UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Kurt Hecher

Immunologische Adaptationsmechanismen und fetale Wachstumsentwicklung im Schwangerschaftsverlauf in Assoziation mit dem kindlichen Geburtsgewicht

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Eva Antonia Beifuß

aus Göttingen

Hamburg 2014

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.12.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. P. Arck

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: PD Dr. E. Tolosa

INHALTSÜBERSICHT

1. EINLEITUNG	**4**
2. MATERIAL UND METHODEN	**20**
3. ERGEBNISSE	**30**
4. DISKUSSION	**43**
5. ZUSAMMENFASSUNG	**54**
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	**LV**
TABELLEN-/ ABBILDUNGSVERZEICHNIS	**LVII**
QUELLENVERZEICHNIS	**LIX**
DANKSAGUNG	**LXX**
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	**LXXI**
TABELLARISCHER LEBENSLAUF	**LXXII**

1. EINLEITUNG 4

1.1 Stellenwert des Geburtsgewichtes 4
1.2 Schwangerschaft und Immunsystem 6
1.3 Endokrine Regulierungsmechanismen während der Schwangerschaft und deren Einfluss auf das Immunsytem 12
1.3.1 Die Bedeutung von Progesteron in der Schwangerschaft 13
1.3.2 Die Bedeutung von Östradiol in der Schwangerschaft 14
1.3.3 Die Bedeutung von Prolaktin in der Schwangerschaft 14

1.4 Plazentare Durchblutung und Dopplersonographie 15
1.5 Arbeitshypothesen und Fragestellungen 19

2. MATERIAL UND METHODEN 20

2.1 Studiendesign 20
2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien 21
2.1.2 Studienkollektiv 21

2.2 Verwendete Materialien 23
2.3 Probengewinnung 24
2.3.1 Blutentnahme 24
2.3.2 Serumgewinnung 24

2.4 Durchflusszytometrie 24
2.4.1 Probenaufbereitung und durchflusszytometrische Messung 24
2.4.2 Verteilungsmuster und Anzahl $CD4^+$ 25
2.4.3 Verteilungsmuster und Anzahl $CD8^+$ 26
2.4.4 Verteilungsmuster und Anzahl weiterer Leukozyten 27

2.5 Hormonmessung 28
2.6 Sonographie 28
2.7 Statistische Auswertung 29

3. ERGEBNISSE 30

3.1 Kindliche Maße und Gestationsalter 30
3.2 Auswertung der durchflusszytometrischen Messung von Zellpopulationen 31
3.2.1 Verteilungsmuster und Anzahl von $CD4^+$-Zellen 31
3.2.2 Verteilungsmuster und Anzahl von $CD8^+$-Zellen 32

3.2.3 Verteilungsmuster und Anzahl weiterer Leukozytenpopulationen 33
3.2.4 Konzentration Progesteron, Östradiol und Prolaktin 34
3.2.5 Sonographische Werte in der 24. Schwangerschaftswoche 35

3.3 Regressionsanalysen 36
3.3.1 $CD4^+$ Zellpopulationen in Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht 37
3.3.2 $CD8^+$ Zellpopulationen in Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht 38
3.3.3 Weitere Leukozytenpopulationen in Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht 39
3.3.4 Hormone in Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht 41
3.3.5 Sonographische Parameter in Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht 41

4. DISKUSSION 43

4.1 Klinische Bedeutung der immunologischen Anpassung während der 14. und 24. Schwangerschaftswoche 43
4.2 Klinische Bedeutung der hormonellen Anpassung während der 14. und 24. Schwangerschaftswoche ... 49
4.3 Klinische Bedeutung dopplersonographischer Untersuchungen während der 24. Schwangerschaftswoche 50
4.4 Reflektion der Methodik und der Ergebnisse 51
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick 52

5. ZUSAMMENFASSUNG 54
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS LV
TABELLEN-/ ABBILDUNGSVERZEICHNIS LVII
QUELLENVERZEICHNIS LIX
DANKSAGUNG LXX
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG LXXI
TABELLARISCHER LEBENSLAUF LXXII

1. Einleitung

1.1 Stellenwert des Geburtsgewichtes

Das Geburtsgewicht und dessen Auswirkungen auf die spätere Gesundheit

Das Geburtsgewicht ist ein Indikator sowohl für die perinatale Gesundheit, als auch für das Auftreten von Krankheiten im späteren Leben eines Menschen (Risnes *et al.* 2011, Goldenberg und Culhane 2007, Friedlander *et al.* 2003). Studien haben gezeigt, dass ein niedriges Geburtsgewicht häufig mit der Entstehung sogenannter Volkskrankheiten assoziiert ist. So konnten beispielsweise Zusammenhänge zwischen niedrigem Geburtsgewicht und koronarer Herzkrankheit im Erwachsenenalter (Huxley *et al*. 2007) in Schweden (Leon *et al.* 1998), in Großbritannien (Barker *et al.* 1993, Frankel *et al.* 1996) und in den USA (Rich-Edwards *et al.* 1997) nachgewiesen werden. Auch der Zusammenhang zwischen erniedrigtem Geburtsgewicht und arterieller Hypertonie (Osmond und Barker 2000), Fettleibigkeit (Curhan *et al.* 1996) oder eingeschränkter Glukosetoleranz bis hin zum Diabetes mellitus im Erwachsenenalter (Phipps *et al*. 1993) ist schon seit Jahren bekannt. Außerdem konnten die Einflüsse eines niedrigen Geburtsgewichtes auf Einschränkungen der Lungenfunktion, insbesondere asthmatischen Erkrankungen (Nepomnyaschy und Reichmann 2006), sowie auf das vermehrte Auftreten psychiatrischer Erkrankungen wie Angststörungen und Depressionen (Boyle *et al*. 2011) nachgewiesen werden.

Niedriges Geburtsgewicht und steigendes durchschnittliches Alter der Mutter

Das durchschnittliche Geburtsgewicht in den entwickelten Industrienationen zeigte in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts einen positiven Trend (Skjaerven *et al.* 2000, Hartwig *et al.* 2013), der dann jedoch in den vergangenen 20 Jahren wieder abnahm. Der Anteil an Kindern mit geringem Geburtsgewicht nahm allmählich wieder zu (Centers for Disease Control and Prevention 2002, Hartwig *et al.* 2013).

Begleitend dazu ist in den vergangen Jahren ein steigendes mütterliches Alter bei Geburt des ersten Kindes zu beobachten gewesen (Lisonkova *et al.* 2010). So stieg das durchschnittliche Alter einer Mutter bei der ersten Geburt in Kanada zwischen 1969 und 2005 von 23,7 auf 29,2 Jahre an. In der Zeit zwischen 1982 und 2005 stieg dort auch der Anteil von 30 bis 34- jährigen Müttern von 18,9 auf 31,4 % an. In den USA, entwickelten europäischen Staaten und Australien sind ähnliche Trends zu verzeichnen (Lisonkova *et al.* 2010).

Es gibt Anhalt Anzeichen dafür, dass ein besonders niedriges oder hohes mütterliches Alter (< 20 bzw. ≥ 35 Jahre) bei Geburt mit vermehrter Frühgeburtlichkeit einhergeht. Ebenfalls ist in diesen Al-

tersgruppen eine erhöhte Inzidenz von Kindern, die zu klein oder zu leicht für den Geburtstermin, also „Small for Gestational Age“ (SGA) sind, zu beobachten (Ananth *et al.* 2004).
Dieser zunehmende Anteil älterer oder besonders junger Primiparae trägt dazu bei, dass ein erniedrigtes Geburtsgewicht und die damit einhergehenden Folgen für die kindliche Gesundheit auch zukünftig eine Problematik in den Industrienationen darstellen wird.

Einflussfaktoren auf das Geburtsgewicht

Wie sich ein Kind während der Schwangerschaft entwickelt, hängt zu einem großen Teil von mütterlichen Voraussetzungen ab (Cogswell und Yip 1995). Einerseits beeinflussen feststehende Grundvoraussetzungen wie Alter, Body-Mass-Index oder Parität der Mutter das Geburtsgewicht. Andererseits ist die fetale Entwicklung auch sehr sensibel und anfällig für veränderbare Faktoren. So haben beispielsweise die mütterliche Gewichtszunahme sowie Blutglukosewerte im Verlauf der Schwangerschaft Auswirkungen auf das kindliche Geburtsgewicht (Roland *et al.* 2012). Des Weiteren können sowohl Faktoren wie Infektionen, Ernährung (Hales und Barker 2001), toxische Substanzen wie Medikamente, Alkohol oder Zigarettenrauch (Bernstein *et al.* 2005), als auch Stress (Elsenbruch *et al.* 2007) auf den Schwangerschaftsverlauf einwirken.
Die Bedeutung äußerer Einflüsse auf die Schwangerschaft und die Entwicklung des Kindes wurde bereits intensiv untersucht. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass auch das maternale Immunsystem und die hormonelle Regulierung während der Schwangerschaft in starkem Zusammenhang mit der intrauterinen Kindesentwicklung und dem Geburtsgewicht stehen (Orsi und Tribe, 2008, Challis *et al.* 2009, Golightly *et al*. 2011, Hartwig *et al.* 2013).
Die Plazenta hat einen hohen Stellenwert in der Versorgung des Fetus mit Sauerstoff und Nährstoffen. Damit eine gute Versorgung und somit auch ein optimales Wachstum des Fetus gewährleistet sind, wird die Entwicklung der Plazenta von Anfang an sowohl vom mütterlichen Immunsystem, als auch von endokrinen Faktoren beeinflusst (Norwitz *et al.* 2001, Smith *et al.* 2009). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass maternale Leukozyten an der morphologischen Entwicklung der plazentaren Gefäße beteiligt sind und somit Einfluss auf die fetale Blutversorgung nehmen (Smith *et al.* 2009). Außerdem tragen Hormone und immunaktive Zellen zur erleichterten Implantation der Blastozyste bei, was sich auf die Funktion der Plazenta während der gesamten Schwangerschaft auswirkt (Norwitz *et al.* 2001). Störungen in dieser sensiblen Implantationsphase sind mit unterschiedlichen Schwangerschaftspathologien wie einer fetalen Wachstumsrestriktion assoziiert (Bulmer *et al.* 2012). Immunologische Faktoren und Hormone beeinflussen demnach direkt oder indirekt den Verlauf der Schwangerschaft und somit auch das Geburtsgewicht und die Gesundheit des Nachkommen im späteren Leben.

1.2 Schwangerschaft und Immunsystem

Grundlagen des Implantationsvorganges

Das genetische Material des heranwachsenden Fetus besteht jeweils zu einem Teil aus mütterlichen und aus väterlichen Anteilen und stellt somit aus immunologischer Sicht einen Fremdkörper für den mütterlichen Organismus dar. Der Fetus wird hinsichtlich dieser Tatsache auch mit einem semi-allogenen Transplantat verglichen (Medawar 1953, Sacks *et al*. 1999).

Zahlreiche Ansätze beschreiben mögliche Ursachen dafür, dass die Mutter den Fetus nicht nur akzeptiert, sondern aktiv toleriert.

Im Mausmodell konnte von Johansson *et al.* gezeigt werden, dass bereits kurze Zeit nach der Befruchtung der Eizelle eine Aktivierung des weiblichen Immunsystems stattfindet. Dabei führen in der Samenflüssigkeit enthaltene väterliche Antigene zu einer Aktivierung von regulierenden maternalen Lymphozyten und zur Steigerung der Zytokinproduktion, wodurch eine Anpassung der mütterlichen Immunreaktion und damit eine erhöhte Toleranz gegenüber den väterlichen Antigenen bewirkt wird (Johansson *et al.* 2004, Robertson 2010).

Eine Aktivierung der Immunantwort des mütterlichen Immunsystems wird jedoch nicht ausschließlich durch das männliche Seminalplasma hervorgerufen. Bereits die Umwandlung des endometrischen Stromas hin zur rezeptiven Dezidua wird als inflammatorischer Vorgang angesehen, denn es kommt neben einer Umwandlung der Gefäßstrukturen zur Einwanderung natürlicher Killerzellen aus der Peripherie (Zoumakis *et al.* 2000, Schneider *et al.* 2011).

Nachdem die Befruchtung der Eizelle im Eileiter stattgefunden hat, findet nach sechs bis sieben Tagen zur Implantation der Blastozyste in die rezeptive Uterusschleimhaut statt. Es kommt dabei zur Invasion des Trophoblasten, der die äußere Zellschicht der Blastozyste darstellt, in die Dezidua (Schneider *et al.* 2011).

Die Implantationsphase stellt ein sehr vulnerables Stadium der Schwangerschaft dar, und so entwickelt sich nur ein kleiner Teil aller entstehenden Schwangerschaften des Menschen erfolgreich bis zum Stadium der implantierten Blastozyste. Es ist bekannt, dass fehlerhafte Abläufe während der Implantationsphase in 75% aller Schwangerschaftsverluste als Ursache angesehen werden können (Norwitz *et al.* 2001). Damit eine beginnende Schwangerschaft komplikationslos ablaufen kann, muss nicht nur das semi-allogene Zellmaterial vom maternalen Organismus toleriert werden, sondern es besteht gleichzeitig die Anforderung an das maternale Immunsystem, sich selbst und den Fetus vor Infektionen durch Viren, Bakterien oder Pilze zu schützen (Challis *et al.* 2009, Munoz-Suano *et al.* 2011).

Im Rahmen der Trophoblasteninvasion entsteht ein direkter Kontakt zwischen semi-allogenem Zellmaterial und maternalem dezidualen Gewebe. Es ist bekannt, dass Antigene, Zellfragmente und auch

ganze Zellen von Trophoblast und Embryo in den mütterlichen Blutkreislauf gelangen können und dort immunologische Reaktionen auslösen (Robertson 2010). Dabei kommt es zur Aktivierung von Immunzellen im Blut oder in Lymphknoten der Mutter, die im Bereich der feto-maternalen Grenze oder systemisch zur Suppression der mütterlichen Immunabwehr und somit zu Tolerierung des Trophoblasten beitragen (Thellin *et al.* 2003, Schneider *et al.* 2011). Gleichzeitig wird jedoch auch das Wachstum und die Invasion des Trophoblasten kontrolliert gefördert. Eine wichtige Rolle spielen die Oberflächenrezeptoren des Trophoblasten: Die Trophoblastenzellen präsentieren keine klassischen MHC-Moleküle (major histocompatibility complex), sondern exprimieren HLA-G (human leucocyte antigen), eine Unterform der MHC-1-Moleküle. Studienergebnisse zeigen, dass die HLA-G-Moleküle mit „killer cell immunoglobulin-like receptors“ (KIRs) interagieren. KIRs sind Rezeptoren der $CD56^{+}$-natürlichen Killer Zellen (NK-Zellen) und die Interaktion mit den HLA-G-Molekülen führt dazu, dass der Synzytiotrohoblast vor dem Angriff durch zytotoxische NK-Zellen geschützt wird (Thellin *et al*. 2003, Le Gal *et al*. 1999). Demnach trägt HLA-G zum Schutz des Fetus vor dem Angriff durch $CD8^{+}$-zytotoxische T-Lymphozyten bei.

In Abbildung 1 wird schematisch das endokrine und immunzytochemische Zusammenspiel dargestellt, welches zum Erhalt der frühen Schwangerschaft wesentlich beiträgt. Der Synzytiotrophoblast sezerniert humanes Choriongonadotropin (hCG), wodurch die Progesteronproduktion des Gelbkörpers anregt wird. Progesteron supprimiert die Prostaglandinproduktion und unterstützt die Zellproliferation im Endometrium. Durch die Expression des veränderten MHC-Moleküls HLA-G kann der Trophoblast mit regulierenden Leukozyten wie NK-Zellen interagieren, die lokal in der Dezidua eine geringe Zytotoxizität aufweisen. Durch eine Veränderung des Zytokinmusters kommt es zu Hemmung der Zell-vermittelten Immunantwort, wodurch der Trophoblast geschützt wird. Außerdem wird die Aktivität des unspezifischen Komplementsystems gehemmt. Es wird somit eine lokale Immunsuppression oder -toleranz bewirkt, die dem Trophoblasten die Implantation erleichtert (Norwitz *et al.* 2001)

Es kann festgehalten werden, dass optimale Wachstumsbedingungen bereits in der frühen Schwangerschaft eine Grundvoraussetzung für die fetale Entwicklung im Verlauf der Schwangerschaft sind.

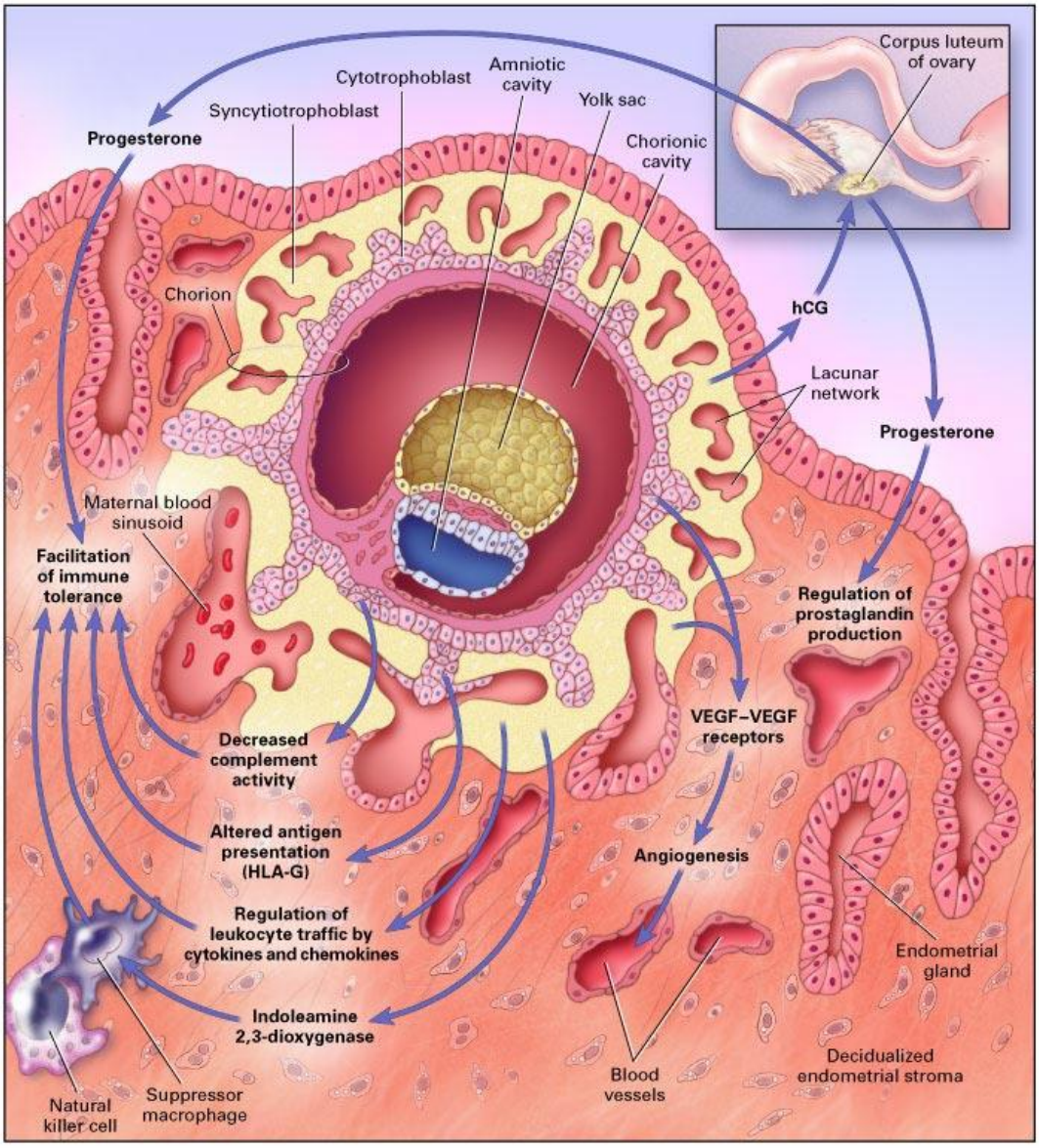

Abb. 1: **Schematische Darstellung: Erhaltungsmechanismen in der frühen Schwangerschaft (Norwitz *et al.* 2001).**
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; hCG: humanes Choriongonadotropin.

Th2-Zellen und regulatorische T-Zellen prägen den erfolgreichen Schwangerschaftsverlauf

T-Lymphozyten besitzen wichtige regulierende Eigenschaften sowohl im Rahmen der Implantationsphase als auch im weiteren Schwangerschaftsverlauf. CD4-positive T-Helferzellen (Th) lassen sich funktionell anhand des von ihnen produzierten Zytokinmusters einteilen. Nach Saito *et al.* (2010) gibt es die Unterteilung in Th1, Th2, Th17 und regulatorische T-Zellen (Tregs).

Th1-Zellen des peripheren Blutes zeichnen sich durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 2 (IL 2), Interferon gamma (IFNγ) und Tumornekrosefaktor α (TNFα) aus. Diese Zytokine werden der zellulären Immunabwehr zugerechnet. Sie haben einen schädlichen Einfluss auf den Erhalt einer Schwangerschaft, da sie die Aktivität von NK-Zellen unterstützen. Th1-Zytokine

wurden kausal in Zusammenhang mit spontanen Aborten gebracht (Raghupathy 1997, Liu *et al.* 2011).

Th17-Zellen produzieren IL 17 und sind mit der Initiierung inflammatorischer Vorgänge sowie der Abstoßung von Transplantaten assoziiert (Saito *et al*. 2010).

Th2-Zellen prägen das Bild der erfolgreichen Schwangerschaft. Sie produzieren die Interleukine IL 4, IL 5, IL 6, IL 10 und IL 13, welche der humoralen Immunabwehr zugerechnet werden. Lange Zeit war die Theorie gängig, dass ein Vorherrschen des Th2-geprägten Zytokinmilieus essentiell mit dem Erfolg einer Schwangerschaft einhergehe. Dieses Paradigma musste jedoch im Laufe der Zeit angepasst werden. Es hat sich gezeigt, dass nicht nur ein Überwiegen der Th1-Zytokine schädlich für eine Schwangerschaft ist, sondern dass auch eine ausgeprägte Dominanz des Th2-Typs mit Aborten und Schwangerschaftskomplikationen einhergeht (Saito *et al*. 2010). Dennoch wird ein ausgewogenes Überwiegen des Th2-Milieus als schwangerschaftsprotektiv angesehen. Es gibt allerdings weitere Zellpopulationen, die als essentiell zum Erhalt einer gesunden Schwangerschaft angesehen werden.

Es wird angenommen, dass $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen (Tregs) immunologische Toleranzmechanismen des maternalen Immunsystems gegenüber den alloantigenen fetalen Zellen modulieren (Aluvihare *et al.* 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass Tregs in der humanen Schwangerschaft an der feto-maternalen Grenzzone zum vorherrschenden Zellbild gehören, wohingegen die Populationen beim Abort kaum nachweisbar sind. Diese erhöhte Frequenz lässt sich allerdings nur lokal in der Dezidua, nicht im peripheren Blut nachweisen (Saito *et al*. 2007). Auch in Mausversuchen wurden erhöhte uterine Konzentrationen von Tregs nachgewiesen, was auf eine lokale Rekrutierung in die feto-maternale Grenzzone schließen lässt (Aluvihare *et al.* 2004).

Tregs sind in der Lage, die Zytokinproduktion von T-Helferzellen und $CD8^+$-T-Zellen zu modulieren. Außerdem vermögen sie die zytotoxische Funktion von NK-Zellen zu supprimieren und haben somit positiven Einfluss auf Implantation und Schwangerschaftserhalt. Versuche an Mäusen, die keine Tregs besaßen, zeigten kurz nach der Implantation ein erhöhtes Auftreten von Aborten (Saito *et al.* 2007).

$CD8^+$-Subpopulationen zeigen unterschiedliches zytotoxisches Potential

Nach Joachim *et al.* (2001) können auch $CD8^+$-Zellen dem Th1- oder dem Th2-Typ zugeordnet werden. Es zeigte sich, dass die Zellen unter Stressexposition vermehrt TNFα produzieren und somit eine abortive Wirkung haben.

