdiabetes (GDM) während der SS untersucht. In vierwöchentlichen Abständen wurde den Patientinnen Blut entnommen und der Verlauf der SS wie auch der Geburt notiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die hGH-V-Konzentration in allen Gruppen kontinuierlich während der SS ansteigt und nach der Geburt rasch wieder aus dem Körper der Mutter eliminiert wird (HWZ: 15 min). Innerhalb fest definierter Zeiträume der SS unterscheidet sich die hGH-V-Konzentration der Patientinnen mit GDM und DM I nicht signifikant von der des Normalkollektivs.

Innerhalb des Normalkollektivs lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen normal-, unter- und übergewichtigen Personen erkennen. So zeigen untergewichtige Patientinnen im Verlauf der SS signifikant höhere hGH-V-Werte als normal- und übergewichtige Patientinnen. Dies spricht für eine inverse Korrelation zwischen hGH-V und Fettgewebe, wie es auch bei hGH-N beschrieben ist. Funktionell kann diskutiert werden, dass bei schlanken Patientinnen höhere

hGH-V-Spiegel zur Induktion einer relativen Insulinresistenz erforderlich sind, die ihrerseits einen hinreichenden Glukose-Flux zur fetoplazentaren Einheit sicherstellt. Zudem konnte bei gewichtskorrigierter Betrachtung der Gruppen zueinander ein signifikanter Unterschied zwischen der hGH-V-Konzentration der Patientinnen mit DM I und der des Normalkollektivs festgestellt werden.

HGH-V korreliert positiv mit der maternalen IGF-I-Konzentration. Diese unterscheidet sich signifikant in beiden pathologischen Gruppen von der des Normalkollektivs. Es besteht keine Korrelation zwischen hGH-V und den morphologischen Daten des Kindes, jedoch zwischen hGH-V und dem Plazentagewicht.

In der Folgestudie wurde der Frage nachgegangen, ob die Veränderung der Insulinsensitivität in der SS mit der hGH-V-Konzentration in Verbindung steht. Hierfür wurde bei 13 Patientinnen ohne Glukosestoffwechselstörung zweimal in der SS ein oraler Glukose-Toleranztest (OGTT) vorgenommen und zu definierten Zeitpunkten während des Tests Blut entnommen.

Die Insulinsensitivität verringerte sich bei 12 der 13 Patientinnen mit Fortschreiten der SS. Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Grad der Insulinresistenz und der hGH-V-Konzentration kann durch Korrelation dieser beiden sich bekanntermaßen mit der Gestationsdauer verändernden Parameter statistisch nicht nachgewiesen werden, liegt jedoch nahe. Diese Vermutung wird auch gestützt durch den hier erbrachten Nachweis einer Korrelation von hGH-V und HbA1c innerhalb des Normbereichs.

Zudem zeigte sich eine signifikante Abnahme der hGH-V-Konzentration 30 Minuten nach Gabe der Glukoselösung in beiden Tests. Diese Beobachtung erlaubt erstmals die Feststellung, dass die plazentare hGH-V-Ausschüttung, gleich dem hypophysären hGH-N, durch Glukose akut in vivo geregelt wird.

Zusammenfassend lässt sich die Hypothese bestätigen, dass dem hGH-V bei der Regulation der Glukosebereitstellung zum Kind eine bedeutende Rolle zukommt. So wird die hGH-V-Sekretion bei hohen maternalen Glukose-Konzentrationen supprimiert, während es bei untergewichtigen Müttern zu einer vermehrten hGH-V-Ausschüttung kommt. Letztlich ist der genaue Interaktionsmechanismus noch unklar und erfordert weitere Untersuchungen, die durch die hier vorgestellte Analyseverfahren des hGH-V-Immunoassays signifikant erleichtert werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abdel Meguid, S. S., H. S. Shieh, et al. (1987). "Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone." Proc Natl Acad Sci U S A **84**: 6434–7.
- Alsat, E., J. Guibourdenche, et al. (1997). "Human placental growth hormone." Am J Obstet Gynecol **177**(6): 1526–34.
- Barbour, L. A., J. Shao, et al. (2002). "Human placental growth hormone causes severe insulin resistance in transgenic mice." Am J Obstet Gynecol **186**(3): 512–7.
- Barnard, R., F. Y. Chan, et al. (1997). "Growth hormone-binding protein in normal and pathologic gestation: correlations with maternal diabetes and fetal growth." J Clin Endocrinol Metab **82**(6): 1879–84.
- Baumann, G., N. Davila, et al. (1991). "Binding of human growth hormone (GH)-variant (placental GH) to GH-binding proteins in human plasma." J Clin Endocrinol Metab **73**(6): 1175–9.
- Baumann, M. U., S. Deborde, et al. (2002). "Placental glucose transfer and fetal growth." Endocrine **19**(1): 13–22.
- Beckers, A., A. Stevenaert, et al. (1990). "Placental and pituitary growth hormone secretion during pregnancy in acromegalic women." J Clin Endocrinol Metab **71**(3): 725–31.
- Bjorklund, A. O., U. K. Adamson, et al. (1998). "Placental hormones during induced hypoglycaemia in pregnant women with insulin-dependent diabetes mellitus: evidence of an active role for placenta in hormonal counter-regulation." Br J Obstet Gynaecol **105**(6): 649–55.
- Boguszewski, C. L., P. A. Svensson, et al. (1998). "Cloning of two novel growth hormone transcripts expressed in human placenta." J Clin Endocrinol Metab **83**(8): 2878–85.
- Brelje, T. C., D. W. Scharp, et al. (1993). "Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy." Endocrinology **132**(2): 879–87.
- Brückel, J. and J. Köbberling (2002). "Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus." Diabetes und Stoffwechsel **11**(Suppl. 2): 6–12.
- Brueckel, J. and J. Koeberling (2002). "Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus." Diabetes und Stoffwechsel **11**(Suppl. 2): 6–10.
- Brunner, E. (2002). Nonparametric Analysis of longitudinal Data in factorial Experiments, Wiley.

