Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin

Prof. Dr. med. Kurt Hecher

Die Bedeutung der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in der Plazenta bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom

Dissertation

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

vorgelegt von:

Sarah Gumpert
aus Neuwied

Hamburg 2015

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.04.2016

Veröffentlicht mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Kurt Hecher

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Udo Schumacher

Inhaltsverzeichnis

1 Arbeitshypothese und Fragestellung ... 1
2 Einleitung ... 2
2.1 Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen ... 2
2.1.1 Definition ... 2
2.1.2 Einteilung ... 2
2.1.3 Präeklampsie ... 3
2.1.3.1 Definition der Präeklampsie ... 3
2.1.3.2 Epidemiologie der Präeklampsie ... 4
2.1.3.3 Einteilung der Präeklampsie ... 4
2.1.3.4 Risikofaktoren der Präeklampsie ... 4
2.1.3.5 Hypothesen zur Pathogenese der Präeklampsie ... 6
2.1.3.6 Klinik und Diagnostik der Präeklampsie ... 7
2.1.3.7 Therapie und Prognose der Präeklampsie ... 8
2.1.3.8 Früherkennung und Prävention der Präeklampsie ... 9
2.1.4 HELLP-Syndrom ... 11
2.1.4.1 Definition des HELLP-Syndroms ... 11
2.1.4.2 Epidemiologie des HELLP-Syndroms ... 11
2.1.4.4 Risikofaktoren des HELLP-Syndroms ... 12
2.1.4.3 Hypothesen zur Pathogenese des HELLP-Syndroms ... 12
2.1.4.4 Klinik und Diagnostik des HELLP-Syndroms ... 12
2.1.4.5 Therapie und Prognose des HELLP-Syndroms ... 14
2.2 Plazentainsuffizienz ... 15
2.2.1 Definition der Plazentainsuffizienz ... 15
2.2.2 Hypothesen zur Pathogenese der Plazentainsuffizienz ... 15
2.2.3 Klinik und Diagnostik der Plazentainsuffizienz ... 16
2.2.4 Therapie und Prognose der Plazentainsuffizienz ... 18
2.3 Tryptophanstoffwechsel ... 19
2.3.1 Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ... 19
2.3.2 Tryptophan ... 21
2.3.3 Die Funktion von IDO im humanen Immunsystem ... 21
2.3.4 IDO in hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen ... 22

3 Material und Methoden ... 24
3.1 Material ... 24
3.1.1 Das Studiendesign ... 24
3.1.2 Das Patientenkollektiv ... 24
3.1.3 Verwendete Materialien ... 26
3.1.3.1 Material zur Gewebefixierung und Weiterverarbeitung ... 26
3.1.3.2 Material für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ... 27
3.1.3.3 Material für die IDO-Immunhistochemie (IHC) ... 27
3.1.3.4 Material für die Vimentin- und Cytokeratin-7-IHC ... 28
3.1.3.5 Material für die Massenspektrometrie ... 31
3.2 Methoden ... 32
3.2.1 Verarbeitung des Plazentagewebes ... 32
3.2.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung ... 32
3.2.1.2 Immunhistochemie ... 33
3.2.1.2.1 Allgemein ... 33
3.2.1.2.2 Die ABC-Methode ... 34
3.2.1.2.3 Färbeverfahren für IDO ... 35
3.2.1.2.4 Färbeverfahren für Vimentin ... 37
3.2.1.2.5 Färbeverfahren für Cytokeratin-7 ... 39
3.2.1.2.6 Lichtmikroskopische Beurteilung ... 40
3.2.2 Verarbeitung des Blutserums ... 41
3.2.2.1 Tandem-Massenspektrometrie ... 41
3.2.2.1.1 Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie ... 41
3.2.2.1.2 Durchführung der Tandem-Massenspektrometrie ... 42
3.3 Statistische Auswertung ... 42

4 Ergebnisse ... 44
4.1 Kollektivbeschreibung ... 44
4.2 IDO im Plazentagewebe ... 50
4.2.1 Immunhistochemie ... 50
4.2.2 IDO als prädiktiver Marker ... 55
4.3 Tryptophanspiegel im Serum ... 60

5 Diskussion ... 64
5.1 IDO im Plazentagewebe ... 65
5.2 IDO und Präeklampsie ... 66
5.3 IDO und HELLP-Syndrom ... 67
5.4 IDO und Plazentainsuffizienz ... 68
5.5 Tryptophan als prädiktiver Marker ... 68
5.6 Klinische Relevanz der Ergebnisse ... 70
5.7 Limitation der Studie ... 71
5.7.1 Patientenauswahl ... 71
5.7.2 Probengewinnung ... 71

6 Zusammenfassung ... 73

7 Abkürzungsverzeichnis ... 74

8 Abbildungsverzeichnis ... 79

9 Tabellenverzeichnis ... 80

10 Literaturverzeichnis ... 81

11 Anhang ... 99
11.1 Ethikvotum ... 99
11.2 Aufklärung zur Studie ... 100
11.3 Aufklärung zum Datenschutz ... 102
11.4 Einverständniserklärung ... 104
11.5 Datenblatt ... 106

12 Danksagung ... 112

13 Lebenslauf ... 113

14 Eidesstattliche Versicherung ... 114

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den schwangerschaftsinduzierten hypertensiven Erkrankungen, deren Pathogenese noch nicht abschließend geklärt ist. Ein besonderes Augenmerk der Arbeit liegt auf der Präeklampsie und dem HELLP-Syndrom.

Die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist eines der zentralen Enzyme des Tryptophanstoffwechsels. Der Einfluss des Tryptophanstoffwechsels auf die Entstehung von oxidativen Stress und auf immunologische Reaktionen im Rahmen des feto-maternalen Zusammenspiels sind die Grundlage für die Hypothese, dass der Tryptophanstoffwechsel einen mögliche Rolle in der Entstehung von hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen spielt.

In der vorliegenden Studie wird die Expression von IDO in der Plazenta untersucht und dabei vor allem die Intensität und Lokalisation von IDO beschrieben.
In einem zweiten Schritt wird der Tryptophanspiegel im Serum der Patientinnen untersucht.

Die zentralen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit:

- Wie verhält sich die Expression von IDO in der Plazenta bei Präeklampsie und HELLP-Syndrom im Vergleich zu einer Schwangerschaft ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung?

- Ist der Tryptophanspiegel im maternalen Serum ein potentieller Marker zur Früherkennung einer Präeklampsie bzw. eines HELLP-Syndroms?

2 Einleitung

2.1 Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen

2.1.1 Definition

Ein arterieller Hypertonus ist die Grundlage für die Gruppe der schwangerschaftsbedingten hypertensiven Erkrankungen. Weltweit kommt es in 6-8% aller Schwangerschaften zu einem arteriellen Hypertonus (DGGG 2013, Lo 2013).
Der arterielle Hypertonus in der Schwangerschaft wird definiert als Bluthochdruck mit systolischen Werten ≥ 140mmHg und diastolischen Werten ≥ 90mmHg, in zwei Messungen innerhalb von mindestens 6 Stunden und maximal 7 Tagen (Brown et al. 2001, Turner 2010).
Eine Proteinurie in der Schwangerschaft liegt bei einer Proteinausscheidung von ≥300mg im 24-Stunden-Sammelurin, einem mindestens 2-fach-positivem (++) Proteinnachweis im Urinstix oder einer Protein-Kreatinin-Ratio >30mg/mmol im Spontanurin (DGGG 2013) vor.
Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Grenzwerte und Einteilungen richten sich nach der aktuellen Leitlinie der DGGG (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe) „Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen“ (DGGG 2013).

2.1.2 Einteilung

Man teilt die hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen in sechs Unterformen ein, die teilweise aufeinander aufbauen (Tabelle 1).
In dieser Arbeit wird ausschließlich auf die Präeklampsie und das HELLP-Syndrom eingegangen.

Form des Hypertonus	Definition
chronischer Hypertonus	- Eintritt der Hypertonie vor der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) - Persistenz der Hypertonie länger als 12 Wochen postpartum (pp) (Seely und Ecker 2011)
schwangerschaftsinduzierter Hypertonus (SIH)	- Eintritt der Hypertonie nach der 20. SSW - Persistenz bis max. 12 Wochen postpartum - keine Proteinurie
Präeklampsie	- neu aufgetretener Hypertonus nach der 20. SSW, Persistenz max. 12 Wochen postpartum - neu auftretende Proteinurie
Propfpräeklampsie	- chronischer Hypertonus - neu auftretende oder sich verschlechternde Proteinurie nach der 20. SSW
Eklampsie	- Präeklampsie - tonisch-klonische Krämpfe
HELLP-Syndrom	- Hämolyse - erhöhte Leberenzyme - Thrombozytopenie

Tabelle 1: Einteilung der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen. (Brown at al. 2011, DGGG 2013)

2.1.3 Präeklampsie

2.1.3.1 Definition der Präeklampsie

Die Präeklampsie wird definiert als ein arterieller Hypertonus (≥140/90mmHg) mit begleitender Proteinurie. Die Symptome treten nach der 20. SSW auf und normalisieren sich bis spätestens 12 Wochen postpartum.

2.1.3.2 Epidemiologie der Präeklampsie

Eine Präeklampsie tritt in 3-14% aller Schwangerschaften weltweit auf (Cunningham und Lindheimer 1992). Sie ist nach den thromboembolischen Ereignissen die zweithäufigste Ursache für die maternale Mortalität in den Industrieländern. Hier ist sie für 15-20% der mütterlichen Todesfälle verantwortlich (Lo 2013).

2.1.3.3 Einteilung der Präeklampsie

Man unterteilt die Präeklampsie zum einen nach dem Zeitpunkt ihres Auftretens. Dabei unterscheidet man die Early-Onset-Präeklampsie (Prävalenz von ca. 0,38%), die vor der 34. SSW auftritt, von der Late-Onset-Präeklampsie (Prävalenz von ca. 2,72%), die ab der 34. SSW beginnt (Lisonkova und Joseph 2011, Raymond und Peterson 2011).
Außerdem unterteilt man die Präeklampsie nach ihrem Schweregrad in eine milde und eine schwere Präeklampsie (Buchbinder et al. 2002, Cruz et al. 2012). Von einer schweren Präeklampsie spricht man, wenn mindestens eines der folgenden Zusatzsymptome vorliegt (DGGG 2013):

- ein arterieller Blutdruck von ≥160/100mmHg
- eine Nierenfunktionsstörung
- ein Lungenödem
- neurologische Auffälligkeiten
- eine fetale Wachstumsrestriktion (IUGR <5. Perzentile und/oder ein pathologischer Doppler in der A. umbilicalis)

2.1.3.4 Risikofaktoren der Präeklampsie

Risikofaktoren für das Auftreten einer Präeklampsie zeigen sich als chronisch/präkonzeptionell oder als schwangerschaftsassoziiert (Campell et al. 1985, Tubbergen et al. 1999, Skjaerven et al. 2002, Wang et al. 2002, Xiong et al. 2002, Nilsson et al. 2004, Duckitt and Harrington 2005, Stella et al. 2006).

Bei den chronisch/präkonzeptionellen Risikofaktoren unterscheidet man zwischen maternalen Grunderkrankungen und/oder Risikofaktoren, partnerbezogenen Risikofaktoren und exogenen Einflüssen (Tabelle 2).
Zu den schwangerschaftsassozierten Risiken (Dekker und Sibai 2001, Duckitt und Harrington 2005), die das Auftreten einer Präeklampsie begünstigen, gehören unter anderem die Mehrlingsgravidität oder der Gestationsdiabetes.

Art des Risikos	**Risikofaktoren**
maternale Risikofaktoren	- positive Familienanamnese - Nulliparität - Alter der Schwangeren > 40 Jahre - langes Schwangerschaftsintervall - Präeklampsie in der Anamnese (Das Gesamtwiederholungsrisiko beträgt 14,7%. Dieses variiert in Abhängigkeit von der SSW: Das Wiederholungsrisiko vor der 28. SSW beträgt 38,6%, nach der 37. SSW 12,9% (Mostello et al. 2008).) - Zugehörigkeit zu bestimmten ethnischen Gruppen - Schwangerschaft durch Eizellspende
maternale Grunderkrankungen	- Adipositas (Body Mass Index (BMI) > 30) - chronisch arterieller Hypertonus - vorbestehender Diabetes mellitus - Autoimmunerkrankungen (z.B. Lupus erythematodes) - vorbestehende Nephropathien - Thrombophilie (z.B. Anti-Phospholipid-Syndrom)
exogene Faktoren	- Nichtraucherinnen - psychosozialer Stress
partnerbezogene Faktoren	- zeitlich begrenzte Spermienexposition - heterologe Insemination - Beteiligung des Vaters an einer früheren Präeklampsie

Tabelle 2: Präkonzeptionelle und chronische Risikofaktoren für eine Präeklampsie. (Campell et al. 1985, Tubbergen et al. 1999, Skjaerven et al. 2002, Wang et al. 2002, Xiong et al. 2002, Nilsson et al. 2004, Duckitt und Harrington 2005, Stella et al. 2006, Mostello et al. 2008, DGGG 2013)

Außerdem bergen kindliche Fehlbildungen wie ein pathologischer Karyotyp (Trisomien oder Triploidien), der Hydrops fetalis oder eine Blasenmole ein erhöhtes Risiko (Riihsinghani et al. 1997, Dekker und Sibai 2001).

2.1.3.5 Hypothesen zur Pathogenese der Präeklampsie

Die Pathogenese der Präeklampsie ist bisher nicht abschließend geklärt. Es gibt verschiedene Hypothesen, wovon jedoch keine als die ursächliche anerkannt wurde. Vielmehr handelt es sich bei der Präeklampsie um ein multifaktoriell entstehendes Krankheitsbild (Redman und Sargent 2005, Schmidt und Kimming 2007). Im Folgenden werden die Hypothesen erläutert.

Gestörte Plazentation

In einer unauffällig verlaufenden Schwangerschaft kommt es zum sogenannten Remodelling der Spiralarterien. Dabei invadieren die extravillösen Trophoblastzellen, im Zuge der interstitiellen Invasion, das innere Drittel des Myometriums. Zeitgleich, im Rahmen der endovaskulären Invasion, ersetzen invasive Trophoblastzellen die Zellen der Tunika media und des Endothels der Spiralarterien. Es entstehen weitgestellte Gefäße mit niedrigen Flusswiderständen, die eine optimale Versorgung der Plazenta und damit des Feten ermöglichen (Robertson 1976, Zhou et al. 1997, Klockenbusch und Fischer 2005). Im Falle der Präeklampsie kommt es durch eine gestörte Invasion des extravillösen Trophoblasten zu einem fehlerhaften Remodelling mit konsekutiver Vasokonstriktion und damit zu einer Hypoperfusion der Plazenta (Brosens 1995, Schmidt und Kimming 2007).

Endotheliale Dysfunktion

Die endotheliale Dysfunktion im maternalen Gefäßsystem entwickelt sich auf dem Boden schon bestehender Schäden im Endothel (Levine et al. 2006) oder aufgrund einer aus der gestörten Plazentation resultierenden Ischämie. Die entstehende Hypoxie führt zu einer Freisetzung endothelschädigender Zytokine (sFlt-1, soluble endoglin) und plazentarer Serummarker (PAPP-A). Gleichzeitig kommt es zu einer verminderten Konzentration von Angiogenesefaktoren (PlGF, VEGF).

Die Symptome der Präeklampsie sind das Ergebnis der endothelialen Dysfunktion und resultieren meist aus Mikroangiopathien der Endorgane (Roberts et al. 1991, Lam et al. 2005, Maynard et al. 2008).

Oxidativer Stress

Oxidativer Stress beschreibt die Störung des Gleichgewichts zwischen pro-oxidativen und anti-oxidativen Systemen im Organismus.

Die Hypoxie in der Plazenta führt zu einer Freisetzung von Zytokinen, welche teilweise zu einer inflammatorischen Antwort des Systems führen und damit oxidativen Stress auslösen kann (Benyo et al. 1997). Bedingt durch den oxidativen Stress kommt es zu einer Freisetzung freier Radikale, die zu einer vermehrten Beeinträchtigung des Endothels führen und zu einer verstärkten Vasokonstriktion.

Immunologische Faktoren

Aus immunologischer Sicht steht die gestörte maternale Immunadaptation und Toleranz gegenüber fetalem Gewebe im Fokus. Eine überschießende maternale Immunantwort durch das fehlerhafte Remodelling der Spiralarterien gilt als eine mögliche Ursache (Reister et al. 2008).

Unter Berücksichtigung der Risikofaktoren (Nulliparität, Partnerwechsel, Verhütung mittels Barrieremethoden) untersuchten andere Studien den Effekt der Exposition gegenüber paternalen und fetalen Antigenen (Einarsson et al. 2003, Karumanchi et al. 2013). Dabei scheint eine verminderte Exposition gegenüber paternalen Antigenen mit einem erhöhten Risiko für eine Präeklampsie einherzugehen, da es zu einer schlechteren Anpassung des maternalen Immunsystem an paternale Antigene kommt. Der Beweis für diese Hypothese ist jedoch noch ausstehend (Tubbergen et al. 1999, Karumanchi et al. 2013).

Des Weiteren konnte man in der Plazenta von Patientinnen mit einer Präeklampsie vermehrt dendritische Zellen nachweisen, sodass eine verstärkte T-Zell vermittelte Immunantwort vermutet wird (Huang et al. 2008).

2.1.3.6 Klinik und Diagnostik der Präeklampsie

Die Blutdruckmessung sollte unter standardisierten Bedingungen mit einer passenden Oberarmmanschette bei der sitzenden Patientin nach einer Ruhephase von ca. 2-3 Minuten erfolgen und primär an beiden Armen durchgeführt werden. Optimalerweise sollte nach dem ersten Verdacht eine 24-Stunden-Blutdruckmessung erfolgen, um den zirkadianen Rhythmus zu beurteilen, der bei einer Präeklampsie verloren geht. Darüber hinaus sollte die Patientin,

sofern sie sich in der ambulanten Betreuung befindet, zur Durchführung von Blutdrucktagesprofilen angeleitet werden (Brown et al. 2001, Bergel et al. 2002, DGGG 2013).
Die Proteinurie wird primär durch einen Urin-Schnelltest untersucht. Jede Spur von Proteinen (+) ist abklärungswürdig (DGGG 2013). Im Verlauf sollte eine 24-Stunden-Sammelurin-Diagnostik durchgeführt werden. Pathologische Werte liegen bei einer Eiweißausscheidung ≥300mg in 24 Stunden vor (Moran et al. 2004, Gangaram et al. 2005, Waugh et al. 2005, Lindheimer und Kanter 2010).
Wie unter 2.1.3.3 beschrieben, kann es im Erscheinungsbild der schweren Präeklampsie zum Auftreten von verschiedenen Zusatzsymptomen kommen.