Unter dem Einfluss des Gelbkörperhormons Progesteron können $CD8^+$-Zellen aber auch die Perforinproduktion von natürlichen Killerzellen im peripheren Blut hemmen (Check *et al.* 2001) und somit schwangerschaftsprotektiv agieren.

Mittlerweile können $CD8^+$-Zellen ihren Oberflächenmolekülen entsprechend in verschiedene Subpopulationen eingeteilt werden. Rich *et al.* (1999) konnten in einer Studie mit schwangeren Frauen nachweisen, dass es schwangerschaftsbegleitend zu einer Veränderung verschiedener Gruppen innerhalb der $CD8^+$-Population kommt. Beispielsweise kommt es zu einem verminderten Auftreten von $CD8^+CD28^+$-Zellen bei schwangeren Frauen im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen.

Über das Verhalten der $CD8^+$-Populationen mit den Oberflächenmarkern CD27 und CD28 während der Schwangerschaft ist bisher wenig bekannt. Tilburgs *et al.* (2010) beschäftigten sich in einer Studie mit dem Vorkommen unterschiedlicher $CD8^+$-Zellpopulationen, die in der feto-maternalen Übergangszone und im peripheren Blut angesiedelt sind. Hierfür wurden die Plazenten und peripher venöses Blut von Frauen nach unkomplizierter Schwangerschaft und Geburt untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich in der Peripherie vor allem naive (nicht aktivierte) Effektor-Zellen und Effektor Memory 1-Zellen (EM1) aufhalten, während in der Dezidua vornehmlich die differenzierten EM-Unterformen EM1, EM2 und EM3 zu finden sind.
Interessant ist dabei die Tatsache, dass die $CD8^+$ Zellpopulationen im peripheren Blut eine deutlich erhöhte Zytotoxizität aufweisen, da sie vermehrt Perforine und Granzyme exprimieren. In der feto-maternalen Übergangszone sind kaum naive $CD8^+$-Zellen anzufinden. Die EM-Zellen, die hier vorherrschen, zeigen ein im Vergleich zu gleichartigen Zellen im Blut sehr reduziertes zytotoxisches Profil. Hier fanden sich jedoch überraschenderweise sehr viel stärker ausgeprägte mRNA-Anteile (messenger RNA), die für Perforine und Granzyme kodieren. Tilburgs *et al.* folgern daraus, dass $CD8^+$-Zellen während der Schwangerschaft einer sehr differenzierten Regulierung unterliegen, und dass deziduale EM-Zellen zwar durch das Vorhandensein von entsprechender mRNA durchaus zytotoxisches Potential besitzen, dieses aber durch bis heute unbekannte Mechanismen unterdrückt wird (Tilburgs *et al.* 2010).
Es ist offenbar essentiell für den Erhalt einer Schwangerschaft, dass ein sensibel abgestimmtes Gleichgewicht zwischen Th1- und Th17-Zellen auf der einen Seite und Th2-Zellen und Tregs auf der anderen Seite besteht (Wegmann *et al.* 1993, Santner-Nanan *et al.* 2009).

Zytotoxische und immunregulatorische NK-Zellen

Der Anteil von NK-Zellen im peripheren Blut des Menschen macht ungefähr zehn bis fünfzehn Prozent der gesamten Lymphozyten aus. Sie werden anhand ihrer Oberflächenmoleküle in zwei Untergruppen unterteilt. $CD56^{dim}CD16^+$-NK-Zellen sind im peripheren Blut vorherrschend und stellen 90 Prozent der NK-Zellen dar (Manaster und Mandelboim 2010). Ihnen werden zytotoxische Eigenschaften zugesprochen. Das Oberflächenmolekül CD16 hat offenbar eine wichtige Bedeutung in der von

Antikörpern induzierten zytotoxischen Aktivität (Dosiou und Giudice 2005). $CD56^{dim}CD16^{+}$ NK-Zellen exprimieren neben CD57 auch KIRs.

Während einer gesunden Schwangerschaft verringert sich die Anzahl $CD16^{+}$ NK-Zellen im peripheren Blut (Makrydimas *et al.* 1994); in Fällen von wiederholten Schwangerschaftsverlusten wurden sie vermehrt nachgewiesen (Kwak *et al*. 1995).

Die restlichen zehn Prozent der peripheren NK-Zellen sind die $CD56^{bright}CD16^{-}$-immunregulatorischen NK-Zellen. Diese sind haupsächlich für die Produktion von INFγ, TNFβ, IL 10 und IL 13 zuständig. Sie wandern unter hormonellem Einfluss (Dosiou und Giudice 2005) in lymphoide Organe ein und wurden auch in der Dezidua nachgewiesen (Manaster und Mandelboim 2010), dort haben sie Einfluss auf die Modulation der maternalen Toleranzmechanismen gegenüber dem Fetus (Saito *et al.* 2008).

Neben den NK-Zellen des peripheren Blutes existiert eine weitere NK-Population direkt an der feto-maternalen Grenze (Kopcow und Karumanchi 2007). Es handelt sich hierbei um sogenannte uterine NK-Zellen (uNK). Diese exprimieren ebenfalls KIRs und enthalten Perforin- und Granzymgranula, wirken jedoch deutlich weniger zytotoxisch als die peripheren NK-Zellen (Kopcow *et al*. 2005). Anhand von Ergebnissen aus Untersuchungen tierischer und menschlicher uNK-Zellen ist davon auszugehen, dass diese Zellen mit vom Trophoblasten exprimierten Molekülen wie dem HLA-C oder HLA-G interagieren und Einfluss auf die Angiogenese und die Umstrukturierung plazentarer Gefäße haben (Kopcow und Karumanchi 2007, Hannah *et al*. 2006). Eine wichtige Rolle spielen Mechanismen wie die Sekretion von INFγ oder IL 8, welche an der Trophoblasteninvasion und dem Umbau der Spiralarterien beteiligt sind. Dies zeigte sich sowohl in in-vitro-Untersuchungen muriner als auch menschlicher Zellen (Hannah *et al*. 2006). Eine Sekretion des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) C durch uNK-Zellen scheint außerdem einen protektiven Effekt auf Endothelzellen zu haben, ebenso ist eine Interaktion mit dem Trophoblasten denkbar (Lash *et al.* 2010)

In Abbildung 2 ist eine schematische Übersicht über die Verteilung und Konzentrationen ausgewählter Zellpopulationen und Hormone während der Schwangerschaft dargestellt. Hieraus wird ersichtlich, dass das zelluläre Immunsystem sowohl systemisch, als auch lokal an der feto-maternalen Grenze Konzentrationsschwankungen unterliegt. Die Treg-Zellen sind hierbei vor allem an der feto-maternalen Grenze lokalisiert, wohingegen der systemische Effekt noch nicht endgültig einzuschätzen ist. Die lokale Antigenpräsentation erfolgt lokal in der Dezidua bereits kurz nach der Befruchtung, zu diesem Zeitpunkt entsteht dann begleitend ein inflammatorischer Prozess. Eine systemische Präsentation fetaler Antigene erfolgt erst, nachdem der maternale und fetale Blutkreislauf in Kontakt getreten sind. Gleichzeitig findet ab dem Zeitpunkt der Befruchtung ein kontinuierlicher Anstieg von Steroidhormonen statt (Patas *et al.* 2013).

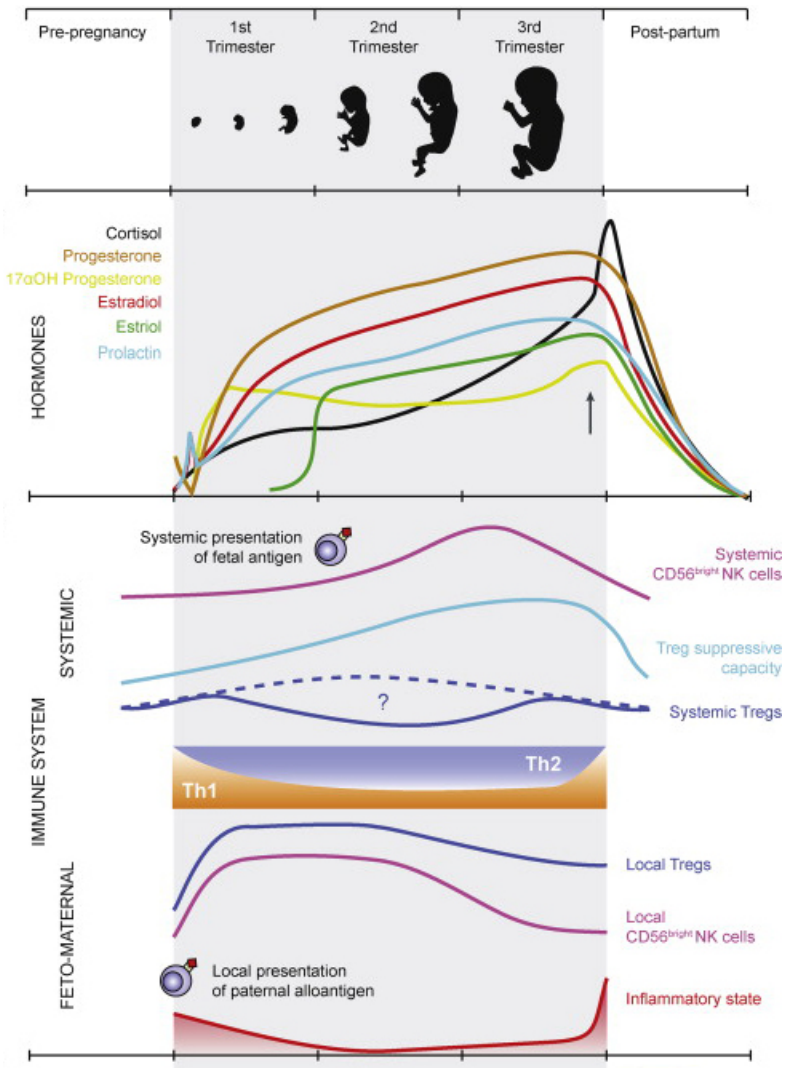

Abb. 2: **Hormonelle und immunologische Anpassung während der physiologischen Schwangerschaft. (modifiziert nach Patas *et al.* 2013)**

1.3 Endokrine Regulierungsmechanismen während der Schwangerschaft und deren Einfluss auf das Immunsytem

Die immunologische Adaptation während der Schwangerschaft unterliegt dem Einfluss endokriner Faktoren. Hormone regulieren die Aktivität und Zytokinproduktion von Immunzellen, indem sie mit von den Zellen exprimierten Hormonrezeptoren interagieren (Zen *et al.* 2010). Während der frühen Schwangerschaft bildet der Trophoblast hCG, ein Peptidhormon, welches in den maternalen Blutkreislauf abgegeben wird und bewirkt, dass der Gelbkörper weiterhin Progesteron produziert. Dieser Vorgang ist für den Erhalt der frühen Schwangerschaft unerlässlich.

1.3.1 Die Bedeutung von Progesteron in der Schwangerschaft

Progesteron ist ein Steroidhormon, das im Ovar vom Gelbkörper gebildet wird. Der Gelbkörper, der im physiologischen Zyklusverlauf nach einigen Tagen zugrunde geht, wird bei erfolgreicher Einnistung der Blastozyste zum Corpus luteum gravidaris, welcher weiterhin Progesteron produziert. Der Trophoblast sezerniert hCG, das auf den Gelbkörper wirkt und bewirkt, dass dieser solange Progesteron produziert, bis dann ab der siebten bis achten SSW (Schwangerschaftswoche) die Plazenta diese Aufgabe bis zum Ende der Schwangerschaft übernimmt.
Wie wichtig die Funktion des Gelbkörpers für den Embryo ist, zeigen die Ergebnisse klinischer Studien, in welchen eine Entfernung des Gelbkörpers zu einem Schwangerschaftsverlust führte (Csapo und Pulkkinen 1978). Eine weitere klinische Studie zeigte, dass die Gabe von Progesteronantagonisten vor der siebten SSW mit großer Sicherheit zum Abort führt (Peyron *et al.* 1993). In Versuchen mit trächtigen Ratten, denen man nach der Befruchtung die Eierstöcke entfernte, war es möglich, die Schwangerschaft durch die Gabe von Progesteron aufrecht zu erhalten (Deanesly 1973).

Die Aufgaben von Progesteron sind vielfältig, unter anderem kann das Hormon die Aktivierung von T-Zellen beeinflussen und unterdrücken (Szekeres-Bartho *et al.* 2001). Als Steroidhormon kann Progesteron intrazellulär auf Ebene der Desoxyribonukleinsäure (DNS) die Genexpression von Zytokinen regulieren. Piccini *et al.* fanden heraus, dass Progesteron die Produktion von proinflammatorischen Th1-Zytokinen wie IFNγ und TNFα supprimiert, während auf der anderen Seite die Proliferation von Th2-Zytokin produzierenden T-Zellen angeregt wird. Zu diesen Zytokinen zählen die bereits genannten IL 4 und IL 5 (Piccinni und Romagnani 1996). IL 4 beeinflusst naive T-Zellen in Hinsicht auf deren Ausdifferenzierung entweder zu einem Th1- oder Th2-Profil. Unter Einwirkung von IL 4 tendieren die Zellen stark in Richtung Th2-Zytokinprofil (Piccinni *et al.* 1995). Progesteron trägt also dazu bei, dass das Gleichgewicht von Th1/Th17- produzierenden Zellen in Richtung Th2 verschoben wird.

Szekeres-Bartho *et al.* (1985) konnten in einer klinischen Untersuchung belegen, dass humane Lymphozyten während der Schwangerschaft eine bis zu hundertfach erhöhte Sensibilität für Progesteron aufweisen und schlossen daraus auf das Vorhandensein sowie eine in der Schwangerschaft vermehrte Expression von Progesteronrezeptoren auf diesen Zellen. Weiterhin ließ sich nachweisen, dass das Ansprechen der Lymphozyten auf Progesteron im Verlauf einer Schwangerschaft zunimmt (Szekeres-Bartho *et al.* 1985). Dies unterstützt die Annahme, dass Progesteron nicht nur zu Beginn, sondern über die gesamte Schwangerschaft hinweg von Bedeutung ist.

Diese These stützt auch die Tatsache, dass im Blut von Frauen mit wiederholten Aborten oder Schwangerschaftskomplikationen in der Vorgeschichte eine stark erniedrigte Anzahl von Progesteronrezeptoren gefunden wurde (Szekeres-Bartho *et al.* 1989).
Canellada *et al.* (2002, 2008) konnten in Mausexperimenten zeigen, dass Progesteron die Antikörperproduktion von B-Lymphozyten unterdrückt.
Außerdem vermag Progesteron die Invasivität des Trophoblasten und das Zytokinprofil von Lymphozyten zu regulieren, indem es die Produktion des sogenannten Progesterone-induced blocking factor (PIBF) durch $CD8^+$-Zellen induziert (Miko *et al*. 2011, Arck *et al.* 2008, Szekeres-Bartho *et al.* 2001).

1.3.2 Die Bedeutung von Östradiol in der Schwangerschaft

Auch Östrogene werden der Klasse der Steroidhormone zugeordnet. Sie werden hauptsächlich im Ovar gebildet. Die biologisch aktive Form ist Östradiol, welches im menschlichen Körper vorwiegend in der 17-β-Konfiguration vorkommt (Leidenberger *et al.* 2009). Es wird hauptsächlich im Eierstock, genauer im Follikel und im Gelbkörper gebildet. Auch im peripheren Fettgewebe werden Östrogene synthetisiert, es ist die Hauptquelle dieser Hormone nach der Menopause.
Eine bedeutende Funktion hat Östradiol zu Beginn der Schwangerschaft, während der Implantationsphase. Es ist maßgeblich an der Proliferation des Endometriums als Vorbereitung zur Implantation beteiligt. Auch der Zeitabschnitt, in welchem eine Implantation stattfinden kann, das sogenannte Implantationszeitfenster, ist streng reguliert und abhängig sowohl von der Progesteron-, als auch von der Östradiolkonzentration (Imakawa *et al.* 2004).
Im zweiten und dritten Trimenon der Schwangerschaft werden die Östrogene zu einem großen Teil von der Plazenta synthetisiert (Doria *et al*. 2006). Die Östrogenproduktion steigt zu dieser Zeit stark an und kann in solch hohen Konzentrationen Lymphozyten zur Produktion von antiinflammatorischen Th2-Zytokinen wie IL 6, IL 4 und IL 10 anregen. Ein weiterer immunmodulatorischer Effekt ist die Suppression von proinflammatorischen Th1-Zytokinen wie IL 12, TNFα und INFγ. Östradiol trägt somit in der späteren Schwangerschaft zum Aufrechterhalten des Th2-geprägten Zytokinmilieus bei (Challis *et al.* 2009).

1.3.3 Die Bedeutung von Prolaktin in der Schwangerschaft

Prolaktin ist ein Polypeptidhormon, das vornehmlich im Hypophysenvorderlappen produziert wird. Nach Imran *et al.* (2007) vergrößert sich unter dem Einfluss von Östradiol während der Schwangerschaft das Volumen der Hypophyse durch Wachstum und Vermehrung der prolaktinproduzierenden Drüsenzellen. Infolge dieser Vergrößerung kommt es auch zur vermehrten Ausschüttung von Prolaktin (Imran *et al.* 2007). Eine weitere Prolaktinquelle während der Schwangerschaft ist die Dezidua.

Deziduales Prolaktin lässt sich während der Schwangerschaft in hoher Konzentration im Fruchtwasser nachweisen. Wie auch Progesteron nimmt Prolaktin Einfluss auf die Stimulation von Lymphozyten und hat somit immunmodulatorische Eigenschaften (Leidenberger *et al.* 2009)

1.4 Plazentare Durchblutung und Dopplersonographie

Die Blutversorgung des sich entwickelnden Fetus ist von essentieller Bedeutung für das fetale Wachstum während der Schwangerschaft. Die Anpassung und Modulation fetoplazentarer und uteroplazentarer Blutgefäße sind deshalb Gegenstand intensiver Forschung.

Uteroplazentare Gefäßversorgung

Die Blutversorgung des Uterus erfolgt aus den paarig angelegten Aa. uterinae, die aus den Aa. iliacae internae entspringen. Diese erreichen den Uterus auf Höhe des Isthmus uteri, wo sie sich aufteilen und dann jeweils den Corpus und die Cervix uteri versorgen. Kranial finden sich Anastomosen mit dem Ramus uterinus der paarigen Aa. ovaricae, die aus der Aorta abdominals entspringen. Im Myometrium zweigen sich die Gefäße zu den Aa. arcuatae auf, von denen Radialarterien abgehen. Diese teilen sich im weiteren Verlauf in Aa. basales und letztendlich in die im Endometrium und in der Dezidua gelegenen Spiralarterien auf (Sohn *et al.* 2003).

Im Rahmen der Plazentation findet physiologischerweise eine Modulation der maternalen Spiralgefäße zu uteroplazentaren Gefäßen statt. Eine eingeschränkte plazentare Angiogenese ist eng verbunden mit Komplikationen wie Präeklampsie und intrauteriner Wachstumsrestriktion (Stampalija *et al.* 2010, Cnossen *et al.* 2008).

Die Entwicklung suffizienter Blutgefäße, die eine optimale Vesorgung des Fetus über die gesamte Dauer der Schwangerschaft garantiert, beginnt mit der Invasion des Synzytiotrophoblasten in das Stratum functionale der Gebärmutterschleimhaut. Durch die starke Proliferation des Synzytiotrophoblasten bilden sich fingerförmige Ausstülpungen und lakunäre Strukturen. Diese vereinigen sich dann zum intervillösen Raum, in dem sich ab der zehnten SSW das mütterliche Blut aus den Spiralarterien sammelt. In der reiferen Plazenta entwickeln sich zottenartige Strukturen, die in den intervillösen Raum reichen (Schneider *et al*. 2011).

Der villöse Trophoblast stellt die äußere Schicht der Zotten dar und besteht aus Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten. Hier erfolgen der Austausch von Nährstoffen und Sauerstoff und deren Weiterleitung an die fetalen Gefäße im Inneren der Zotten, sowie die Produktion von β-HCG (Schneider *et al*. 2011).

An den Zottenspitzen, am Übergang zur Dezidua, bilden sich extravillöse Trophoblastenzellen heraus, die stark proliferieren (Kumpel und Manoussaka 2012). Der extravillöse Trophoblast (EVT) bildet

Zellsäulen, die in die Dezidua einwachsen. Bulmer *et al.* (2012) zeigten, dass sich außerdem Zellen des EVT in den Spiralarterien ansiedeln und einen Umbau des Gefäßendothels bewirken. Im Verlauf dieses Umbaus werden glatte Muskelzellen der Gefäßwand durch EVT-Zellen, sowie durch fibrinoides Gewebe ersetzt. Auch die Membrana elastica interna wird zerstört. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass der Umbau der Gefäße durch die Zellen des EVT initiiert wird. Hingegen wird angenommen, dass bestimmte Leukozytenpopulationen wie Makrophagen und uterine NK-Zellen den Anstoß zum Gefäßumbau geben, und dieser dann durch den Einfluss des EVT vollendet wird (Smith *et al.* 2009, Bulmer *et al.* 2012). Die Gefäße vermögen den Blutfluss in den intervillösen Raum durch Druckveränderungen weder negativ noch positiv zu beeinflussen, durch den Verlust der muskulären Fasern verlieren sie die Fähigkeit zur Lumenregulation. Dieser Zustand der maximal dilatierten Gefäße ermöglicht einen ungestörten Transport von Nährstoffen und Blutgasen zum Fetus (Bulmer *et al.* 2012).
Der Bedarf an Blutvolumen steigt im Verlauf der Schwangerschaft, da der Fetus zum Wachstum Nährstoffe benötigt. Die Invasivität des EVT und der dadurch bedingte zelluläre Umbau der Spiralarterien sind mit der 24. SSW abgeschlossen (Stampalija *et al.* 2010). Bis zu diesem Zeitpunkt steigt physiologischer Weise die uteroplazentare Durchblutung stetig an, während der Widerstand sinkt. Auch die diastolische Flussgeschwindigkeit nimmt zu. Da der Umbau der Gefäße hauptsächlich in der Dezidua stattfindet, nimmt zunächst der Widerstand in den Spiralarterien ab. Im weiteren Verlauf verringert sich dann der Widerstand nach distal fortlaufend in den Aa. arcuatae und schließlich, um den Zeitpunkt der 24. SSW, ist auch in den uterinen Arterien nur noch selten ein erhöhter Flusswiderstand zu messen. Wird eine maximale Weitstellung der plazentaren Gefäße durch fehlerhaften Umbau verhindert, ist sonographisch ein erhöhter Widerstand der uteroplazentaren Gefäße nachweisbar (Schneider *et al*. 2011). Die Qualität der materno-fetalen Durchblutung wird in der Klinik sonographisch anhand der A. uterina beurteilt.

Ein fehlerhafter Gefäßumbau hat Folgen für die gesamte Schwangerschaft

Ein mangelhafter Umbau der Spiralgefäße in der Frühschwangerschaft wird schon sein langer Zeit mit Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie oder Wachstumsrestriktionen des Fetus in Zusammenhang gebracht (Khong *et al.* 1986). Außerdem ließ sich zeigen, dass ein mangelhafter Gefäßumbau gehäuft bei von arteriellem Bluthochdruck geprägten Schwangerschaften gefunden wird (Pijnenborg *et al*. 1991). Weitere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass sogar späte Schwangerschaftsverluste mit verminderter Trophoblasteninvasion und mangelhaftem Gefäßumbau im Zusammenhang stehen (Ball *et al*. 2006).