- Bühling, K. J., J. Sidor, et al. (2003). "Gestationsdiabetes: Screening, oraler Glukosetoleranztest und Blutzuckertagesprofil." Dtsch Med Wochenschr **128**: 1408–1411.
- Butte, N. F. (2000). "Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus." Am J Clin Nutr **71**(5 Suppl): 1256S–61S.
- Carpenter, M. W. and D. R. Coustan (1982). "Criteria for screening tests for gestational diabetes." Am J Obstet Gynecol **144**(7): 768–73.
- Catalano, P. M., N. M. Drago, et al. (1998). "Longitudinal changes in pancreatic  $\beta$ -cell function and metabolic clearance rate of insulin in pregnant woman with normal and abnormal glucose tolerance." Diabetes Care **21**: 403–8.
- Catalano, P. M., L. Huston, et al. (1999). "Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus  
Physiologic and molecular alterations in carbohydrate metabolism during pregnancy and gestational diabetes mellitus." Am J Obstet Gynecol **180**(4): 903–16.
- Caufriez, A., F. Frankenne, et al. (1990). "Placental growth hormone as a potential regulator of maternal IGF-I during human pregnancy." Am J Physiol **258**(6 Pt 1): E1014–9.
- Caufriez, A., F. Frankenne, et al. (1993). "Regulation of maternal IGF-I by placental GH in normal and abnormal human pregnancies." Am J Physiol **265**(4 Pt 1): E572–7.
- Caufriez, A., F. Frankenne, et al. (1994). "Regulation of maternal insulin-like growth factor I by placental growth hormone in pregnancy. Possible action of maternal IGF-I on fetal growth." Horm Res **42**(1-2): 62–5.
- Chen, E. Y., Y. C. Liao, et al. (1989). "The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution." Genomics **4**(4): 479–97.
- Chowen, J. A., D. Evain-Brion, et al. (1996). "Decreased expression of placental growth hormone in intrauterine growth retardation." Pediatr Res **39**(4 Pt 1): 736–9.
- Cooke, N. E., J. Ray, et al. (1988). "Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins." J Biol Chem **263**(18): 9001–6.
- Cooke, N. E., J. Ray, et al. (1988). "Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns." J Clin Invest **82**(1): 270–5.
- de Vos, A. M., M. Ultsch, et al. (1992). "Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex." Science **255**: 306–12.

- de Zegher, F., M. Vanderschueren-Lodeweyckx, et al. (1990). "Perinatal growth hormone (GH) physiology: effect of GH-releasing factor on maternal and fetal secretion of pituitary and placental GH." J Clin Endocrinol Metab **71**(2): 520–2.
- Eriksson, L., F. Frankenne, et al. (1988). "Growth hormone secretion during termination of pregnancy. Further evidence of a placental variant." Acta Obstet Gynecol Scand **67**(6): 549–52.
- Eriksson, L., F. Frankenne, et al. (1989). "Growth hormone 24-h serum profiles during pregnancy--lack of pulsatility for the secretion of the placental variant." Br J Obstet Gynaecol **96**(8): 949–53.
- Evain-Brion, D., E. Alsat, et al. (1994). "Placental growth hormone variant: assay and clinical aspects." Acta Paediatr Suppl **399**: 49–51; discussion 52.
- Evain-Brion, D., E. Alsat, et al. (1990). "Regulation of growth hormone secretion in human trophoblastic cells in culture." Horm Res **33**(6): 256–9.
- Fisher, P. M., H. W. Sutherland, et al. (1980). "The insulin response to glucose infusion in normal human pregnancy." Diabetologia **19**(1): 15–20.
- Fletcher, B., M. Gulanick, et al. (2002). "Risk factors for type 2 diabetes mellitus." J Cardiovasc Nurs **16**(2): 17–23.
- Frankenne, F., J. Closset, et al. (1988). "The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant." J Clin Endocrinol Metab **66**(6): 1171–80.
- Frankenne, F., M. L. Scippo, et al. (1990). "Identification of placental human growth hormone as the growth hormone-V gene expression product." J Clin Endocrinol Metab **71**(1): 15–8.
- Glueck, C. J., P. Streicher, et al. (2002). "Treatment of polycystic ovary syndrome with insulin-lowering agents." Expert Opin Pharmacother **3**(8): 1177–89.
- Hennen, G., F. Frankenne, et al. (1985). "A human placental GH: increasing levels during second half of pregnancy with pituitary GH suppression as revealed by monoclonal antibody radioimmunoassays." Int J Fertil **30**(2): 27–33.
- Ho, K. K. Y., A. J. O'Sullivan, et al. (1996). "Metabolic actions of growth hormone in man." Endocrine J **43**(Suppl): S57–63.
- Igout, A., F. Frankenne, et al. (1995). "Somatogenic and lactogenic activity of the recombinant 22 kDa isoform of human placental growth hormone." Growth Regul **5**(1): 60–5.