2.1.3.7 Therapie und Prognose der Präeklampsie

Die Therapie der Präeklampsie ist nicht ursächlich, da die Pathogenese der Präeklampsie noch nicht abschließend geklärt ist.
Vielmehr erfolgt eine symptomorientierte Therapie mit suffizienter Blutdruckeinstellung (DGGG 2013). Dies ist eine Kompromissentscheidung, die aus mütterlicher Sicht sinnvoll ist, um die Mutter vor zerebro-/vaskulären Komplikationen wie zerebralen Blutungen zu schützen. Auf der anderen Seite kann die Blutdrucksenkung durch eine verminderte plazentare Durchblutung zur Minderversorgung des Feten führen (Magee et al. 2011, von Dadelszen 2011). Die medikamentöse Blutdruckeinstellung sollte möglichst in einem stationären Setting erfolgen und bei anhaltenden Blutdruckwerten ≥150/100mmHg, spätestens bei Werten ≥160/110mmHg begonnen werden. Ziel ist eine Blutdrucksenkung auf Werte um 150mmHg systolisch und um 80-100mmHg diastolisch (DGGG 2013). Das Mittel der ersten Wahl zur Langzeitbehandlung ist Alpha-Methyldopa (Abalos et al. 2001). Zur akuten Therapie von massiven Blutdruckspitzen gibt es zwei Medikamente, die im off-lable-use eingesetzt werden: Nifedipin (oral) oder Urapidil (intravenös (i.v.)) (Wacker et al. 2006). Zugelassen zur antihypertensiven Therapie der schweren Präeklampsie ist Dihydralazin. Es kommt nach dessen Einnahme jedoch gehäuft zu Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Reflextachykardien und persistierender Hypertonie, die eine Abgrenzung zu einer Verschlechterung der Präeklampsiesymptomatik erschweren (Wacker et al. 2006, DGGG 2013). Außerdem werden bei der Therapie mit Dihydralazin schwere maternale

Hypotensionen (67% im Vergleich zu 0% bei anderen Antihypertensiva) beschrieben, die wie die vorzeitige Plazentalösungen (18% im Vergleich zu 0% bei anderen Antihypertensiva) einen schlechten Einfluss auf das fetale Outcome haben (Magee et al. 2003).
Jede Einstellung des Blutdrucks sollte unter regelmäßigen, intermittierenden CTG-Kontrollen erfolgen, da es zu einer fetalen Minderversorgung kommen kann.
Zur Vermeidung zerebraler Krampfanfälle sollte im Falle einer schweren Präeklampsie eine Therapie mit Magnesiumsulfat mit einer Erhaltungsdosis von 1g/h eingeleitet werden. Dadurch kann das Eklampsie-Risiko halbiert werden (Altmann et al. 2002, Magpie Trial 2007, Steegers et al. 2010).
Die einzig mögliche kausale Therapie der Präeklampsie ist die Beendigung der Schwangerschaft. Die Schwangerschaftswoche ist für den Entbindungszeitpunkt von entscheidender Relevanz. Soweit aus maternaler Sicht möglich, sollte eine Prolongation bis zur 37. SSW erfolgen, danach ist die Entbindung frühzeitig anzustreben (Cruz et al. 2012, DGGG 2013).

2.1.3.8 Früherkennung und Prävention der Präeklampsie

In den letzten Jahren wurden verschiedene Studien zur Entwicklung standardisierter Tests zur Früherkennung einer Präeklampsie durchgeführt.
Die Arbeitsgruppe um Nicolaides in London hat ein standardisiertes Screening zur Präeklampsie-Früherkennung eingeführt. Dabei werden im Rahmen des Ersttrimesterscreenings (11.-14. SSW) Anamneseparameter (Alter, BMI, Familienanamnese, vorangegangene Schwangerschaften, ethnische Zugehörigkeit), der mittlere arterieller Blutdruck, Dopplerwerte (Pulsatility-Index der Aa. uterinae) sowie PlGF und PAPP-A miteinander korreliert (Akolekar et al. 2011 und 2013). Bei einem so durchgeführten Screening erkennt man 93,4-95,2% der early-onset Präeklampsien. Die Rate an falsch-positiven Ergebnissen (FPR) beträgt 5-10% (Akolekar et al. 2011 und 2013). Die Erkennungsrate für die späte Präeklampsie ist mit 37,8-71,1% deutlich geringer (DGGG 2013).
Im Rahmen des Zweittrimesterscreenings (20.-24. SSW) wird zur Prädiktion eines erhöhten Risikos für eine Präeklampsie die Dopplersonographie der Aa. uterinae empfohlen (DGGG 2013). Der dabei bestimmte Pulsatility Index (PI) in Kombination mit der postsystolischen Inzisur (Notch) gehört mit einer

Erkennungsrate von 42,8% zu den besten Markern (Yu et al. 2005, Papageorghiou und Leslie 2007) für die Prädiktion einer Präeklampsie. Dabei ist die Dopplersonographie vor allem ein Marker zur Erkennung der early-onset Präeklampsie.

Andere Studien zeigen, dass mit einer Kombination aus dem mittleren PI der Dopplerwiderstände der maternale Aa. uterinae, der maternalen Anamnese und eines Screenings auf die Serumaktivität von Activin A und Inhibin A eine Prädiktion von 90% für eine early-onset Präeklampsie möglich ist (Spencer et al. 2006).

Weitere Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren Screening-Parameter im Rahmen des Zweittrimesterscreenings etabliert (Verlohren et al. 2010). Diese Serumparameter sind vor allem zur Risikostratifizierung bei auffälligen uterinen Dopplerwerten oder Patientinnen mit anderen Risikofaktoren für eine Präeklampsie indiziert.

Bei den Serumparametern handelt es sich um den anti-angiogenetischen Faktor sFlt-1 und den pro-angiogenetischen PlGF bzw. dem Quotient aus beiden Faktoren (Verlohren et al. 2012). Die Idee dahinter basiert auf der Hypothese eines Ungleichgewichtes zwischen pro-angiogenetischen und anti-angiogenetischen Faktoren (Levine et al. 2006). Man geht davon aus, dass im Rahmen einer Präeklampsie die pro-angiogenetischen Faktoren vermindert und die anti-angiogenetischen Faktoren erhöht sind und es damit auch zu einem ansteigenden sFlt-1/PlGF-Quotienten kommt. Nach neusten Studien gibt es für diesen Quotienten jeweils zwei verschiedene Cut-Off-Werte für unterschiedliche Schwangerschaftsphasen (Verlohren et al. 2014). Dabei zeichnet sich der untere Cut-Off-Wert durch eine hohe Sensitivität und der obere Cut-Off durch eine hohe Spezifität aus. Zwischen der 20+0 und 33+6 SSW liegen die Grenzen bei ≤33 (geringstes Risiko) und ≥85 (höchstes Risiko). Nach der 34+0 SSW liegen die Cut-Off-Werte bei ≤33 (geringstes Risiko) und ≥110 (höchstes Risiko). Im Falle eines Ergebnisses zwischen den beiden Grenzwerten müssen regelmäßige Kontrollen durchgeführt werden.

Jedoch kann mit Hilfe dieser Serumparameter eine Präeklampsie nicht sicher ausgeschlossen oder definitiv vorhergesagt werden. Es kann lediglich eine Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Präeklampsie und einer damit

verbundenen Entbindungskonsequenz für die nächsten Wochen angegeben werden (Crispi et al. 2008, Lehnen et al. 2013, Verlohren et al. 2014).
Zur Prävention einer Präeklampsie wird der Beginn einer low-dose-ASS-Therapie (75-100mg/d) bei Schwangeren mit den unter 2.1.3.4 aufgeführten Risikofaktoren empfohlen (Bujold et al. 2010). Bei Beginn der Therapie vor der 16. SSW kann man eine signifikante Senkung des Auftretens der frühen (bis 34+0 SSW) und schweren Präeklampsie, des SIH, der IUGR (bei pathologischen Dopplerwerten der Aa. uterinae) und der daraus resultierenden Frühgeburtlichkeit verzeichnen (Bujold et al. 2009, Roberge et al. 2012, DGGG 2013).

2.1.4 HELLP-Syndrom

2.1.4.1 Definition des HELLP-Syndroms

HELLP ist ein Synonym für Hämolyse, erhöhte Leberenzyme und eine verminderte Thrombozytenzahl (englische Übersetzung: Hemolysis, Elevated Liver Enzymes and Low Platelets).
Es gehört, wie unter 2.1.2 beschrieben, zu den hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen.

2.1.4.2 Epidemiologie des HELLP-Syndroms

Das HELLP-Syndrom tritt deutlich seltener als die Präeklampsie auf. Es kommt in ca. 0,1-0,8% aller Schwangerschaften vor (Baha und Sibai 2013). Bei Schwangeren mit einer schweren Präeklampsie ist das Risiko stark erhöht, hier kommt es in 10-20% der Fälle zur Ausbildung eines HELLP-Syndroms (Baha und Sibai 2013). Jedoch muss sich das HELLP-Syndrom nicht auf dem Boden einer Präeklampsie entwickeln, denn es liegt in 5-15% der Fälle keine Proteinurie, in über 20% kein Hypertonus und in 15% weder ein Hypertonus noch eine Proteinurie vor (Sibai 2004).

2.1.3.4 Risikofaktoren des HELLP-Syndroms

Für das HELLP-Syndrom gibt es im Gegensatz zur Präeklampsie kaum klar definierte Risikofaktoren. Lediglich eine hypertensive Schwangerschafts-erkrankung in einer vorangegangenen Schwangerschaft oder eine positive Familienanamnese gehen mit einem erhöhten Risiko für ein HELLP-Syndrom einher (Lachmeijer et al. 2001, van Pampus et al. 2001, Baha und Sibai 2013).

2.1.4.3 Hypothesen zur Pathogenese des HELLP-Syndroms

Die Pathogenese des HELLP-Syndroms ist ähnlich wie die der Präeklampsie bisher nicht abschließend geklärt. In den Fällen, in denen ein HELLP-Syndrom auf dem Boden einer Präeklampsie entsteht, kann von ähnlichen Grundmechanismen ausgegangen werden (siehe 2.1.3.5) (Sibai 2013). Warum es aber in diesen Fällen zu einer Exazerbation mit Ausbildung der Symptome eines HELLP-Syndroms kommt, ist ungeklärt.
Auch im Falle eines HELLP-Syndroms erscheint die gestörte Plazentation eine mögliche Ursache. Hinzu kommt eine Entzündungsreaktion der Leber mit einer verstärkten Aktivierung des Gerinnungssystems (Benedetto et al. 2011, Abildgaard und Heimdal 2013).
Des Weiteren gibt es eine Hypothese, die besagt, dass das HELLP-Syndrom in weniger als 2% der Fälle mit einer Unterfunktion der fetalen Langketten-3-hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (LCHAD) einhergeht (Yang et al. 2002).
Es gibt insgesamt jedoch wenige Untersuchungen zur Pathogenese des HELLP-Syndroms, da von einem ähnlichen Pathomechanismus wie der Präeklampsie ausgegangen wird und im Gegensatz zur Präeklampsie meist nur geringe Fallzahlen vorliegen.

2.1.4.4 Klinik und Diagnostik des HELLP-Syndroms

Das charakteristische Symptom bei Patientinnen mit einem HELLP-Syndrom ist der rechtsseitige Oberbauchschmerz, der durch eine erhöhte Leberkapsel-spannung hervorgerufen wird (Haram et al. 2009).

Zur Diagnostik des HELLP-Syndroms dienen verschiedene Laborparameter – die vor allem durch die klassische Trias aus Hämolyse, erhöhten Leberwerten und verminderten Thrombozyten gekennzeichnet werden (Weinstein 1982, DGGG 2013).

Das Ausmaß der Hämolyse wird untersucht durch die Bestimmung von Haptoglobin, Bilirubin, Kreatinin, Hämoglobin und der D-Dimere. Mit einem positiv-prädiktiven Vorhersagewert von 95-97% ist das Haptoglobin der sensitivste Marker zur Diagnosefindung (Wilke et al. 1992). Der Normalwert liegt bei 0,3g/L und kann im Falle einer schweren Hämolyse bis unter 0,06g/L absinken. Eine Normalisierung erfolgt ca. 24-30 Stunden post partum.

Des Weiteren werden zur Diagnostik die Leberenzyme herangezogen. Zeigen sich Werte der Serum-Aspartat-Aminotransferase (ASAT), vormals Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und/oder der Serum-Alanin-Aminotransferase (ALAT), vormals Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) über den Normbereich (10-35U/L) in Kombination mit einem Abfall der Thrombozytenzahl unter 100.000/µl, kann die Diagnose eines HELLP gestellt werden. Die Serum-Lactatdehydrogenase (LDH) ist kein Diagnoseparameter des HELLP-Syndroms, jedoch korreliert die Höhe mit dem Schweregrad der Erkrankung (Martin et al. 1999, DGGG 2013).

Die Bedeutung des C-reaktiven-Proteins (CRP) in der Diagnostik des HELLP-Syndroms ist noch unklar. Es gibt Studien, die besagen, dass das CRP als ein Akute-Phase-Protein im Rahmen einer Entzündungsreaktion erhöht ist (van Runnard Heimel et al. 2008).

Der Verlauf eines HELLP-Syndroms kann sehr unterschiedlich sein. In 46% kommt es zu einer spontanen Remission (Visser und Wallenburg 1995). Es kann jedoch auch innerhalb von Stunden zu einer Exazerbation der Symptome mit einer dissemenierten intravasalen Gerinnungsstörung kommen (Sibai et al. 1993, Rath et al. 2000).

Das HELLP-Syndrom kann mit Hirnblutungen, Leber- und Nierenversagen oder Multiorganversagen zum Tod der Patientin führen (Roberts et al. 1991, Lam et al. 2005, Maynard et al. 2008).

2.1.4.5 Therapie und Prognose des HELLP-Syndroms

Die einzige kausale Therapie eines HELLP-Syndroms ist die sofortige Beendigung der Schwangerschaft. Zur Prolongation der Schwangerschaft bei stabiler Gesamtkonstellation kann eine Therapie mit Glucokortikoiden durchgeführt werden (DGGG 2013). Es werden vor allem Methylprednisolon (32mg/d i.v.) oder Dexamethason (2-3x10mg/d i.v.) verwendet (Martin et al. 2006). Bei einer Therapie mit Prednisolon ist eine zusätzliche Lungenreifeinduktion durchzuführen, da es nur beschränkt plazentagängig ist (Blanford und Murphy 1977). In der Mehrzahl der Studien führt eine Behandlung mit Glucokortikoiden zu einer klinischen und biochemischen Remission (Isler et al. 2001, O'Brian et al. 2002, Martin et al. 2003, Matchaba und Moodley 2004). Im Gegensatz dazu belegen jedoch einige andere, teils placebokontrollierte Studien (Fonseca et al. 2005), dass der Nutzen einer Glucocorticoid-Therapie für das feto-maternale Outcome bei einem HELLP-Syndrom nicht eindeutig nachweisbar ist (Woudstra et al. 2010).
Die Entbindung sollte in Abhängigkeit von maternalen und fetalen Faktoren sowie der Schwangerschaftswoche erfolgen.
Bei Beginn eines HELLP-Syndroms nach der 34. SSW sollte die Schwangerschaft beendet werden. Dies kann bei stabilem Befund auch durch eine vaginale Entbindung erfolgen (Rath 2000, Rath und Bartz 2004, DGGG 2013).
In der 24. bis 34. SSW ist die Prolongation grundsätzlich anzustreben, eine Beendigung der Schwangerschaft muss jedoch bei einer DIG (disseminierte intravasale Gerinnung), schwerer Niereninsuffizienz und einem Lungenödem erfolgen. Andernfalls gelten die Regeln zur Beendigung einer Schwangerschaft wie im Falle einer Präeklampsie (DGGG 2013).
Zur Prävention eines erneuten HELLP-Syndroms oder einer anderen hypertensiven Erkrankung in der nächsten Schwangerschaft sollte wie unter 2.1.3.8 beschrieben eine Therapie mit ASS in der Frühschwangerschaft begonnen werden.

2.2 Plazentainsuffizienz

2.2.1 Definition der Plazentainsuffizienz

Die Plazentainsuffizienz beschreibt eine Störung der plazentaren Diffusions- und Perfusionskapazitäten, sodass eine ausreichende fetale Versorgung nicht mehr gewährleistet ist.

2.2.2 Hypothesen zur Pathogenese der Plazentainsuffizienz

Im Falle einer Plazentainsuffizienz unterscheidet man zwischen der akuten Plazentainsuffizienz, die durch ein plötzliches Ereignis auftritt, und der chronischen Plazentainsuffizienz, die vor allem mit verschiedenen Schwangerschaftserkrankungen in Zusammenhang steht (Gruenwald 1963).
In der folgenden Tabelle (Tabelle 3) werden mögliche Ursachen der akuten und der chronischen Plazentainsuffizienz aufgeführt.

Akute Plazentainsuffizienz	**Chronische Plazentainsuffizienz**
Uterine Dauerkontraktion	Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen
Verminderte Nabelschnurdurchblutung	Diabetes mellitus
Vorzeitige Plazentalösung	Pathologischer fetaler Karyotyp
Plazenta-Praevia-Blutung	Kollagenosen/Lupus erythematodes
Randsinusblutung	Infektionen
Vena-Cava-Kompressionssyndrom	Uterus myomatosus
Eklampsie	Maternale Niereninsuffizienz
	Nikotinabusus
	Maternale Mangelernährung
	Maternales Alter (>35 Jahren)

Tabelle 3: Ursachen der Plazentainsuffizienz. (Lechtig et al. 1975, Khoury 1988, Kiechle 2007)

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vor allem mit der chronischen Plazentainsuffizienz, ausgelöst durch hypertensive Schwangerschafts-erkrankungen. Bei der chronischen Plazentainsuffizienz kann die Leistung der Plazenta eine normale fetale Entwicklung nicht mehr gewährleisten (Kubli 1968).