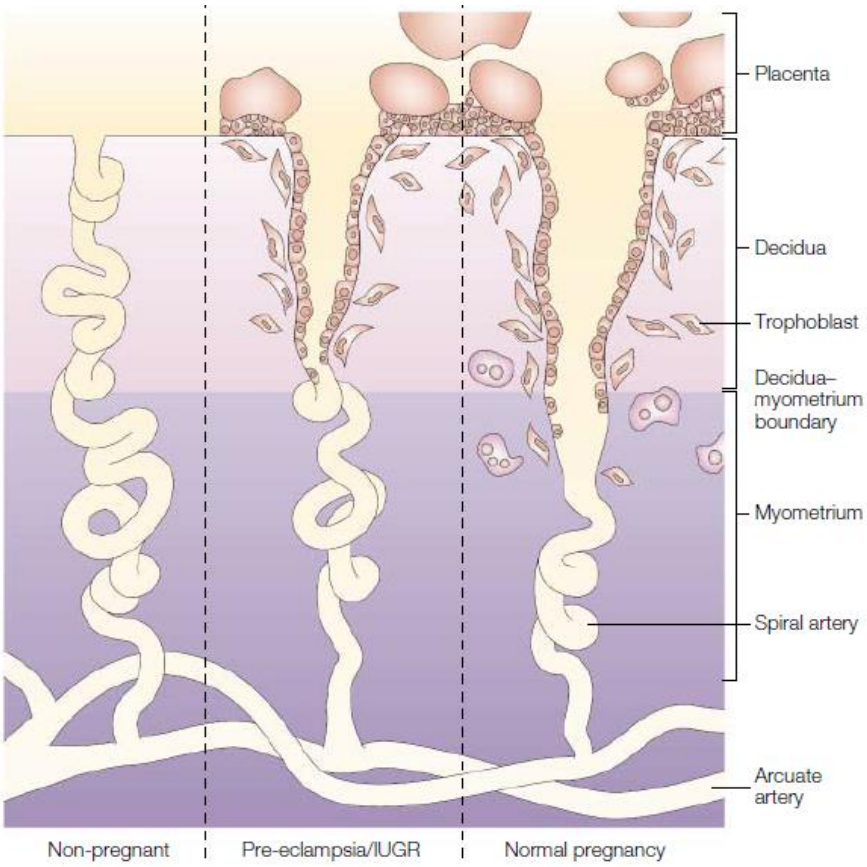

Abb.3: **Schematische Darstellung: Umbau der Spiralarterien und plazentare Blutversorgung (Moffett-King 2002).**

Abbildung 3 zeigt die uteroplazentaren Gefäße Vergleich zwischen dem nicht schwangeren Zustand, dem verminderten Gefäßumbau bei Präeklampsie oder Intrauteriner Wachstumsrestriktion (IUGR), sowie dem physiologischen Gefäßumbau in einer gesunden Schwangerschaft. Im Rahmen der pathologischen Schwangerschaft ist die Trophoblasteninvasion reduziert, was in einer verminderten Blutversorgung des Fetus mit erhöhten Widerständen der uteroplazentren Gefäße resultiert (Moffet-King 2002).

Fetoplazentare Gefäßversorgung

Die paarig angelegten Nabelschnurarterien entspringen beidseits den fetalen Aa. iliacae internae und ziehen dann vom Fetus über eine durchschnittliche Länge von 50 Zentimetern durch die Amnionhöhle zur Plazenta, wo sie sich an deren Oberfläche in Chorionplattengefäße verzweigen (Sohn *et al*. 2003).

Dopplersonographisch lässt sich die Durchblutung der uterinen und umbilikalen Gefäße auf nicht invasive Weise darstellen. Diese Methode wurde bereits vielfach in Studien angewandt, um spätere Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie oder intrauterine Wachstumsrestriktion frühzeitig anhand der plazentaren und fetalen Durchblutungsmuster zu erkennen. Die Aa. umbilicales sind besonders geeignet zur Darstellung der fetoplazentaren Perfusion, während die Aa. uterinae Aufschluss über die maternoplazentaren Durchblutungsverhältnisse geben (Hüneke und Ude 2002). Die Parameter Resistance Index (RI) und Pulsatility Index (PI) beschreiben die Intensität der Widerstände in den untersuchten Gefäßen. Erhöhte Widerstandsindizes gehen mit einer verminderten Perfusion einher. Treten in der Darstellung der Flusskurven der Aa. uterinae postsystolische Inzisuren auf, so wird dies als „Notch-Phänomen“ bezeichnet (s. Abb.4). Das Auftreten eines beidseitigen Notching, das über die 24. SSW hinaus persistiert, ist als pathologisch zu werten. Ab diesem Zeitpunkt sollten die Gefäße durch den histologischen Umbau die maximale Fähigkeit zur Dilatation erreicht haben. Das Notch-Phänomen stellt einen unzureichenden Anpassungsprozess der uteroplazentaren Arterien an die Schwangerschaft dar und tritt häufig in Verbindung mit schwangerschaftsassoziierten Pathologien wie Präeklampsie oder Intrauteriner Wachstumsrestriktion auf (Harrington *et al.* 1996, Cnossen *et al.* 2008).

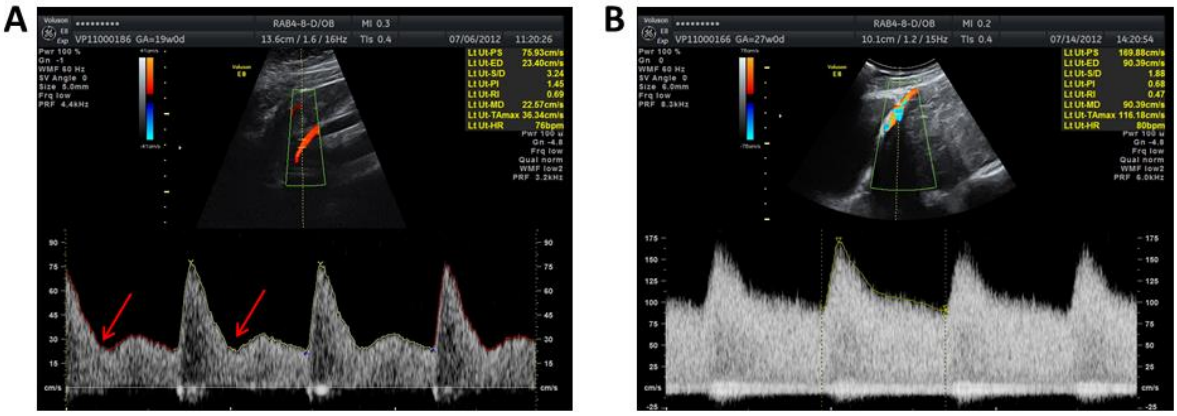

Abb. 4: **Flusskurven der A. uterina in der 24. SSW.** Darstellung der Dopplerflusskurven der A. uterina bei einer Probandin mit hohen Pulsatilitäts- und Resistenzindices (entspricht hohen Widerständen). Die roten Pfeile markieren postsystolische Inzisuren (Notching) (Bild A). In Bild B zeigt sich eine physiologische Flusskurve mir niedrigen Pulsatilitäts- und Resistenzindizes und dementsprechend niedrigen Gefäßwiderständen.

1.5 Arbeitshypothesen und Fragestellungen

Die Anpassung des mütterlichen Immunsystems an den semi-allogenen Fetus und die gleichzeige Fähigkeit zur Aufrechterhaltung einer kompetenten Immunabwehr gegen von außen einwirkende pathogene Einflüsse stellt eine komplexe Aufgabe für den menschlichen Körper dar. In der vorliegenden Studie soll daher zunächst nachgewiesen werden, welche immunkompetenten Zellpopulationen des peripheren Blutes im Verlauf der Schwangerschaft bestimmten Adaptationsvorgängen unterliegen. Es ergeben sich hierdurch folgende Fragestellungen:

- Gibt es Unterschiede in Verteilungsmuster und Anzahl von $CD4^+$ Zellpopulationen im peripheren Blut schwangerer Frauen zwischen der 14. und der 24. SSW?
- Gibt es Unterschiede in Verteilungsmuster und Anzahl von $CD8^+$ Zellpopulationen im peripheren Blut schwangerer Frauen zwischen der 14. und der 24. SSW?
- Gibt es Unterschiede in Verteilungsmuster und Anzahl ausgewählter Leukozytenpopulationen im peripheren Blut schwangerer Frauen zwischen der 14. und der 24. SSW?

Gemäß der Annahme, dass auch immunkompetente Hormone einen wichtigen Einfluss auf den Erhalt der Schwangerschaft haben und mit dem zellulären Immunsystem interagieren, ergibt sich eine weitere grundlegende Fragestellung:

- Wie verhalten sich die Schwangerschaftshormone Progesteron, 17-β-Östradiol und Prolaktin zwischen der 14. und der 24. SSW?

Der Hypothese folgend, dass zelluläre und hormonelle Adaptationsvorgänge maßgeblich am Erfolg des Schwangerschaftsverlaufes beteiligt sind und somit auch Einfluss auf die fetale Gesundheit und das Geburtsgewicht haben, wurden diesbezüglich weitere Fragestellungen formuliert:

- Lassen sich anhand der Frequenz von $CD4^+$-, $CD8^+$-Populationen, weiteren Leukozyten oder der Konzentrationsspiegel von Progesteron, Östradiol oder Prolaktin in der 14. oder 24. SSW Risiken für ein erniedrigtes Geburtsgewicht ableiten?

Es kann angenommen werden, dass Immunzellen an der Gefäßinvasion im Rahmen der Plazentation beteiligt sind. Eine mangelhafter Blut- und Nährstoffaustausch zwischen Mutter und Fetus hat ebenfalls einen Effekt auf die kindliche Gesundheit. In der vorliegenden Studie wird folgende Fragestellung betrachtet:

- Welche Aussage lässt sich anhand der dopplersonographisch gemessenen uterinen und plazentaren Durchblutungswerte zum Zeitpunkt der 24. SSW im Hinblick auf das Risiko für ein erniedrigtes Geburtsgewicht ableiten?

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die Datenerhebung erfolgte im Rahmen einer prospektiven Studie. Bei den Teilnehmerinnen handelt es sich um Frauen mit intakter Einlingsgravidität, die von niedergelassenen Gynäkologen in Hamburg und im Hamburger Umland betreut wurden. Die Studienteilnehmerinnen wurden im Rahmen der PRINCE-Studie (Prenatal Identification of Children's Health), die am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) durchgeführt wird, rekrutiert.

Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission in Hamburg genehmigt (Genehmigungsnummer: PV3694). Die Daten für die vorliegende Dissertation wurden an zwei Zeitpunkten während der Schwangerschaft, sowie nach der Geburt erhoben. Nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch und der Einwilligung der Teilnehmerin erfolgte in der 12.-14. SSW eine venöse Blutentnahme und die Erhebung biometrischer Daten der Mutter. Im Zeitraum um die 24. SSW wurde erneut peripher venöses Blut entnommen, sowie eine Ultraschalluntersuchung des Kindes durchgeführt. Aus organisatorischen Gründen wurden Termine mit bis zu sieben Tagen Abweichung um die 24. Woche vergeben. Nach der Geburt wurden den Frauen Fragebögen bezüglich des Schwangerschafts- und Geburtsverlaufes sowie den bei Geburt erhobenen kindlichen Daten zugestellt. Nach Rückerhalt der Daten erfolgte die Datenanalyse. Einen Überblick über den zeitlichen Ablauf der Studie gibt die Abbildung 5.

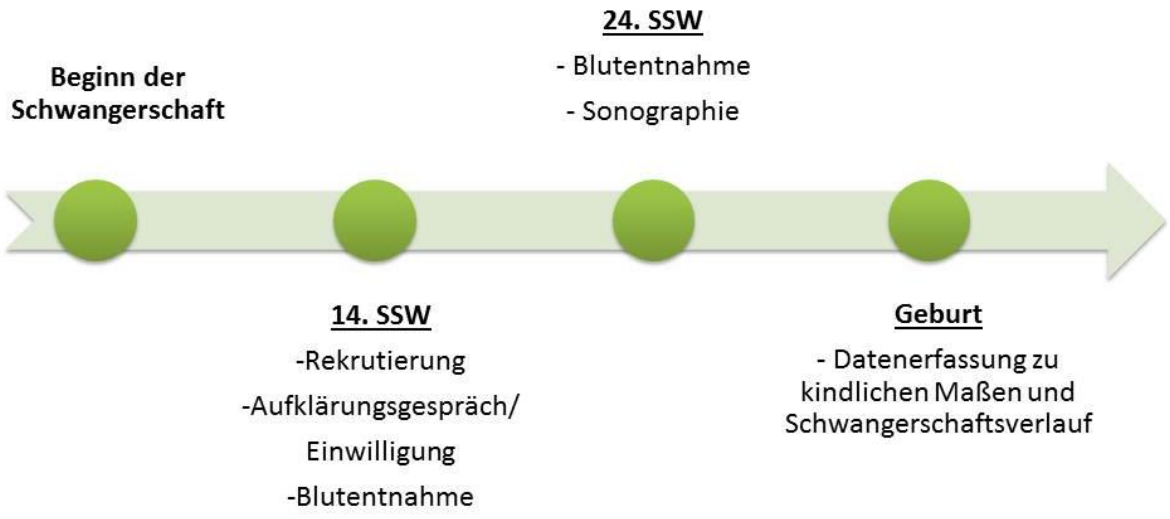

Abb.5: **Ablauf der Studie.**

2.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Grundbedingung für die Studienteilnahme war eine zum Aufnahmezeitpunkt intakte, auf natürliche Weise entstandene Einlingsschwangerschaft. Dies bedeutet, dass eine künstliche Befruchtung oder hormonelle Stimulationen als Ausschlusskriterium bewertet wurden. Eine weitere Voraussetzung für die Studienteilnahme war die Volljährigkeit der Schwangeren. Schwangere mit Erkrankungen des Stoffwechsels wurden ausgeschlossen. Ein nachträglicher Ausschluss von Studienteilnehmerinnen erfolgte bei Auftreten bestimmter Schwangerschaftskomplikationen, welche nachfolgend erläutert werden, oder bei Geburt des Kindes außerhalb des Zeitrahmens zwischen der 37. und 42. SSW. Nur zwei Studienteilnehmerinnen gaben an, zu rauchen. Nachträglich wurden Raucherinnen aus der Studie ausgeschlossen, um etwaige Ergebnisverzerrungen zu vermeiden.

2.1.2 Studienkollektiv

Die Anzahl der schwangeren Frauen, deren Daten für die vorliegende Dissertationsarbeit erhoben wurden, beträgt n= 49. Nach Ausschluss auf Grund von Infektionen während der Schwangerschaft, sowie der Ausschluss von Raucherinnen und einer Frühgeburt, reduzierte sich die Studienpopulation auf n=44 (Abb. 6).

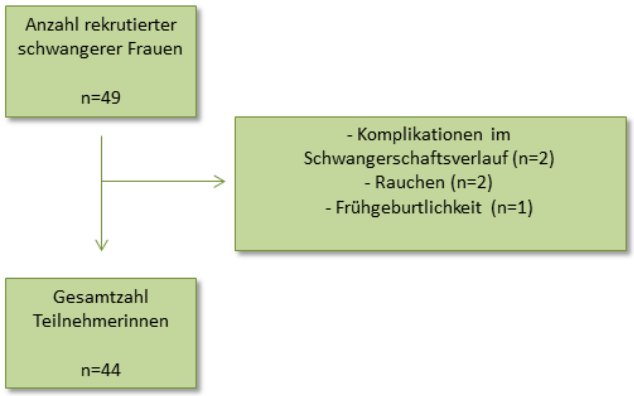

Abb.6: **Auswahl der Studienteilnehmerinnen.**

Traten im Verlauf der Schwangerschaft Komplikationen auf, so wurden diese einzeln bewertet und die betreffende Probandin gegebenenfalls nachträglich aus der Population ausgeschlossen. Zum Ausschluss führten vor allem Infekte, die zum Zeitpunkt der Blutentnahmen stattfanden und somit Einfluss auf die immunologischen Parameter gehabt hätten. Zu den nachträglich ausgeschlossenen Teilnehmerinnen gehörte eine Schwangere, die aufgrund einer Cholecystolithiasis zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme in antibiotischer Behandlung befand. Eine weitere Frau gab eine schwere Gastroenteritis im Zeitfenster der Blutentnahme an. Bei einer dritten Studienteilnehmerin kam es in

der 36. SSW zu einer Frühgeburt, was ebenfalls zum Ausschluss aus der Studienpopulation führte, da es sich um die einzige Frühgeburt der gesamten Kohorte handelte. Weitere Komplikationen, die jedoch nicht zum Ausschluss aus der Studienpopulation führten,) waren eine Mittelfußfraktur (n= 1), Harnwegsinfekt und Arterieller Hypertonus in der 35. SSW (n= 1), grippaler Infekt in der 34. SSW (n= 1), Sturz ohne weitere Folgen (n= 3). Da die genannten Komplikationen nicht im Zeitfenster der Blutentnahmen stattfanden, verblieben die Probandinnen in der untersuchten Kohorte.

Demographische Informationen über die untersuchte Studienkohorte wie Alter, Body-Mass-Index (BMI), ethnische Herkunft und weitere sind in der Tabelle 1 dargestellt.
Das Alter der Probandinnen, sowie Herkunft, höchster Schulabschluss und Berufstätigkeit wurden zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung erfasst.
Bei den Teilnehmerinnen handelt es sich hauptsächlich um gesunde, mitteleuropäische Frauen im durchschnittlichen Alter von 32 Jahren.
Insgesamt leiden sieben Schwangere an chronischen Erkrankungen, darunter zwei Frauen an Asthma / Emphysem, eine Teilnehmerin an Morbus Bechterew und vier Teilnehmerinnen geben eine medikamentös substituierte Hyper- oder Hypothyreose an.

Demographische Informationen		n
Alter (J)	32.15 ± 4.45	44
BMI[a] (kg/m^2)	24.22 ± 3.57	44
Erfolgreiche Schwangerschaften (%)	27.3	12
Chronische Erkrankungen (%)	15,9	7
Medikamenteneinnahme (%)	9.1	4
Höchster Schulabschluss		43
Abitur (%)	27.3	12
Fachabitur (%)	13.6	6
Fach-/ Hochschulabschluss (%)	43.2	19
Mittlere Reife (%)	11.4	5
Berufstätigkeit (%)	84	37
Ethnische Herkunft		43
Mitteleuropäisch (%)	90.9	40
Eurasisch (%)	4.5	2
Asiatisch (%)	2.3	1

Tabelle 1: Beschreibung der Studienpopulation. [a] BMI= Body-Mass-Index.

2.2 Verwendete Materialien

Die für die Blutentnahmen und die folgenden Blutanalysen verwendeten Materialien sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Blutentnahme	**Hersteller**
Monovette Serum-Gel 7,5 ml	Sarstedt
Monovette EDTA KE 7,5 ml	Sarstedt
Safety-Kanüle/ Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt
Serumgewinnung für die Hormonanalyse	
Eppendorf Pipette Research plus 1-200µl	Eppendorf
Eppendorf Pipette Research plus 1-200µl	Eppendorf
Eppendorf Pipette Research plus 500-1000µl	Eppendorf
epT.I.P.S. Pipettenspitzen 200µl	Eppendorf
epT.I.P.S. Pipettenspitzen 1000µl	Eppendorf
Reagiergefäß SafeSeal 1,5 ml	Sarstedt
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific
Durchflusszytometrie	
FACS-Röhrchen 5ml	Becton Dickinson BioSciences
Eppendorf Pipette Research plus 1-200µl	Eppendorf
epT.I.P.S. Pipettenspitzen 200µl	Eppendorf
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich
Vortex-Genie Touch Mixer	Scientific Industries
Antikörper gegen: CD3 (APC); CD4 (V500); CD14 (PacBlue/V450); CD16 (FITC); CD19 (PE-Cy7); CD25 (PE); CD27 (FITC); CD28 (PE-Cy7); CD39 (PE-Cy7); CD45 (PerCP/Cy5.5); CD45RA (PacBlue/V450); CD45RO (PerCP/Cy5.5); CD56 (PE); CD62L (PacBlue/V450); CD127 (PerCP/Cy5.5); CCR2 (CD192) (APC); CCR5 (CD195) (PE); CCR5 (CD195) (FITC); CCR7 (CD197) (APC)	Becton Dickinson Pharmingen
Antikörper gegen CD8 (APC-Cy7)	Bio Legend
Destilliertes Wasser	UKE Hamburg Eigenproduktion
FACS Lysing Solution (zehnfache Konzentr.)	Becton Dickinson
FACS Canto II Zytometer	Becton Dickinson
FACS Diva Softwareprogramm	Becton Dickinson

Tabelle 2: Materialien und Hersteller.

2.3 Probengewinnung

2.3.1 Blutentnahme

Die Entnahme der Blutproben erfolgte im Anschluss an die Ultraschalluntersuchung direkt in der Studienambulanz der *Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin* des UKE. Zu jedem Termin wurde den Studienteilnehmerinnen je eine Serum-Monovette mit 7,5 ml Fassungsvermögen, sowie zwei EDTA-Röhrchen à 7,5 ml aus einer peripheren Vene entnommen. Innerhalb von zwei Stunden nach der Entnahme wurden die Blutproben im Labor weiterverarbeitet.

2.3.2 Serumgewinnung

Die Serum-Monovette wurde 15 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in kleinen Portionen à 250 und 100 µl in verschlossenen Röhrchen zur weiteren Verarbeitung bei -80° Celsius eingefroren.

2.4 Durchflusszytometrie

2.4.1 Probenaufbereitung und durchflusszytometrische Messung

Zur Vorbereitung der Blutproben für die durchflusszytometrischen FACS-Analysen (Fluorescence activated cell sorting) wurden jeweils 100 µl EDTA-Blut in drei separate FACS-Röhrchen pipettiert. Die Färbung der Zellen erfolgte mit farbstoffgekoppelten Antikörpern der Firmen *Bio Legend* und *Becton Dickinson*. Die Antikörper wurden zunächst in unterschiedlichen Verdünnungen zu drei Ansätzen zusammengefügt und daraufhin wurde je ein Ansatz mit den bereits abgefüllten 100 µl EDTA-Blut inkubiert. Die Zusammensetzungen der Antikörperansätze mit den jeweils gekoppelten Antikörpern sind in der Tabelle 3 aufgeführt.

Farbstoff	Analyse1 / Verdünnung	Analyse 2 / Verdünnung	Analyse 3 / Verdünnung
V500	CD4 / 1:10	CD4 / 1:10	CD4 / 1:10
PacBlue/V450	CD62L / 1:3	CD45RA / 1:10	CD14 / 1:3
FITC	CCR5 / pur	CD27 / 1:10	CD16 / 1:3
PE	CD25 / pur	CCR5 / pur	CD56 / 1:3
PerCP/Cy5.5	CD127 / 1:3	CD45RO / 1:10	CD45 / 1:3
PE-Cy7	CD39 / 1:3	CD28 / 1:10	CD19 / 1:3
APC	CCR2 / 1:3	CCR7 / pur	CD3 / 1:10
APC-Cy7	-	CD8 / 1:10	CD8 / 1:10

Tabelle 3: Zusammensetzung der Antikörper mit den konjugierten Farbstoffen im jeweiligen Ansatz.

Anschließend wurden die Zellen mit dem jeweiligen Antikörperansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit angesetzt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze gut durchmischt und zu jedem Ansatz ein Milliliter *BD FACS Lysing solution* (in zuvor angesetzter 1:10 Verdünnung mit Aqua dest.) gegeben. Die Lysing solution bewirkt, dass die im EDTA-Blut enthaltenen Erythrozyten zerstört werden, damit diese vom FACS-Gerät nicht als Signal gemessen werden. Nach zehnminütiger Inkubationszeit wurde die Mixtur erneut für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde daraufhin in zwei weiteren Wiederholungen mit PBS (phophate buffered saline) gewaschen und abzentrifugiert. Die gereinigten Zellen wurden anschließend mit 300 µl PBS angesetzt und bis zur Messung im Kühlschrank bei 4° Celsius verwahrt.
Die durchflusszytometrische Messung wurde an dem Gerät *FACS Canto II* der Firma *Becton Dickinson* durchgeführt. Als Software für die Messung wurde das Programm *BD FACSDiva* genutzt. Pro Tube wurden 50.000 vitale Zellen gemessen, bei Erreichen dieser Zellzahl stoppte die Messung automatisch. Die Auswertung der gemessenen Zellen erfolgte mit dem Software-Programm *FlowJo (Version 7.6.1)*.
Mit Hilfe dieses Programmes erfolgte die Eingrenzung, das sogenannte „Gating“ der jeweiligen Subpopulationen der Zellen. Zur Qualitätssicherung erfolgte neben ausführlicher Literaturrecherche die Durchführung von Negativkontrollen, den sogenannten „Fluorescence minus one“-Kontrollen (FOM). Hierbei wurden die Blutproben mit allen Antikörper-Reagenzien inkubiert, abgesehen von dem zu überprüfenden Antikörper. Im Vergleich der Positiv- mit der Negativ-Kontrolle konnte nachgewiesen werden, dass die gesuchte Zellpopulation in der FOM-Kontrolle nicht angefärbt wurde.