- Igout, A., M. L. Scippo, et al. (1989). "Expression and secretion of the human placental growth hormone in Escherichia coli." Nucleic Acids Res **17**(10): 3998.
- Jara, C. S., A. T. Salud, et al. (1989). "Immunocytochemical localization of the human growth hormone variant in the human placenta." J Clin Endocrinol Metab **69**(5): 1069–72.
- Kerner, W., C. Fuchs, et al. (2001). "Evidenzbasierte Diabetes Leitlinie: DDG." Deutsche Diabetes-Gesellschaft.
- Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495–7.
- Lacroix, M. C., P. Bolifraud, et al. (2002). "Placental growth hormone and lactogen production by perfused ovine placental explants: regulation by growth hormone-releasing hormone and glucose." Biol Reprod **66**(3): 555–61.
- Lacroix, M. C., J. Guibourdenche, et al. (2002). "Human placental growth hormone-a review." Placenta **23**(Suppl A): S87–94.
- Liebhaber, S. A., M. Urbanek, et al. (1989). "Characterization and histologic localization of human growth hormone-variant gene expression in the placenta." J Clin Invest **83**(6): 1985–91.
- Lonberg, U., P. Damm, et al. (2003). "Increase in maternal placental growth hormone during pregnancy and disappearance during parturition in normal and growth hormone-deficient pregnancies." Am J Obstet Gynecol **188**(1): 247–51.
- Lucarelli, P., F. Gloria-Bottini, et al. (2000). "A study of human growth hormone and insulin gene regions in relation to metabolic control of non-insulin-dependent diabetes mellitus." Metabolism **49**(4): 424–6.
- Lucas, M. J. (2001). "Diabetes complicating pregnancy." Obstet Gynecol Clin North Am **28**(3): 513–36.
- Lytras, A., M. E. Bock, et al. (1994). "Detection of placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin ribonucleic acid expression in human trophoblastic neoplasms by reverse transcriptase-polymerase chain reaction." Endocrinology **134**(6): 2461–7.
- MacLeod, J. N., I. Worsley, et al. (1991). "Human growth hormone-variant is a biologically active somatogen and lactogen." Endocrinology **128**(3): 1298–302.
- Matsuda, M. and R. A. DeFronzo (1999). "Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp." Diabetes Care **22**(9): 1462–70.

- Matthews, D. R., J. P. Hosker, et al. (1985). "Homeostasis Model Assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man." Diabetologia **28**: 412–19.
- McIntyre, H. D., A. Russell, et al. (2002). "Placental growth hormone is not suppressed by oral glucose loading in normal human pregnancy." Horm Metab Res **34**(5): 250–3.
- McIntyre, H. D., R. Serek, et al. (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." J Clin Endocrinol Metab **85**(3): 1143–50.
- Melen, L., G. Hennen, et al. (1997). "Both pituitary and placental growth hormone transcripts are expressed in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC)." Clin Exp Immunol **110**(2): 336–40.
- Metzger, B. E. and D. R. Coustan (1998). "Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee." Diabetes Care **21**(Suppl 2): B161–7.
- Nickel, B. E. and P. A. Cattini (1991). "Tissue-specific expression and thyroid hormone regulation of the endogenous placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin genes in a human choriocarcinoma cell line." Endocrinology **128**(5): 2353–9.
- O'Sullivan, J. B. and C. M. Mahan (1964). "Criteria for the oral glucose tolerance test in pregnancy." Diabetes **13**: 278.
- O'Sullivan, J. B., C. M. Mahan, et al. (1973). "Screening criteria for high-risk gestational diabetic patients." Am J Obstet Gynecol **116**: 895.
- Otto, H. and T. Somville (1998). "Leitlinie: Die ärztliche Betreuung der schwangeren Diabetikerin." Arbeitsgemeinschaft Diabetes und Schwangerschaft der DDG und DGGG.
- Patel, N., E. Alsat, et al. (1995). "Glucose inhibits human placental GH secretion, in vitro." J Clin Endocrinol Metab **80**(5): 1743–6.
- Ray, J., B. K. Jones, et al. (1989). "Glycosylated human growth hormone variant." Endocrinology **125**(1): 566–8.
- Ray, J., H. Okamura, et al. (1990). "Human growth hormone-variant demonstrates a receptor binding profile distinct from that of normal pituitary growth hormone." J Biol Chem **265**(14): 7939–44.