2.2.3 Klinik und Diagnostik der Plazentainsuffizienz

Die Plazentainsuffizienz kann in der akuten Form einen intrauterinem Fruchttod, eine vorzeitige Plazentalösung oder eine akute Verschlechterung der fetalen Sauerstoffversorgung zur Folge haben (Tabelle 3).
Die chronische Form zeigt sich meist in einer Wachstumsrestriktion des Feten und kann ebenfalls mit einem intrauterinen Fruchttod enden.
Ein Schätzgewicht unterhalb der Norm (<10. Perzentile) beschreibt eine Small for Gestational Age (SGA) -Situation. Die Ursachen sind vielfältig, so muss man zwischen einem normal gewachsenem, aber konstitutionell kleinem Feten ohne Pathologie und dem wachstumsrestriktivem IUGR-Feten (Ott 1988) unterscheiden, aber auch Infektionen und Chromosomenanomalien können mit einem verminderten Wachstum einhergehen.
Eine IUGR-Situation ist charakterisiert durch die longitudinal abflachende Wachstumskurve, sowie erhöhte utero- und fetoplazentare Widerstände in der Dopplersonographie.
Die entscheidenden Messwerte zur Bestimmung des fetalen Schätzgewichts sind der biparietale Durchmesser (BIP), der Kopfumfang (KU), der Abdomenumfang (AU), die Femur- (FL) und die Humeruslänge (HL).
Der AU bietet die sensitivste Methode (98%), um eine Wachstumsrestriktion zu diagnostizieren, da ein vermindertes Wachstum der Leber ein früher Hinweis auf eine IUGR-Situation ist (Baschat et al. 2000). Diese Messung hat aber einen, im Vergleich zur Gewichtsschätzung, geringeren positiv prädiktiven Wert (36%).
Die KU/AU-Ratio, das Verhältnis von Kopf- zu Abdomenumfang ist ein weiterer wichtiger diagnostischer Faktor, da es im Falle einer Wachstumsrestriktion in der Regel zu einem asymmetrischen Wachstums kommt, mit vergleichsweise größerem Kopf und damit einer erhöhten KU/AU-Ratio (Campbell und Thoms 1977). Die Sensitivität ist mit 70-80% geringer als die der Gewichtsschätzung und des AU, die KU/AU-Ratio vermindert aber die Falsch-Positiv-Rate.
Außerdem bezeichnend für einen IUGR-Feten ist das Abflachen der Wachstumskurve. Deshalb sind in einer SGA-Konstellation regelmäßige Fetometrien wichtig (Bobrow und Soothill 1999).
Ein weiteres Kriterium in der Verlaufsbeobachtung von IUGR und SGA-Feten ist die Fruchtwassermenge. Eine Oligohydramnion kann ein Hinweis auf eine

verminderte Nierenperfusion und Oligurie sein (Veille und Kanaan 1989). Im Gegensatz dazu gehen eine normale Fruchtwassermenge oder ein Hydramnion bei kleinen Feten häufig mit einer Aneuploidie oder Infektionen einher (Groome et al. 1991).

Die Dopplersonographie stellt einen weiteren wichtigen Parameter zur Diagnostik der Plazentainsuffizienz dar.

Auf der maternalen Seite werden die Aa. uterinae beidseits untersucht. Dabei sind die erhöhte Pulsatilität (PI >95. Perzentile) sowie das Notching Diagnosekriterien für eine Plazentainsuffizienz, die durch eine gestörte Plazentation zu erklären ist (siehe 2.1.3.5). In der regelrechten Schwangerschaft kann man eine Abnahme der uterinen Widerstände beobachten sowie ein Verschwinden des zu Beginn der Schwangerschaft noch physiologischen Notching (Gomez et al. 2008).

Auf fetaler Seite wird zur Abschätzung der plazentaren Dysfunktion und fetalen Dekompensation die A. umbilicalis, die A. cerebri media sowie der Ductus venosus (DV) untersucht.

Eine Verminderung der diastolischen Blutflussgeschwindigkeiten und somit eine Pulsatilitätszunahme der A. umbilicalis ist ein Zeichen eines erhöhten feto-plazentaren Widerstands. Bei einem extrem erhöhten Widerstand zeigt sich ein enddiastolischer Null- oder Rückfluss der A. umbilicalis (Hecher et al. 2001, Ferrazzi et al. 2002).

Im Falle einer Agravierung des fetalen Zustandes kommt es zu einer zunehmenden Kreißlaufzentralisation. Dies zeigt sich durch den Brain-Sparing-Effekt. Dabei kommt es zu einer steigenden peripheren Widerstandserhöhung mit zentraler Vasodilatation, die sich in einem verminderten Widerstand und einer verminderten Pulsatilität der A. cerebri media zeigt (Baschat et al. 2000).

Als wichtigster venöser Dopplerparameter gilt der Ductus venosus. Eine zunehmende Pulsatilität sowie Veränderungen im Flussmuster mit negativer A-Welle sind Zeichen der fetalen Dekompensation (Hecher et al. 2001, Baschat et al. 2003).

Ein weiterer Parameter zur Diagnostik und Überwachung ist die computerisierte CTG-Analyse entsprechend den Dawes-Redman-Kriterien (Dawes et al. 1982). Dabei werden Parameter wie Kurz- und Langzeitvariation der fetalen Herzfrequenz, die Bandbreite der Oszillation, die Anzahl von Akzelerationen,

Dezelerationen sowie fetalen Bewegungen und die Baseline der fetalen Herzfrequenz beurteilt.

2.2.4 Therapie und Prognose der Plazentainsuffizienz

Bezüglich der Therapie und der Prognose der Plazentainsuffizienz muss man zwischen der akuten und der chronischen Form der Plazentainsuffizienz unterscheiden.
Die akute Form kann beispielsweise beim Vena-Cava-Kompressionssyndrom konservativ durch Lageveränderung der Mutter behoben werden. Die vorzeitige Plazentalösung stellt jedoch einen geburtshilflichen Notfall dar und die sofortige Entbindung ist indiziert.
Für die chronische Plazentainsuffizienz gibt es keine ursächliche Behandlung. Wichtig im klinischen Management sind regelmäßige klinische Kontrollen des fetalen Wohlbefindens durch Bestimmung der fetalen Dopplerparameter (A. cerebri media, A. umbilicalis, Ductus venosus) sowie der Fruchtwassermenge und regelmäßige CTG-Kontrollen. Im Falle von zugrundeliegenden maternalen Schwangerschaftserkrankungen müssen diese möglichst suffizient behandelt werden.
Im Rahmen der regelmäßigen Kontrollen werden Entbindungskriterien für den Fall einer Verschlechterung des fetalen oder maternalen Zustandes festgelegt. Mit fortschreitendem Gestationsalter sinkt die Schwelle für eine Intervention im Sinne der vorzeitigen Entbindung, da das Risiko einer fetalen Schädigung oder eines intrauterinen Fruchttodes gegenüber den Risken der Frühgeburtlichkeit zunimmt (Kahn et al. 2003). Eine Lungenreifeinduktion mit Betamethason ist bei absehbarer Frühgeburtlichkeit zu empfehlen, auch wenn diese Behandlung zu einer kurzfristigen und in der Regel reversiblen Verminderung der fetalen Bewegungen und der Kurzzeitvariation (KZV) der Herzfrequenz führen kann (Derks et al. 1995). Bezüglich der Wahl des optimalen Entbindungszeitpunktes abhängig von fetalen Parametern gibt es aktuelle Empfehlungen, die sich an der TRUFFLE Studie orientieren. Diese randomisierte in den Jahren 2005-2010 Patientinnen mit einer schweren frühen fetalen Wachstumsrestriktion (26+0-32+0 SSW) in Kombination mit einem erhöhten Pulsatility Index der A. umbilicalis (PI >95. Perzentile) in drei verschiedene Studiengruppen. In der ersten Gruppe wurde

der Entbindungszeitpunkt anhand von CTG-Veränderungen festgelegt (KZV<3,5ms 26+0-28+6 SSW und KZV<4,0ms 29+0-32+0 SSW), in der zweiten Gruppe anhand von frühen Veränderungen des Ductus venosus (PI >95. Perzentile) und in der 3. Gruppe anhand von späten Veränderungen des Ductus venosus (Nullfluss oder Rückfluss der A-Welle). Für alle drei Gruppen gab es ein Sicherheitsnetz, welches eine sofortige Entbindung beim Auftreten von schweren CTG-Veränderungen vorsah (KZV<2,6ms 26+0-28+6 SSW; KZV<3,0 29+0-32+0 SSW oder wiederholt spontane variable Dezelerationen). In der Gruppe der späten Veränderungen des Ductus Venosus zeigte sich im Vergleich zu Gruppe 1, die den Entbindungszeitpunkt anhand von CTG-Veränderungen bestimmte, ein signifikant besseres neurologisches Outcome der überlebenden Kinder im Alter von 2 Jahren. Eine Häufung der perinatalen Todesfälle in der Gruppe der späten DV-Veränderungen wurde beschrieben, dieser Zusammenhang war jedoch nicht statistisch signifikant (Lees et al. 2013, Lees at al. 2015).

2.3 Tryptophanstoffwechsel

2.3.1 Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)

IDO ist ein 42kD großes, glykosyliertes monomeres Enzym aus der Gruppe der Hämenzyme (Daley-Yates et al. 1988). Die genetische Information befindet sich auf Chromosom 8. IDO ist wenig substratspezifisch und akzeptiert neben L-Tryptophan auch anderen Indolamine (Taylor und Feng 1991).

Es handelt sich um eine Dioxygenase, welche die oxidative Spaltung von aromatischen Pyrrolringen wie des Indolringes des Tryptophan katalysiert. Dabei werden beide O-Moleküle des molekularen Sauerstoffs (O_2) eingebaut (Daley-Yates et al. 1988, Werner und Werner-Felmayer 2007).

Im Tryptophanstoffwechsel, auch Kynurenin-Abbauweg genannt, katalysiert IDO die Reaktion von Tryptophan (L- oder D-Form) zu N-Formylkynurenin, wobei freie O_2-Radikale oder alternativ ein Superoxid als Sauerstoffdonor fungieren (Abbildung 1). IDO agiert in diesem Schritt als Radikalfänger (Santoso et al. 2002). Die Endprodukte dieses Stoffwechselweges sind Nikotinsäure bzw. Nikotinsäureamid, welche für die Produktion von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) und somit zur Energiegewinnung von Bedeutung sind.

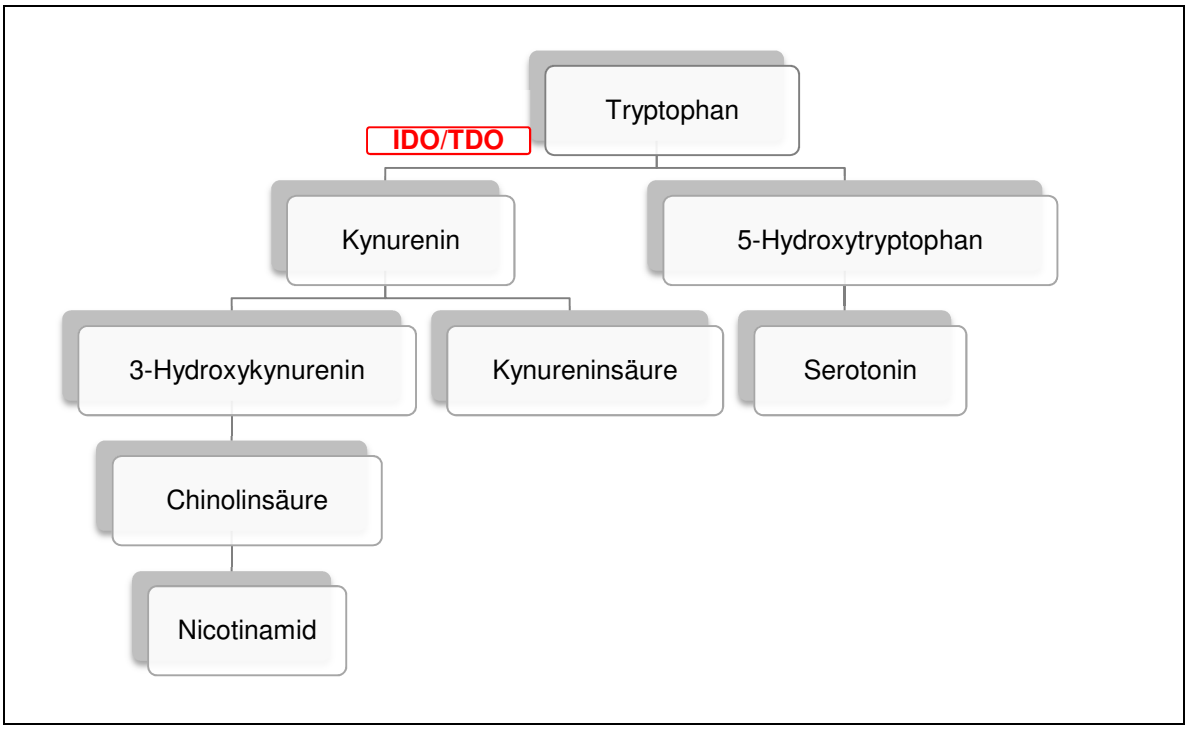


Abbildung 1: Der Tryptophanstoffwechsel. (vereinfachte Darstellung, angelehnt an eine Grafik aus Dantzer et al. 2008)

Andere Metabolite des Abbauweges sind zum Teil neurotoxisch oder auch neuroprotektiv oder greifen regulierend in das Immunsystem ein (siehe 2.3.3).

IDO kommt in allen Geweben des menschlichen Körpers vor. Eine verstärkte Expression zeigt sich in der Plazenta sowie in Makrophagen, dabei kommt vor allem die immunologische Funktion zum Tragen (Taylor und Feng 1991, Kudo et al. 2000).

Es existieren zwei Isoenzyme der Indolamin-2,3-Dioxygenase-1 (IDO-1):

1. Die Indolamin-2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2), die im Jahre 2007 erstmals beschrieben wurde und deren genaue Rolle aktuell noch unklar ist. Sie hat aber einen deutlich geringeren Anteil am Tryptophanabbau als IDO-1 und TDO (Sedlmayr et al. 2014).
2. Die Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) wird hauptsächlich in den Hepatozyten exprimiert. Man geht davon aus, dass sie für die systemische Serumkonzentration von Tryptophan verantwortlich ist (Saito et al. 1991). Sie ist bezüglich des Tryptophan substratspezifisch und akzeptiert im Gegensatz zu IDO-1 nur L-Tryptophan.

In der vorliegenden Arbeit steht IDO stets für die Indolamin-2,3-Dioxygenase-1, damit steht IDO synonym für IDO-1.

2.3.2 Tryptophan

Tryptophan gehört zu den essentiellen Aminosäuren. Damit muss es aktiv vom Menschen aufgenommen werden. Tryptophan hat im menschlichen Organismus unterschiedliche Funktionen. In erster Linie wird es im Rahmen der Proteinbiosynthese benötigt. Tryptophan spielt außerdem eine Rolle im menschlichen Immunsystem (siehe 2.3.3). Im zentralen Nervensystem entsteht aus Tryptophan Serotonin, das zum einen als zentraler und peripherer Neurotransmitter, zum anderen als Gewebshormon im Rahmen der Darmperistaltik und bei der Kontraktion der Gefäßmuskulatur fungiert. Des Weiteren wird aus Tryptophan in der Zirbeldrüse Melantonin produziert, das für den circadianen Tag-Nacht-Rhythmus verantwortlich ist (Branchey et al. 1982).

2.3.3 Die Funktion von IDO im humanen Immunsystem

IDO hat immunregulatorische wie auch -suppressive und -supportive Aufgaben und spielt sowohl in der Erregerabwehr als auch bei der Tumorentstehung und in der Immuntoleranz gegenüber dem Feten eine entscheidende Rolle.
Die immunregulatorische Wirkung von IDO ergibt sich vorrangig durch eine Tryptophandepletion, einer lokalen oder systemischen Verminderung des Tryptophanangebots in Folge einer vermehrten Expression von IDO/TDO.
Tryptophan bzw. dessen Abbauprodukte werden zur Aktivierung von regulatorischen T-Lymphozyten, die eine Immunsuppression bewirken, benötigt (Terness et al. 2002).
Eine vermehrte Induktion von IDO in Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen und dentritischen Zellen erfolgt durch den Insulin-like-growth-factor-α (IGF-α) und kann durch Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) zusätzlich gesteigert werden (Robinson et al. 2003). Auch Interferon-γ und Lipopolysaccharide führen zu einer Steigerung der IDO-Expression (Taylor und Feng 1991). Im Gegenzug wird IDO unter anderem durch 1-L-Methyl-Tryptophan sowie durch Stickstoff (NO) gehemmt (Thomas et al. 1994, Munn et al. 1998).
IDO unterbindet die Proliferation von Krankheitserregern (Bakterien, Viren und Parasiten) durch die Hemmung der Proteinbiosynthese, die unter anderem von Tryptophan abhängig ist. Durch den schnellen Abbau des Tryptophan durch IDO

wird die Proteinbiosynthese vieler Fremdzellen in der Umgebung gestoppt, sodass diese sich nicht mehr vermehren können (Nicholas und Shane 2007).
Auch die Zellproliferation von Tumorgewebe ist abhängig von Tryptophan (Kai et al. 2003). Im Rahmen verschiedener Tumorerkrankungen kommt es zu einer verstärkten IDO-Expression im Tumorgewebe und in den antigen-präsentierenden Zellen im zugehörigen Sentinal-Lymphknoten. Dies führt wiederum zu einer verminderten T-Zell-Produktion, wodurch es zu einer Immuntoleranz des Organismus gegenüber den Tumorantigenen kommt. Die aktuelle Forschung beschäftigt sich bereits mit Ansätzen zur Hemmung von IDO in der Tumortherapie (Katz et al. 2008).
Durch seine spezielle Lokalisation in der Plazenta und seine Bedeutung in der Immuntoleranz wurde die Bedeutung von IDO im Rahmen der Schwangerschaft untersucht. Schon 1998 wurde gezeigt, dass IDO eine entscheidende Rolle in der Immuntoleranz gegenüber dem Feten spielt und hier eine immunsuppressive Wirkung hat. Durch eine Hemmung von IDO mit 1-Methyltryptophan konnte die T-Zell vermittelte Abstoßung des allogenen, genetisch nicht identischen Feten im Mausmodell induziert werden (Munn et al. 1998, Mellor et al. 2001).
Man geht davon aus, dass in einer unauffällig verlaufenden Schwangerschaft hohe IDO-Konzentrationen im Plazentagewebe vorliegen und vermehrt Tryptophan abgebaut wird. Dadurch kommt es zu einem Absinken des Tryptophan-Spiegels und damit zu einer verminderten T-Zell-Produktion. Dies verhindert die T-Zell vermittelte Abstoßung des Feten.