2.4.2 Verteilungsmuster und Anzahl $CD4^+$

Alle in Abbildung 7 gezeigten $CD4^+$-Zellen entstammen den in Bild A abgebildeten Lymphozyten. Aus den Lymphozyten ließen sich mit Hilfe der „Histogram“-Anzeigefunktion die $CD4^+$ Zellen herausfiltern (Bild B). Innerhalb der $CD4^+$ Lymphozyten wurden dann jeweils $CD39^+$ (C), $CCR5^+$ (D), $CD62L^+$ (E) sowie regulatorische T-Zellen (F) dargestellt. Die regulatorischen T-Zellen werden über die Oberflächenmarkerkonstellation $CD4^+CD25^+CD127^{dim}$ identifiziert. Die Treg-Population wurde weiterhin in Untergruppen mit den Oberflächenmolekülen $CD39^+$ (G), $CCR5^+$ (H), $CD62L^+$ (I) unterteilt.

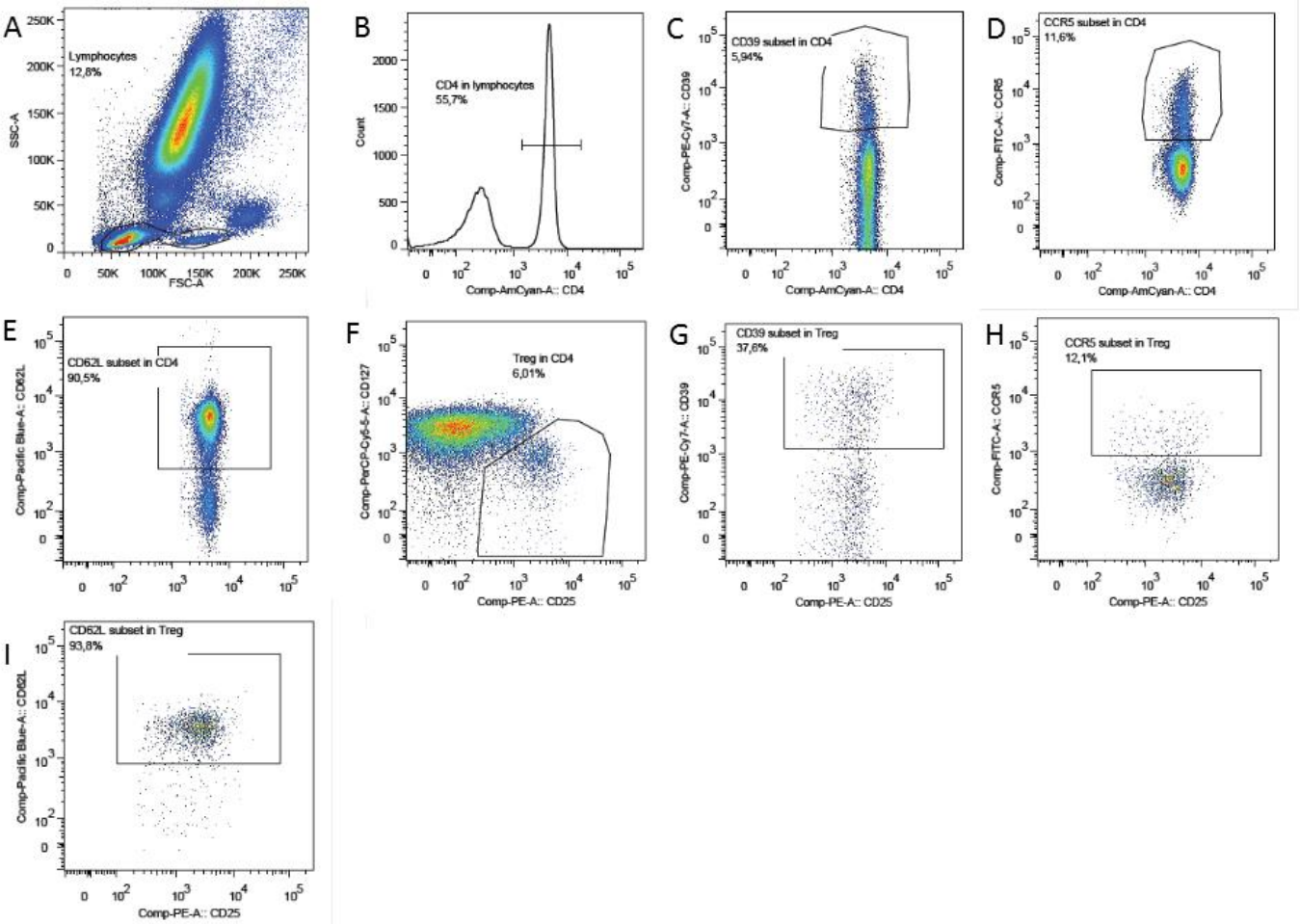

Abb. 7: **Darstellung von Lymphozyten und CD4$^+$ Zellpopulationen.** Die Zellpopulationen werden als „Dot Plots“ gezeigt, hierbei ist jede Zelle als einzelner Punkt dargestellt. Eine Ausnahme bildet Figur B, hier wurde die „Histogramm“-Darstellung gewählt. Die X- und Y-Achse sind mit den jeweiligen Oberflächenmarkern beschriftet.
Erläuterung der einzelnen Bilder: A: Lymphozyten, B: CD4$^+$ Lymphozyten, C: CD4$^+$CD39$^+$ Zellen, D: CD4$^+$CCR5$^+$ Zellen, E: CD4$^+$CD62L$^+$ Lymphozyten, F: CD4$^+$CD25$^+$CD127^{dim} regulatorische T-Zellen (Treg), G: CD39$^+$ Treg, H: CCR5$^+$ Treg, I: CD62L$^+$ Treg.

2.4.3 Verteilungsmuster und Anzahl CD8$^+$

Die Auswertungen der CD8$^+$ Zellen sind in der Abbildung 8 aufgezeigt. Die CD8$^+$ Zellen wurden sowohl in Lymphozyten (A) als auch in Leukozyten (D) bestimmt. Die Untergruppen der CD8$^+$ Zellen entstammen der CD8$^+$ Lymphozytenpopulation. Zunächst wurden die naiven T-Zellen (CD45RA$^+$CCR7$^+$), die Effektor T-Zellen (CD45RA$^+$CCR7$^-$), die zentralen Gedächtnis T-Zellen (CD45RA$^-$CCR7$^+$) sowie die effektor Gedächtnis T-Zellen (CD45RA$^-$CCR7$^-$) dargestellt (B). Im nächsten Schritt wurden dann die effektor Gedächtniszellen noch einmal anhand der Oberflächenmarker CD27 und CD28 unterteilt (C).

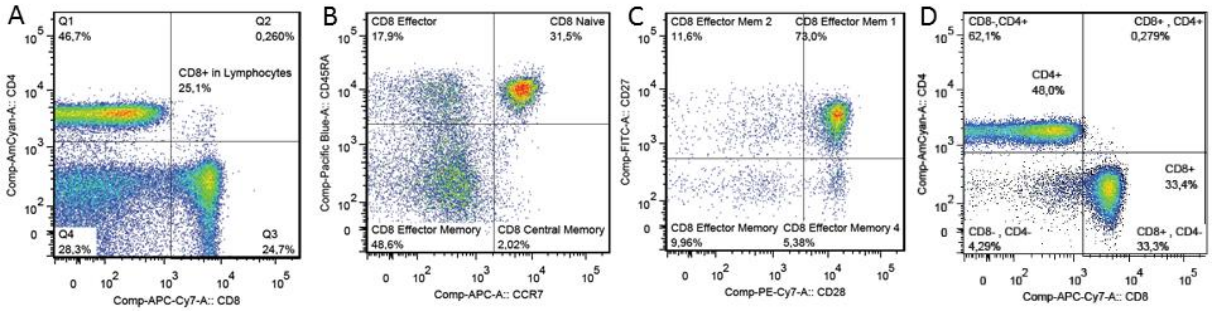

Abb.8: **Darstellung von CD8$^+$ Zellen.** Die Zellgruppen sind als „Dot Plots“ dargestellt, jeder Punkt stellt eine einzelne Zelle dar. Die X- und Y-Achse sind mit den jeweiligen Oberflächenmarkern beschriftet. Erläuterung der einzelnen Bilder: A: CD8$^+$ Lymphozyten, B: CCR7+CD45RA+ Naiv, CCR7-CD45RA- Effektor Memory, CCR7-CD45RA$^+$ Effector, CCR7$^+$CD45A$^-$ Central Memory. Diese Zellen sind Subpopulationen der in A dargestellten CD8$^+$ Lymphozyten. C: Subgruppen der CCR7$^-$CD45RA- Effektor Memory Zellen (B): CD27$^+$CD28$^+$ Effector Memory 1, CD27$^+$ CD28$^-$ Effector Memory 2, CD27$^-$CD28$^-$ Effector Memory 3, CD27$^-$CD28$^+$ Eff. Memory 4. D: CD4$^+$ und CD8$^+$ Zellgruppen in CD45$^+$ Leukozyten.

2.4.4 Verteilungsmuster und Anzahl weiterer Leukozyten

Der folgenden Abbildung 9 ist die Einteilung und Abgrenzung weiterer unterschiedlicher Leukozytenpopulationen zu entnehmen. Es wurde zunächst wurde die Gesamtheit der peripheren Leukozyten dargestellt (A). Aus diesen Zellen ließen sich nachfolgend die CD45$^+$ Leukozyten isolieren (B), denen die darauffolgenden Zellabbildungen entstammen.

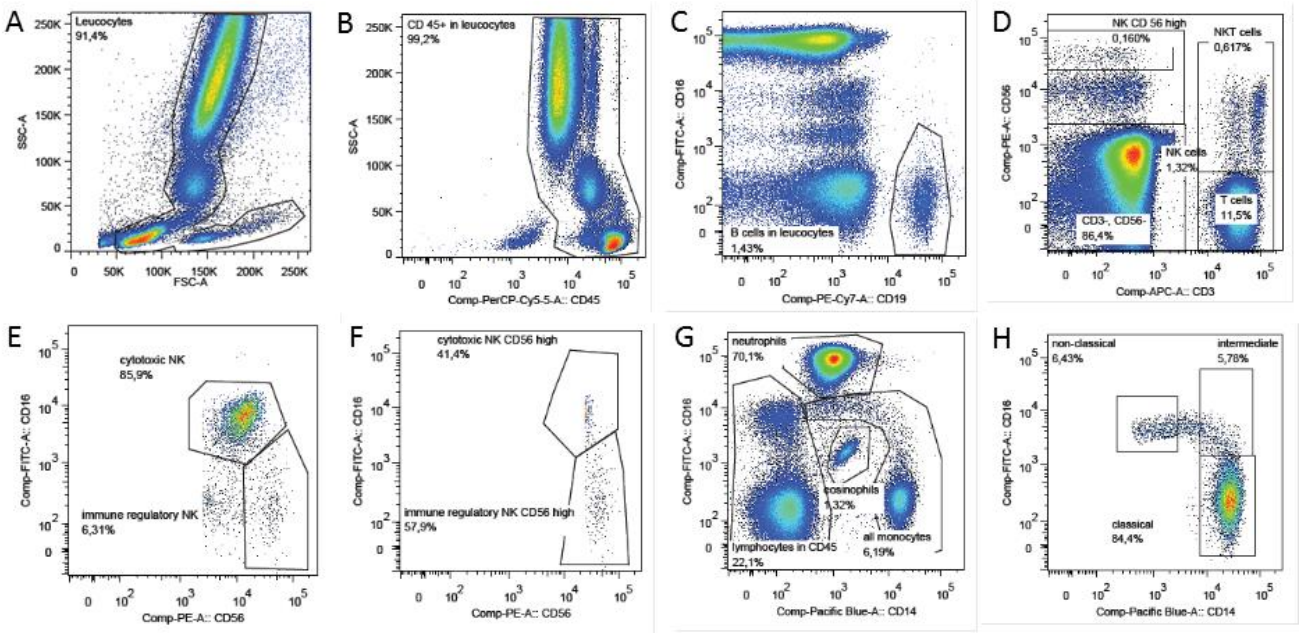

Abb. 9: **Darstellung von weiteren Leukozytenpopulationen.** Die Zellpopulationen sind als „Dot Plots“ dargestellt, jeder Punkt entspricht einer Zelle. Die X- und Y-Achse sind mit den jeweiligen Oberflächenmarkern beschriftet. Inhalt der einzelnen Bilder: A: Gesamtanteil von Leukozyten im peripheren Blut, B: Anteil CD45$^+$ Zellen an der Gesamtheit der Leukozyten, C: CD19$^+$CD16$^-$ B-Zellen in CD45$^+$Leukozyten, D: CD3$^+$ CD56$^+$ NKT-Zellen, CD$^+$CD56$^-$ T-Zellen, CD3$^-$CD56$^+$ NK-Zellen und CD3$^-$ CD56^{+++} NK-Zellen, E: CD16$^-$CD56$^+$ regulatorische NK, CD16$^+$CD56$^+$ zytotoxische NK (aus D), F: CD3$^-$CD16$^-$CD56^{+++} regulatorische NK, CD3$^-$CD16$^+$CD56^{+++} Zyt. NK (aus D), G: CD16^{dim}CD14^{dim} Eosinophile, Monozyten, CD14$^+$CD16^{dim} Neutrophile, H: CD14$^-$CD16$^+$ nicht klassische Monozyten, CD14$^+$CD16$^+$ intermediäre Monozyten, CD14$^-$CD16$^+$ klassische Monozyten (aus Monozyten in G).

2.5 Hormonmessung

Die Messungen der Hormone Progesteron, Prolaktin und ß-2-Östradiol wurden im *Institut für Klinische Chemie* des UKE durchgeführt. Dafür wurden 400 µl der eingefrorenen Proben zunächst langsam über den Zeitraum einer halben Stunde aufgetaut, fünf Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert und der so gesäuberte Überstand gemessen. Die Messung der Hormonwerte wurde mit dem Gerät *ADVIA Centaur XP* der Firma *Siemens* durchgeführt.

Die Werte für Progesteron und ß-2-Östradiol wurden durch kompetitive Immunoessays ermittelt. Für die Bestimmung des Prolaktinwertes wurde ein Sandwich-Immunoessay durchgeführt. Befanden sich die Hormonkonzentrationen oberhalb festgelegter Grenzen, wurden maschinell automatische Verdünnungen durchgeführt. Überstiegen die Proben auch nach der automatischen Verdünnung noch den Messbereich, wurden manuelle Verdünnungen erforderlich. Für diese Verdünnungen wurde Serum von gesunden Männern verwendet, da dieses im Vergleich zum Serum schwangerer Frauen nur vernachlässigbar geringe Konzentrationen der Hormone Progesteron, Östradiol und Prolaktin enthält. Die Verdünnungsfaktoren wurden im Messgerät eingestellt und durch das System automatisch berechnet.

Die Verdünnungsgrenzen betrugen für Progesteron ≤ 60 ng/ml, für ß-2-Östradiol ≤ 3000 pg/ml und für Prolaktin ≤200 ng/ml.

2.6 Sonographie

Die Erhebung der sonographischen Daten erfolgte wie die venöse Blutentnahme in der Studienambulanz der *Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin* des UKE zum Zeitpunkt der 24. SSW. Alle Messungen erfolgten transabdominal und in Rückenlage der Studienteilnehmerin. Die Untersuchungen wurden von drei Fachärztinnen für Gynäkologie und Geburtshilfe mit dem Ultraschallgerät *GE Voluson E8* durchgeführt. Dabei wurden die Abdominal-Ultraschallköpfe *RAB 4-8-D (4-8 MHz)* und *RAB 2-5-D (2-5 MHz)* verwendet. Für die Speicherung, Verwaltung und Abfrage der erhobenen Daten wurde das Programm *PIA ViewPoint* von *GE* verwendet.

Im Rahmen der sonographischen Untersuchung wurden die Wachstumsparameter Kopfumfang, biparietaler Durchmesser (BPD), Abdominalumfang und die Länge des Femurs gemessen. Aus diesen Daten ließ sich dann auch automatisch das geschätzte fetale Gewicht zu diesem Zeitpunkt errechnen. Des Weiteren wurden dopplersonographische Messungen der uterinen Arterien und der Nabelschnurgefäße durchgeführt. Hierbei wurden die Widerstandsparameter PI und RI sowie das Auftreten eines Notching dokumentiert.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm *SPSS Statistics 17.0*. Außerdem wurde das Programm *GraphPad Prism 5* für Vergleiche zwischen der 14. und der 24. SSW und für graphische Darstellungen genutzt. Für die Populationsvergleiche der Zellpopulationen zwischen der 14. und 24. SSW wurden Man-Whitney-Tests durchgeführt. Alle Variablen wurden hinsichtlich einer Normalverteilung überprüft. Wenn eine Normalverteilung aufgrund von einzelnen Ausreißern nicht gegeben war, kam es zum Ausschluss der identifizierten Ausreißer oder die betreffende Variable wurde logarithmiert. In die folgenden Regressionsanalysen wurden nur normalverteilte Variablen einbezogen.

Es wurde $p < 0.05$ als relevantes Signifikanzniveau (p-Wert) für die Auswertung der Zellpopulationen, Hormonkonzentrationen und der Regressionsanalysen festgelegt. Graphisch wird dieser Wert mit einem Stern dargestellt. P-Werte < 0.01 werden graphisch mit zwei Sternen gekennzeichnet, p-Werte <0.001 mit drei Sternen.

3. Ergebnisse

3.1 Kindliche Maße und Gestationsalter

Alle Probandinnen der untersuchten Kohorte brachten lebende Einlingskinder zur Welt, davon 18 Mädchen (40,9 %) und 26 Jungen (59,1 %). Die Maße der Neugeborenen, sowie das Gestationsalter bei Geburt sind in der nachfolgenden Tabelle 4 aufgeführt. Das mittlere Geburtsgewicht liegt in dieser Studie mit 3490 Gramm etwas über dem Durchschnitt für deutsche Kinder, der 3387 Gramm beträgt (Straube *et al.* 2010). Die mittlere Körperlänge bei Geburt liegt mit 52 Zentimetern nur 0,6 cm über dem deutschen Durchschnitt (51,4 cm) (Straube *et al.* 2010).

Variable	Mittelwert	Minimum	Maximum	Standard-Abweichung	n
Geburtsgewicht (g)	3490.38	2550.0	4270.0	399.87	44
Körperlänge (cm)	51.95	48.00	57.00	2.28	44
Gestationsalter bei Geburt (Wochen)	39.59	37.0	41.0	1.15	44

Tabelle 4: Geburtsgewicht und Körperlänge der Neugeborenen, Gestationsalter bei Geburt.

3.2 Auswertung der durchflusszytometrischen Messung von Zellpopulationen

3.2.1 Verteilungsmuster und Anzahl von CD4$^+$-Zellen

Die folgende Graphik gibt einen Überblick über die Verteilung von CD4$^+$ Zellpopulationen während der 14. und der 24. SSW (Abb.10). In die Berechnungen wurden alle Studienteilnehmerinnen (n=44) einbezogen.

Zum Vergleich der Zellpopulationen zwischen der 14. SSW und der 24. SSW wurden Man-Whitney-Tests durchgeführt.

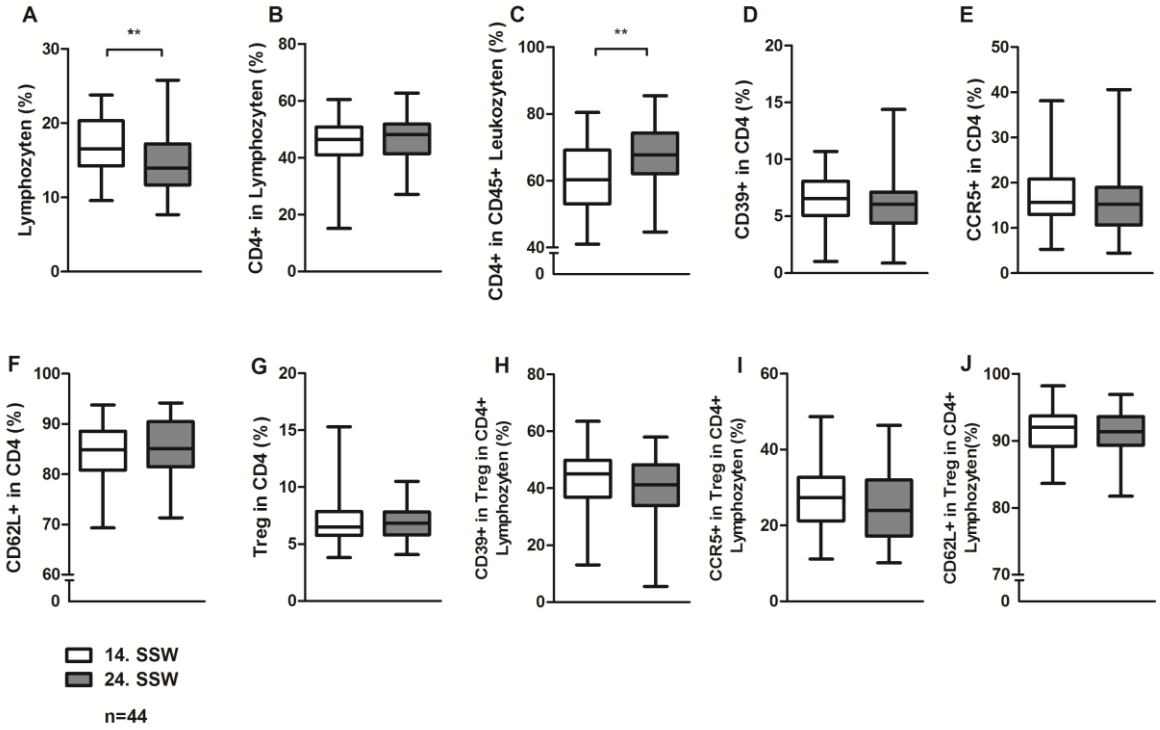

Abb.10: **Vergleich von CD4$^+$ Zellpopulationen in der 14. und 24. SSW. n = 44.** Die Bezeichnung der jeweiligen Zellgruppe findet sich als Beschriftung an der jeweiligen Y-Achse. Die mit * gekennzeichneten Populationen unterscheiden sich signifikant voneinander. * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$.

Die Population der Lymphozyten (A) hat sich im Zeitraum zwischen der 14. und der 24. SSW signifikant verringert ($p = 0.0054$). Währenddessen ist die Anzahl der CD4$^+$CD45$^+$ Leukozyten (C) angestiegen ($p = 0.0018$). Die weiteren Populationen zeigen keine signifikanten Differenzen in ihrer Frequenz zwischen der 14. und der 24. SSW.