- Rygaard, K., A. Revol, et al. (1998). "Absence of human placental lactogen and placental growth hormone (HGH-V) during pregnancy: PCR analysis of the deletion." Hum Genet **102**(1): 87–92.
- Schäfer-Graf, U. M., H. Reiher, et al. (2001). "Board der AG Diabetes und Schwangerschaft der DDG: Diagnostik und Therapie des Gestationsdiabetes." Deutsche Diabetes-Gesellschaft.
- Schaffer, C., M. Graninger, et al. (2001). "Prokaryotic glycosylation." Proteomics **1**: 248–61.
- Schiffer, C., M. Ultsch, et al. (2002). "Structure of a phage display-derived variant of human growth hormone complexed to two copies of the extracellular domain of its receptor: evidence for strong structural coupling between receptor binding sites." J Mol Biol **316**(2): 277–89.
- Seeburg, P. H. (1982). "The human growth hormone gene family: nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone." DNA **1**(3): 239–49.
- Silva, C. M., M. T. Kloth, et al. (2002). "Intracellular signaling by growth hormone variant (GH-V)." Growth Horm IGF Res **12**(5): 374–80.
- Strasburger, C. J., J. Kostyo, et al. (1989). "The antigenic epitopes of human growth hormone as mapped by monoclonal antibodies." Endocrinology **124**: 1548–57.
- Strasburger, C. J., Z. Wu, et al. (1996). "Immunofunctional assay of human growth hormone (hGH) in serum: a possible consensus for quantitative hGH measurement." J Clin Endocrinol Metab **81**(7): 2613–20.
- Su, Y., S. A. Liebhaber, et al. (2000). "The human growth hormone gene cluster locus control region supports position-independent pituitary- and placenta-specific expression in the transgenic mouse." J Biol Chem **275**(11): 7902–9.
- Untergasser, G., M. Hermann, et al. (1998). "Complex alternative splicing of the GH-V gene in the human testis." Eur J Endocrinol **139**(4): 424–7.
- Urbanek, M., J. N. MacLeod, et al. (1992). "Expression of a human growth hormone (hGH) receptor isoform is predicted by tissue-specific alternative splicing of exon 3 of the hGH receptor gene transcript." Mol Endocrinol **6**(2): 279–87.
- Urbanek, M., J. E. Russell, et al. (1993). "Functional characterization of the alternatively spliced, placental human growth hormone receptor." J Biol Chem **268**(25): 19025–32.
- Veldhuis, J. D., M. Bidlingmaier, et al. (2002). "Impact of experimental blockade of peripheral growth hormone (GH) receptors on the kinetics of endogenous and exogenous GH removal in healthy women and men." J Clin Endocrinol Metab **87**(12): 5737–45.

- Verhaeghe, J., M. Bougoussa, et al. (2000). "Placental growth hormone and IGF-I in a pregnant woman with Pit-1 deficiency." Clin Endocrinol (Oxf) **53**(5): 645–7.
- Verhaeghe, J., A. Pintiaux, et al. (2002). "Placental GH, IGF-I, IGF-binding protein-1, and leptin during a glucose challenge test in pregnant women: relation with maternal body weight, glucose tolerance, and birth weight." J Clin Endocrinol Metab **87**(6): 2875–82.
- White, P. (1949). "Pregnancy complicating diabetes." Am J Med **7**: 609–616.
- White, P. (1965). "Pregnancy and diabetes, medical aspects." Med Clin North Am: 1015–1024.
- Wilde (2001). "Nichols Advantage IGF-1 Referenzbereiche." Nichols Institute Diagnostika.
- Wu, Z., M. Bidlingmaier, et al. (2003). "A new nonisotopic, highly sensitive assay for the measurement of human placental growth hormone: development and clinical implications." J Clin Endocrinol Metab **88**(2): 804–11.
- Wu, Z., S. E. Kirk, et al. (1998). "Quantitative measurement of human placental growth hormone (hGH-V) by the immunofunctional hGH assay and a pituitary (GH-N)-specific sandwich immunoassay." 80th Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans **P2–182**.
- Xing, A. Y., J. C. Challier, et al. (1998). "Unexpected expression of glucose transporter 4 in villous stromal cells of human placenta." J Clin Endocrinol Metab **83**(11): 4097–101.
- Yamashita, H., J. Shao, et al. (2000). "Physiologic and molecular alterations in carbohydrate metabolism during pregnancy and gestational diabetes mellitus." Clin Obstet Gynecol **43**(1): 87–98.