2.3.4 IDO in hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen

Es existieren bereits verschiedene Studien, die IDO in hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen, jedoch ausschließlich im Falle einer Präeklampsie, untersucht haben.
Angelehnt an die mögliche Pathogenese der Präeklampsie (siehe 2.1.3.5) wurde die Rolle von IDO bei der Entstehung von oxidativem Stress und einer dadurch entstehenden Präeklampsie untersucht.
Santoso beschreibt schon 2002 im Rahmen der Präeklampsie erhöhte Level freier Sauerstoffradikale, da diese nicht durch IDO im Tryptophanabbau verbraucht werden. Freie Sauerstoffradikale sind ein Indikator für oxidativen Stress und gelten

somit als mögliche Ursache der Präeklampsie (Santoso et al. 2002, Nishizawa et al. 2011).

Des Weiteren ist der immunologische Aspekt von verstärktem Interesse. Geht man davon aus, dass die Präeklampsie eine verstärkte maternale Immunantwort auf die bestehende Schwangerschaft ist, wird diese ggf. durch verminderte IDO-Expression ausgelöst. Dies führt zu einem erhöhten Level an Tryptophan, welches zur Aktivierung von T-Zellen genutzt wird (Wilczynski 2006, Sedlmayr 2007, Nishizawa et al. 2007 und 2008).

Wieder andere Arbeitsgruppen untersuchen Veränderungen in der systemischen inflammatorischen Immunantwort des maternalen Organismus, welche als verstärkt im 3. Trimenon beschrieben wird. Durch eine verminderte IDO-Expression und durch einen konsekutiv erhöhten Tryptophanspiegel könnte diese verstärkt sein und damit zu den Symptomen der Präeklampsie führen (Kudo et al. 2003).

Nicht nur die Untersuchung von IDO in der Plazenta ist von großem Interesse, sondern auch die Messung des Tryptophanspiegels, da dies potentiell ein einfaches diagnostisches Mittel darstellt. In der normalen Schwangerschaft werden verminderte Tryptophanspiegel im Gegensatz zur nicht schwangeren Frau beschrieben (Schröcksnadel 1996).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Das Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt sich um eine prospektive klinisch-experimentelle Studie. Nach einem positiven Ethikvotum (siehe 11.1) der Ärztekammer Hamburg vom 01.07.2010 wurde zwischen Juli 2010 und Mai 2011 das erforderliche Material monozentrisch in der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) gewonnen.
Vor Einschluss in die Studie wurden alle Patientinnen ausführlich über den Inhalt (siehe 11.2) sowie datenrechtliche Bestimmungen (siehe 11.3) aufgeklärt und haben eine schriftliche Einverständniserklärung unterschrieben (siehe 11.4), die bis zur endgültigen Anonymisierung widerrufen werden konnte.
Die ursprüngliche Studie sollte sich mit dem Adhäsionsmolekül ALCAM (Activated Leucozyte Cell Adhesion Molecule) und seinem Einfluss auf die Entstehung einer Präeklampsie bzw. eines HELLP-Syndroms beschäftigen. Dieses konnte jedoch nach ausführlichen immunhistochemischen Untersuchungen nicht in der Plazenta nachgewiesen werden. Es folgte somit eine Umstellung der Studie auf IDO. Das Ethikvotum sowie die Aufklärung und Einverständniserklärung umfassten bereits eine Ausweitung der Untersuchung auf andere Moleküle, wodurch kein erneutes Ethikvotum oder weitere Aufklärungen erforderlich waren.

3.1.2 Das Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv besteht aus zwei verschiedenen Gruppen:

- die Gruppe der an einer der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen erkrankten Patientinnen (n=30)
- das Kontrollkollektiv ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung (n=43).

In die Studie eingeschlossen wurden Patientinnen mit der Diagnose einer Präeklampsie und/oder eines HELLP-Syndroms und Schwangere, ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung, die stationär auf der Pränatalstation

des UKE betreut bzw. im Kreißsaal entbunden wurden. Bei sämtlichen Patientinnen waren alle Einschlusskriterien erfüllt und keines der Ausschlusskriterien lag vor. Für jede der eingebundenen Patientinnen wurde ein Datenblatt (11.5) zur Erfassung der Follow-Up-Daten erstellt.
Von allen Patientinnen wurden präpartal Serumproben sowie postpartal Plazentaproben gesammelt.

Einschlusskriterien für die Studiengruppe

- schwangere Patientinnen mit den klinischen Symptomen (Kopfschmerzen, Augenflimmern, rechtsseitige Oberbauchschmerzen, Übelkeit) einer Präeklampsie/HELLP-Syndroms und/oder den laborchemischen Parametern (erniedrigtes Haptoglobin, erhöhte Serum-Aminotransferasen, erniedrigte Thrombozytenzahl) eines HELLP-Syndroms
- Alter zwischen 18 und 45 Jahren
- Einlingsgravidität
- schriftliches Einverständnis

Einschlusskriterien für die Kontrollgruppe

- Schwangere mit normotonem Blutdruck
- Alter zwischen 18 und 45 Jahren
- Einlingsgravidität
- schriftliches Einverständnis

Ausschlusskriterien für die Studien- und Kontrollgruppe

- Mehrlingsgravidität
- gravierende chronische oder akute Erkrankungen (ausgenommen Hypertonus und Diabetes mellitus)
- bekannter Alkohol-/Medikamenten- oder Drogenmissbrauch

Die Diagnosestellung der Präeklampsie erfolgte anhand der klinischen Parameter entsprechend den Leitlinien der DGGG 2010. Diese umfassen ein gleichzeitiges Auftreten von arteriellem Hypertonus (RR≥140/90mmHg) und einer Proteinurie (≥300mg im 24-Stunden-Sammelurin oder alternativ ein 2fach positiver Proteinnachweis in der Urinteststreifenuntersuchung). Das HELLP-Syndrom wurde bei gleichzeitigem Auftreten einer Hämolyse (Haptoglobin als sensitivster

Marker <0,30g/l [Normbereich: 0,03-2,0g/l]), erhöhten Serum-Aminotransferasen (GPT und GOT >35U/l [Normbereich: 10-35U/l]) und verminderter Thrombozytenzahl (Thrombozyten <100.000/µl [Normbereich: 150.000-400.000/µl]) diagnostiziert (National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy 2000). Die hier verwendeten laborchemischen Normwerte orientieren sich an den Normwertgrenzen des Zentrallabors des UKE.

In keinem der hier untersuchten Fälle kam es zum Auftreten einer Eklampsie.

Die Patientinnen wurden stationär aufgenommen, entsprechend der Leitlinien behandelt und ggf. frühzeitig entbunden.

3.1.3 Verwendete Materialien

3.1.3.1 Material zur Gewebefixierung und Weiterverarbeitung

<u>Puffer und Lösungen</u>

- Phosphatpuffer 0,2M (pH 7,2-7,4)
  - 1000ml Aqua destillata
  - 28,42g Na_2HPO_4 x 2 H_2O *(Roth 4984.2)*
  - 2,76g NaH_2PO_4 x H_2O *(Merck 6346)*
- Formalin 3,7% (gepuffert)
  - 100ml Formaldehydlösung 37% *(Roth CP10.1)*
  - 500ml Phosphatpuffer 0,2M
  - 400ml Aqua demineralisata

<u>Verbrauchsmaterialien</u>

- Paraffin – Paraplast Plus *(Mccormick No.: 39502004)*
- Rotilabo Einbettkassetten *(Roth No. K113.1)*
- Objektträger SuperFrost/Plus *(Assistent 2409/1)*
  - Elka *(Assistent 8037/1)*

<u>Geräte</u>

- Automatische Gewebe-Infiltration *(Leica TP1020)*
- Kompakte Paraffinausgießstation *(Leica EG1160)*

- Brutschrank *(Biotherm 37, Julabo)*
- Schlittenmikrotom *(Leica SM2000R)*
- Paraffinstreckbecken *(Leica HI1210)*
- Wärmeplatte *(Medax 12800)*
- Microtome Blade *(Feather S35)*

3.1.3.2 Material für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Puffer und Lösungen

- Aqua destillata
- Xylol *(Sigma Aldrich UN1307)*
- Alkoholreihe (Ethanol 80%, 96%, 99%) *(Walter UN1170)*
- Mayers Hämatoxylin-Lösung *(Sigma 51275-1L)*
- Eosin G-Lösung 0,5% *(Roth X883.2)*
- Entellan *(Merck 107960)*

Verbrauchsmaterialien

- Deckgläser 24 x 60mm *(Roth H878)*

3.1.3.3 Material für die IDO-Immunhistochemie

Puffer und Lösungen

- Aqua destillata
- Leitungswasser
- Xylolersatz-Medium HS200 (XEM) *(national diagnostics 1-01914)*
- Alkoholreihe (Ethanol 80%, 96%, 99%) *(Walter CMP)*
- 2-Propanol *(Th. Geyer)*
- TBS-Puffer (pH 7,6)

  4000ml Aqua destillata
  24,22g Trizma base *(Sigma T1503-1kg)*
  34,87g Natriumchlorid *(J.T. Baker 3624-01)*
- Mayers Hämalaunlösung *(Merck 109246)*

Reagenzien

- Epitope Retrival Solution (pH 6,0) *(Dako K5207)*
- Swine Serum *(Dako X0901)*
- Anti-IDO-1 *(Atlas HPA023072)*
- Dako Real Antibody Diluent *(Dako S0809)*
- Swine Anti Rabbit *(Dako E0353)*
- ABC-Alkalische Phosphatase (AP) *(Vectastain AK5200)*
- Permanent Red *(Dako K0640)*

Verbrauchsmaterialien

- Pipettenspitzen *(Sarstedt)*
- Deckgläser 24x60mm *(Roth, Karlsruhe H 878)*
- Sample container with plastic cap *(Sterilin STER129A)*
- Aquatex, wässriges Eindeckmittel *(Merck 108562)*

Geräte

- Varistain™ 24-4 Automatic Slide Stainer *(Thermo Scientific)*
- Wasserbad *(GFL)*
- Schüttelgerät ST5 *(CAT)*
- Pipetten *(eppendorf Reaserch 1000 28125; 20 244700 und 14408)*
- Digitales FireWire Farbkamerasystem *(Leica DFC320)*
- Mikroskop *(Zeiss, Axioskop 40)*
- Bildbearbeitungsprogramm *(Adobe Photoshop 7.0)*

3.1.3.4 Material für die Vimentin- und Cytokeratin-7-IHC

Puffer und Lösungen

- Aqua destillata
- Salzsäure (Chlorwasserstoff (HCL) in Wasser gelöst) 4 mol/l *(Roth N076.1)*
- Xylol *(Sigma Aldrich UN1307)*
- Alkoholreihe (Ethanol 80%, 96%, 99%) *(Walter UN1170)*
- Vimentin-Immunhistochemie
    - Citrat-Puffer (pH 6,0) 10mM

      2000ml Aqua destillata

5,88g tri-Natriumcitrat-Dihydrat *(Merck 106448)*

- CK-7-Immunhistochemie
  - TEC-Puffer (pH 9,0)
    - Stammlösung

      1000ml Aqua destillata

      10mMol Trizma base *(Sigma T1503-1kg)*

      1mMol EDTA *(Merck 108418)*
    - Arbeitslösung

      Stammlösung 1:10 verdünnen mit AD

      0,3ml Tween 20 *(Merck 817072)*
- H_2O_2-Methanol 0,5%

  200ml Methanol *(Walter UN1230)*

  3,33ml Perhydrol 30% *(Merck UN2014)*
- TBS-Puffer (pH 7,4)
  - Stammlösung

    1000ml Aqua destillata

    60,5g Trizma base *(Sigma T1503-1kg)*

    86,6g Natriumchlorid *(Roth 3957.1)*
  - Arbeitslösung

    Stammlösung 1:10 verdünnen mit AD
- BSA-Lösung 2%

  50ml Aqua destillata

  1g Albumin Fraktion V *(Roth 8076.2)*
- Hematoxylin solution according to Mayer *(Sigma 51275-1L)*
- Entellan *(Merck 107960)*

<u>Reagenzien</u>

- Blocking Solution (Vectastain-ABC-Kit) *(Vector Laboratories PK-4002)*

  1ml TBS Arbeitslösung (pH 7,4)

  20µl Normal Serum (Horse) *(Vector Laboratories PK-4002)*

- Anti-Vimentin-Antikörper

  (monoclonal mouse anti vimentin Clone V9, Dako M0725 LOT 00056622)
- Anti-CK-7-Antikörper

  (Clone OV-TL 12/30 Dako M7018 monoclonal mouse anti-human LOT 00056994)

- Secondary-Antibody-Reagenz *(Vector Laboratories PK-4002)*
  - 1ml TBS Arbeitslösung (pH 7,4)
  - 20µl Normal Serum *(Vector Laboratories PK-4002)*
  - 20µl biotinylated Anti-Mouse IgG *(Vector Laboratories PK-4002)*
- ABC-Reagenz (Vectastain-ABC-Kit) *(Vector Laboratories PK-4002)*
  - 1ml TBS Arbeitslösung (pH 7,4)
  - 20µl A *(Vector Laboratories PK-4002)*
  - 20µl B *(Vector Laboratories PK-4002)*
- DAB-Substrat (Peroxidase Substrate Kit DAB) *(Vector Laboratories SK-4100)*
  - 5ml Aqua destillata
  - 2 Tropfen Buffer *(Vector Laboratories SK-4100)*
  - 4 Tropfen DAB *(Vector Laboratories SK-4100)*
  - 2 Tropfen H_2O_2 *(Vector Laboratories SK-4100)*

<u>Verbrauchsmaterialien</u>

- Pipettenspitzen *(Sarstedt; Eppendorf)*
- Reaktionsgefäße *(Eppendorf; Greiner)*
- Deckgläser 24 x 60mm *(Roth H878)*
- Dako Pen *(Dako S2002)*

<u>Geräte</u>

- Mikrowelle *(Exquisit Continent MW800)*
- Pipetten *(eppendorf Reaserch 1000 28125; 20 244700 und 14408)*
- pH-Meter „inoLab“ *(WTW)*
- Magnetrührer *(IKAMAG RCT)*
- Präzisionswaage *(Kern KB)*
- Wasserbad *(GFL)*
- Plattformschüttler *(Heidolph Polymax 1040)*
- Schüttelgerät *(Vortex-Genie 2)*
- Mikroskop *(Zeiss Axioskop 40)*
- Kamera *(Leica DFC320)*

3.1.3.5 Material für die Massenspektrometrie

Puffer, Lösungen und Reagenzien

- Butanol-HCl
  - 100µl Acetylchlorid *(Sigma-Aldrich 239577)*
  - 900ml n-Butanol *(Sigma-Aldrich B7906)*
- Aminosäure-Standard-Mischung (1:1) *(Waters)*
  - Isotopisch markierte Aminosäuren
  - Methanol (oder Methanol/H_2O)
- Mischung (80:20)
  - Acetonitril *(271004 Sigma-Aldrich)*
  - H_2O
- Reagenzien-Kit *(Waters)*

Verbrauchsmaterialien

- Serumröhrchen „S-Monovette“ 7,5ml Z-Gel *(Sarstedt)*
- Microtube 1,5ml Safe Seal *(Sarstedt 72706400)*
- Pipettenspitzen *(Sarstedt; Eppendorf)*
- standardisiertes Filterpapier *('Whatman 903', Dassel, Germany)*
- Filterplatten 0,45µm *(Millipore, Schwalbach)*
- Polypropylen-96-well-Platte *(Greiner bio-one, Solingen-Wald)*
- Plastikdeckel *(Cap for masterblock, Greiner bio-one)*
- Biochrom 20 - Amino Acid Analyzers *(80-2114-73 Pharmacia)*

Geräte

- Zentrifuge „Megafuge 1.0R“ *(Heraeus Instruments)*
- Zentrifuge 51080R *(Eppendorf)*
- Pipetten *(eppendorf Reaserch 1000 28125; 20 244700 und 14408)*
- Puncher *(Wallac DBS Multipuncher, PerkinElmer Life Science)*
- Heizplatte *(Schrader Nentershausen)*
- Brutschrank *(Heraeus)*
- Waters 2796 HPLC-System *(Waters, Eschborn)*
- Quattro-Micro-ms/ms-System *(Micromass, Eschborn)*

3.2 Methoden

3.2.1 Verarbeitung des Plazentagewebes

Das Plazentagewebe wurde nach der Geburt frisch gesammelt. Zwischen dem Zeitpunkt der Plazentageburt und der Weiterverarbeitung des Materials lagen maximal 3 Stunden, in denen das Material kühl gelagert wurde.

Von jeder Plazenta wurden von der maternalen Seite 2 1,0x1,0x0,5cm dicke Proben entnommen.

Das Gewebe wurde anschließend in einer beschrifteten (APgp) Gewebekassette für max. 24 Stunden in 3,7%igem gepufferten Formalin fixiert.

Nach Fixierung des Materials in Formalin wurde das Gewebe dreimal in einem 0,2-molaren Phosphatpuffer gewaschen und anschließend für maximal 7 Tage in oben beschriebenem Puffer bei 4°C gelagert. Diese Vorarbeiten wurden im gynäkologischen Forschungslabor unter der Leitung von Frau Dr. Milde-Langosch durchgeführt.

Die Weiterverarbeitung erfolgte im Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Leitung: Prof. Dr. med. Udo Schumacher). Dort erfolgte die Einbettung des formalinfixierten Gewebes in Paraffin. Dazu wurde das Gewebe innerhalb von 29 Stunden zuerst durch sukzessive Durchtränkung mit Isopropanol in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend mit erwärmtem (60°C) und verflüssigtem Paraffin durchtränkt. Danach wurde das paraffingetränkte Gewebe in kleine Paraffinquader eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden anschließend mithilfe eines Schlittenmikrotoms jeweils zehn 5µm dicke Serienschnitte pro Präparat hergestellt.

3.2.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

An allen Schnitten wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) durchgeführt, um das Plazentagewebe nach allgemeinen histologischen und morphologischen Gesichtspunkten zu untersuchen.