3.2.2 Verteilungsmuster und Anzahl von CD8$^+$-Zellen

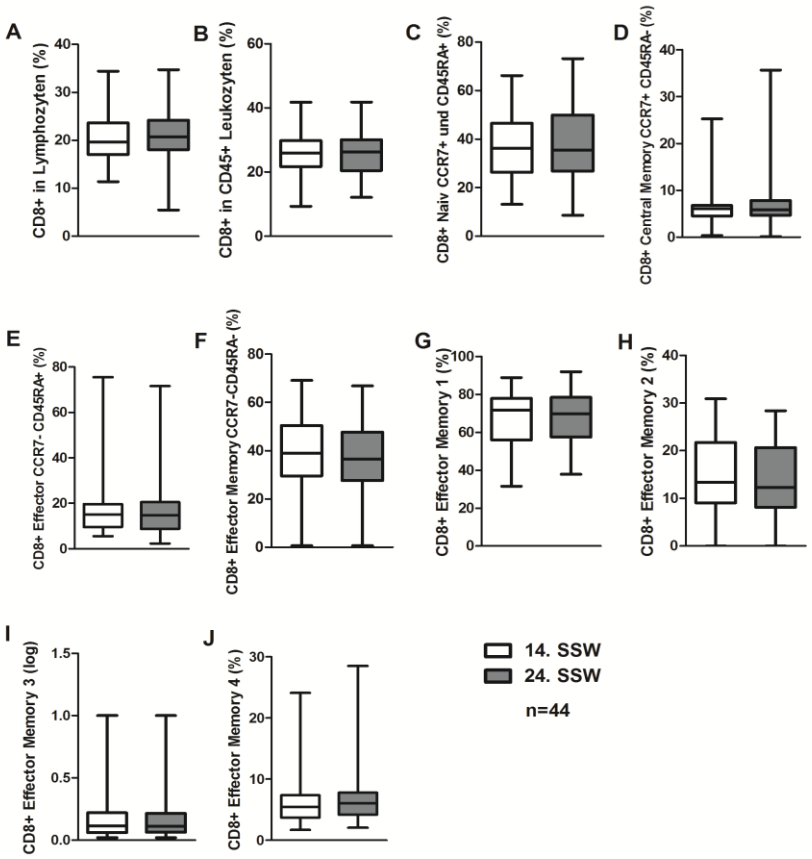

Abb. 11: **Vergleich von CD8$^+$ Zellpopulationen in der 14. und 24. SSW. n= 44.**
Die Bezeichnung der jeweiligen Zellgruppe findet sich als Beschriftung an der jeweiligen Y-Achse. Die mit * gekennzeichneten Populationen unterscheiden sich signifikant voneinander. * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$.

Abbildung 11 zeigt die Unterschiede zwischen den untersuchten CD8$^+$ Zellpopulationen in der 14. und 24. SSW. Keine der hier untersuchten CD8$^+$ Zellpopulationen zeigt eine signifikante Veränderung der prozentualen Verteilung zwischen der 14. und der 24. SSW.

3.2.3 Verteilungsmuster und Anzahl weiterer Leukozytenpopulationen

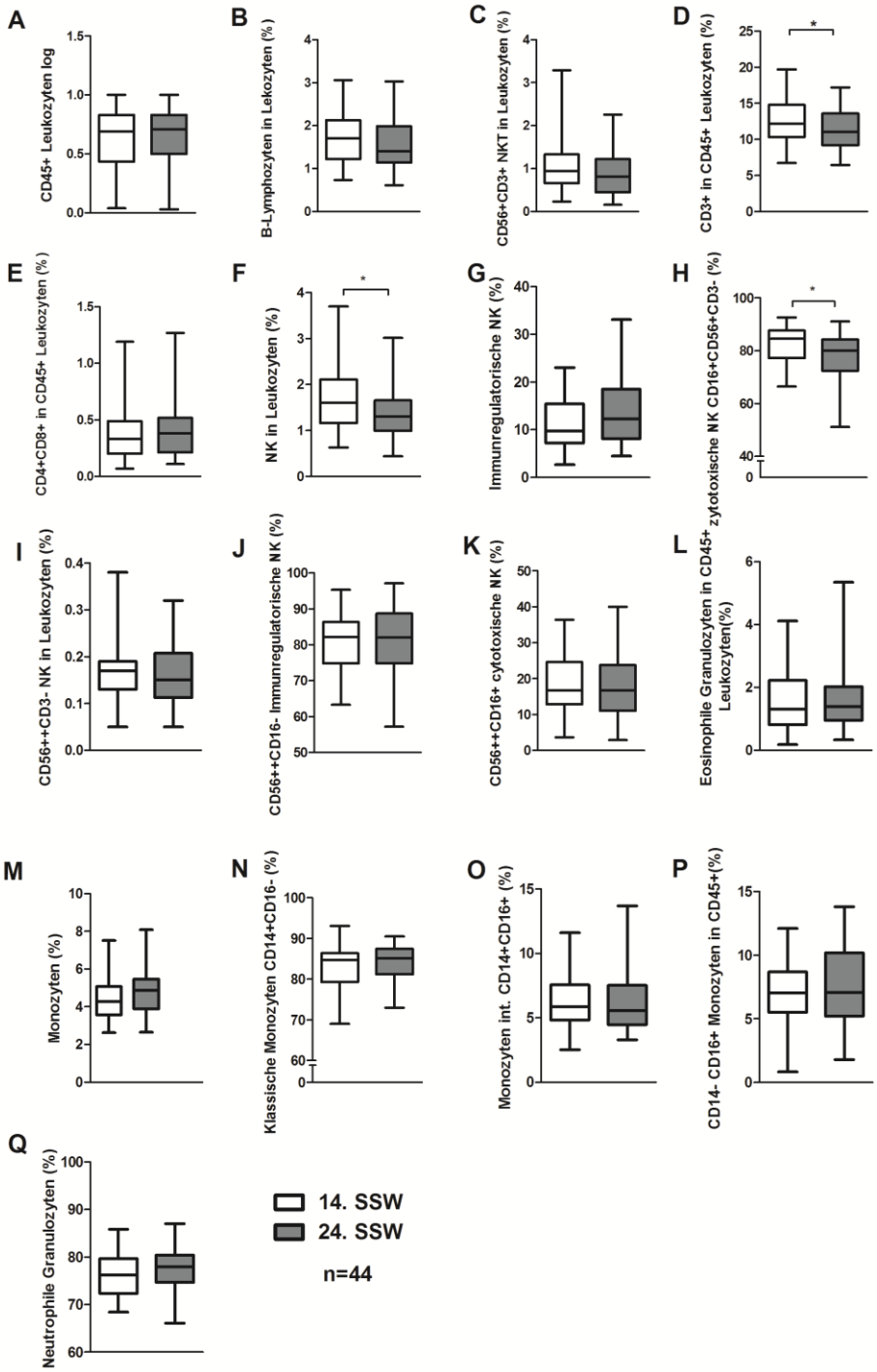

Abb. 12: **Vergleich von weiteren Leukozytenpopulationen in der 14. und der 24. SSW. n = 44.**
Die Bezeichnung der jeweiligen Zellgruppe findet sich als Beschriftung an der jeweiligen Y-Achse. Die mit * gekennzeichneten Populationen unterscheiden sich signifikant voneinander. * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$.

Der Darstellung der Vergleiche der Leukozytenpopulationen (Abbildung 12) ist zu entnehmen, dass der Anteil der $CD3^{+}CD45^{+}$ T-Zellen (D) im signifikanten Maße zurückgegangen ist (p = 0.013). Auch der Anteil der NK-Zellen (F) (p = 0.04) und deren Untergruppe, der zytotoxischen NK-Zellen (H) (p = 0.017), sind signifikant abgesunken.

3.2.4 Konzentration Progesteron, Östradiol und Prolaktin

Ein Vergleich der Konzentrationen der im Serum gemessenen Hormone zum Zeitpunkt der 14. und der 24. SSW ist der graphischen Abbildung 13 zu entnehmen.

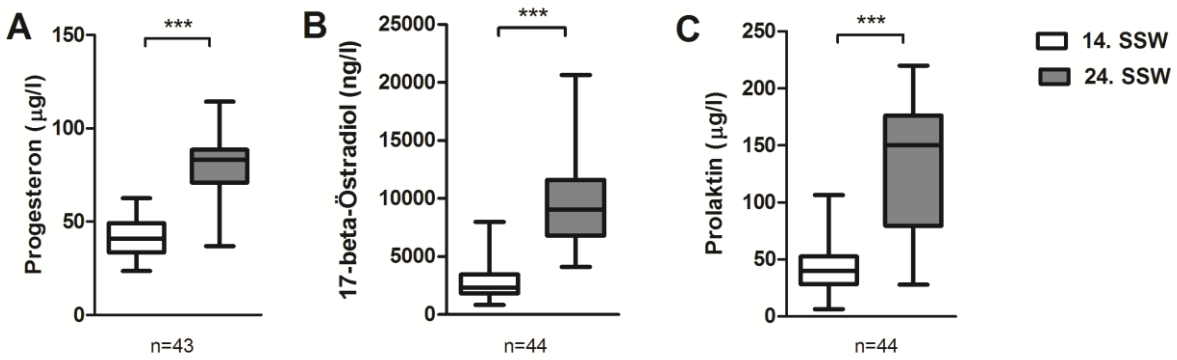

Abb. 13: **Vergleich von Hormonen in der 14. und 24. SSW.** A: Progesteron, n=43. B: 17-β-Östradiol, n=44. C: Prolaktin, n=44. Die mit * gekennzeichneten Populationen unterscheiden sich signifikant voneinander. * = p ≤ 0.05, ** = p ≤ 0.01; *** = p ≤ 0.001.

Die Konzentrationen aller im Rahmen dieser Studie gemessenen Hormone haben sich zwischen der 14. und der 24. SSW signifikant erhöht. Die Werte für Progesteron stiegen im Mittel von 41,5 µg/l auf 79,5 µg/l. Östradiol stieg von 2747,8 auf 9655,7 ng/l und Prolaktin von 40,6 auf 132,4 µg/l. Bei der Messung von Progesteronwerten im Serum musste eine Probandin aufgrund der Einnahme eines Progesteronpräparates nachträglich ausgeschlossen werden.

3.2.5 Sonographische Werte in der 24. Schwangerschaftswoche

Die sonographisch erfassten Maße der untersuchten Feten in der 24. SSW sind in Tabelle 5 aufgeführt. Das mittlere fetale Schätzgewicht zu diesem Zeitpunkt liegt bei 680,3 Gramm, der Kopfumfang bei 221,9 Millimetern. Die Abbildung 14 zeigt exemplarisch physiologische Flusskurven der A. umbilicalis sowie der Aa. uterinae im Rahmen der dopplersonographischen Untersuchung

	n	Mittelwert	Minimum	Maximum	Standard-Abweichung
Kopfumfang (mm)	44	221,9	208,1	248,0	8.4
biparietaler Durchmesser (mm)	44	61,4	56,0	70,0	3.0
Umfang Abdomen (mm)	44	196,0	178,0	220,0	10.3
Femurlänge (mm)	44	43,1	38,7	48,0	2.4
Schätzgewicht (g)	44	680,3	533	867	86.9

Tabelle 5: Sonographisch ermittelte fetale Maße in der 24. SSW.

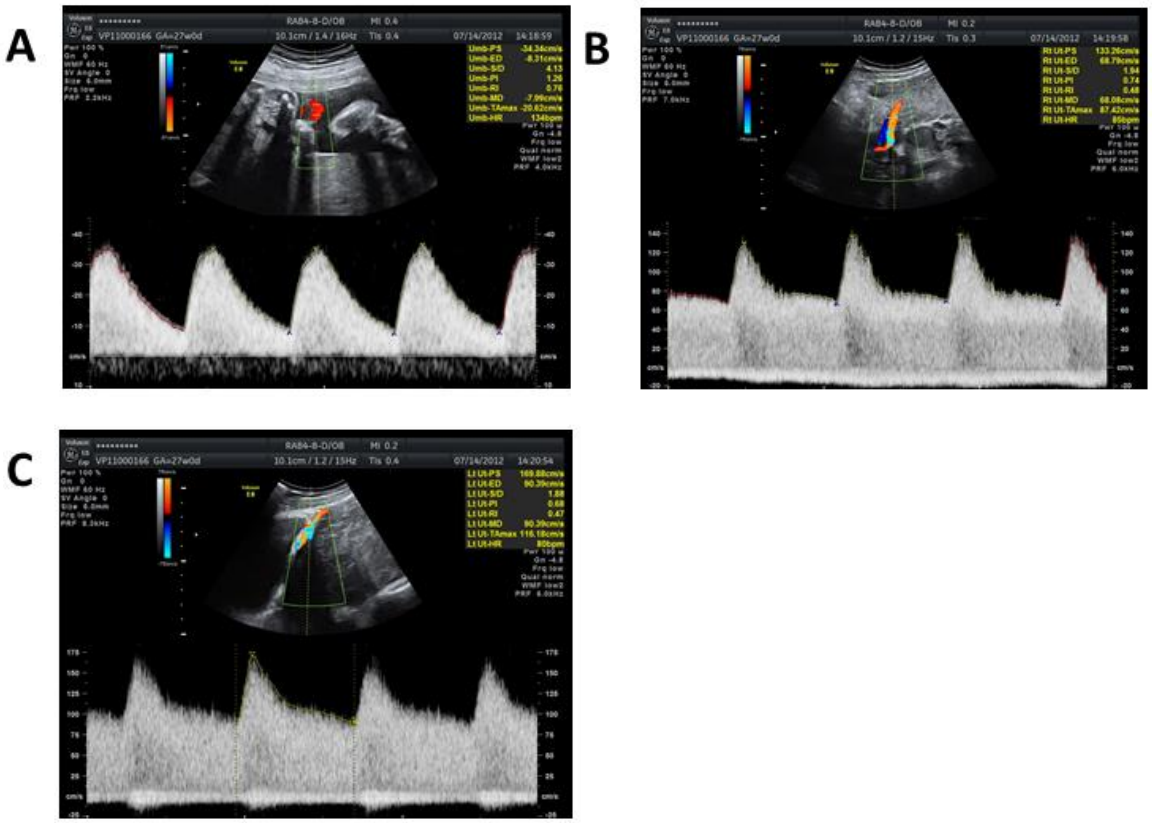

Abb. 14: **Dopplersonographische Darstellung von Flusskurven der A. umbilicalis und der Aa. uterinae in der 24. SSW.** A: A. umbilicalis, B: A. uterina rechts, C: A. uterina links. Gezeigt werden physiologische Flusskurven.

In Abbildung 15 sind die Mittelwerte der Resistenz- und Pulsatilitätsindices dieser Gefäße dargestellt. Bei Betrachtung der durchschnittlichen Mittelwerte fällt auf, dass die Aa. uterinae rechts und links

jeweils den identischen durchschnittlichen RI (**A**; RI beidseits 0,48) und PI (**B**; PI beidseits 0,74) zeigen.

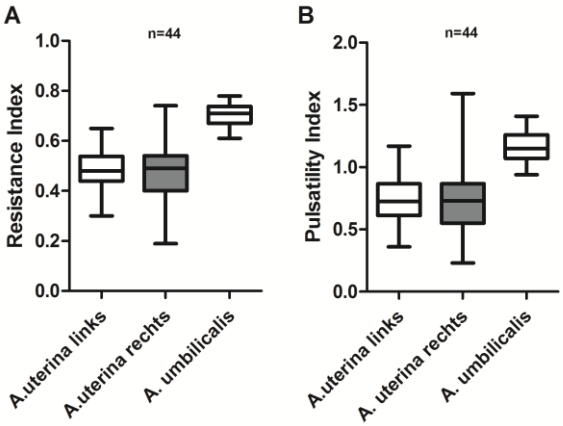

Abb. 15: **Vergleich der Widerstands- und Pulsatilitätsindices RI (A) und PI (B) in den Aa. uterinae und der A. umbilicalis in der 24. SSW. n = 44.**

3.3 Regressionsanalysen

Um die Zusammenhänge zwischen Zellfrequenzen, hormonellen Konzentrationen und sonographischen Parametern mit dem Geburtsgewicht zu analysieren, wurden multivariate Regressionsanalysen durchgeführt. Es sollte dabei festgestellt werden, welchen Einfluss die erfassten einzelnen Parameter unter Berücksichtigung von bekannten interagierenden Größen auf das Geburtsgewicht haben. Ziel war es hierbei, Risikofaktoren für ein erniedrigtes Geburtsgewicht festzustellen. Dabei wurde das Geburtsgewicht als abhängige Variable in die Berechnungen einbezogen. Die Zellen, Hormone und Ultraschallparameter flossen als unabhängige Variablen in die Berechnungen ein. Außerdem wurden Variablen bestimmt, die als Confounder (Einflussgrößen) in die Berechnungen mit eingeschlossen wurden. Als Confounder wurden für alle Berechnungen der maternale BMI und das Gestationsalter bei Geburt in die Berechnungen mit einbezogen. Voraussetzung für die Einbeziehung der Variablen war deren Normalverteilung.

3.3.1 CD4$^+$ Zellpopulationen in Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht

Unabhängige Variable	n	B[a]	Standardfehler	β[b]	95% KI[c]		p
CD4$^+$ Zellen							
Lymphozyten	43	-27.892	13.888	-.260	-55.983	.199	0.052
CD4$^+$ Lymphozyten	39	11.937	7.746	.227	-3.788	27.661	0.132
CD4$^+$ CD45$^+$ Leukozyten	43	-6.654	5.095	-.174	-16.960	3.651	0.199
CD4$^+$ CD39$^+$	43	7.529	24.156	.042	-41.332	56.390	0.757
CD4$^+$ CCR5$^+$	42	-.903	11.004	-.011	-23.179	21.373	0.935
CD4$^+$ CD62L$^+$	43	-.830	10.470	-.011	-22.007	20.348	0.937
CD4$^+$ CD25$^+$ Treg	42	12.010	38.244	.043	-65.412	89.432	0.755
CD39$^+$ Treg	43	-2.491	4.388	-.076	-11.366	6.385	0.574
CCR5$^+$ Treg	43	-6.025	5.989	-.133	-18.138	6.089	0.321
CD62L$^+$ Treg	43	6.515	16.807	.052	-27.480	40.510	0.700

Tabelle 6: Einfluss von CD4$^+$ Zellen in der 14. SSW auf das Geburtsgewicht. Die Berechnungen sind korrigiert für die Einflussvariablen 1. Maternaler Body-Mass-Index und 2. Gestationsalter bei Geburt. [a]nicht standardisierter Regressionskoeffizient. [b]standardisierter Regressionskoeffizient. [c]95% KI= 95% Konfidenzintervall für den nicht standardisierten Regressionskoeffizienten B.

Unabhängige Variable	n	B[a]	Standardfehler	β[b]	95% KI[c]		p
CD4$^+$ Zellen							
Lymphozyten	43	-18.606	13.322	-.189	-45.551	8.340	0.170
CD4$^+$ Lymphozyten	43	-7.371	7.266	-.134	-22.068	7.326	0.317
CD4$^+$ CD45$^+$ Leukozyten	43	3.846	5.926	.089	-8.141	15.833	0.520
CD4$^+$ CD39$^+$	43	11.256	21.196	.073	-31.617	54.129	0.598
CD4$^+$ CCR5$^+$	42	-9.365	9.955	-.127	-29.519	10.788	0.353
CD4$^+$ CD62L$^+$	43	.599	10.277	.008	-20.188	21.386	0.954
CD4$^+$ CD25$^+$ Treg	43	31.360	35.935	.118	-41.325	104.045	0.388
CD39$^+$ Treg	43	-5.921	3.827	-.203	-13.663	1.821	0.130
CCR5$^+$ Treg	43	-9.540	5.886	-.214	-21.445	2.365	0.113
CD62L$^+$ Treg	43	21.098	16.017	.174	-11.300	53.497	0.195

Tabelle 7: Einfluss von CD4$^+$ Zellen in der 24. SSW auf das Geburtsgewicht. Die Berechnungen sind korrigiert für die Einflussvariablen 1. Maternaler Body-Mass-Index und 2. Gestationsalter bei Geburt. [a]nicht standardisierter Regressionskoeffizient. [b]standardisierter Regressionskoeffizient. [c]95% KI= 95% Konfidenzintervall für den nicht standardisierten Regressionskoeffizienten B .

Weder in der 14. (Tabelle 6), noch in der 24. SSW (Tabelle 7) konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen den analysierten CD4$^+$ Zellpopulationen und dem Geburtsgewicht gezeigt werden. Erkennbar ist ein Trend einer invers gerichteten Korrelation zwischen dem Gesamtanteil der Lymphozyten in der 14. SSW und dem Geburtsgewicht (p = 0.052, Tabelle 6)

3.3.2 CD8$^+$ Zellpopulationen in Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht

Unabhängige Variable	n	B[a]	Standard-fehler	β[b]	95% KI[c]		p
CD8$^+$ Zellen							
CD8$^+$ Lymphozyten	43	-6.304	10.038	-.085	-26.609	14.000	0.534
CD8$^+$CD45$^+$ Leukozyten	43	-4.120	8.205	-.070	-20.716	12.475	0.618
CCR7$^+$CD45RA$^+$ Naiv	43	-4.130	3.996	-.142	-12.392	3.772	0.287
CCR7$^-$CD45RA$^-$ Effector Memory	43	1.361	3.724	.049	-6.172	8.894	0.717
CCR7$^-$CD45RA$^+$ Effector	39	-9.523	10.771	-.133	-31.390	12.344	0.383
CCR7$^+$CD45A$^-$ Central Memory	42	-2.437	29.377	-.012	-61.908	57.034	0.934
CD27$^+$CD28$^+$ Eff. Memory 1	43	-8.988	3.849	-.317	-16.774	-1.203	**0.025**
CD27$^+$CD28$^-$ Eff. Memory 2	43	14.922	6.567	.296	1.640	28.205	**0.029**
CD27$^-$CD28$^-$ Eff. Memory 3	40	-456.001	595.407	-.108	-1663.542	751.540	0.449
CD27$^-$CD28$^+$ Eff. Memory 4	40	-26.368	25.922	-.145	-78.940	26.203	0.316

Tabelle 8: Einfluss von CD8$^+$ Zellen in der 14. SSW auf das Geburtsgewicht. Die Berechnungen sind korrigiert für die Einflussvariablen 1. Maternaler Body-Mass-Index und 2. Gestationsalter bei Geburt. [a]nicht standardisierter Regressionskoeffizient. [b]standardisierter Regressionskoeffizient. [c]95% KI= 95% Konfidenzintervall für den nicht standardisierten Regressionskoeffizienten B.

Unabhängige Variable	n	B[a]	Standard-fehler	β[b]	95% KI[c]		p
CD8$^+$ Zellen							
CD8$^+$ Lymphozyten	43	-8.990	8.570	-.139	-26.324	8.344	0.301
CD8$^+$CD45$^+$ Leukozyten	43	-2.479	7.576	-.045	-17.803	12.846	0.745
CCR7$^+$CD45RA$^+$ Naiv	43	-3.764	3.745	-.132	-11.338	3.810	0.321
CCR7$^-$CD45RA$^-$Effector Memory	43	1.464	3.650	.053	-5.920	8.848	0.691
CCR7$^-$CD45RA$^+$ Effector	39	-3.676	9.075	-.060	-22.099	14.747	0.688
CCR7$^+$CD45A$^-$ Central Memory	42	-9.557	27.158	-.049	-64,536	45.422	0.691
CD27$^+$CD28$^+$ Eff. Memory 1	43	-7.988	3.980	.425	-16.039	.063	0.052
CD27$^+$CD28$^-$ Eff. Memory 2	43	12.179	7.557	.216	-3.107	27.466	0.155
CD27$^-$CD28$^-$ Eff. Memory 3	41	-245.661	615.510	-.057	-1492.,803	1001.480	0.692
CD27$^-$CD28$^+$ Eff. Memory 4	41	-24.009	25.918	-.130	-76.524	28.506	0.360

Tabelle 9: Einfluss von CD8$^+$ Zellen in der 24. SSW auf das Geburtsgewicht. Die Berechnungen sind korrigiert für die Einflussvariablen 1. Maternaler Body-Mass-Index und 2. Gestationsalter bei Geburt. [a]nicht standardisierter Regressionskoeffizient. [b]standardisierter Regressionskoeffizient. [c]95% KI= 95% Konfidenzintervall für den nicht standardisierten Regressionskoeffizienten B.

In den für $CD8^+$-Zellen durchgeführten Regressionsanalysen zeigt sich, dass ein erhöhter Anteil an EM1-Zellen im Blut der Mutter in der 14. SSW mit einem niedrigeren Geburtsgewicht der Kinder einhergeht (p = 0.025) (s. Tabelle 8).

Bei den EM2-Zellen zeigt sich das Gegenteil: erhöhte EM2-Werte während der Schwangerschaft, vor allem in der 14. SSW, korrelieren signifikant mit einem höheren Geburtsgewicht (p = 0.029) (s. Tabelle 8). In der 24. Woche ist der Zusammenhang bei beiden Populationen nicht signifikant, es lässt sich jedoch ein Trend erkennen: der p-Wert für EM1 beträgt p = 0.052, für EM2 wurde ein Wert von p = 0.155 berechnet (s. Tabelle 9). Die bei der EM1- Population nachgewiesene Korrelation mit dem Geburtsgewicht ist, wie schon in der 14. SSW, invers.