## **8 Anhang**

<b>8.1</b>	<b><u>Anhang 1</u></b>	
	<b>Studienlaufzettel</b>	<b>113</b>
<b>8.2</b>	<b><u>Anhang 2</u></b>	
	<b>Aufklärungsbogen: Studie: Plazentares Wachstumshormon und Glukosestoffwechselstörung</b>	<b>114</b>
<b>8.3</b>	<b><u>Anhang 3</u></b>	
	<b>Aufklärungsbogen: Klinische Studie zur Untersuchung der Insulinsensitivität in der Schwangerschaft</b>	<b>117</b>



**hang 2 Aufklärungsbogen: Studie: Plazentares Wachstumshormon und  
Glukosestoffwechselstörung**

**Klinikum der Universität München**

Medizinische Klinik – Innenstadt  
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

\_\_\_\_\_ **LMU**  
Ludwig \_\_\_\_\_  
Maximilians –  
Universität \_\_\_\_\_  
München \_\_\_\_\_

Klinikum der Universität München • Medizinische Klinik – Innenstadt  
Ziemssenstraße 1 • D-80336 München

PD Dr. med. C. J. Strasburger  
Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität  
Medizinische Klinik

Tel.: 089/5160-2353  
Fax: 089/5160-4566

Dr. med. H.-P. Buchinger  
I. Frauenklinik, Maistraße 11

Tel.: 089/5160-4111

Dr. med. H. Feldmeier  
Medizinische Klinik, Ziemssenstraße 1

Tel.: 089/5160-2111

**Aufklärung und Einwilligung des Patienten zur Teilnahme an einer klinischen Studie**

Verlaufsbestimmung des plazentaren Wachstumshormons bei normalen Schwangerschaften und bei Schwangerschaften mit Zuckerkrankheit

Sehr geehrte Patientin,

**Einleitung**

Wir bitten Sie, an einer ihre Schwangerschaft begleitenden klinischen Studie teilzunehmen. Erforscht werden soll die Bedeutung des plazentaren Wachstumshormons für die Entwicklung der Zuckerkrankheit in der Schwangerschaft.

Das plazentare Wachstumshormon ist ein von der Plazenta (Mutterkuchen) ab der 12. Schwangerschaftswoche gebildetes Hormon. Es reduziert ab der zweiten Schwangerschafts-hälfte die Produktion des normalerweise in der Hirnanhangsdrüse der Mutter gebildeten Wachstumshormons. Das plazentare Wachstumshormon ist offenbar für die Nährstoffbereitstellung und für das Wachstum des Babys während der Schwangerschaft wichtig.

Man vermutet einen Zusammenhang zwischen dem plazentaren Wachstumshormon und Formen der Zuckerkrankheit, die während der Schwangerschaft auftreten können.

Sie helfen mit Ihrer Einwilligung, diesen Zusammenhang zum Zuckerstoffwechsel während der Schwangerschaft genauer zu untersuchen.

Anschrift: D-80336 München • Ziemssenstraße 1 • Telefon (0 89) 51 60-0 (Vermittlung)  
Verkehrsverb.: U1, U2, U3, U6, U7, U8, 16, 17, 18, 27, 31 o. 56 bis Haltestelle Sendlinger Tor  
Verkehrsverb.: U3, U6 oder 58 bis Haltestelle Goetheplatz



**Studienverlauf**

Während Ihrer Schwangerschaft wird Ihnen alle vier Wochen ein Röhrchen Blut (5-6 ml) entnommen. Dies erfolgt, sofern organisatorisch möglich, im Rahmen Ihrer normalen Schwangerschaftsvorsorgeuntersuchungen. Die letzte Blutentnahme wird einen Tag nach der Entbindung auf der jeweiligen geburtshilflichen Station vorgenommen.

Zusätzlich werden wir bei Ihnen um die 24. Schwangerschaftswoche einen Zuckerbelastungstest durchführen. Das bedeutet, daß Sie eine Zuckerlösung mit 50g Zucker zu trinken bekommen und zweimal Blut entnommen wird. Das erste Mal direkt vor dem Trinken der Lösung aus der Armvene, um den Ausgangszuckerwert festzustellen, das zweite Mal nach einer Stunde aus der Fingerbeere. Die erste Blutentnahme ersetzt bei diesem Arztbesuch natürlich die oben angesprochene Studienblutentnahme. Sie müssen für diese Untersuchung nicht nüchtern sein. Nach Vorschlägen deutscher und internationaler Fachgesellschaften soll dieser Test in Zukunft routinemäßig im Rahmen der Schwangerschaftsvorsorge bei jeder schwangeren Frau durchgeführt werden.

Sollte bei Ihnen bereits eine Zuckerkrankheit (Insulinpflichtiger Diabetes mellitus) bekannt sein, wird der Belastungstest bei Ihnen selbstverständlich nicht vorgenommen.