Die Schnitte werden entsprechend des Färbeprotokolls in die folgenden Lösungen getaucht:

- Entparaffinieren entlang der absteigenden Alkohlreihe
  - zweimal 20 Minuten in Xylol
  - zweimal für je 5 Minuten in 100%iges, 96%iges, 80%iges Ethanol
- kurz in Aqua destillata
- 3 Minuten in Mayers Hämatoxylin-Lösung
- kurz in 3%iges HCl/Ethanol
- 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser „bläuen“
- 3 Minuten in Eosin
- zweimal in H_2O schwenken
- Entwässern entlang der aufsteigenden Alkoholreihe
  - zweimal für je 5 Minuten in 80%iges, 96%iges, 100%iges Ethanol
  - zweimal 10 Minuten in Xylol
- 1 Tropfen Eindeckmedium auftragen
- Deckgläschen auflegen
- Über Nacht trockenen lassen

3.2.1.2 Immunhistochemie

3.2.1.2.1 Allgemein

Zur Detektion der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in der Plazenta wurde das Färbeverfahren der Immunhistochemie angewendet. Dabei werden Proteine als Antigene mit Hilfe von Antikörpern markiert und anschließend durch Detektionssysteme, die an den Antikörper gebunden sind, sichtbar gemacht.

Um im Plazentagewebe klar zwischen Deziduazellen sowie extra- und intravillösem Trophoblasten unterscheiden zu können, wurde an allen Schnitten zusätzlich Cytokeratin-7 (CK-7) sowie Vimentin gefärbt.
Sowohl die Färbung von IDO als auch von Cytokeratin-7 und Vimentin wurde mit Hilfe der ABC-Methode durchgeführt.
Die IDO-IHC wurde im Labor der Anatomie durchgeführt, die CK-7- und Vimentin-IHC sowie die HE-Färbung im gynäkologischen Forschungslabor.

3.2.1.2.2 Die ABC-Methode

Die immunhistochemische Färbung nach der ABC-Methode (Abbildung 2), wobei ABC für Avidin-Biotin-Complex steht, beruht auf der hohen Affinität des Glycoproteins Avidin zum Vitamin Biotin (Hsu und Raine 1981).
Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, wobei es nicht unbedingt zu einer Besetzung aller Bindungsstellen kommen muss.
Bei der ABC-Methode wird zuerst der Primärantikörper auf das Präparat gegeben, welcher in einer Antigen-Antikörper-Reaktion das gesuchte Protein bindet. Anschließend wird ein Sekundärantikörper hinzugegeben, welcher wiederum am Primärantikörper ansetzt.
Der Sekundärantikörper ist für die beschriebene Methode biotinyliert, wobei Biotin kovalent an den Antikörper gebunden ist.
Danach wird das ABC-Reagenz hinzugefügt (Avidin-Biotin-Complex, ABC). Der Komplex besteht aus Avidin und einem biotinylierten Enzym, der Meerrettich-Peroxidase oder der Alkalischen Phosphatase, wobei mindestens eine Biotin-Bindungsstelle des Avidin unbesetzt ist.

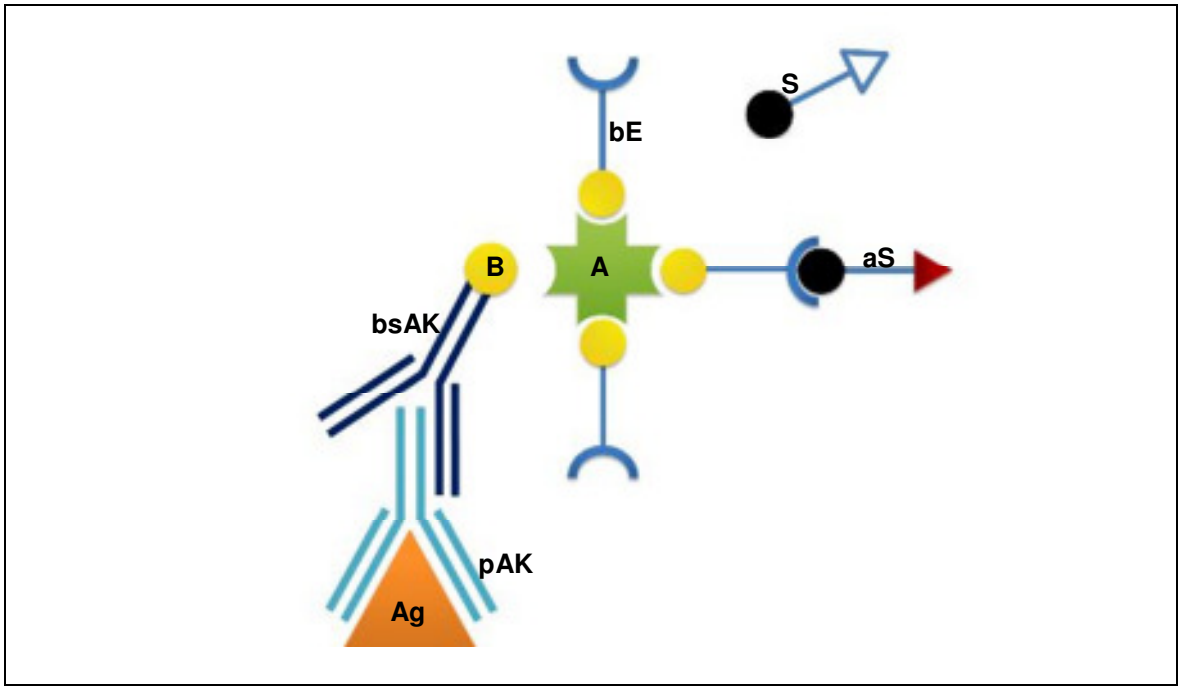


Abbildung 2: Die ABC-Methode. (angelehnt an eine Grafik aus Pathologie-online 1997-2015)
Legende: Ag = Antigen, pAK = Primärantikörper, bsAK = biotinylierter Sekundärantikörper, B = Biotin, A = Avidin, bE = biotinyliertes Enzym, S = Substrat, aS = aktiviertes Substrat.

Aufgrund seiner hohen Affinität zu Biotin bindet das Avidin mit der freien Bindungsstelle nun an das an den Sekundärantikörper gekoppelte Biotin.
Durch Zugabe der Substrat-Chromogen-Lösung wird der Komplex sichtbar gemacht.
In der vorliegenden Arbeit wurde zur IDO-Detektion Permanent Red verwendet. Die Detektion von Vimentin und CK-7 wurde mit DAB-Substrat durchgeführt.

3.2.1.2.3 Färbeverfahren für IDO

Im Folgenden wird der immunhistochemische Prozess zur Färbung mit dem Anti-IDO-1-Antikörper beschrieben.

Entparaffinierung

Automatisches Entparaffinieren und Rehydratisieren der Schnitte über eine absteigende Alkoholreihe im Varistain™ Automatic Slide Stainer für 35 Minuten.

Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung

- Epitop-Retrival-Solution in einer Verdünnung von 1:10 mit AD auf 97°C im Wasserbad für 30 Minuten erhitzen
- Schnitte in die erhitzte Epitop-Retrival-Solution tauchen und für weitere 25 Minuten im Wasserbad bei 97°C belassen
- Den Puffer inklusive der Schnitte aus dem Wasserbad entfernen und für 30 Minuten abkühlen
- Die Hälfte des Puffers abgießen, mit AD auffüllen und für weitere 10 Minuten abkühlen
- Schnitte aus dem Puffer nehmen und dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS-Puffer spülen

Blocking

- Swine-Serum in TBS-Puffer 1:10 verdünnen
- Überschüssige Flüssigkeit von den Schnitten abklopfen und diese in die feuchte Kammer legen
- Pro Schnitt ca. 100µl Blockingsolution auftragen, bis das Material vollständig bedeckt ist

- Bei Raumtemperatur für 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubieren
- Swine-Serum abklopfen und Schnitte zurück in die feuchte Kammer legen

Primärer Antikörper

- Anti-IDO-1-AK in Antibody-Diluent 1:500 verdünnen
- Pro Schnitt ~100µl primären AK geben, bis das Material vollständig bedeckt ist
- Über Nacht bei 4°C in der Kühlkammer inkubieren
- AK abklopfen und Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS-Puffer spülen
- Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und in die feuchte Kammer legen

Sekundärer Antikörper

- Swine-Anti-Rabbit in Antibody-Diluent 1:200 verdünnen
- Pro Schnitt ~100µl sekundären AK geben, bis das Material vollständig bedeckt ist
- Bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubieren
- Sekundären AK abklopfen und Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS-Puffer spülen
- Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und in die feuchte Kammer legen

Detektion

- Pro Schnitt ~100µl ABC-AP-Reagenz (dieses 30 Minuten vorher ansetzen) geben, bis das Material vollständig bedeckt ist
- Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS-Puffer spülen
- Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und in die feuchte Kammer legen
- Pro Schnitt ~100µl DAKO Liquid Permanent Red geben, bis das Material vollständig bedeckt ist
- Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren und dann Färbelösung abgießen
- Schnitte für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
- Schnitte für 2 Minuten in AD spülen

Gegenfärbung

- Schnitte für 3 Sekunden in Hämalaun-Lösung tauchen
- Schnitte für 5 Minuten unter fließendem warmen Leitungswasser bläuen
- Schnitte für 2 Minuten in AD spülen

Dehydrierung und Eindeckelung

- Entwässerung über die aufsteigende Alkoholreihe im Varistain™ Automatic Slide Stainer innerhalb von ca. 100 Minuten
- Überschüssiges Xylol abklopfen
- Deckgläschen mit einem Tropfen Entellan auf dem Objektträger fixieren

3.2.1.2.4 Färbeverfahren für Vimentin

Entparaffinierung

- Schnitte zweimal für jeweils 10 Minuten in Xylol tauchen
- Schnitte entlang der absteigenden Alkohlreihe je zweimal für jeweils 5 Minuten in 99%iges, 96%iges und 80%iges Ethanol tauchen
- Schnitte zweimal für 5 Minuten in AD spülen

Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung

- Citratpuffer in der Mikrowelle aufkochen, anschließend 1 Minute abkühlen lassen
- Schnitte für 30 Minuten in den erhitzten Puffer eintauchen und dreimal für jeweils 5 Minuten in AD spülen
- Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 0,5%iges H_2O_2-Methanol tauchen und dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS-Puffer spülen
- Material auf jedem Objektträger mit Fettstift umranden, um das Abfließen der aufgetragenen Seren zu verhindern
- Überschüssige Flüssigkeit von den Schnitten abklopfen und diese in die feuchte Kammer legen

Blocking

- Pro Schnitt ~100µl Blockingsolution geben, bis das Material vollständig bedeckt ist

- In der feuchten Kammer für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und in die feuchte Kammer legen

Primärer Antikörper

- Anti-Vimentin-AK 1:50 in 2%igem BSA verdünnen
- Pro Schnitt ~100µl primären AK geben, bis das Material vollständig bedeckt ist
- Über Nacht bei 4°C in der Kühlkammer inkubieren
- Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS-Puffer spülen
- Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und in die feuchte Kammer legen

Sekundärer Antikörper

- Pro Schnitt ~100µl sekundären AK geben, bis der Schnitt vollständig bedeckt ist
- In der feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubieren
- Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS-Puffer spülen
- Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und in die feuchte Kammer legen

Detektion

- Pro Schnitt ~100µl ABC-Reagenz (dieses 30 Minuten vorher ansetzen) geben, bis das Material vollständig bedeckt ist
- In der feuchten Kammer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS-Puffer spülen
- Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und in die feuchte Kammer legen
- Pro Schnitt ~100µl DAB-Substrat geben, bis das Material vollständig bedeckt ist
- In der feuchten Kammer für 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (feuchte Kammer lichtdicht abdecken)
- Färbelösung abgießen und zweimal für jeweils 5 Minuten in AD spülen

Gegenfärbung

- Schnitte für 5 Minuten in Hämatoxylin-Lösung eintauchen
- Schnitte für 10 Sekunden in AD spülen und für 5 Minuten unter fließendem warmen Leitungswasser bläuen

Dehydrierung und Eindeckelung

- Dehydrieren in einer aufsteigenden Alkoholreihe, dazu Schnitte je zweimal für jeweils 5 Minuten in 80%iges, 96%iges und 99%iges Ethanol sowie zweimal für jeweils 10 Minuten in Xylol eintauchen
- Überschüssiges Xylol abklopfen
- Deckgläschen mit einem Tropfen Entellan auf dem Objektträger fixieren

3.2.1.2.5 Färbeverfahren für Cytokeratin-7

Entparaffinierung

vgl. 3.2.1.2.4

Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung

- TEC-Puffer (pH 9,0) in der Mikrowelle aufkochen, anschließend für 1 Minute abkühlen
- Schnitte für 30 Minuten in den erhitzten Puffer eintauchen
- Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in AD spülen
- Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 0,5%iges H_2O_2-Methanol tauchen
- Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS-Puffer spülen
- Material auf jedem Schnitt mit Fettstift umranden, um das Abfließen der aufgetragenen Seren zu verhindern
- Überschüssige Flüssigkeit von den Schnitten abklopfen und diese in die feuchte Kammer legen

Blocking

vgl. 3.2.1.2.4

Primärer Antikörper

- Anti-CK-7-AK 1:100 in 2%igem BSA verdünnen
- Pro Schnitt ~100µl primären AK geben, bis das Material vollständig bedeckt ist
- In der feuchten Kammer über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubieren
- Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in TBS-Puffer spülen

- Überschüssige Flüssigkeit abklopfen und Schnitte in die feuchte Kammer legen

Sekundärer Antikörper

vgl. 3.2.1.2.4

Detektion

vgl. 3.2.1.2.4

Gegenfärbung

vgl. 3.2.1.2.4

Dehydrierung und Eindeckelung

vgl. 3.2.1.2.4

3.2.1.2.6 Lichtmikroskopische Beurteilung

Alle Schnitte wurden von drei unabhängigen Begutachtern unter Anonymisierung analysiert. Dabei wurde die Beurteilung an das Verfahren des „Immunreaktiven Scores (IRS)“ (Remmele und Stegner 1987) angelehnt, bei dem vor allem die Farbintensität und der prozentuale Anteil der angefärbten Zellen beurteilt wird. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde ein vereinfachter Beurteilungsscore – ähnlich dem in anderen IDO-Studien – angewandt (Santoso et al. 2002, Hönig et al. 2004).

Bei keiner bis lediglich vereinzelter Anfärbung IDO-positiver Zellen wurde der Schnitt mit einem IDO-Score von ’1’ = ’schwach’ bewertet. Das zunehmende Auftreten IDO-positiver Zellen sowie die intensivere Anfärbung wurde als ’moderat’ (IDO-Score = 2) und die flächendeckend starke IDO-Anfärbung als ’stark’ (IDO-Score = 3) definiert (Abbildung 9).

Bei abweichenden Beurteilungen wurde ein Mittelwert aus den drei Scores der Gutachter gebildet und dieser dann verwendet.

3.2.2 Verarbeitung des Blutserums

Das Blut wurde präpartal in einem Serumröhrchen entnommen und für maximal 12 Stunden kühl gelagert.
Anschließend wurde es bei 4°C und 3400U/min in der Zentrifuge Megafuge 1.0R zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und davon jeweils 1ml in ein Eppendorf-Gefäß gefüllt. Die Proben wurden anschließend bei -20°C eingelagert. Diese Vorarbeit wurde im gynäkologischen Forschungslabor unter der Leitung von Frau Dr. Milde-Langosch durchgeführt.

3.2.2.1 Tandem-Massenspektrometrie

3.2.2.1.1 Prinzip der Tandem-Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) stellt ein Verfahren zum Messen von Massen und Molekülen dar, bei dem die zu untersuchende Komponente, der Analyt, in die Gasphase überführt und ionisiert wird. Die Ionen werden dann durch ein elektrisches Feld beschleunigt und durch den Analysator in einem Vakuum nach dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt, wobei jedem ein spezifisches m/z zuzuordnen ist. Der vereinfachte Aufbau eines Massenspektrometers beinhaltet somit eine Probezuführung, die Ionenquelle, den Massenanalysator und den Ionendetektor.
Der beispielhafte Ablauf einer MS-Analyse ist wie folgt: Die Ionen werden in der Ionenquelle gebildet, auf kinetische Energie beschleunigt und durch den Massenanalysator nach ihren m/z-Werten aufgeteilt. Der Detektor misst im nächsten Schritt die Ladung und den Strom, daraus wird ein Massenspektrum erstellt, bei dem die Ionenintensitäten gegen das m/z-Verhältnis aufgetragen werden (Bahr und Karas 2002).
Die in dieser Arbeit verwandte Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) erlaubt darüber hinaus die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Analysten aus einer Probe mit einer gleichzeitig erhöhten Stoffspezifität (Lukacs et al. 2004). Sie besteht aus zwei Stufen der Massenanalyse (Bahr und Karas 2002):
Stufe 1: Auswahl der Ionensorte und Stufe 2: Analyse der einzelnen Fragmente.

3.2.2.1.2 Durchführung der Tandem-Massenspektrometrie

Zur Weiterverarbeitung für die massenspektrometrischen Analyse wurde das Serum kurz aufgetaut, mit Hilfe des Vortexers geschüttelt und dann jeweils ca. 100µl Serum auf das standardisierte Filterpapier gegeben und über Nacht luftgetrocknet.
Die massenspektrometrische Analyse wurde im Screening Center Nord für das Neugeborenen-Stoffwechsel-Screening unter Leitung von Herrn Dr. Zoltan Lukacs durchgeführt (Lukacs und Santer 2006).