3.3.3 Weitere Leukozytenpopulationen in Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht

Unabhängige Variable	n	B[a]	Standard-fehler	β[b]	95% KI[c]		p
Leukozytenscreening							
$CD45^+$ Leukozyten log	43	175.904	190.532	.122	-209.483	561.292	0.362
$CD19^+CD16^-$ B	43	-103.577	86.909	-.157	-279.366	72.212	0.241
$CD3^+$ $CD56^+$ NKT	38	-12.244	132.984	-.014	-282.500	258.012	0.927
$CD3^+CD56^-$ T	43	-27.164	17.838	-.199	-63.244	8.917	0.136
$CD4^+CD8^+$	43	-158.225	238.266	-.097	-640.163	323.713	0.511
$CD3^-CD56^+$ NK	40	-63.899	95.497	-.098	-257.576	129.778	0.508
$CD16^-$ $CD56^+$ Regulatorische NK	40	-2.384	10.506	-.033	-23.690	18.922	0.822
$CD16^+CD56^+$ Zytotoxische NK	40	-2.483	7.812	-.045	-18.326	13.360	0.752
$CD3^-CD56^{+++}$ NK	40	-1065.188	794.248	-.191	-2675.997	545.621	0.188
$CD3^-CD16^-CD56^{+++}$ Reg. NK	40	-11.627	5.867	-.269	-23.527	.272	0.055
$CD3^-CD16^+CD56^{+++}$ Zyt. NK	40	10.837	5.742	.257	-.807	22.482	0.067
$CD16^{dim}CD14^{dim}$ Eosinophile	40	21.882	60.100	.053	-100.007	143.771	0.718
Monozyten	40	-47.738	49.267	-.137	-147.655	52.180	0.339
Intermediäre Monozyten	40	27.062	24.600	.156	-22.829	76.953	0.279
Klassische Monozyten	40	-21.066	11.407	-.260	-44.201	2.069	0.073
Nicht-klassische Monozyten	40	27.105	24.284	.163	-22.146	76.356	0.272
$CD14^+CD16^{dim}$ Neutrophile	40	19.902	11.640	.236	-3.706	43.510	0.096

Tabelle 10: Einfluss von Leukozytenpopulationen in der 14. SSW auf das Geburtsgewicht. Die Berechnungen sind korrigiert für die Einflussvariablen 1. Maternaler Body-Mass-Index und 2. Gestationsalter bei Geburt. [a]nicht standardisierter Regressionskoeffizient. [b]standardisierter Regressionskoeffizient. [c]95% KI= 95% Konfidenzintervall für den nicht standardisierten Regressionskoeffizienten B

Die in Tabelle 10 dargestellten Leukozytenpopulationen zeigen keinen signifikanten Einfluss auf das Geburtsgewicht. Es lassen sich jedoch Tendenzen erkennen, die auf einen eventuellen inversen Einfluss von $CD3^{-}CD16^{-}CD56^{+++}$ regulatorischen NK-Zellen (p = 0.055), klassischen Monozyten (p = 0.073) und neutrophilen Granulozyten (p = 0.096) sowie auf eine positive Assoziation zytotoxischer NK-Zellen (p = 0.067)mit dem Geburtsgewicht schließen lassen.

Unabhängige Variable	n	B[a]	Standard-fehler	β[b]	95% KI[c]		p
Leukozytenscreening							
$CD45^{+}$ Leukozyten log[d]	43	41.821	203.274	.028	-369.339	452.982	0.838
$CD19^{+}CD16^{-}$ B	43	-167.360	99.778	-.217	-369.179	34.459	0.101
$CD3^{+}$ $CD56^{+}$ NKT	43	-116.333	96.306	-.160	-311.131	78.464	0.234
$CD3^{+}CD56^{-}$T	43	-45.607	17.920	-.321	-81.853	-9.361	**0.015**
$CD4^{+}CD8^{+}$	42	-28.135	298.503	-.015	-632.422	576.152	0.925
$CD3^{-}CD56^{+}$ NK	43	-32.865	85.395	-.054	-205.592	139.862	0.702
$CD16^{-}$ $CD56^{+}$ Regulatorische NK	43	-2.431	8.193	-.040	-19.004	14.141	0.768
$CD16^{+}CD56^{+}$ Zytotoxische NK	43	2.566	6.698	.051	-10.982	16.115	0.704
$CD3^{-}CD56^{+++}$ NK	43	-1238.435	828.865	-.196	-2914.972	438.102	0.143
$CD3^{-}CD16^{-}CD56^{+++}$ Reg. NK	43	-3.333	5.689	-.079	-14.841	8.175	0.561
$CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+++}$ Zyt. NK	43	3.253	5.881	.074	-8.642	15.148	0.583
$CD16^{dim}CD14^{dim}$ Eosinophile	41	55.393	83.949	.092	-114.704	225.491	0.513
Monozyten	43	-48.377	41.222	-.165	-131.757	35.003	0.248
Intermediäre Monozyten	42	14.423	26.874	.071	-39.980	68.826	0.595
Klassische Monozyten	43	-10.078	13.840	-.107	-38.073	17.917	0.471
Nicht-klassische Monozyten	43	25.779	19.118	.190	-12.890	64.448	0.185
$CD14^{+}CD16^{dim}$ Neutrophile	43	22.929	11.285	.260	.103	45.754	**0.049**

Tabelle 11: Einfluss von Leukozytenpopulationen in der 24. SSW auf das Geburtsgewicht. Die Berechnungen sind korrigiert für die Einflussvariablen 1. Maternaler Body-Mass-Index und 2. Gestationsalter bei Geburt. [a]nicht standardisierter Regressionskoeffizient. [b]standardisierter Regressionskoeffizient. [c]95% KI= 95% Konfidenzintervall für den nicht standardisierten Regressionskoeffizienten B. [d]logarithmiert.

Es zeigt sich ein signifikanter Einfluss von $CD3^{+}CD56^{-}$T-Zellen auf das Geburtsgewicht (p = 0.015), wobei erhöhte Zellkonzentrationen mit einem niedrigen Geburtsgewicht assoziiert sind (s. Tabelle 11). Auch die $CD14^{+}CD16^{dim}$ neutrophilen Granulozyten beeinflussen das Geburtsgewicht signifikant (p = 0.049) positiv.

3.3.4 Hormone in Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht

Auch zur Berechnung eines Einflusses der Hormone Progesteron, Östradiol und Prolaktin wurden für die 14. SSW (Tabelle 12) und die 24. SSW (Tabelle 13) Regressionsanalysen durchgeführt:

Unabhängige Variable	n	B	Standard-fehler	β	95% KI[a]		P
Progesteron (ng/ml)	42	-4.818	5.550	-.129	-16.054	6.419	0.391
Östradiol (pg/ml)	41	-.044	.048	-.127	-.142	.054	0.372
Prolaktin (ng/ml)	43	1.354	2.967	.063	-4.646	7.355	0.651

Tabelle 12: Einfluss von Hormonen in der 14. SSW auf das Geburtsgewicht. Die Berechnungen sind korrigiert für die Einflussvariablen 1. Maternaler Body-Mass-Index und 2. Gestationsalter bei Geburt. [a]nicht standardisierter Regressionskoeffizient. [b]standardisierter Regressionskoeffizient. [c]95% KI= 95% Konfidenzintervall für den nicht standardisierten Regressionskoeffizienten B.

Unabhängige Variable	n	B	Standard-fehler	β	95% KI[a]		p
Progesteron (ng/ml)	42	4.548	4.268	.159	-4.091	13.188	0.293
Östradiol (pg/ml)	43	.009	.017	.077	-.025	.043	0.591
Prolaktin (ng/ml)	42	.859	1.054	.115	-1.274	2.991	0.420

Tabelle 13: Einfluss von Hormonen in der 24. SSW auf das Geburtsgewicht. Die Berechnungen sind korrigiert für die Einflussvariablen 1. Maternaler Body-Mass-Index und 2. Gestationsalter bei Geburt. [a]nicht standardisierter Regressionskoeffizient. [b]standardisierter Regressionskoeffizient. [c]95% KI= 95% Konfidenzintervall für den nicht standardisierten Regressionskoeffizienten B.

Die gemessenen Hormone haben weder in der 14. noch in der 24. SSW einen signifikanten Einfluss auf die abhängige Variable Geburtsgewicht.

3.3.5 Sonographische Parameter in Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht

Unabhängige Variable	n	B	Standard-fehler	β	95% KI[a]		p
Kopfumfang (cm)	43	-1.947	6.903	-.040	-15.910	12.015	0.779
Biparietaler Durchmesser (cm)	43	-13.756	19.401	-.098	-52.998	25.487	0.483
Bauchumfang (cm)	43	9.314	5.505	.235	-1.821	20.450	0.099
Femurlänge (cm)	43	13.807	23.392	.081	-33.508	61.121	0.558
geschätztes Gewicht (g)	43	.739	.664	.158	-.605	2.083	0.273

Tabelle 14: Zusammenhang sonographisch ermittelter fetaler Maße in der 24. SSW mit dem Geburtsgewicht. Die Berechnungen sind korrigiert für die Einflussvariablen 1. Maternaler Body-Mass-Index und 2. Gestationsalter bei Geburt. [a]nicht standardisierter Regressionskoeffizient. [b]standardisierter Regressionskoeffizient. [c]95% KI= 95% Konfidenzintervall für den nicht standardisierten Regressionskoeffizienten B.

Anhand der in der 24. SSW erhobenen Größenparameter und des geschätzten Gewichtes (Tabelle 14) lässt sich kein signifikanter Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht darstellen.

Unabhängige Variable	n	B	Standard-fehler	β	95% KI[a]		P
A. umbilicalis PI[b]	43	-1026.958	418.983	-.304	-1874.431	-179.486	**0.019**
A. umbilicalis RI[c]	43	-2300.592	1254.184	-.235	-4837.417	236.234	0.074
A.uterina links PI	43	-262.855	304.670	-.116	-879.109	353.399	0.394
A.uterina links RI	43	-388.260	688.634	-.077	-1781.154	1004.634	0.576
A.uterina rechts PI	42	-308.131	242.297	-.167	-798.635	182.373	0.211
A.uterina rechts RI	43	-355.791	503.703	-.094	-1374.627	663.044	0.484

Tabelle 15: Zusammenhang dopplersonographisch ermittelter Durchblutungsparameter in der 24. SSW mit dem Geburtsgewicht. Die Berechnungen sind korrigiert für die Einflussvariablen 1. Maternaler Body-Mass-Index und 2. Gestationsalter bei Geburt. [a]nicht standardisierter Regressionskoeffizient. [b]standardisierter Regressionskoeffizient. [c]95% KI= 95% Konfidenzintervall für den nicht standardisierten Regressionskoeffizienten B.

Tabelle 15 stellt die Zusammenhänge dopplersonographisch ermittelter Resistenz- und Pulsatilitätsindices in der 24. SSW dar.

Der PI der Nabelschnurarterie zeigt einen signifikanten inversen Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht (p = 0.019), während der RI einen nicht signifikanten Trend in dieselbe Richtung erkennen lässt (p = 0 .074).

4. Diskussion

4.1 Klinische Bedeutung der immunologischen Anpassung während der 14. und 24. Schwangerschaftswoche

Während einer Schwangerschaft finden im maternalen Organismus sowie auch an der feto-maternalen Grenzzone ständig immunologische Anpassungsvorgänge statt, durch welche die bestmöglichen Wachstumsbedingungen für den Fetus erreicht werden sollen.

Die Auswertung der $CD4^+$ Zellpopulationen innerhalb der untersuchten Studienpopulation zeigte einen deutlichen Rückgang des Gesamtanteils an Lymphozyten im Verlauf des zweiten Trimenon der Schwangerschaft. Dieses Anpassungsverhalten stimmt mit Beobachtungen anderer Publikationsarbeiten überein. Bereits Valdimarsson *et al.* (1983) beobachteten eine Verminderung der Anzahl an Lymphozyten im peripheren Blut schwangerer Frauen. Im Schwangerschaftsverlauf wurde ein kontinuierliches Absinken der Lymphozytenkonzentration bis zur 25.-28. SSW beobachtet, anschließend stieg der Lympohozytenanteil an, um zum Zeitpunkt der Geburt fast das Level nicht-schwangerer Frauen zu erreichen (Valdimarsson *et al.* 1983). Auch weitere Studien konnten einen generellen Rückgang der Lymphozyten im peripheren Blut beobachten (Johnstone *et al.* 1994, Kühnert *et al.* 1998). Ein Absinken der Lymphozytenpopulation lässt im Allgemeinen auf eine Reduzierung der immunologischen Kompetenz im Sinne einer Erregerabwehr schließen. Auch besteht die Möglichkeit, dass durch das während einer Schwangerschaft physiologisch erhöhte Zirkulationsvolumen eine Verdünnung mit konsekutiver Lymphopenie besteht. Da jedoch in dieser Studie die $CD4^+$ Subpopulationen im Verhältnis erhöht sind, ist es wahrscheinlicher, dass eine Verschiebung innerhalb der Kompartimente Blut und Gewebe besteht. Es ist beispielsweise denkbar, dass einzelne Subpopulationen vom peripheren Blut in andere Gewebe wie beispielsweise Uterus und Plazenta oder in Lymphknoten einwandern und dort eine lokale Immunmodulation bewirken, während andere $CD4^+$ Lymphozyten in der Peripherie verbleiben. (Johnstone *et al.* 1994).

In weiteren Vergleichen schwangerer und nicht schwangerer Frauen konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von Lymphozyten während einer Schwangerschaft insgesamt deutlich erniedrigt ist, wohingegen Leukozytenpopulationen im Verhältnis stärker aktiviert werden (Valdimarsson *et al.* 1983, Luppi *et al.* 2002).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen der hier vorliegenden Studie, in der unter den $CD4^+CD45^+$-Leukozyten eine signifikante Vermehrung der Populationen festgestellt werden konnte ($p = 0.0018$). Diese identifizierte Gruppe von $CD4^+$-Leukozyten ist jedoch nicht unterteilt in Zellen mit einem Th1 oder Th2-Zytokinprofil. Somit lässt sich nicht klar bestimmen, welche Art von

Zytokinen durch diese Zellen produziert wird und ob die Adaptation des Immunsystems an dieser Stelle schwangerschaftsprotektiv ausgerichtet ist.

Die regulatorischen T-Zellen mit den Unterpopulationen, die anhand der Oberflächenmarker CD39, CCR5 und CD62L identifiziert wurden, zeigten keine signifikante Veränderung im Verlauf des zweiten Trimenons. Diese Beobachtungen stützen die Forschungsergebnisse von Somerset *et al*. (2004). Die Arbeitsgruppe konnte einen signifikanten Anstieg der Konzentration regulatorischer T-Zellen nur im Verlaufe des ersten Trimenons sowie im Vergleich mit nicht Schwangeren bei Menschen nachweisen. Im zweiten Trimenon hingegen stellten sich konstant hohe Werte ein, die dann im dritten Timenon bis zur Geburt nur leicht absanken. In dem in dieser Studie untersuchten Zeitraum, der das zweite Trimenon widerspiegelt, zeigt sich eine konstante Konzentration der Tregs. Möglicherweise bedeutet dies, dass die regulatorische Anpassungsreaktion durch Tregs vor allem zu Beginn der Schwangerschaft stattfindet und sich im zweiten Trimenon bereits ein stabiles hohes Konzentrationsniveau eingestellt hat.

Neben der Erfassung der immunologischen Adaptation von $CD4^+$ Zellen sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen Zellverteilungen und dem kindlichen Geburtsgewicht besteht. Im Rahmen der multivariaten Regressionsanalysen konnte für $CD4^+$ Zellen jedoch kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit Daten von Bartha und Comino-Delgado (1999), die unterschiedliche Lymphozytensubpopulationen im Blut gesunder Schwangerer mit Lymphozyten im Blut von Frauen, bei deren Feten eine intrauterine Wachstumsrestriktion vorlag, verglichen. In diesen Untersuchungen fand sich in linearen Regressionsanalysen kein signifikanter Zusammenhang zwischen $CD4^+$-Lymphozyten und dem Geburtsgewicht. Dies konnte sowohl in den gesunden Schwangerschaften, als auch bei Vorliegen einer IUGR festgestellt werden (Bartha und Comino-Delgado 1999). Im Unterschied zu der hier vorliegenden Studie wurde das venöse Blut in der 38.-39. SSW entnommen. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen ergänzen somit die vorhandene Datenlage und zeigen, dass sich weder in der 14. noch in der 24. SSW die fetale Gesundheit im Sinne eines erniedrigten Geburtsgewichtes anhand der Frequenz einzelner $CD4^+$-Zellgruppen vorherbestimmen lässt.

Aufgrund der geringen Datenlage beschäftigte sich eine aktuelle Studie von Raghupathy *et al.* (2012) mit der Fragestellung, ob in Zusammenhang mit intrauteriner Wachstumsrestriktion eine erhöhte Aktivität von $CD4^+$-Zellen gefunden werden kann. Untersucht wurde humanes Blut kurz nach der Geburt nach komplikationslosem Schwangerschaftsverlauf, sowie das Blut von Frauen mit IUGR-Kindern mit und ohne plazentarer Dysfunktion. Hierbei wurde der Schwerpunkt nicht auf die Zellfrequenz, son-

dern auf deren Aktivität gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass die $CD4^+$-Zellen in IUGR-Schwangerschaften vermehrt die proinflammatorischen Zytokine IL 8 und TNFα produzieren, wohingegen das antiinflammatorische Zytokin IL 13 vemindert sezerniert wird. Möglicherweise führt ein Ungleichgewicht zugunsten proinflammatorischer Zytokine zu latenten Entzündungsreaktionen, die endotheltoxisch wirken und die Spiralarterieninvasion beeinträchtigen oder zu Mikrothrombosierungen beitragen (Raghupathy *et al.* 2012). Somit wäre die Versorgung des Feten durch eine verminderte plazentare Durchblutung eingeschränkt. Diese Erkenntnisse bezüglich der Zellaktivität könnten zukünftig bereits während der frühen Schwangerschaft genutzt werden, um die zytotoxische Aktivität dieser Zellen neben der nichtinvasiven Ultraschalldiagnostik als Prädiktor für ein zu niedriges Geburtsgewicht zu nutzen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Erfassung von Zellfrequenzen gelegt. Auf die Messung zellulärer Aktivität wurde verzichtet, da die Messung von Zytokinen im Serum häufig ungenau und weniger sensitiv als im Immunoessay ist. Auf diese Methode wurde zudem aus finanziellen Gründen verzichtet. Da sich ein Anstieg der $CD4^+$Zellen im Verlauf der Schwangerschaft nachweisen ließ, wäre es interessant genauer zu eruieren, welche Zytokine hauptsächlich produziert werden. Diese Fragestellung könnte in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden.

Kühnert *et al.* (1998) beobachteten periphere $CD8^+$-Lymphozyten des Menschen über den gesamten Schwangerschaftsverlauf und fanden zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung der prozentualen Verteilung. Tallon *et al.* (1984) fanden ebenfalls einen konstant bleibenden Anteil von $CD8^+$ Zellen während des ersten und zweiten Trimenons, ein leichtes Absinken der Zellpopulation wurde im dritten Trimenon beobachtet. Diese Ergebnisse stimmen überein mit den in der vorliegenden Studie untersuchten Daten.

Die Anpassung und das Verhalten von Subpopulationen der $CD8^+$- Zellen im Verlauf der Schwangerschaft sind bisher noch nicht wissenschaftlich beschrieben, vielmehr wurden Vergleiche mit $CD8^+$-Zellen nicht schwangerer Probandinnen angestellt. Hier wurde in einigen Studien ein genereller Anstieg von $CD8^+$-Zellen während der Schwangerschaft gezeigt (Tallon *et al.* 1984, Rich *et al.* 1999, Luppi *et al.* 2002). Rich *et al.* (1999) untersuchten zusätzlich Subpopulationen der $CD8^+$-Zellen, die auch in dieser Studie von Bedeutung sind. Im Rahmen einer gesunden Schwangerschaft sind die naiven T-Zellen erhöht, während die Gedächtnis-T-Zellen und die $CD28^+$-Zellpopulationen prozentual vermindert sind (Rich *et al.* 1999). CD28 ist ein Oberflächenmolekül, das mit einer verstärkten Immunabwehr assoziiert ist. In Verbindung mit dem T-Zellrezeptor kann CD28 naive T-Zellen aktivieren und die Produktion des proinflammatorischen Interleukin 2 induzieren. CD28 trägt damit zu verstärkter Immunabwehr und Abstoßung von Organen bei (Bour-Jordan und Bluestone 2002). Andererseits übernimmt CD28 auch regulatorische Aufgaben hinsichtlich der Differenzierung eines Th2-gerichteten Zy-

tokinmilieus. Dolfi *et al.* (2011) konnten in Mausversuchen zeigen, dass eine Blockade des Moleküls CD28 zu einer erhöhten Apoptoserate in $CD8^+$-Zellen führt.

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Regressionsanalysen zeigen signifikante Zusammenhänge zwischen zwei Unterpopulationen der $CD8^+$-Zellen und dem Geburtsgewicht.
Unter Berücksichtigung der das Geburtsgewicht beeinflussenden Confoundervariablen „maternaler Body-Mass-Index“ und „Gestationsalter bei Geburt“ ließen sowohl die Populationen $CD8^+CD27^+CD28^+$ Effector Memory 1 ($p = 0.025$), als auch $CD8^+CD27^+CD28^-$ Effector Memory 2 ($p = 0.029$) in der 14. SSW einen Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht erkennen. EM1 zeigte hierbei höhere Konzentrationen bei Müttern mit kleineren Kindern, EM2-Werte waren erhöht bei höheren Geburtsgewichten.
Da diese $CD8^+$-Subpopulationen hinsichtlich ihrer Funktion während der Schwangerschaft noch recht unbekannt sind, lassen sich zum jetzigen Zeitpunkt noch keine eindeutigen Aussagen über die genaue Funktionsweise und Einfluss auf den Schwangerschaftsverlauf machen. Tilburgs *et al.* (2010) fanden heraus, dass EM1-Zellen zum Zeitpunkt der Geburt weniger „Effektor-Funktion“ besitzen als EM2-Zellen, welche Perforin und Granzym B exprimieren. Dies gilt jedoch vornehmlich für die untersuchten Zellen des peripheren Blutes, wohingegen sich in der Dezidua eine verringerte Expression dieser Proteine bei der gleichen Zellpopulation darstellte (Tilburgs *et al.* 2010). Es ist also davon auszugehen, dass im Laufe der Schwangerschaft eine Migration peripherer Blutzellen in die feto-maternale Grenzzone in der Plazenta stattfindet. Dies zeigt sich in der Tatsache, dass in phänotypisch gleichen Zellen an unterschiedlichen Wirkungsorten des Körpers deutliche Veränderungen in der Expression ihrer Genprodukte nachzuweisen sind (Tilburgs *et al.* 2010).
Der positive Zusammenhang zwischen EM2-Zellen und einem erhöhten Geburtsgewicht, der in dieser Studie gezeigt werden konnte, könnte durch eine veränderte Zytokinexpression in der Dezidua erklärt werden. Während dieser Zelltyp im peripheren Blut eine erhöhte Effektorfunktion aufweist, könnte die Produktion von Perforin und Granzym B lokal durch bisher unbekannte Mechanismen herabreguliert sein.
Andererseits ist es auch vorstellbar, dass die Zellen lokal trotz eines erhöhten zytotoxischen Potentials keine schädlichen Auswirkungen auf den Fetus an sich haben, sondern eher die Gefäßinvasion der Spiralarterien begünstigen, wie es auch bei uterinen NK-Zellen vermutet wird (Lissauer 2012). In diesem Rahmen wäre eine antithrombotischer, vasodilatativer Einfluss dieser Zellen denkbar.
Die Ergebnisse in der hier vorliegenden Studie lassen vermuten, dass sich ein erhöhter Anteil von EM2 Zellen im frühen zweiten Trimenon der Schwangerschaft protektiv auf die Entwicklung des Kindes im Sinne eines höheren Geburtsgewichtes auswirken könnte.