Daneben werden wir Sie zu Ihrem Schwangerschaftsverlauf, zu Befinden, Gewichtszunahme und nach der Geburt zu Geburtsgröße, Geburtsgewicht und Plazentagröße befragen und einen Blick in Ihren Mutterpaß werfen.

**Risiken**

Außer daß es an der Stelle der Blutentnahme am Arm - wie bei jeder Blutentnahme - zu Rötung, Entzündung oder Bluterguß kommen kann, bestehen keine Risiken.

Der Zuckerbelastungstest hat keinerlei Risiken.

**Rechte, Widerruf, Vertraulichkeit**

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Sie können Ihre Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen.

Sie haben jederzeit das Recht alle wichtigen Informationen über die Studie einzuholen.

Sie haben das Recht auf Vertraulichkeit. Alle im Rahmen der Studie anfallenden, persönlichen Daten werden anonymisiert ausgewertet und nicht an Dritte weitergegeben.

Sie erhalten von uns eine Kopie der Patienteninformation und der Einwilligungserklärung.

Für weitere Fragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung; wenden Sie sich bitte an Ihren Studienarzt:

Herrn/Frau Dr. med.

.....Tel.:.....

Vielen Dank für Ihr Interesse. Überdenken Sie die Information sorgfältig und unterzeichnen Sie die nachfolgende Einwilligungserklärung, wenn Sie an der Studie teilnehmen möchten.

Ärztliche Vermerke zum Aufklärungsgespräch:

.....

.....

.....

.....

.....

**Schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der klinischen Studie zum placentaren Wachstumshormon:**

Alle Fragen zur klinischen Studie über das placentare Wachstumshormon wurden von meinem behandelnden Arzt, Herrn/Frau Dr. med. .... zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich bin über das Wesen der Studie aufgeklärt worden, habe die Patientenaufklärung gelesen und verstanden und bin bereit, meine Daten für diese Studie zur Verfügung zu stellen.

Eine Kopie der Patientenaufklärung und -einwilligung ist mir ausgehändigt worden.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum, Stempel und Unterschrift  
des behandelnden Arztes

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum und Unterschrift  
der Patientin

Tel.: ...../.....

### 8.3 **Anhang 3 Aufklärungsbogen: Klinische Studie zur Untersuchung der Insulinsensitivität in der Schwangerschaft**

## Klinikum der Universität München

Medizinische Klinik – Innenstadt  
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

\_\_\_\_\_ **LMU**  
Ludwig \_\_\_\_\_  
Maximilians –  
Universität \_\_\_\_\_  
München \_\_\_\_\_

Klinikum der Universität München • Medizinische Klinik – Innenstadt  
Ziemssenstraße 1 • D-80336 München

**PD Dr. med. C. J. Strasburger**      Medizinische Klinik, Ziemssenstr.1      Tel.: 089/5160-2353  
Fax: 089/5160-4566

**Dr. med. H.-P. Buchinger**      I. Frauenklinik, Maistraße 11      Tel.: 089/5160-4111

**Dr. med. H. Feldmeier**      Medizinische Klinik, Ziemssenstr.1      Tel.: 089/5160-2111

## **Aufklärung und Einwilligung des Patienten zur Teilnahme an einer klinischen Studie**

**Verlaufsbestimmung des plazentaren Wachstumshormons während der Schwangerschaft und seine Bedeutung bei Schwangerschaften mit Diabetes mellitus und Gestationsdiabetes (Zuckerkrankheit)**

**zusätzlich: Verlaufsbestimmung der Insulinsensitivität (-empfindlichkeit)**

Sehr geehrte Patientin,  
wir bitten Sie, an einer ihre Schwangerschaft begleitenden klinischen Studie teilzunehmen. Erforscht werden soll die Bedeutung des plazentaren Wachstumshormons für die Entwicklung der Zuckerkrankheit in der Schwangerschaft.

Das plazentare Wachstumshormon ist ein von der Plazenta (Mutterkuchen) ab der 12. Schwangerschaftswoche gebildetes Hormon. Es reduziert ab der zweiten Schwangerschaftshälfte die Produktion des normalerweise in der Hirnanhangsdrüse der Mutter gebildeten Wachstumshormons. Das plazentare Wachstumshormon ist offenbar für die Nährstoffbereitstellung und für das Wachstum des Babys während der Schwangerschaft wichtig.

Anschrift: D-80336 München • Ziemssenstraße 1 • Telefon (0 89) 51 60-0 (Vermittlung)  
Verkehrsverb.: U1, U2, U3, U6, U7, U8, 16, 17, 18, 27, 31 o. 56 bis Haltestelle Sendlinger Tor  
Verkehrsverb.: U3, U6 oder 58 bis Haltestelle Goetheplatz



Man vermutet einen Zusammenhang zwischen dem plazentaren Wachstumshormon und Formen der Zuckerkrankheit, die während der Schwangerschaft auftreten können.