3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch Frau Dr. med. Tanja Kottmann der Clinical Research Organisation und wurde mit Hilfe von SPSS Statistics für Windows, Version 22.0 durchgeführt (SPSS Inc., Chicago, USA).
Bei der Darstellung der Daten wurden die metrischen Variablen als Mittelwerte und Mediane, die Streumaße als Standardabweichung und Quartile und die kategorisierten/nominalen Daten als absolute und relative Häufigkeiten angegeben.
In einem ersten Schritt wurden die metrischen Variablen mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf ihre Normalverteilung überprüft.
Nicht normalverteilten Variablen (Shapiro-Wilk-Test: $p<0,05$) wurden im Weiteren durch nichtparametrische Test untersucht. Handelte es sich dabei um 2 unabhängige nicht normalverteilte Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test, bei mehr als 2 unabhängigen, nicht normalverteilten Variablen, der H-Test nach Kruskal und Wallis verwendet.
Bei normalverteilten Variablen (Shapiro-Wilk-Test: $p\geq0,05$) wurden parametrische Tests verwendet. Dabei wurde beim Vergleich von mehr als 2 unabhängigen normalverteilten Variablen die einfaktorielle ANOVA angewendet.
Der Chi-Quadrat-Test und der exakte Test nach Fisher wurden anwendet, wenn kategorisierte Daten vorlagen.
Um die Übereinstimmung verschiedener Untersucher in ihren ordinal skalierten Befunden zu beurteilen wurde der Rangkorrelationskoeffizient Kendall-Tau-b verwendet. Der Rangkorrelationskoeffizient trifft eine Aussage bezüglich des

Übereinstimmungsgrades der Untersuchungsergebnisse, dabei entspricht Kendall-Tau-b=1 einer vollkommenen Übereinstimmung und ein Kendall-Tau-b, das gegen 0 geht, einer sehr schwachen Übereinstimmung, die sich auch zufällig ergeben könnte.
Bei allen oben genannten Tests erfolgte eine zweiseitige Signifikanzprüfung. Ein p-Wert kleiner gleich 0,05 ($p \leq 0,05$) wurde als statistisch signifikant bewertet.

Auch die verwendeten Grafiken wurden mit SPSS erstellt. Kategorisierte Daten wurden durch einfache und gruppierte Balkendiagramme dargestellt.
Im Falle von normalverteilten Stichproben wurden Fehlerbalken zur Veranschaulichung der Mittelwerte verwendet, wobei als Streumaß der Standardfehler aufgetragen wurde.
Bei nicht normalverteilten Variablen wurden Box-Plots zur Darstellung der Mediane und Quartilsabstände genutzt. Innerhalb der Boxen sind der Median und die 25.-75. Perzentile zu finden, der die T-Balken entsprechen dem kleinsten und dem größten Wert, dabei sind Ausreißer und Extremwerte nicht mit einbezogen. Ausreißer, in der Grafik als Kreis dargestellt, liegen 1,5-3 Boxenlängen außerhalb der Box. Extremwerte, als Sternchen dargestellt, liegen mehr als 3 Boxenlängen außerhalb der Box.
Einige zusätzliche Abbildungen wurden mit Microsoft Word 2010 und Microsoft Excel 2008 erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Kollektivbeschreibung

Im Rahmen dieser Studie wurde ein Kollektiv von 73 Patientinnen untersucht. Für jede Patientin wurde das oben beschriebene Material (siehe 3.1.2) gesammelt, die klinischen und histologischen Parameter ermittelt und umfangreiche Follow-Up-Daten erhoben (siehe 11.5).
Das Kollektiv wurde in drei Gruppen eingeteilt: Das Kontrollkollektiv bestehend aus 43 Patientinnen ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung, eine Gruppe von 19 Patientinnen, die ausschließlich an einer Präeklampsie erkrankten und 11 Patientinnen, welche die Symptome eines HELLP-Syndrom aufwiesen, teilweise traten diese Symptome in Kombination mit den Symptomen einer Präeklampsie auf.

In Tabelle 4 und 5 werden die klinischen Charakteristika der eingeschlossenen Patientinnen zusammengefasst. Dabei wurde das Augenmerk auf mögliche Risikofaktoren für eine Präeklampsie oder ein HELLP-Syndrom (Alter, adipöser BMI, Diabetes mellitus (neu aufgetretener Gestationsdiabetes (GDM) oder vorbestehender Diabetes, Nikotinabusus und Nulliparität) sowie auf mögliche Konsequenzen aus der Schwangerschaftserkrankung (Frühgeburtlichkeit und Entbindungsmodus) und Begleiterscheinungen (Plazentainsuffizienz) gelegt.

Entsprechend der Einschlusskriterien und wie per definitionem zu erwarten zeigten sich signifikante Unterschiede ($p<0,001$) beim Auftreten einer Proteinurie (Tabelle 5), zwischen den systolischen und diastolischen Blutdruckwerten (Tabelle 4) und beim mittleren arteriellen Druck (Abbildung 3 und Tabelle 4).
Eine Proteinurie konnte bei allen Präeklamptikerinnen (n=19), bei 63,6% (n=7) der Patientinnen mit einem HELLP-Syndrom und bei 2,3% (n=1) der vermeintlich gesunden Schwangeren diagnostiziert werden (Tabelle 5).
Der mittlere arterielle Blutdruck (MAD), der systolische Druck und auch der diastolische Blutdruck waren in der Gruppe der Patientinnen mit Präeklampsie am höchsten, gefolgt vom HELLP-Kollektiv und den Patientinnen ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung (Tabelle 4).

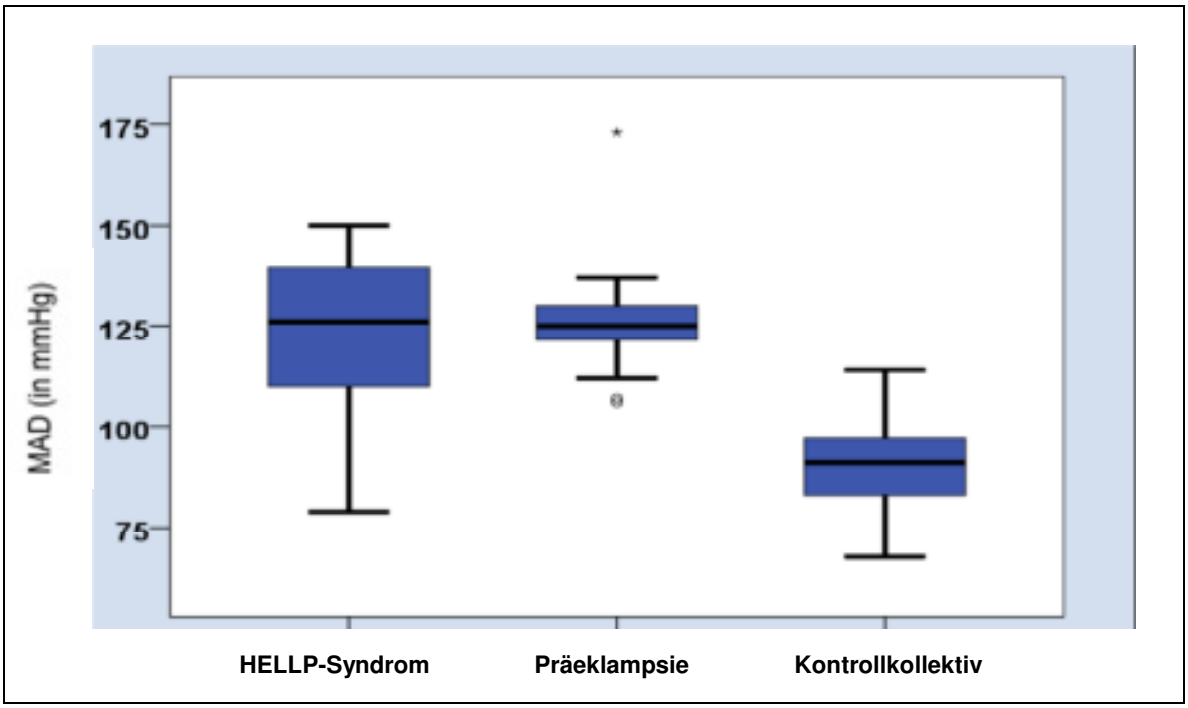


Abbildung 3: Mittlerer arterieller Druck (MAD).
Darstellung des MAD (in mmHg) als Box-Plot in Abhängigkeit von der Zuteilung zu einer Gruppe (HELLP, Präeklampsie und Kontrollkollektiv). Dabei liegt der Median und die 25.-75. Perzentile innerhalb der Box. Die T-Balken entsprechen dem kleinsten und dem größten Wert. Ausreißer, in der Grafik als Kreis dargestellt, liegen maximal 1,5-3 Boxenlängen außerhalb der Box. Extremwerte, als Sternchen dargestellt, liegen mehr als 3 Boxenlängen außerhalb der Box.

Untersuchte man die differenzierten Blutdruckwerte (Tabelle 4), ergab sich im Gesamtkollektiv ein durchschnittlicher Blutdruck von 141/86mmHg (MAD 105mmHg), im Präeklampsie-Kollektiv von 172/103mmHg (MAD 126mmHg), bei den HELLP-Patientinnen von 164/101mmHg (MAD 122mmHg) und bei den Schwangerschaftsverläufen ohne Hypertonus von 121/75mmHg (MAD 90mmHg).

	N	**Gesamt-kollektiv**	**Präeklampsie**	**HELLP**	**Kontrollkollektiv**	**p-Wert**
		Mittelwert (± SD)	Mittelwert (± SD)	Mittelwert (± SD)	Mittelwert (± SD)	
Alter (in Jahren)	73	34 (± 5)	34 (± 4)	34 (± 5)	33 (± 5)	0.622
SSW bei Geburt*	73	38 (± 3)	37 (± 4)	37 (± 3)	40 (± 3)	**<0.001**
MAD (in mmHg)	72	105 (± 22)	126 (± 14)	122 (± 21)	90 (± 10)	**<0.001**
Systolischer Druck (in mmHg)	72	141 (± 30)	172 (± 18)	164 (± 30)	121 (± 13)	**<0.001**
Diastolischer Druck (in mmHg)	72	86 (± 18)	103 (± 15)	101 (± 17)	75 (± 9)	**<0.001**

Tabelle 4: Patientencharakteristik 1.
Die Daten sind dargestellt als Mittelwert (± Standardabweichung (SD)) der jeweiligen Grundgesamtheit N. Ein p-Wert ≤0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen und „fett“ hervorgehoben. *Die SSW entspricht den bereits abgeschlossenen Schwangerschaftswochen.

Bei der Untersuchung der möglichen Risikofaktoren für eine hypertensive Schwangerschaftserkrankung (siehe 2.1.3.4) kam man zu folgenden Ergebnissen: Das durchschnittliche Alter aller Patientinnen lag bei 34 Jahren (Tabelle 4), dies gilt außerdem sowohl für die Patientinnen mit einer Präeklampsie als auch diejenigen mit einem HELLP-Syndrom. Lediglich die Patientinnen der Kontrollgruppe ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung waren durchschnittlich 33 Jahre alt. Damit ergibt sich kein signifikanter Unterschied (p=0,622) zwischen den Gruppen.

Auch bei der Untersuchung des BMI zeigte sich kein signifikanter Unterschied (p=0,536) zwischen den Patientinnen mit bzw. ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung (Tabelle 5).

		Präeklampsie		**HELLP-Syndrom**		**Kontrollkollektiv**		**p-Wert**
	N	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Gesamtkollektiv	73	19	(26.0)	11	(15.1)	43	(58.9)	
BMI								0.536
Normal (<25)	54	13	(68.4)	7	(63.6)	34	(79.1)	
Übergewichtig (25-30)	13	5	(26.3)	2	(18.2)	6	(14.0)	
Adipositas (>30)	6	1	(5.3)	2	(18.2)	3	(7.0)	
Diabetes mellitus (Typ I und II, GDM)	9	0	(0.0)	3	(27.3)	6	(14.0)	0.080
Nikotinabusus	3	1	(5.3)	1	(9.1)	1	(2.3)	0.576
Nulliparität	53	15	(78.9)	9	(81.8)	29	(67.4)	0.197
Entbindungsmodus								
Spontan	27	7	(36.8)	2	(18.2)	18	(41.9)	0.558
Sectio	40	10	(52.6)	9	(81.8)	21	(48.8)	0.143
Vaginal operativ	6	2	(10.5)	0	(0.0)	4	(9.3)	0.553
Frühgeburtlichkeit (<37+0 SSW)	15	5	(26.3)	6	(54.5)	4	(9.3)	**0.002**
Geburtsgewicht								0.354
SGA (<10. Perzentile)*	10	3	(15.8)	3	(27.3)	4	(9.3)	
eutroph (10.-90. Perz.)	50	10	(52.6)	6	(54.5)	34	(79.1)	
LGA (>90. Perzentile)**	2	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(4.7)	
Plazentainsuffizienz	11	6	(31.6)	2	(18.2)	3	(7.0)	**0.042**
Proteinurie	27	19	(100)	7	(63.6)	1	(2.3)	**<0.001**

Tabelle 5: Patientencharakteristik 2.
Die Daten sind dargestellt als n (Anzahl der Merkmalsausprägungen) und deren prozentualer Anteil an der jeweiligen Grundgesamtheit N. Ein p-Wert ≤0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen und „fett“ hervorgehoben
* SGA ist definiert als gesunde Neugeborene unter der 10. Perzentile. Die IUGR-Feten finden sich in der Gruppe der Patientinnen mit Plazentainsuffizienz. ** LGA = Large for gestational age.

Einen Nikotinabusus konnte man lediglich bei drei Patientinnen feststellen, jeweils eine in jeder Gruppe, somit ergab sich wiederum kein signifikanter Unterschied (p=0,576) (Tabelle 5).
Der Großteil, der in die Studie eingeschlossenen Patientinnen war erstgebärend (n=53 (72,6%)). Es waren 78,9% (n=15) der Präeklamptikerinnen erstgebärend, 81,8% (n=9) der Patientinnen mit einem HELLP-Syndrom und 67,4% (n=29) der Patientinnen ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung (Tabelle 5). Dies ergab keinen signifikanten Unterschied (p=0,197) zwischen den erkrankten Patientinnen und dem Kontrollkollektiv.
In das vorliegenden Kollektiv wurden 9 Patientinnen mit Diabetes mellitus eingeschlossen, dabei wurde nicht zwischen vorbestehendem (Typ I und II) und neu aufgetretenem Gestationsdiabetes unterschieden (Tabelle 5). Keine der Diabetikerinnen hatte eine Präeklampsie, 3 zeigten die Symptome eines HELLP-Syndroms und 6 keine Symptome einer hypertensiven Erkrankung. Es konnte wiederum kein signifikanter Unterschied (p=0,080) bei der Verteilung der Diabetikerinnen gezeigt werden.

Bei der Untersuchung der möglichen resultierenden Konsequenzen ergaben sich die folgenden Ergebnisse:
Beim Vergleich des Entbindungsmodus (Tabelle 5) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Spontanpartus: p=0,558, Sectio: p=0,143, vaginal operative Entbindung p=0,553).
Zur Untersuchung des Geburtsgewichtes wurde zwischen SGA- und LGA-Kindern, sowie eutrophen Neugeborenen unterschieden. Davon separat wurden Kinder mit einer Wachstumsrestriktion bei Plazentainsuffizienz untersucht.
Bei den Patientinnen ohne Plazentainsuffizienz zeigte sich kein signifikanter (p=0,354) Unterschied bei der Verteilung des Geburtsgewicht zwischen Patientinnen mit bzw. ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung (Tabelle 5). Eine Plazentainsuffizienz, definiert als eine Wachstumsrestriktion des Feten (IUGR) bei pathologischen utero- und fetoplazentaren Kreißlaufverhältnissen (siehe 2.2.3), trat in 11 Fällen auf. Es zeigten 31,6% (n=6) der präeklamptischen Patientinnen, 18,2% (n=2) der Patientinnen mit einem HELLP-Syndrom und 7% (n=3) der Patientinnen ohne Symptome einer hypertensiven Schwangerschafts-erkrankung eine Plazentainsuffizienz. Bei Patientinnen ohne hypertensive

Schwangerschaftserkrankung kam es signifikant seltener (p=0,042) zu einer Plazentainsuffizienz (Tabelle 5).

Im Gesamtkollektiv erfolgte die Entbindung durchschnittlich in der 39. SSW. Die Patientinnen mit einer Präeklampsie und mit einem HELLP-Syndrom wurden im Durchschnitt in der 38. SSW entbunden und damit signifikant früher (p<0,001) als die Patientinnen der Kontrollgruppe, die durchschnittlich in der 41. SSW entbunden wurden (Tabelle und Abbildung 4).

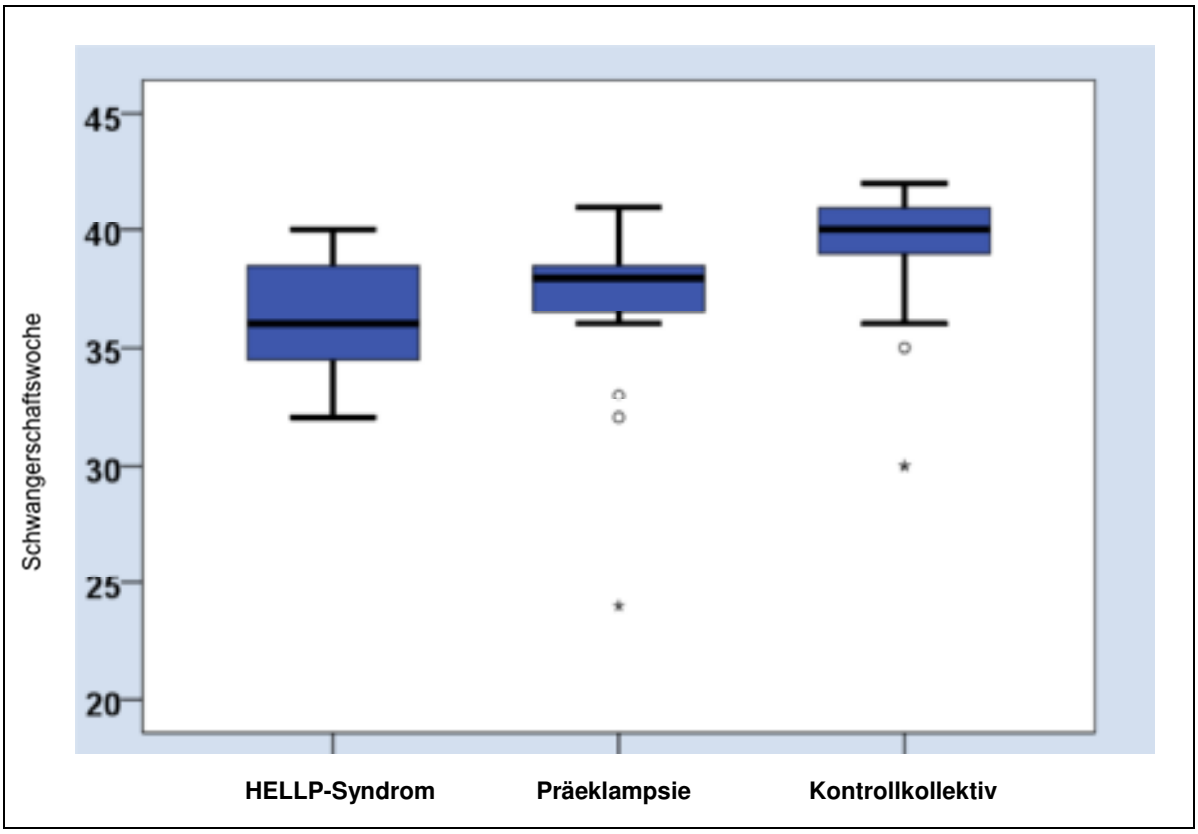


Abbildung 4: Schwangerschaftswoche bei Entbindung.
In dieser Abbildung wird die Schwangerschaftswoche in Abhängigkeit von der Zuteilung zu einer Gruppe (HELLP, Präeklampsie und Kontrollkollektiv) als Box-Plot dargestellt. Dabei liegt der Median und die 25.-75. Perzentile innerhalb der Box. Die T-Balken entsprechen dem kleinsten und dem größten Wert. Ausreißer, in der Grafik als Kreis dargestellt, liegen maximal 1,5-3 Boxenlängen außerhalb der Box. Extremwerte, als Sternchen dargestellt, liegen mehr als 3 Boxenlängen außerhalb der Box.