Im Vergleich der Leukozytenpopulationen der 14. und der 24. SSW fand sich ein signifikanter Rückgang der $CD3^+$ T-Zellen, der $CD3^-CD56^+$-NK, sowie der $CD16^+CD56^+$ zytotoxischen NK-Zellen (s. Abbildung 12). Diese Ergebnisse entsprechen den Erkenntnissen von Castilla *et al.* (1989), die ebenfalls einen deutlichen Rückgang von $CD3^+$-und $CD16^+$-NK-Zellen in menschlichem peripheren Blut feststellten, insbesondere im zweiten Schwangerschaftsdrittel. Auch im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen lässt sich im Blut Schwangerer ein erniedrigter Anteil peripherer NK-Zellen nachweisen (Dosiou und Giudice 2005).

Uterine NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle während der Trophoblasteninvasion und der Ausbildung und Entwicklung des plazentaren Gefäßsystems (Moffett-King 2002). Sie haben eine geringe zytotoxische Aktivität, es werden ihnen eher regulierende Eigenschaften zugesprochen.

Eine Messung vitaler uteriner NK-Zellen im Verlauf einer menschlichen Schwangerschaft ist mit heutigen Methoden nicht möglich, diese können nur nach der Geburt oder in Abortmaterial analysiert werden. In dieser vorliegenden Studie wurden daher die NK-Zellen des peripheren Blutes während der Schwangerschaft untersucht.

Im peripheren Blut herrschen $CD16^+CD56^+$-NK-Zellen vor, die auf Grund erhöhter IFNγ-Produktion dem Th1-Zytokinprofil zugerechnet werden (Moffett-King 2002). Während einer Schwangerschaft verringert sich neben dem prozentualen Anteil der NK-Zellen auch die IFNγ-Produktion (Veenstra van Nieuwenhoven *et al.* 2003, 2008).

Dass sich in der vorliegenden Studie die Anzahl dieser zytotoxischen NK-Zellen und der Gesamtzahl der NK-Zellen zwischen der 14. und der 24. SSW verringert, unterstützt das Modell einer Th2-gerichteten Anpassung des maternalen Immunsystems an eine Schwangerschaft.

Untersuchungen der Leukozytensubpopulationen ergaben einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhten $CD3^+$T-Zellen in der 24. SSW und einem erniedrigtem Geburtsgewicht ($p = 0.015$) (s. Tabelle 11). Bartha und Comino-Delgado (1999) konnten in der 39. SSW keinen Unterschied in der Verteilung von T-Zellen im Vergleich von gesunden und IUGR-Schwangerschaften finden. Es ist allerdings bekannt, dass $CD3^+56^-$T-Zellen Vorläuferzellen der zytotoxischen NKT-Zellen sind (Kühnert *et al.* 1998, Lu und Negrin 1994). In dieser Studie konnte im Rahmen der physiologischen Schwangerschaft ein signifikanter Rückgang der $CD3^+$T-Zellen verzeichnet werden, der als schwangerschaftsprotektiv gewertet werden kann. Zusätzlich zu einer Veränderung der Populationsgröße ändern T-Lymphozyten während der Schwangerschaft auch ihr Verhalten bezüglich der Produktion von Zytokinen. Das Gleichgewicht der Zytokinproduktion wird zugunsten eines Th2-gerichteten Profils verschoben und könnte so zur Toleranz des Fetus durch das mütterliche Immunsystem beitragen (Veenstra van Nieuwenhoven *et al.* 2008).

Nach den hier erhobenen Daten scheinen erhöhte $CD3^+$-Spiegel im peripheren Blut mit bisher noch unbekannten Mechanismen einen signifikanten negativen Einfluss auf die fetale Entwicklung gegen Ende des zweiten Trimenon zu haben. Möglicherweise kommt es durch erhöhte $CD3^+$-Spiegel zu einer konsekutiven Erhöhung zytotoxischer NKT-Zellen, wodurch das fetale Wachstum beeinträchtigt wird. Um dieses Effekt nachzuweisen, müssten zusätzlich die NKT-Populationen im dritten Trimenon untersucht werden.

Überraschenderweise zeigen die Ergebnisse, dass $CD14^+CD16^{dim}$ neutrophile Granulozyten in signifikantem positiven Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht stehen. Dies bedeutet, dass nach den Berechnungen ein höheres Geburtsgewicht mit einer erhöhten Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der 24. SSW einhergeht ($p = 0.049$). Wie Monozyten gehören die Granulozyten dem angeborenen Immunsystem an, das vornehmlich die Aufgabe der unspezifischen Erregerabwehr hat.
Sacks *et al.* (1999) konnten zeigen, dass während der humanen Schwangerschaft eine Aktivierung von Monozyten und Granulozyten stattfindet. Der Aktivierungsgrad wurde in dieser Studie anhand von reaktiven Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid gemessen. Nicht schwangere Frauen zeigten eine signifikant niedrigere Aktivität dieser Zellen. Interessanterweise zeigten Vergleichsgruppen mit präeklamptischen Schwangerschaften und septischen Patientinnen ebenfalls eine Aktivierung dieser Zellen, allerdings in einer stärkeren Ausprägung (Sacks *et al.* 1999). Auch Kühnert *et al.* konnten einen signifikanten Granulozytenanstieg im Rahmen von physiologischen Schwangerschaften feststellen. Die höchsten Konzentrationen wurden dabei zwischen der 24. und der 35. SSW gemessen Kühnert *et al.* 1998).
Veenstra van Nieuwenhoven *et al.* (2003) führen mögliche Mechanismen an, durch die eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems induziert werden kann: Schwangerschaftshormone wie Progesteron oder Östradiol könnten die Aktivität von Granulozyten und Monozyten beeinflussen. Die Datenlage zu dieser Theorie ist bisher noch gering, wobei Progesteron und Östradiol eine monozytäre Zytokinproduktion zu begünstigen scheinen.
Ebenfalls denkbar ist eine Aktivierung der Granulozyten und Monozyten während der Zellpassage durch die Plazenta.
Ein weiterer möglicher Mechanismus könnte darin bestehen, dass Zellen oder Zellfragmente des Trophoblasten permanent in die maternale Blutzirkulation abgegeben werden, wodurch Granulozyten und Monozyten direkt aktiviert werden (Veenstra van Nieuwenhoven *et al.* 2003).

In welcher Weise diese Aktivierung der angeborenen Immunabwehr auf das Ergebnis der Geburt, im Speziellen auf das Geburtsgewicht Einfluss nimmt, ist bisher noch wenig untersucht. Denkbar sind Mechanismen, welche die Trophoblasteninvasion und die Anpassung der Spiralarterien unterstützen

und somit zu einer verbesserten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Feten beitragen. In der hier vorliegenden Studie wurde hauptsächlich die Verteilung der unterschiedlichen Zellpopulationen ermittelt. Der reine prozentuale Anteil an einzelnen Zellpopulationen ist jedoch nicht gleichbedeutend mit dem Aktivitätsgrad dieser Zellen, hierfür müssten spezifische Aktivitätsmarker oder die Zytokinproduktion nach Zellstimulation gemessen werden.

Ob ein hoher Anteil von Granulozyten in der 24. SSW tatsächlich als Prädiktor für ein hohes Geburtsgewicht herangezogen werden kann, sollte in weiterführenden Studien mit mehr Studienteilnehmerinnen überprüft werden.

4.2 Klinische Bedeutung der hormonellen Anpassung während der 14. und 24. Schwangerschaftswoche

Ein signifikanter Anstieg der hier untersuchten Hormone Progesteron, 17-β-Östradiol und Prolaktin ist typischerweise im Verlauf einer Schwangerschaft vorzufinden (Freemark 2010). Dies wurde auch in der vorliegenden Studie für die Zeit zwischen der 14. und der 24. SSW ermittelt.

Ein Zusammenhang zwischen den ermittelten Hormonkonzentrationen und dem Geburtsgewicht konnte für keines der Hormone gezeigt werden.

Von einem ähnlichen Ergebnis berichten Mucci *et al.* (2003) in einer prospektiven Geburtenstudie an kaukasischen Frauen. Die Wissenschaftler untersuchten peripheres Blut hinsichtlich der Hormonkonzentrationen von Progesteron, 17-β-Östradiol (E2), Prolaktin und weiteren Hormonen während der 16. und der 27. SSW. Wie in der hier vorliegenden Studie konnte keine signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration eines der drei Hormone und dem Geburtsgewicht oder anderen Parametern wie dem plazentaren Gewicht oder der kindlichen Körperlänge bei Geburt nachgewiesen werden (Mucci *et al.* 2003).

Die Beurteilung der Hormonwerte in der vorliegenden Studie erfolgte ohne Berücksichtigung der zirkadianen Rhythmik, da eine Blutentnahme immer zur gleichen Uhrzeit aus organisatorischen Gründen nicht durchführbar war.

Aus den Berechnungen dieser Studie lässt sich schließen, dass unter den gegebenen Bedingungen weder die Serumkonzentrationen von Progesteron, Östradiol oder Prolaktin in der 14. oder 24. SSW als Indikator für die Risikoberechnung eines erniedrigten Geburtsgewichtes geeignet sind. Das Ergebnis von Mucci konnte damit bestätigt werden.

4.3 Klinische Bedeutung dopplersonographischer Untersuchungen während der 24. Schwangerschaftswoche

Die Dopplersonographie der uterinen Arterien und der Nabelschnurarterien ist ein wichtiges Hilfsmittel, um während der Schwangerschaft auf nicht invasive Weise einen Status der Blutversorgung der Plazenta und des Feten zu erheben. Bis zur 24. SSW ist der histologische Umbau und Adaptationsvorgang der Spiralarterien vollzogen. Physiologischerweise steigt der Blutfluss zur Plazenta stetig an, während die Widerstände der Spiralarterien abnehmen (Stampalija *et al.* 2010). Dieser verringerte Widerstand spiegelt sich in einer erleichterten Blutzufuhr durch die Aa. Uterinae in Richtung Uterus wider. Ein frühdiastolisches Notching, das in der 24. SSW persistiert, ist mit Pathologien wie Präeklampsie und IUGR assoziiert (Harrington *et al.* 1996, Cnossen *et al*. 2008). In der hier vorliegenden Studie wurde zum Zeitpunkt der 24. SSW bei keiner Studienteilnehmerin ein Notching in der Darstellung der Dopplerflusskurven festgestellt. Die Widerstandsindizes PI und RI der uterinen Arterien wiesen keine Differenzen im Mittelwert bezüglich der untersuchten Körperseite (links oder rechts) auf. Auch traten im Verlauf der Studie bei keiner Teilnehmerin schwangerschaftsassoziierte Komplikationen wie Präeklampsie oder eine intrauterine Wachstumsrestriktion auf.

Die Ergebnisse der Regressionsanalysen zeigen, dass die untersuchten Widerstandindizes der Arteriae uterinae in der 24. SSW keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht aufweisen.

Es fand sich jedoch ein inverser signifikanter Zusammenhang zwischen dem PI der Umbilikalarterie ($p = 0.019$), und auch der RI lässt einen Trend in dieselbe Richtung erkennen, ohne jedoch signifikant zu werden ($p = 0.074$). Dies bedeutet, dass niedrige Widerstände in der Arteria umbilicalis mit einem höheren Geburtsgewicht einhergehen. Niedrige Widerstände sind das Zeichen eines uneingeschränkten fetoplazentaren Blutflusses, während hohe Widerstände auf Veränderungen im plazentaren Gefäßbett mit verringerter Durchblutung schließen lassen (Graf *et al*. 2012). Es lässt sich somit festhalten, dass umbilikale Widerstandsparameter, welche in der 24. SSW der physiologischen Schwangerschaft erfasst werden, eine prädiktive Bedeutung für das kindliche Geburtsgewicht haben. Für die klinische Anwendung ist es bedeutsam, ob die therapeutischen Maßnahmen, welche nachfolgend auf eine Screeninguntersuchung folgen, von Vorteil für die perinatale Gesundheit sind.

Die Autoren Stampalija *et al.* (2010) und Alfirevic *et al.* (2010a, 2010b) analysierten eine große Anzahl an Studien bezüglich des Einsatzes von dopplersonographischen Untersuchungen in der Schwangerschaft und deren Einfluss auf die perinatale Kindesgesundheit. Die fetale perinatale Gesundheit schloss unter anderem die intrauterine Wachstumsrestriktion sowie das Geburtsgewicht mit ein. Die untersuchten Schwangeren wurden in den meisten Studien in zwei Risikogruppen eingeteilt, entwe-

der Hochrisiko-Schwangerschaften (Alfirevic *et al.* 2010a) oder Schwangerschaften mit erniedrigtem Risiko (Alfirevic *et al.* 2010b). Der Hochrisikogruppe wurden Schwangere zugerechnet, die körperliche Voraussetzungen mitbrachten, welche eher mit einer erhöhten perinatalen Mortalität einhergehen. Dazu gehörten Frauen mit Diabetes, chronischer Hypertonie oder Präeklampsie, Herz- und Nierenerkrankungen sowie Thrombophilie (Alfirevic *et al.* 2010a). Das Ergebnis zeigt, dass eine Verbesserung der maternalen sowie der fetalen perinatalen Gesundheit durch eine im zweiten Trimenon durchgeführte dopplersonographische Untersuchung der uterinen Gefäße (Stampalija *et al.* 2010) und der Umbilikalarterie nur in der Gruppe der Hochrisikoschwangerschaften zu erkennen ist. Diese Verbesserung ist hierbei bedingt durch die aufgrund von pathologischen Doppler-Ergebnissen durchgeführte geburtshilfliche Therapie, beispielsweise durch die Gabe von niedrig dosierter Acetylsalicylsäure (ASS). Unter den Schwangeren, die der Gruppe mit erniedrigtem Risiko angehören, zeigte sich keine Veränderung der perinatalen Komplikationsrate nach durchgeführter dopplersonographischer Untersuchung und konsekutiver Behandlung im Vergleich zu Frauen, bei denen keine Ultraschalldiagnostik durchgeführt wurde.

Es ist allerdings laut einer aktuellen Analyse von Roberge *et al.* (2013) von Bedeutung, zu welchem Zeitpunkt ein therapeutisches Verabreichen von Acetylsalicylsäure erfolgt. Eine Verbesserung der fetalen Gesundheit wird demnach vor allem bei einer ASS-Gabe noch vor Beendigung der plazentaren Gefäßmodellierung statt, wobei hier die Zeit vor der 16. SSW als optimales Zeitfenster beschrieben wird.

4.4 Reflektion der Methodik und der Ergebnisse

Die Mechanismen zu verstehen, welche sich in einem so komplexen Zustand wie der Schwangerschaft zwischen Mutter und Kind abspielen, ist das Ziel vieler Forschungsvorhaben. In humanen Studien wird eine Limitierung dadurch erreicht, dass es mit heutigen Untersuchungsmethoden nicht möglich ist, vitale Zellpopulationen direkt an der feto-maternalen Übergangszone zu untersuchen.

Es kann jedoch auch durch periphere Zellen eine Vielzahl an Informationen gewonnen werden, die Auskunft über den maternalen Adaptationsprozess während der Schwangerschaft geben. Diese Studie gibt einen Überblick über die Anpassung verschiedenster Zellpopulationen in der 14. und der 24. SSW.

Die Anzahl der miteinander verglichenen Probandinnen ist hinsichtlich der Zellanalyse nicht immer gleich. Dies hat zum Teil labortechnische Gründe, zum Teil wurden auch einzelne Werte aus den Regressionsanalysen ausgeschlossen, wenn es sich um einzelne statistische Ausreißer handelte.

Aufgrund der verhältnismäßig geringen Anzahl an Probandinnen (n=44) wurde jedoch darauf geachtet, dass immer nur die notwendige Anzahl an Patientinnen ausgeschlossen wurde. In den meisten Analysen waren die Variablen jedoch normalverteilt.

Das Gestationsalter bei Geburt sowie der maternale BMI wurden aufgrund der deutlichen Beeinflussung des Geburtsgewichtes in die Berechnungen mit einbezogen. Da beispielsweise die Raucherinnen (n=2) und die Schwangere mit verfrühter Geburt vor der 37. SSW (n=1) zu kleine Gruppierungen darstellten, um als Einflussgrößen oder eigene Gruppen in die Berechnungen einbezogen zu werden, wurden die betreffenden Probanden aus der Studie ausgeschlossen.
Bei der Hormonmessung konnte die zirkadiane Rhythmik aus organisatorischen Gründen nicht eingehalten werden. Auch neuroendokrine Mechanismen wurden in der Studie nicht untersucht. Inwiefern sich dies auf die Konzentration der jeweiligen Hormone während der Schwangerschaft auswirkt, ist ein sehr komplexes Themengebiet, welches hier nicht berücksichtigt werden konnte.

Insgesamt scheint es aufgrund der relativ kleinen Zahl der Studienpopulation sinnvoll, die Ergebnisse anhand einer größeren Fallzahl zu überprüfen. Es wäre dann auch sehr interessant zu untersuchen, ob zwischen den einzelnen Variablengebieten wie Immunzellen, Hormonen und Durchblutung Interaktionskreisläufe vorhanden sind. Kausale Zusammenhänge konnten in der vorliegenden Studie wegen der wenigen Studienteilnehmerinnen nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Studie gibt einen Einblick in die Adaptationsvorgänge des peripheren zellulären Immunsystems sowie die hormonelle Anpassung gesunder schwangerer Frauen an die Schwangerschaft.
Es konnten signifikante Abnahmen der Konzentrationen von Lymphozyten, $CD3^+$-T-Zellen, NK-Zellen und deren Subpopulation zytotoxische NK-Zellen, sowie die Zunahme von $CD4^+$-Leukozyten zwischen der 14. und der 24. SSW beobachtet werden. Wie zu erwarten, zeigten auch die analysierten Hormone Progesteron, Östradiol und Prolaktin einen deutlichen Anstieg in diesem Zeitraum.
Ein signifikanter Zusammenhang mit dem kindlichen Geburtsgewicht konnte anhand der durchgeführten Regressionsanalysen in der 14. SSW für die $CD8^+$-Subpopulationen Effector Memory 1 (EM1) und Effector Memory 2 (EM2) gefunden werden, hierbei ist der Zusammenhang mit EM1-Zellen invers und mit den EM2- Zellen positiv.
In der 24. SSW zeigten ebenfalls EM1, sowie $CD3^+$ T-Zellen und neutrophile Granulozyten und der sonographisch gemessene Widerstandsindex PI einen signifikanten inversen Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht. Die weiteren untersuchten Zellpopulationen und Hormone sind in dieser Untersuchung nicht signifikant mit dem Geburtsgewicht assoziiert.
Somit lässt sich festhalten, dass in dieser Studie Parameter identifiziert werden konnten, die schon frühzeitig in der Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko für ein erniedrigtes Geburtsgewicht erkennen lassen. Um eine Empfehlung für die Erfassung der genannten Parameter im klinischen Alltag ausspre-

chen zu können, sollten die ermittelten Ergebnisse in einer größeren Studie erneut untersucht und verifiziert werden. Die sonographische Diagnostik der uterinen Arterien und der Umbilikalgefäße sind bereits jetzt gängige Methoden im klinischen Alltag und die Erfassung der umbilikalen Widerstandsparameter in der 24. SSW hat einen prädiktiven Wert für das kindliche Geburtsgewicht. Da die Anpassung und der Umbau der plazentaren Gefäße mit der 24. SSW weitestgehend abgeschlossen sind, wären Untersuchungen zu früheren Zeitpunkten der Schwangerschaft sehr interessant, zumal zu diesem Zeitpunkt therapeutisch, beispielsweise durch die Gabe von niedrig dosierter Acetylsalicylsäure, eingegriffen werden kann. Diese Maßnahme scheint insbesondere vor der 16. SSW einen therapeutischen Effekt auf die perinatale Gesundheit und das Geburtsgewicht zu haben (Roberge *et al.* 2013).

Abschließend sollte festgehalten werden, dass es sich bei der in dieser Studie untersuchten Population um gesunde schwangere Frauen handelt, bei denen kein komplizierter Schwangerschaftsverlauf anzunehmen war. Es ist daher abzuwägen, welcher Nutzen für die Frauen und Kinder durch aufwändige diagnostische Maßnahmen zu erwarten ist. Es ist anzunehmen, dass wenn sich im Rahmen von Bluttests oder Ultraschalluntersuchungen auffällige Befunde ergeben, dies für die an sich gesunde Schwangere mit einer psychischen Verunsicherung und Beunruhigung verbunden ist, die durch verstärkte Überwachung und eventuelle Krankenhausaufenthalte noch gesteigert werden kann. Diese Stressbelastung könnte wiederum Auswirkungen auf immunologische und hormonelle Stoffwechselvorgänge haben.

Eine Überprüfung der vorliegenden Ergebnisse in einem größeren Studienkollektiv wird demnach empfohlen.

5. Zusammenfassung

Ein erniedrigtes Geburtsgewicht ist mit einer erhöhten perinatalen Morbidität, sowie dem Risiko für metabolische, allergische und psychiatrische Erkrankungen im späteren Leben eines Menschen assoziiert. In der vorliegenden Studie wurden maternale Anpassungsmechanismen während der Schwangerschaft zu den Zeitpunkten der 14. und der 24. SSW untersucht und es wurde analysiert, anhand welcher Parameter sich ein Risiko für ein erniedrigtes Geburtsgewicht berechnen lässt.

Im Rahmen einer prospektiven Studie an 44 gesunden schwangeren Frauen erfolgten periphere venöse Blutentnahmen in der 14. und der 24. SSW, sowie eine sonographische Erfassung fetaler Körpermaße und eine dopplersonographische Untersuchung der Aa. unterinae und der A. umbilicalis in der 24. SSW. Im Blut wurde eine Vielzahl an $CD4^+$-, $CD8^+$-Zellpopulationen und Leukozytenpopulationen bestimmt. Außerdem wurden die Konzentrationen der Hormone Progesteron, Östradiol und Prolaktin im maternalen Serum analysiert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen deutliche Abnahmen der Konzentrationen von Lymphozyten, $CD3^+$ T-Zellen, zytotoxischen sowie gesamt-NK-Zellen sowie eine Zunahme der $CD4^+$ Leukozyten und der Hormone Progesteron, Östradiol und Prolaktin zwischen der 14. und der 24. SSW. Diese Entwicklungen sprechen für eine Anpassung des peripheren maternalen Immunsystems an die Schwangerschaft in Richtung eines schwangerschaftsprotektiven Zytokinmilieus. Im Zusammenhang mit einem erhöhten Geburtsgewicht zeigten ließen sich bereits in der 14. SSW erhöhte Effector Memory 2 Zellen (EM2), sowie in der 24. SSW erhöhte neutrophile Granulozyten nachweisen. Einen signifikanten inversen Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht zeigten in der 14. SSW die $CD8^+$ Effector Memory 1 Zellen (EM1) sowie in der 24. SSW die $CD3^+$ T-Zellen. Auch zeigen die Ergebnisse einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhten Widerständen der Umbilikalarterie in der 24. SSW und einem in der Folge erniedrigtem Geburtsgewicht.