Sie helfen mit Ihrer Einwilligung, diesen Zusammenhang zum Zuckerstoffwechsel während der Schwangerschaft genauer zu untersuchen.

### **Studienverlauf**

Während Ihrer Schwangerschaft wird Ihnen alle vier Wochen ein Röhrchen Blut (5-6 ml) entnommen. Dies erfolgt, sofern organisatorisch möglich, im Rahmen Ihrer normalen Schwangerschaftsvorsorgeuntersuchungen. Die letzte Blutentnahme wird einen Tag nach der Entbindung auf der jeweiligen geburtshilflichen Station vorgenommen.

Bestimmung der Insulinempfindlichkeit:

Zusätzlich werden wir bei Ihnen dreimal in der Schwangerschaft, zwischen der 6.-12., der 18.-24. und der 32.-38. Schwangerschaftswoche einen Zuckerbelastungstest durchführen. Das bedeutet, daß Sie eine Zuckerlösung mit 75g Zucker zu trinken bekommen. Diese Zuckermenge ist in etwa 3-4 Semmeln enthalten. Anschließend wird Ihnen zu bestimmten Zeitpunkten Blut aus einer zuvor in die Vene gelegten Plastikkanüle entnommen. Der Test dauert zwei Stunden und findet unter standardisierten Bedingungen im Funktionsraum der Medizinischen Klinik Innenstadt statt. Sie müssen für diese Untersuchung nüchtern sein.

Nach Vorschlägen deutscher und internationaler Fachgesellschaften wird dieser Test zur Erkennung von Zuckerstoffwechselstörungen bei symptomlosen, gesunden Frauen eingesetzt und gewinnt, auch wenn er nicht routinemäßig bei allen Schwangerschaften durchgeführt wird, an Bedeutung.

Wir werden den Test dreimal mit Ihnen durchführen, da wir die Veränderung der Insulinempfindlichkeit während Ihrer Schwangerschaft untersuchen wollen und diese drei fixen Zeiträume eine Verlaufskontrolle ermöglichen.

Die Tests werden wir in den jeweiligen Zeitfenstern natürlich an Ihren Terminkalender anpassen.

Daneben werden wir Sie zu Ihrem Schwangerschaftsverlauf, zu Befinden, Gewichtszunahme und nach der Geburt zu Geburtsgröße, Geburtsgewicht und Plazentagröße befragen und einen Blick in Ihren Mutterpaß werfen.

### **Risiken**

Außer daß es an der Stelle der Blutentnahme am Arm - wie bei jeder Blutentnahme - zu Rötung, Entzündung oder Bluterguß kommen kann, bestehen keine Risiken.

Es sind keine Risiken des Zuckerbelastungstests bekannt. Nur wer an einer insulinpflichtigen Zuckerkrankheit leidet darf an der Studie nicht teilnehmen.

**Rechte, Widerruf**

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Sie können Ihre Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen.

Sie haben jederzeit das Recht alle wichtigen Informationen über die Studie einzuholen.

**Vertraulichkeit der Daten**

Sie haben das Recht auf Vertraulichkeit. Alle im Rahmen der Studie anfallenden, persönlichen Daten werden anonymisiert ausgewertet und nicht an Dritte weitergegeben.

Sie erhalten von uns eine Kopie der Patienteninformation und der Einwilligungserklärung.

Für weitere Fragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung; wenden Sie sich bitte an Ihren Studienarzt:

Herrn/Frau Dr. med.

.....Tel.:.....

Vielen Dank für Ihr Interesse. Überdenken Sie die Information sorgfältig und unterzeichnen Sie die nachfolgende Einwilligungserklärung, wenn Sie an der Studie teilnehmen möchten.

Ärztliche Vermerke zum Aufklärungsgespräch:

.....  
.....  
.....  
.....

**Schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der klinischen Studie zum plazentaren Wachstumshormon:**

Alle Fragen zur klinischen Studie über das plazentare Wachstumshormon mit Kontrolle der Insulinempfindlichkeit wurden von meinem behandelnden Arzt, Herrn/Frau Dr. med. .... zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich bin über das Wesen der Studie aufgeklärt worden, habe die Patientenaufklärung gelesen und verstanden und bin bereit, meine Daten für diese Studie zur Verfügung zu stellen.

Eine Kopie der Patientenaufklärung und -einwilligung ist mir ausgehändigt worden.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum, Stempel und Unterschrift  
des behandelnden Arztes

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum und Unterschrift  
der Patientin

Tel.: ...../.....

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. Christian J. Strasburger, der mir dieses Thema überließ und mir somit die Möglichkeit bot, die Brücke zwischen der Endokrinologie und der Gynäkologie / Geburtshilfe zu schlagen. Zudem durfte ich in seinem Labor und in der neuroendokrinen Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München das wissenschaftliche Arbeiten erlernen.

Herrn Dr. med. Martin Bidlingmaier, der mit mir sowohl den experimentellen als auch den klinischen Teil plante, neue Ideen einbrachte, stets zur Diskussion der Ergebnisse anregte und schließlich jederzeit mit Rat und Tat zu Seite stand.