Die Untersuchung der Frühgeburtlichkeit ergab, dass es in 15 Fällen zu einer Entbindung vor 37+0 SSW kam, davon zeigten 5 Patientinnen die Symptome einer Präeklampsie und 6 Patientinnen die Symptome eines HELLP-Syndroms. Aus der Kontrollgruppe hatten 4 Patientinnen eine Frühgeburt. Patientinnen ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung hatten somit signifikant (p=0,002) seltener eine Frühgeburt (Abbildung und Tabelle 5).

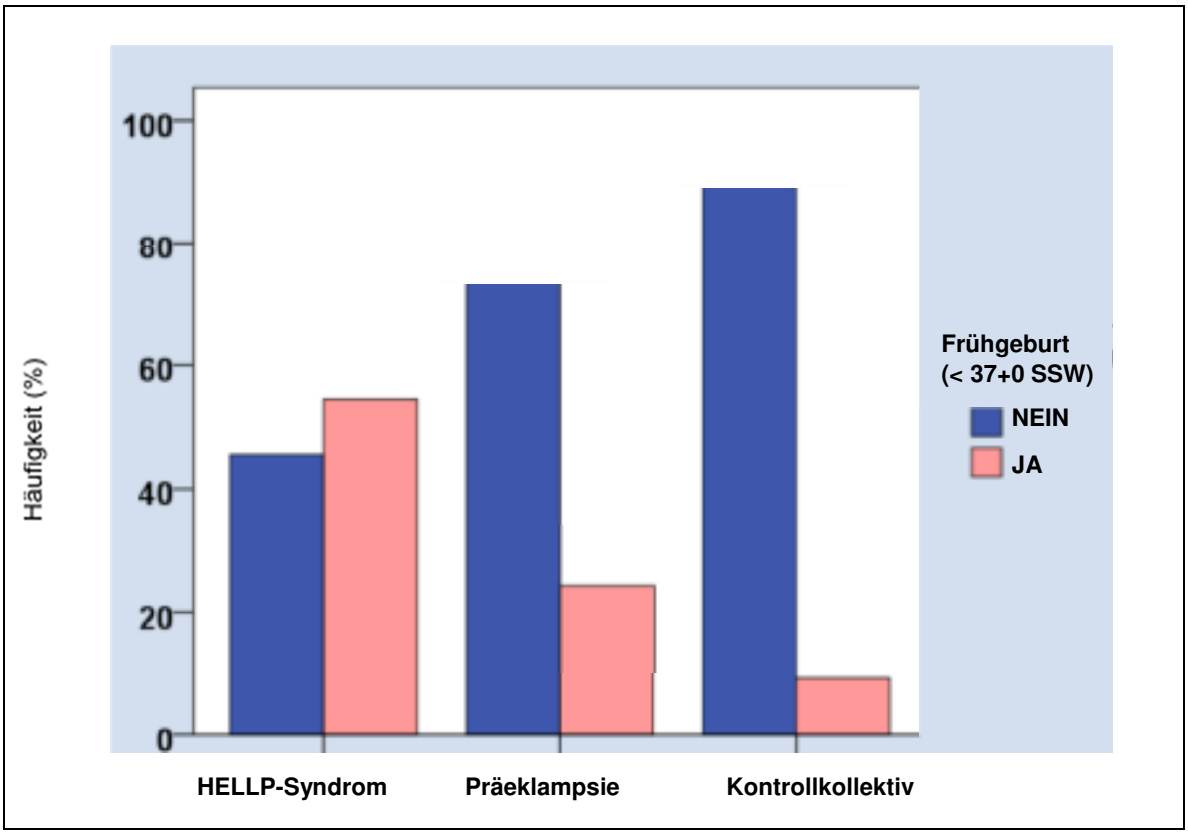


Abbildung 5: Frühgeburtlichkeit.
In diesem Balkendiagramm wird die relative Häufigkeit der Frühgeburt (< 37+0 SSW) in den verschiedenen Gruppen (HELLP, Präeklampsie und Kontrollkollektiv) aufgetragen. Die Frühgeburt wird rosa, eine termingerechte Geburt blau dargestellt.

4.2 IDO im Plazentagewebe

4.2.1 Immunhistochemie

Im Rahmen der Studie wurden 73 Plazentaproben – wie unter Material und Methoden beschrieben – immunhistochemisch gefärbt und klassifiziert.

Zu Beginn wurden alle Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (Abbildung 6), um eine morphologische Beurteilung des Gewebes durchführen zu können.

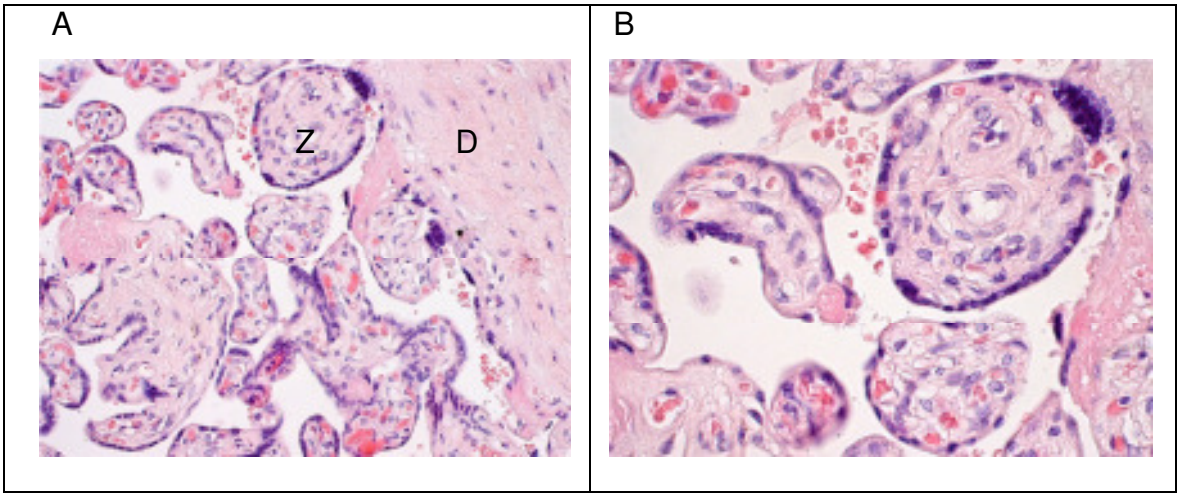


Abbildung 6: Hämatoxylin-Eosin-Färbung.
In der HE Färbung sieht man den typischen Aufbau der Plazenta mit Anschnitten der Zotten (Z) (bestehend aus dem Zottenstroma, umgeben vom Zyto- und Synzytiotrophoblasten) und der Dezidua (D). Die Zellkerne werden blau, das Stroma in einem hellen Rot-Ton angefärbt. Die Erythrozyten in den Zottengefäßen bzw. im intravillösen Raum sind rosa angefärbt. A: 20fache Vergrößerung. B: 40fache Vergrößerung.

Im nächsten Schritt wurden alle Schnitte mit Antikörpern gegen Vimentin und CK-7 gefärbt (Abbildung 7). Dies erfolgte zur eindeutigeren Differenzierung zwischen Deziduagewebe und Zottenepithel (Moll et al. 1982). Anti-Vimentin, ein mesenchymaler Marker, färbt das Zytoplasma des dezidualen Gewebes, das Zottenstroma und das Zottenendothel.
Zytokeratin-7 färbt die epithelialen Anteile der Zotten (den Zyto- und Synzytiotrophoblasten) sowie den invadierenden extravillösen Trophoblast in der Dezidua an.

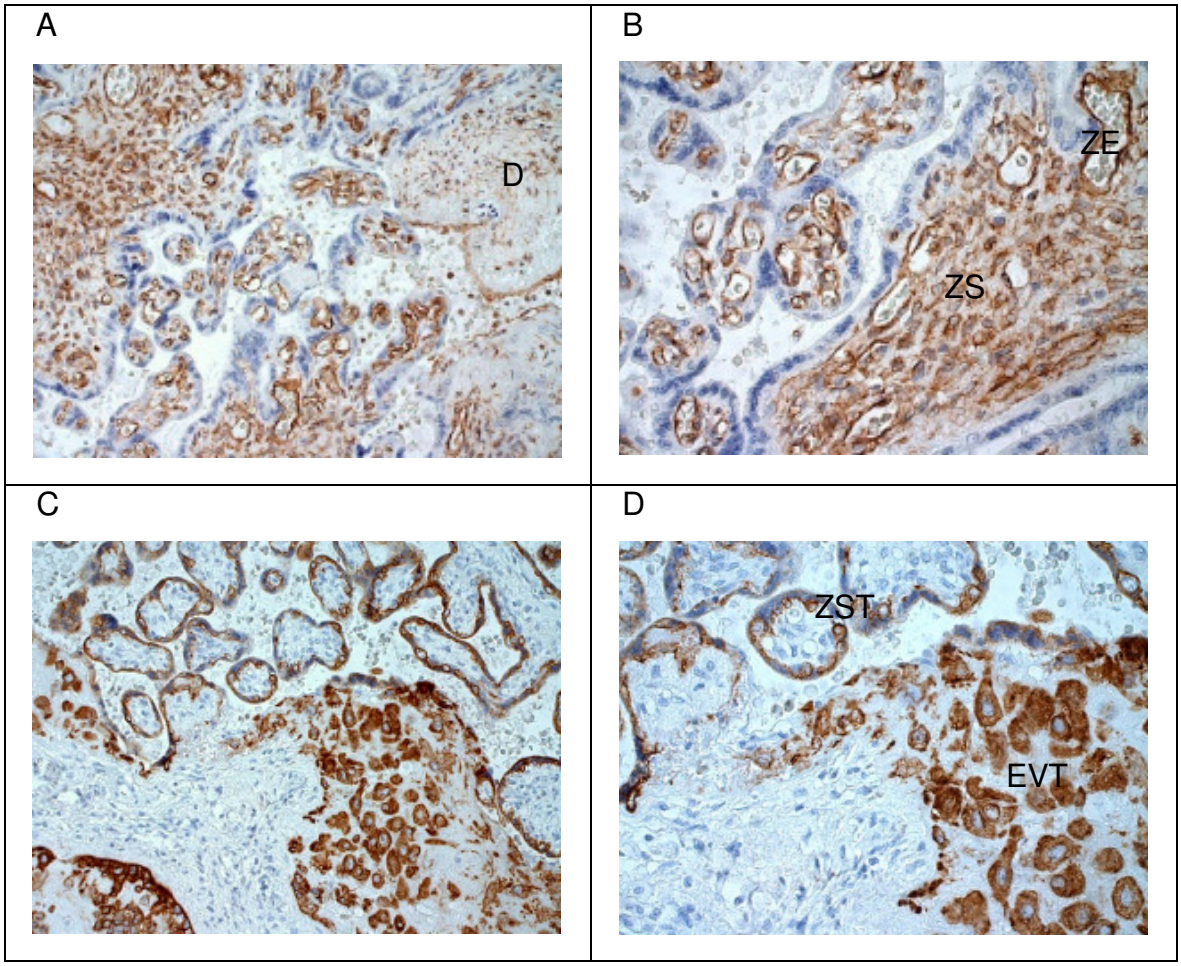


Abbildung 7: Anti-Vimentin-Färbung und Anti-CK-7-Färbung.
A (20fache Vergrößerung) und B (40fache Vergrößerung) zeigen die Anfärbung mit Anti-Vimentin-AK: Die mit Vimentin markierten Zellen mesenchymalen Ursprungs wurden mit Hilfe von DAB braun angefärbt. In den vorliegenden Schnitten wurden die Deziduazellen (D), das Zottenstroma (ZS) und das Zottenendothel (ZE) angefärbt.
C (20fache Vergrößerung) und D (40fache Vergrößerung) zeigen die Anfärbung mit Anti-CK-7 Antikörper: Die mit CK-7 markierten Zellen epithelialen Ursprungs wurden mit Hilfe von DAB braun angefärbt. In den vorliegenden Schnitten wurde der villöse Zyto-/Synzythiotrophoblast (ZST) und der extravillöse Trophoblast (EVT) angefärbt.

Anschließend wurde die IDO-Immunhistochemie durchgeführt. Die Einteilung des Expressionslevels erfolgt wie unter 3.2.1.2.6 beschrieben, angelehnt an den IRS-Score und andere IDO-Studien unter Anonymisierung durch drei unabhängige Gutachter (Remmele und Stegner 1987, Santoso et al. 2002, Hönig et al. 2004).

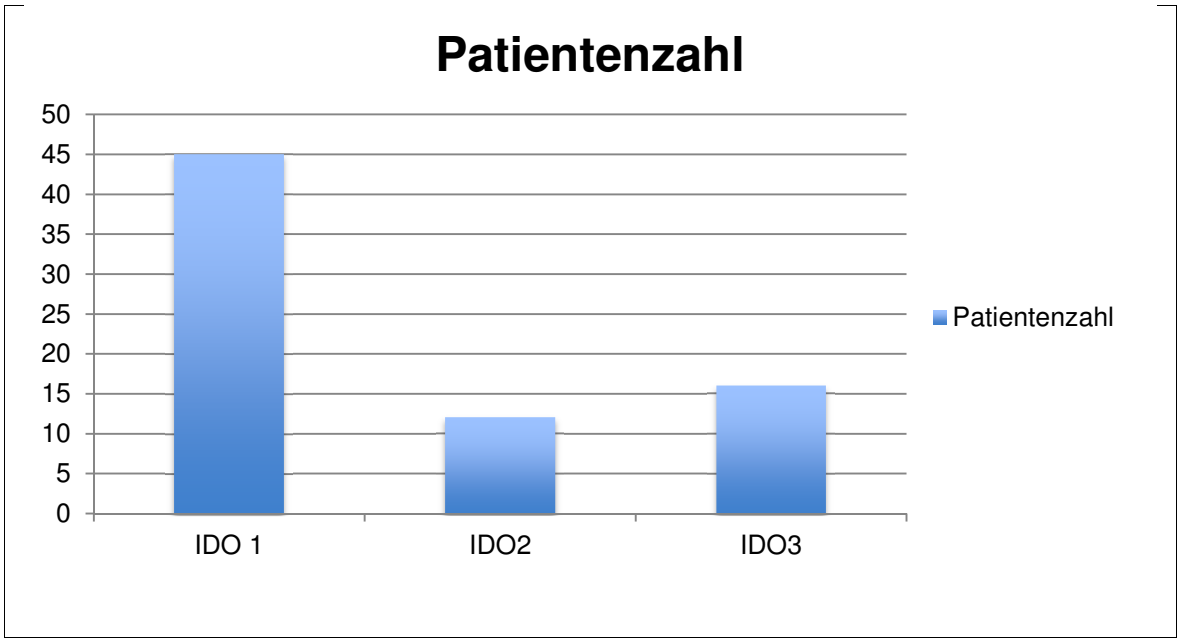
Bei abweichenden Beurteilungen wurde ein Mittelwert aus den drei Scores der Gutachter gebildet. Zu unterschiedlichen Ergebnissen kam es in 12 Fällen (16%), dabei wich maximal einer der Gutachter um einen Punkt von den anderen beiden ab.

Zur Beurteilung der Übereinstimmungsgüte zwischen den jeweiligen Gutachtern wurde der Rangkorrelationskoeffizient Kendall-Tau-b verwendet (Tabelle 6). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich zwischen allen Gutachtern ein Kendall-Tau-b von >0,81 und damit eine sehr gute Übereinstimmung.

	Gutachter A	Gutachter B	Gutachter C
Gutachter A	1.0	0.9	0.823
Gutachter B	0.9	1.0	0.884
Gutachter C	0.823	0.884	1.0

Tabelle 6: Rangkorrelationskoeffizient Kendall-Tau-b.
Ein Rangkorrelationskoeffizient Kendall-Tau-b von 0,81-1,0 entspricht einer sehr guten Übereinstimmung der Gutachter.

Im Gesamtkollektiv zeigte sich bei 61,6% (n=45) eine leichte IDO-Anfärbung, bei 16,4% (n=12) eine moderate und bei 21,9% (n=16) eine starke IDO-Färbung (Abbildung 8 und Tabelle 7).



IDO-Score	1	2	3
n	45	12	16
(%)	(61.6)	(16.4)	(21.9)

Abbildung 8 und Tabelle 7: IDO-Expressionslevel.
Die Einteilung erfolgt angelehnt an den IRS-Score und andere IDO-Studien. Bei keiner bis lediglich vereinzelter Anfärbung IDO-positiver Zellen wurde der Schnitt mit einem IDO-Score von '1'=schwach bewertet. Das zunehmende Auftreten IDO-positiver Zellen sowie die intensivere Anfärbung wurde als 'moderat' (IDO-Score=2) und die flächendeckend starke IDO-Anfärbung als 'stark' (IDO-Score=3) definiert. In der Tabelle sind die absoluten Werte (n) und die relativen Werte (%) für die einzelnen IDO-Scores angeben.

Die IDO-Expression zeigte sich vor allem im Endothel der Zotten (Abbildung 9). Dabei wurden vor allem das Zytoplasma und der Nucleolus der Endothelzellen

angefärbt. Eine Anfärbung des Zyto- oder des Synzthytiotrophoblasten konnte nicht gezeigt werden.