In der vorliegenden Studie konnten somit immunologische und hormonelle Anpassungsmechanismen gesunder Schwangerer nachgewiesen werden. Außerdem wurden Parameter identifiziert, mit deren Hilfe sich Risiken für ein erniedrigtes Geburtsgewicht bereits in der 14. Und 24. SSW erkennen lassen. Bevor diese Parameter jedoch im klinischen Alltag Anwendung finden, sollten die Erkenntnisse dieser Arbeit in einer größeren Studienpopulation verifiziert werden.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
A.	Arteria
Aa.	Arteriae (plural)
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
B	bone marrow
BD	Becton Dickinson
BMI	Body-Mass-Index
BPD	biparietaler Durchmesser
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	effector Memory
et al.	et alii
EVT	extravillöser Trophoblast
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forwardscatter
g	Beschleunigung
GE	General Electric
hCG	humanes Chroriongonadotropin
HLA	human leukocyte Antigen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IUGR	intrauterine growth restriction
KIR	killer cell immunoglobulin-like receptor
MHC	major histocompatibility complex
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
mRNA	messenger ribonucleic acid
n	Anzahl der untersuchten Personen
ng	Nanogramm

NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NKT	natürliche Killer T-Zellen
P	relevantes Signifikanzniveau
Pac Blue	Pacific Blue
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
PI	Pulsatilitätsindex
PIA	professional image archiving
PIBF	progesterone-induced blocking factor
PRINCE	Prenatal identification of children's health
Reg.	regulatorisch
RI	Resistenzindex
rpm	rounds per minute
SGA	small for gestational age
SSC	Sidescatter
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Thymus
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
uNK	uterine NK-Zelle
USA	United States of America
VEGF	vascular endothelial growth factor
Zyt.	zytotoxisch

TABELLEN-/ ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis

		Seite
1	Beschreibung der Studienpopulation	22
2	Materialien und Hersteller	23
3	Zusammensetzung der Antikörper mit den konjugierten Farbstoffen im jeweiligen Ansatz	24
4	Geburtsgewicht und Körperlänge der Neugeborenen, Gestationsalter bei Geburt	30
5	Sonographisch ermittelte fetale Maße in der 24. SSW	35
6	Einfluss von $CD4^+$ Zellen in der 14. SSW auf das Geburtsgewicht	37
7	Einfluss von $CD4^+$ Zellen in der 24. SSW auf das Geburtsgewicht	37
8	Einfluss von $CD8^+$ Zellen in der 14. SSW auf das Geburtsgewicht	38
9	Einfluss von $CD8^+$ Zellen in der 24. SSW auf das Geburtsgewicht	38
10	Einfluss von Leukozytenpopulationen in der 14. SSW auf das Geburtsgewicht	39
11	Einfluss von Leukozytenpopulationen in der 24. SSW auf das Geburtsgewicht	40
12	Einfluss von Hormonen in der 14. SSW auf das Geburtsgewicht	41
13	Einfluss von Hormonen in der 24. SSW auf das Geburtsgewicht	41
14	Zusammenhang sonographisch ermittelter fetaler Maße in der 24. SSW mit dem Geburtsgewicht	41
15	Zusammenhang sonographisch ermittelter Durchblutungsparameter in der 24. SSW mit dem Geburtsgewicht.	42

Abbildungsverzeichnis

		Seite
1	Schematische Darstellung: Erhaltungsmechanismen in der frühen Schwangerschaft (Norwitz *et al.* 2001)	8
2	Hormonelle und immunologische Anpassung während der physiologischen Schwangerschaft (modifiziert nach Patas *et al.* 2013)	12
3	Schematische Darstellung: Umbau der Spiralarterien und plazentare Blutversorgung (Moffett-King 2002).	17
4	Flusskurven der A. uterina in der 24. SSW	18
5	Ablauf der Studie	20

6	Auswahl der Studienteilnehmerinnen	21
7	Darstellung von Lymphozyten und $CD4^+$ Zellpopulationen	26
8	Darstellung von CD8+ Zellen	27
9	Darstellung von weiteren Leukozytenpopulationen	27
10	Vergleich von $CD4^+$ Zellpopulationen in der 14. und 24. SSW	31
11	Vergleich von $CD8^+$ Zellpopulationen in der 14. und 24. SSW	32
12	Vergleich von weiteren Leukozytenpopulationen in der 14. und der 24. SSW	33
13	Vergleich von Hormonen in der 14. und 24. SSW	34
14	Dopplersonographische Darstellung von Flusskurven der A. umbilicalis und der Aa. uterinae in der 24. SSW	35
15	Vergleich der Widerstands- und Pulsatilitätsindices RI (A) und PI (B) in den Aa. uterinae und der A. umbilicalis in der 24. SSW	36

QUELLENVERZEICHNIS

Alfirevic Z, Stampalija T, Gyte GML (2010a) Fetal and umbilical doppler ultrasound in high-risk pregnancies (Review) *Cochrane Database Syst Rev;* (1): CD007529.

Alfirevic Z, Stampalija T, Gyte GML (2010b) Fetal and umbilical doppler ultrasound in normal pregnancy (Review). *Cochrane Database Syst Rev;* (8): CD001450.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG (2004) Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature Immunology;* 5 (3): 266-271.

Ananth CV, Balasubramanian B, Demissie K, Kinzler WL (2004) Small-for-gestational-age births in the United States an age-period-cohort analysis. *Epidemiology;* 15: 28-35.

Arck PC, Rücke M, Rose M, Szekeres-Bartho J, Douglas AJ, Pritsch M, Blois SM, Pincus MK, Bärenstrauch N, Dudenhausen JW, Nakamure K, Sheps S, Klapp BF (2008) Early risk factors for miscarriage: a prospective cohort study in pregnant women. *Reproductive BioMedicine Online;* 3031: 101-113.

Ball E, Bulmer JN, Ayis S, Lyall F, Robson SC (2006) Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. *J. Pathology*; 208: 535-542.

Barker DJP Osmond C, Simmonds SJ, Wield GA (1993) The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *BMJ;* 306: 422-426.

Bartha JL, Comino-Delgado R (1999) Lymphocyte subpopulations in intrauterine growth retardation in women with or without previous pregnancies. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology;* 82: 23-27.

Bernstein IM, Mongeon JA, Badger GJ, Solomon L, Heil SH, Higgins ST (2005) Maternal Smoking and its Association with Birth Weight. *Obstetrics and Gynecology;* 106 (5): 968-991.

Bour-Jordan H, Bluestone JA (2002) CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *Journal of Clinical Immunology;* 22 (1): 1-7.

Boyle MH, Miskovic V, Van Lieshout R, Duncan L, Schmidt LA, Hoult L, Paneth N, Saigal S (2011) Psychopathology in young adults born at extremely low birthweight. *Psychological Medicine;* 41: 1763-1774.

Bulmer JN, Innes BA, Levey J, Robson SC, Lash GE (2012) The role of vascular smooth muscle cell apoptosis and migration during uterine spiral artery remodeling in normal human pregnancy. *FASEB Journal*; 26 (7): 2975-2985.

Canellada A, Blois S, Gentile T, Margni RA (2002) In vitro modulation of protective antibody responses by estrogen, progesterone and interleukin-6. *Am J Reprod Immunol;* 48: 333-343.

Canellada A, Alvarez I, Berod L, Gentile TJ (2008) Estrogen and progesterone regulate the IL-6 signal transduction pathway in antibosy secreting cells. *Steroid Biochem Mol Biol;* 111 (3-5): 255-261

Castilla JA, Rueda R, Vargas ML, Gonzales-Gomez F, Garcia-Olivares E (1989) Decreased levels of circulating CD4+ T lymphocytes during normal human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology;* 15: 103-111.

Centers for Disease Control and Prevention. Infant mortality and low birth weight among black and white infants - United States 1980-2000. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51: 589-59.

Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, Petraglia F (2009) Inflammation and Pregnancy. *Reproductive Sciences*; 16 (2): 206-215.

Check JH, Szekeres-Bartho J, Nazari P, Katz Y, Check ML (2001) A corpus luteum is not a prerequisite for the expression of progesterone induced blocking factor by T-lymphocytes a week after implantation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics;* 18 (11): 603-607.

Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BWJ, v.d. Post JAM, Coomarasamy A, Zwindermann AH, Robson SC, Bindels PJE, Kleijnen J, Khan KS (2008). Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systemic review and bivariable meta-analysis. *Canadian Medical Association Journal;* 178 (6): 701-711.

Cogswell ME, Yip R (1995) The Influence of Fetal and Maternal Factors on the Distribution of Birthweight. *Seminars in Perinatology;* 19 (3): 222-240.

Csapo AI, Pulkkinen M (1978) Indispensability of the human corpus luteum in the maintenance of early pregnancy luteectomy evidence. *Obstetrical and Gynecological Survey;* 33 (2): 69-81.

Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D, Ascherio AL, Stampfer MJ (1996) Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. *Circulation*; 94: 3246–3250.

Deanesly R (1973) Termination of early pregnancy in rats after ovariectomy is due to immediate collapse of the progesterone-dependent decidua. *Journal of Reproduction and Fertility;* 35: 183-186.

Dolfi DV, Duttagupta PA, Boesteanu AC, Mueller YM, Oliai CH, Borowski AB, Katsikis PD (2011) Dendritic Cells and CD28 costimulation are required to sustain virus-specific CD8+ T cell responses during the effector phase in vivo. *The Journal of Immunology;* 186 (8): 4599-4608.

Doria A, Iaccarino L, Sarzi-Puttini P, Ghirardello A, Zampieri S, Arienti S, Cutolo M, Todesco S (2006) Estrogens in Pregnancy and Systemic Lupus Erythematosus. *Ann NY Acad Sci;* 1069: 247-256.

Dosiou C, Giudice LC (2005) Natural Killer Cells in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Loss: Endocrine and Immunologic Perspectives. *Endocrine Reviews;* 26 (1): 44-62.

Elsenbruch S, Benson S, Rücke M, Rose M, Dudenhausen J, Pincus-Knackstedt MK, Klapp BF, Arck PC (2007) Social support during pregnancy: effects on maternal depressive symptoms, smoking and pregnancy outcome. *Human Reproduction*; 22 (3): 869-877

Frankel S, Elwood P, Sweetnam P, Yarnell J, Smith GD (1996) Birthweight, body-mass index in middle age, and incident coronary heart disease. *Lancet*; 348: 1478–80

Freemark M (2010) Placental hormones and the control of fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab;* 95 (5): 2054-2057.

Friedlander Y, Paltiel O, Deutsch L, Knaanie A, Massalha S, Tiram E, Harlap S (2003) Birthweight and relationship with infant, child and adult mortality in the Jerusalem perinatal study. *Paediatric and Perinatal Epidemiology;* 17: 398-406.

Goldenberg RL, Culhane JF (2007) Low birth weight in the United States. *Am J Clin Nutr;* 85 (2): 5845-5905.

Golightly EM, Jabbour HN, Norman JE (2011) Endocrine immune interactions in human parturition. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 335: 52-59.

Graf AH (2012): Morphologie, Physiologie und Pathologie des maternoplazentaren,fetoplazentaren und fetalen Kreislaufs. In: Steiner H, Schneider KTM (Hrsg.):Dopplersonographie in Geburtshilfe und Gynäk
ologie. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York : 9-10

Hales CN, Barker DJP (2001) The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin;* 60: 5-20

Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, Mandelboim O (2006) Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface*. Nat Med*; 12: 1065–1074.

Harrington K, Cooper D, Lees C, Hecher K, Campbell S (1996) Doppler ultrasound of the uterine arteries: the importance of bilateral notching in the prediction of pre-eclampsia, placental abruption or delivery of a small-for-gestational-age baby. *Ultrasound Obstet Gynecol;* 7: 182-188.

Hartwig IRV, Pincus MK, Diemert A, Hecher K, Arck PC (2013) Sex-specific effect of first-trimester maternal progesterone on birthweight. *Human Reproduction*; 28 (1): 77–86.

Hüneke B, Ude C (2002) Dopplersonographische Blutflussmessungen in uterinen und fetalen arteriellen Gefäßen als Screeninguntersuchung in der 32.-34. Schwangerschaftswoche. *Z Geburtsh Neonatol;* 206: 57-64.

Huxley R, Owen CG, Whincup PH, Derek GC, Rich-Edwards J, Smith GD, Collins R (2007) Is birth weight a risk factor for ischemic heart disease in later life? *Am J Clin Nutr,* 85 (5): 1244-1250.

Imakawa K, Chang KT, Christenson RK (2004) Pre-implantation conceptus and maternal uterine communications: molecular events leading to successful implantation. *Journal of Reproduction and Development;* 50 (2): 155-169.

Imran SA, Ur E, Clarke DB (2007) Managing prolactin-secreting adenomas during pregnancy. *Canadian Family Physician;* 53: 653-658.

Joachim RA, Hildebrandt M, Oder J, Klapp BF, Arck PC (2001) Murine stress-triggered abortion is mediated by increase of CD8+ TNFα+ decidual cells via substance P. *American Journal of Reproductive Immunology;* 45: 303-309.

Johansson M, Bromfield JJ, Jasper MJ, Robertson SA (2004) Semen activates the female immune response during early pregnancy in mice. *Immunology*; 112: 290-300.

Johnstone FD, Thong KJ, Bird AG, Whitelaw J (1994) Lymphocyte subpopulations in early human pregnancy. *Obstet Gynecol*;83 (6): 941–6.

Khong TY, de Wolf F, Robertson WB, Brosens I (1986) Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology;* 93 (10): 1049-1059.

Kühnert M, Strohmeier R, Stegmüller M, Halberstadt E (1998) Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology;* 76: 147-151.

Kopcow HD, Allan DSJ, Chen X, Rybalov B, Andzelm MM, Ge B, Strominger JL (2005) Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *PNAS;* 102 (43): 15563-15568.

Kopcow HD, Karumanchi SA (2007) Angiogenic Factors and Natural Killer (NK) Cells in the Pathogenesis of Preeclampsia. *J Reprod Immunol;* 76 (1-2): 23-29.

Kumpel BM, Monoussaka MS (2012) Placental immunology and maternal alloimmune responses. *Vox Sanguinis;* 102 (1): 2-12.

Kwak JY, Beaman KD, Gilman-Sachs A, Riuz JE, Schewitz D, Beer AE (1995) Up-regulated expression of CD56+, CD56+/CD16+, and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol;* 34 (2): 93-99.

Lash GE; Robson SC; Bulmer JN (2010) Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta;* 31: S87-S92.

Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J, Guillet JG, Carosella ED, Rouas-Freiss N (1999) HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* 11 (8): 1351-1356.

Leidenberger F, Strowitzki T, Ortman O (2009) Klinische Endokrinologie für Frauenärzte. *Springer Berlin Heidelberg;* 4. Auflage

Leon DA, Lithell HO Vågerö D, Koupilová I, Mohsen R, Berglund L, Lithell UB, McKeigue PM (1998) Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15000 Swedish men and women born 1915-29. *BMJ*; 317: 241–245

Lisonkova S, Janssen PA, Sheps SB, Lee SK, Dahlgren L (2010) The effect of maternal age on adverse birth outcomes: does parity matter? *JOGC;* 32 (6), 541-548.

Lissauer DM (2012) The biological and clinical significance of the maternal immune response to fetal antigens. Seite 24

Liu F, Guo J, Tian T, Wang H, Dong F, Huang H, Dong M (2011) Placental trophoblasts shifted Th1/Th2 balance toward Th2 and inhibited Th17 immunity at fetomaternal interface. *APMIS*; 119: 597-604.

Lu PH, Negrin RS (1994) A novel population of expanded human CD3 CD56 cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol*; 153 (4): 1687-96.

Luppi P, Haluszczak C, Trucco M, Deloia JA (2002) Normal Pregnancy is Associated with Peripheral Leukocyte Activation. *AJRI*; 47: 72-81.

Makrydimas G, Plachouras N, Higueras MT, Thilaganathan B, Nicolaides K (1994) Maternal peripheral blood lymphocyte subpopulations in normal and pathological pregnancies. *Fetal Diagn Ther;* 9: 371-378.

Manaster I, Mandelboim O (2010) The unique properties of uterine NK cells. *Am J Reprod Immunol*; 63: 434-444.

Medawar PB (1953) Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol;* 7: 320–338

Miko E, Halasz M, Jericevic-Mulac B, Wicherek L, Arck PC, Arató G, Skret Magierlo J, Rukavina D, Szekeres-Bartho J (2011) Progesterone-induced blocking factor (PIBF) and trophoblast invasiveness. *Journal of Reproductive Immunology;* 90: 50-57.

Moffett-King A (2002) Natural killer cells and pregnancy. *Nature Reviews Immunology;* 2: 656-663.

Mucci LA, Lagiou P, Tamimi RM, Hsieh CC, Adami HO, Trichopoulos D (2003) Pregnancy estriol, Östradiol, progesterone and prolactin in relation to birth weight and other birth size variables (United States) *Cancer Causes Control;* 14: 311-318.

Munoz-Suano A., Hamilton AB, Betz AG (2011) Gimme shelter: the immune system during pregnancy. Immunological Reviews, 241: 20–38.

Nepomnyaschy L, Reichman NE (2006) Low birthweight and asthma among young urban children. *Am J Public Health;* 96: 1604-1610.

Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ (2001) Implantation and the survival of early pregnancy. *The New England Journal of Medicine*; 345 (19): 1400-1408.

Osmond C, Barker DJ (2000) Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect*.; 108 (3): 545–553.

Orsi NM, Tribe RM (2008) Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J Neuroendocrinol*; 20: 462-469.

Patas K, Engler JB, Friese MA, Gold SM (2013) Pregnancy and multiple sclerosis: feto-maternal immune cross talk and its implications for disease activity. *Journal of Reproductive Immunology;* 97 (1): 140-146.

Peyron R, Aubény E, Targosz V, Silvestre L, Renault M, Elkik F, Leclerc P, Ulmann A, Baulieu EE (1993) Early termination of pregnancy with Mifepristone (RU486) and the orally active prostaglandin Misoprostol. *The New England Journal of Medicine*; 328 (21): 1509-1513.

Phipps K, Barker DJP, Hales CN, Fall CHD, Osmond C, Clark PMS (1993) Fetal growth and impaired glucose tolerance in men and women. *Diabetologia*; 36: 225-228

Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parrochi P Manetti R et al. (1995) Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4-production and membrane CD30 Expression in established Th1 cell clones. *The Journal of Immunology;* 155: 128-133.

Piccinni MP, Romagnani S (1996) Regulation of fetal allograft survival by hormone-controlled Th1- and Th2-Type cytokines. *Immunologic Research*; 15:141-150.

Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, Rees A, Tiltman A, Vercruysse L, van Assche A (1991) Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *British Journal of Obstetrics and Gynecology;* 98: 648-655.

Raghupathy R (1997) Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today*; 18:478–82.

Raghupathy R, Al-Azemi M, Azizeh F (2012) Intrauterine growth restriction: Cytokine profiles of trophoblast antigen-stimulated maternal lymphocytes. *Clinical and Developmental Immunology;* Article ID 734865.

Rich KC, Siegel JN, Jennings C, Rydman RJ, Landay AL (1999) CD8+ lymphocytes and HIV infection: characterization of CD8+ subpopulations and CD8+ noncytotoxic antiviral activity. *AIDS Research and Human Retroviruses;* 15 (7): 665-670.

Rich-Edwards JW, Stampfer MJ, Manson JE, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC, Hennekens CH (1997) Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ*; 315: 396–400

Risnes KR, Vatten LJ, Baker JL, Jameson K, Sovio U, Kajantie E, Osler M, Morley R, Jokela M, Painter RC, Sundh V, Jacobsen GW, Eriksson JG, Sørensen TIA, Bracken MB (2011) Birthweight and mortality in adulthood: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*; 40:647–661

Roberge S, Nicolaides KH, Demers S, Villa P, Bujold E (2013) Prevention of perinatal death and adverse perinatal outcome using low-dose aspirin: a meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*;41 :491–499.

Robertson SA (2010). Immune regulation of conception and embryo implantation – all about quality control? *Journal of Reproductive Immunology*; 85: 51-57.

Roland MCP, Friis CM, Voldner N, Godang K, Bollerslev J, Haugen G, Henriksen T (2012) Fetal Growth versus Birthweight: The Role of Placenta versus Other Determinants. PLoS ONE 7(6): e39324.

Sacks G, Sargent I, Redman C (1999) An innate view of human pregnancy. *Immunology Today*; 20: 114-118.

Saito S, Shima T, Nakashima A, Shiozaki A, Ito M, Sasaki Y (2007) What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? *J Assist Reprod Genet*; 24: 379-386.

Saito S, Akitoshi N, Subaru MH, Shiozaki A (2008) The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunolog;y* 77: 14–22

Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M (2010) Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology;* 63: 601-610.

Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu EH, Fazekas de St Groth B, Nanan R (2009) Systemic Increase in the Ratio between Foxp3+ and IL-17-Producing CD4+ T Cells in Healthy Pregnancy but Not in Preeclampsia. *Journal of Immunology;* 183 (11): 7023-7030.

Schneider H, Husslein PW, Schneider KTM (2011) Die Geburtshilfe, 4. Aufl., Springer Berlin Heidelberg.

Skjaerven R, Gjessing HK, Bakketeig LS (2000) Birthweight by gestational age in Norway. *Acta Obstet Gynecol Scand;* 79: 440-449.

Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK, Jones RL (2009) Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am. J. Pathol*. 174, 1959–1971

Sohn C, Tercanli S, Holzgreve W (Hrsg.) (2003) Ultraschall in Gynäkologie und Geburtshilfe. *Georg Thieme Verlag.*

Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT (2004) Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology;* 112: 38-43.

Stampalija T, Gyte GML, Alfirevic Z (2010) Utero-placental Doppler ultrasound for improving pregnancy outcome. *Cochrane Database of Systematic Reviews;* Issue 9. Art. No. CD008363.

Straube S, Voigt M, Hesse V, Jährig K, Hallier E, Schmidt T, Wittwer-Backofen U (2010) Comparison of Anthropometric Characteristics of German-born Vs. Asian-born Mothers and their Neonates- an analysis of the German Perinatal Study (19th Communication). *Geburtsh Frauenheilk;* 70: 472-477.

Szekeres-Bartho J, Hadnagy J, Pasca AS (1985) The suppressive effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: unique progesterone sensitivity of pregnancy lymphocytes. *Journal of Reproductive Immunology;* 7:121-128.

Szekeres-Bartho J, Reznikoff-Etievant MF, Varga P, Pichon MF, Varga Z, Chaouat G (1989) Lymphocytic progesterone receptors in normal and pathological human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology;* 16: 239-247.

Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Par G, Polgar B, Palkovics T, Szereday L (2001) Progesterone as an immunomodulatory molecule. *International Immunopharmacology*; 1: 1037-1048.

Tallon DF, Corcoran DJ, O'Dwyer EM, Greally JF (1984) Circulating lymphocyte subpopulations in pregnancy: a longitudinal study. *J Immunol.;* 132 (4): 1784-1787.

Thellin O, Heinen E (2003) Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicology*; 185: 179-184.

Tilburgs T, Schonkeren D, Eikmans M, Nagtzaam NM, Datema G, Swings GM, Prins F, van Lith JM, van der Mast BJ, Roelen DL, Scherjon SA, Claas FH (2010) Human decidual tissue contains different CD8+ effector-memory T cells with unique properties. *The Journal of Immunology;* 185: 4470-4477.

Valdimarsson H, Mulholland C, Fridriksdottir V, Coleman DV (1983) A longitudinal study of leucocyte blood counts and lymphocyte responses in pregnancy: a marked early increase of monocyte-lymphocyte ratio. *Clin Exp Immunol;* 53: 437-443.

Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM (2003) The immunology of successful pregnancy. *Human Reproduction Update;* 4: 347-357.

Veenstra van Nieuwenhoven AL, Moes H, Heineman MJ, Santema J, Faas MM (2008) Cytokine production by monocytes, NK cells, and lymphocytes is different in preeclamptic patients as compared with normal pregnant women. *Hypertension in Pregnancy;* 27: 207-224.

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunology Today*; 14 (7): 353-356.

Zen M, Ghirardello A, Iaccarino L, Tonon M, Campana C, Arienti S, Rampudda M, Canova M, Doria A (2010) Hormones, immune response, and pregnancy in healthy women and SLE patients. *Swiss Med WKLY*; 140 (13-14): 187-201

Zoumakis E, Margioris AN, Stournaras C, Dermitzaki E, Angelakis E, Makrigiannakis A, Koumantakis E, Gravanis A (2000) Corticotrophin-releasing hormone (CRH) interacts with inflammatory prostaglandins and interleukins and affects the decidualization of human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod*; 6(4):344-51

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Frau Professor Dr. Petra Arck, die mir die Möglichkeit zur Mitarbeit an der PRINCE-Studie unter ihrer Leitung gab und mich bei der der Wahl der Thematik sowie der Ausarbeitung meiner Dissertation sehr unterstützte.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Isabel Hartwig M.Sc., die mir bei der Auswertung und Darstellung der Daten stets zur Seite stand und durch die ich den Umgang mit Auswertungsprogrammen erlernen konnte.

Bei Agnes Wieczorek möchte ich mich herzlich für die kompetente Anleitung und Einarbeitung in die Durchführung aller labortechnischen Methoden bedanken.

Ich danke außerdem Frau Dr. med. Anke Diemert und Frau Dr. med. Mirja Pagenkemper, die bei Fragen zu klinischen Daten, insbesondere der sonographischen Untersuchungsergebnisse, stets sehr hilfsbereite Ansprechpartnerinnen waren.

Gudula Hansen möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft bei allen Fragen rund um die Studienorganisation danken.

Meiner Familie und Oliver danke ich von Herzen für die uneingeschränkte Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....

Tabellarischer Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.