Herrn Dr. med. Zida Wu, der maßgeblich für die Entwicklung der Antikörper verantwortlich ist und in methodischen Fragen, wann immer es ihm möglich war, ein offenes Ohr hatte.

Herrn Dr. med. Peter Buchinger und Frau Dr. med. Barbara Schießl, die meine Arbeit an der I. Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München monitorten, mir durch die Mitarbeit in der Diabetes-Sprechstunde für Schwangere einen einzigartigen Einblick in die Klinik gewährten und durch Ihre Unterstützung maßgeblich dazu beitrugen, dass eine so große Anzahl von Patientinnen rekrutiert werden konnte.

Herrn Dr. med. H. Feldmeier und Frau Rosi Lohr, die mir über die Diabetesambulanz einen Einblick in die Erkrankung Diabetes gewährten und mir in der Überwachung derselben in der Schwangerschaft behilflich waren.

Frau Susan E. Kirk, MD, University of Virginia, Charlottesville, U.S.A., der es gelungen war, aufgereinigtes hGH-V herzustellen und uns dies freundlicherweise als Matrix für die Erstellung des Assays zur Verfügung zu stellte.

Herrn Prof. Dr. med. Paul Saenger, MD, Albert Einstein College of Medicine, New York, U.S.A., der sein Sabbaticle in der neuroendokrinen Arbeitsgruppe ableistete und mit vielen neuen Ideen die Arbeit mit hGH-V bereicherte.

Frau Dr. rer. nat. Edith Kahler und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Brunner, Medizinische Statistik, Georg-August-Universität Göttingen, die nach meinem Weggang aus München mir bei der Auswertung meiner Daten halfen.

Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft, insbesondere Frau Marianne Fischer, die mich und meine Arbeit finanziell unterstützte und mich zur Durchführung der zweiten Studie anregte.

Mein Dank gilt allen gegenwärtigen und auch ehemaligen Mitarbeiterinnen der neuroendokrinen Arbeitsgruppe, der Diabetesambulanz und diabetologischen Arbeitsgruppe: Edith Gulis, Kathy Müller-Schertler, Mümine Mus, Katleen Schaal, Rita Schwaiger, Stefanie Stadie, Tanja Wernetshammer, Frau Baumann, Frau Eimer, Frau Grünfeld, Frau Müller.

Zudem möchte ich allen folgenden Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern danken, die durch Ihre aktive Mitarbeit und das einfache „Daran Denken“ die Studie unterstützt haben:

Allen Ärzten und Schwestern der Allgemeinen Ambulanz und der Privatambulanz der I. UFK München sowie den Schwestern der Wochenstationen, allen Hebammen und den Mitarbeiterinnen des Archivs der I. UFK München. Den Mitarbeiterinnen des Zentrallabors der Medizinischen Klinik Innenstadt.

Für die Durchsicht des Manuskripts und all die wertvollen Tipps bin ich Herrn Prof. Dr. med. Heinz Hartmann und Herrn Stefan Meißner sehr dankbar.

Vor allem bei meinen Eltern, Großeltern und Freunden möchte ich mich für Ihre große Unterstützung und Toleranz im Bezug auf das Dauerthema Doktorarbeit bedanken.

## 10 Lebenslauf

**Name** Stephanie Christiane Friß

**Geburtsdatum** 12. Oktober 1974

**Geburtsort** Ulm / Donau

### Ausbildung

1981 – 1985 Grundschule Senden-Ay

1985 – 1994 Illertal-Gymnasium Vöhringen

1994 – 1995 Freiwilliges Soziales Jahr, Rehabilitationskrankenhaus Ulm

1995 – 1997 Studium der Humanmedizin Universität Regensburg

1997 – 2001 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München

1999 – 2000 Studentische Aushilfskraft an der Ludwig-Maximilians-Universität München, I. Universitätsfrauenklinik; Abteilung für gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin und am Zentrum für Reproduktionsmedizin, Prof. Dr. D. Berg, Dr. B. Lesoine, Dr. U. Berg, München

1999 – 2002 Mitarbeit im Labor von Herrn PD Dr. med. C. J. Strasburger an der Medizinischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München (komm. Direktor Prof. Dr. med. D. Schlöndorff)

2001 – 2002 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Abschluss des Studiums mit der dritten ärztlichen Prüfung Mai 2002

seit 10.2002 Ausbildung zur Fachärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe an der Universitätsfrauenklinik der Georg-August-Universität Göttingen (Direktor Prof. Dr. med. G. Emons)

### Stipendium / Preise

2001 – 2002 Promotionsstipendium des Stifterverbands für die Deutsche Wissenschaft, Marianne und Dr. Fritz Walter Fischer Stiftung

11.2001 STEPS - Award 2001  
Nachwuchsförderpreis der Arbeitsgemeinschaft für pädiatrische Endokrinologie