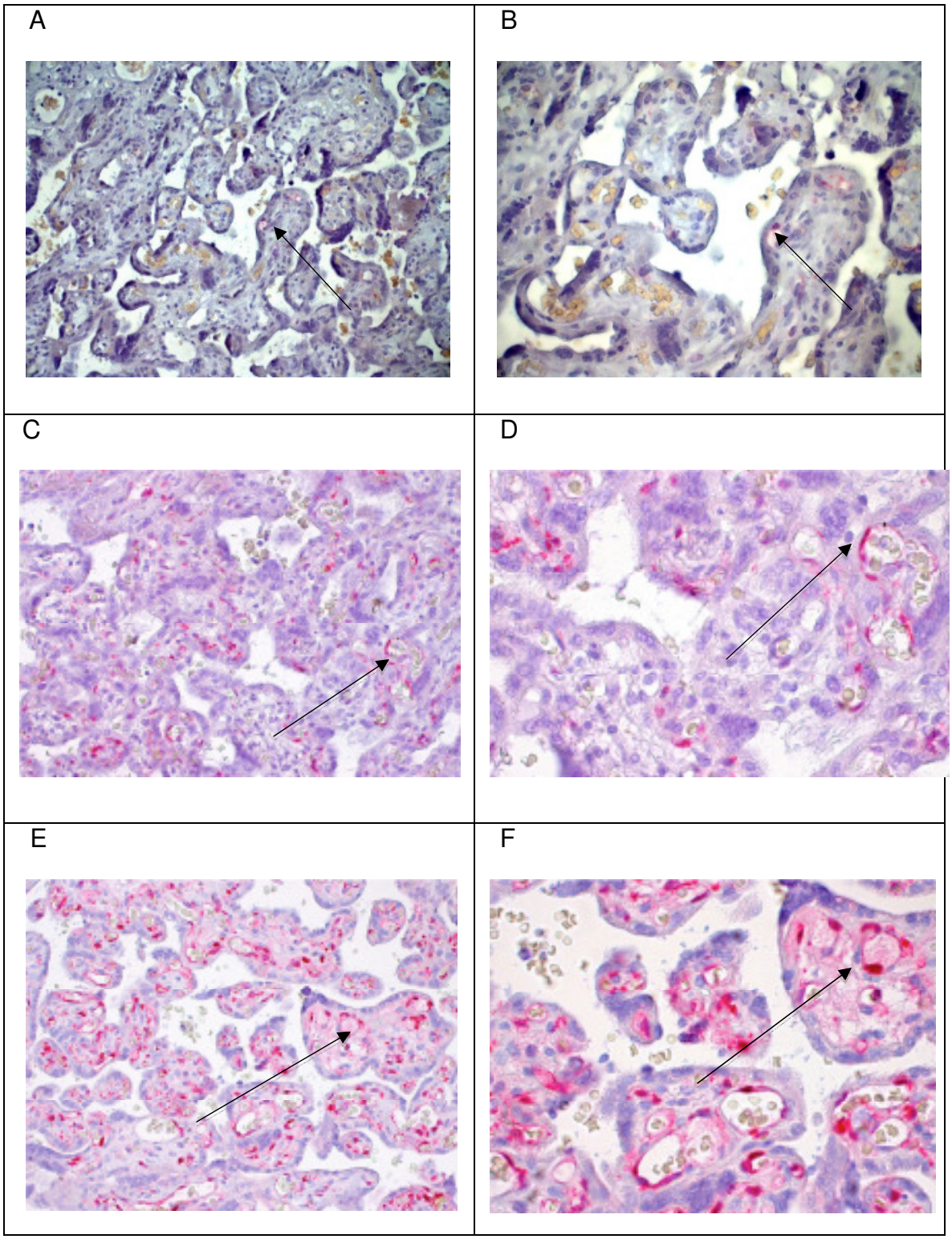


Abbildung 9: Anti-IDO-Färbung.
A-F zeigen die Anfärbung mit Anti-IDO-1-AK, diese wurde mit Hilfe von Permanent Red sichtbar gemacht. Die IDO-Expression konnte überwiegend im Zytoplasma und in den Zellkernen des Zottenendothels dargestellt werden. A (20fache Vergrößerung) und B (40fache Vergrößerung): IDO-Score von '1'='schwach': vereinzelte schwache IDO-Färbung (Pfeil). C (20fache Vergrößerung) und D (40fache Vergrößerung): IDO-Score von '2'='moderat': zunehmende und intensivere IDO-Färbung (Pfeil). E (20fache Vergrößerung) und F (40fache Vergrößerung): IDO-Score von '3'='stark': starke flächendeckende IDO-Färbung (Pfeil).

Des Weiteren konnte eine positive Färbung innerhalb der Dezidua nachgewiesen werden (Abbildung 10). In der Dezidua zeigte sich die IDO-Expression im Endothel der Spiralarterien und im invasiven extravillösen Trophoblasten, der die maternalen Spiralarterien auskleidet. Die Identifizierung des EVT gelang durch eine Differenzierung zwischen der vimentin-positiven Dezidua und dem CK-7-positiven invasiven extravillösen Trophoblasten.

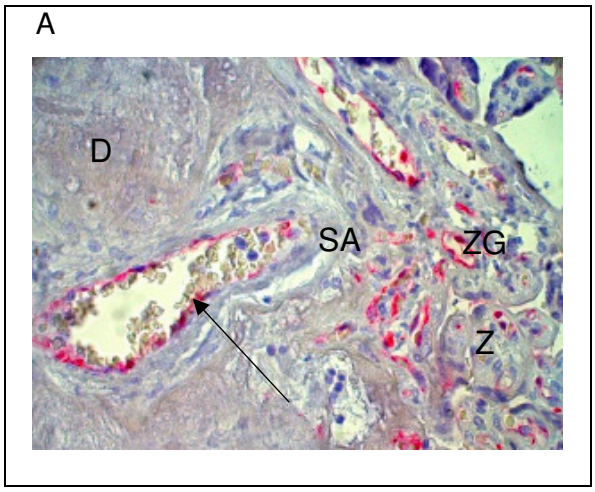


Abbildung 10: Anti-IDO-Färbung – Dezidua.
A (40fache Vergrößerung): IDO-positive Zellen (Pfeil) in den Spiralarterien der Dezidua. Auch in diesem Schnitt ist eine starke IDO-Färbung zu beobachten (IDO-Score von '3'='stark'). Legende: D=Dezidua; SA=Spiralarterie; Z=Zotten; ZG=Zottengefäße.

4.2.2 IDO als prädiktiver Marker

Um den Stellenwert von IDO als prädiktiven Marker für hypertensive Schwangerschaftserkrankungen – im Besonderen für das HELLP-Syndrom und die Präeklampsie – zu untersuchen, wurden die verschiedenen IDO-Klassifikationen mit den genannten Erkrankungen, verschiedenen Risikofaktoren und zusätzlich erhobenen Parametern korreliert.

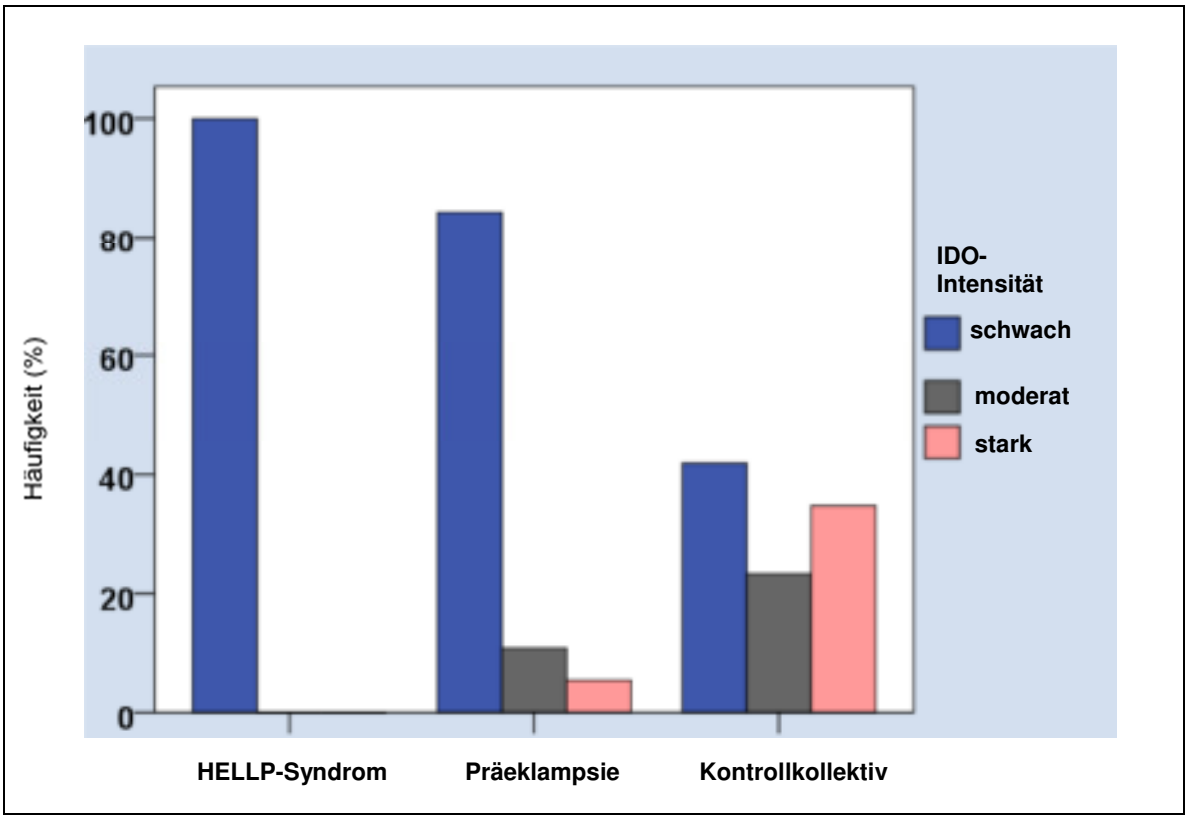


Abbildung 11: Verteilung der IDO-Intensitäten.
Das Balkendiagramm zeigt die verschiedenen IDO-Intensitäten (negativ/schwach = blau, moderat = grau, stark = rosa) und ihre relative Häufigkeit in den verschiedenen Patientengruppen (HELLP, Präeklampsie und Kontrollkollektiv).

Bei den Schwangeren ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung (n=43) zeigten 18 (41,9%) eine schwache IDO-Färbung. 10 Präparate (23,3%) wiesen eine moderate, 15 (34,9%) eine starke Färbung auf.

In der Gruppe der Patientinnen mit einer Präeklampsie (n=19) zeigte nur noch eine (5,3%) Plazenta eine starke Anfärbung, 2 (10,5%) eine moderate und die restlichen 16 (84,2%) eine schwache Färbung. Die HELLP Patientinnen zeigten alle eine schwache Färbung (n=11). Die Patientinnen mit hypertensiver Schwangerschafts-erkrankung zeigten somit eine signifikant (p=0,001) niedrigere

IDO-Expression (Tabelle 8 und Abbildung 11) als die Patientinnen der Kontrollgruppe.

		Präeklampsie		**HELLP-Syndrom**		**Kontrollkollektiv**		**p-Wert**
	N	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Grundgesamtheit	73	19	(26.0)	11	(15.1)	43	(58.9)	
IDO Intensität								**0.001**
schwach (1)	45	16	(84.2)	11	(100)	18	(41.9)	
moderat (2)	12	2	(10.5)	0	(0)	10	(23.3)	
stark (3)	16	1	(5.3)	0	(0)	15	(34.9)	

Tabelle 8: Verteilung der IDO-Intensitäten.
Die Daten sind dargestellt als n (Anzahl der Merkmalsausprägungen) und deren prozentualer Anteil an der jeweiligen Grundgesamtheit N. Ein p-Wert ≤0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen und „fett“ hervorgehoben.

Da die Präeklampsie durch einen erhöhten Blutdruck nach der 20. SSW von über 140/90mmHg und eine Proteinurie (siehe 2.1.3.1) definiert wird, wurden auch diese Parameter einzeln mit der IDO-Intensität korreliert (Tabelle 9 und 10).

		IDO			**p-Wert**
		schwach (1)	**moderat (2)**	**stark (3)**	
	N	Mittelwert (± SD)	Mittelwert (± SD)	Mittelwert (± SD)	
SSW bei Geburt*	73	38 (± 4)	40 (± 1)	39 (± 3)	**0.007**
MAD (in mmHg)	72	113 (± 20)	93 (± 20)	89 (± 13)	**<0.001**
Systolischer Druck (in mmHg)	72	152 (± 28)	124 (± 25)	120 (± 18)	**<0.001**
Diastolischer Druck (in mmHg)	72	93 (± 17)	77 (± 18)	73 (± 12)	**<0.001**
Alter (in Jahren)	73	34 (± 5)	32 (± 5)	35 (± 4)	0.244

Tabelle 9: Univariate Analyse – IDO 1.
Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung der jeweiligen Grundgesamtheit N. Ein p-Wert ≤0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen und „fett“ hervorgehoben. *Die SSW entspricht den bereits abgeschlossenen Schwangerschaftswochen.

Bei der Untersuchung der Blutdruckwerte zeigte sich eine signifikant (p<0,001) niedrigere IDO-Intensität bei einem erhöhten Blutdruck (Tabelle 9 und Abbildung 12). Bei einer schwachen IDO-Färbung war der durchschnittliche Blutdruck

152/93mmHg (MAD 113mmHg), bei einer moderaten IDO-Färbung 124/77mmHg (MAD 93mmHg) und bei einer starken IDO-Färbung 120/73mmHg (MAD 89mmHg).

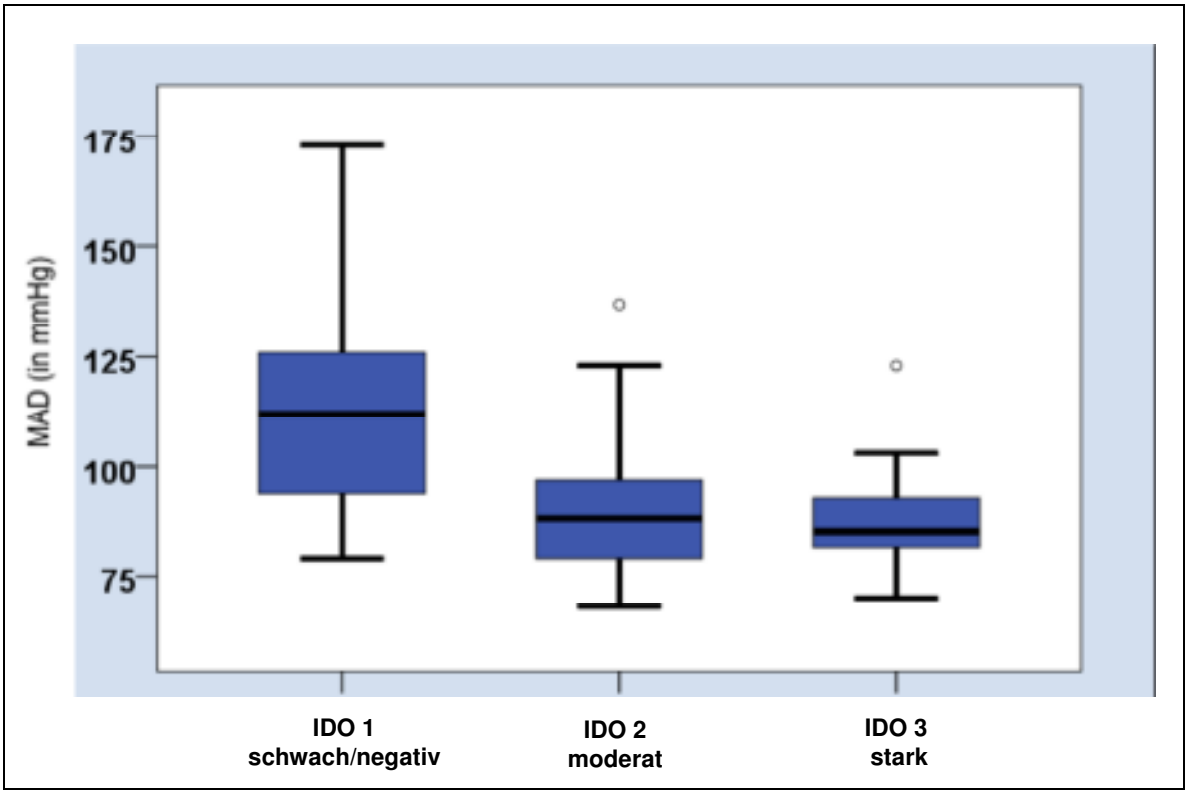


Abbildung 12: Mittlerer arterieller Druck (MAD) und IDO.
Darstellung des MAD in Abhängigkeit von der IDO-Intensität, als Box-Plot mit dem Median und der 25.-75. Perzentile innerhalb der Box. Die T-Balken entsprechen dem kleinsten und dem größten Wert. Ausreißer, in der Grafik als Kreis dargestellt, liegen maximal 1,5-3 Boxenlängen außerhalb der Box. Extremwerte, als Sternchen dargestellt, liegen mehr als 3 Boxenlängen außerhalb der Box.

Auch die Plazenten von Patientinnen mit einer Proteinurie zeigten eine signifikant (p=0,001) niedrigere IDO-Expression als diejenigen ohne Proteinurie (Tabelle 10). Von den 27 Schwangeren mit einer Proteinurie wurde bei 24 Patientinnen die IDO-Färbung mit schwach, bei zwei Patientinnen mit moderat und bei einer Patientin mit stark bewertet.

Das durchschnittliche Alter der Patienntinnen zeigte keinen signifikanten (p=0,244) Unterschied in der IDO-Intensität. Patientinnen bei denen eine schwache IDO-Färbung vorlag waren durchschnittlich 34 Jahre, Patientinnen mit einer moderaten IDO-Färbung 32 Jahre und mit einer starken IDO-Färbung 35 Jahre alt.

In einem weiteren Schritt wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen einem niedrigen Geburtsgewicht und der IDO-Expression untersucht. Dazu wurde wiederum zwischen eutrophen, sowie SGA- und LGA-Kinder unterschieden. In die

SGA-Gruppe wurden nur gesunde Neugeborene unter der 10. Perzentile eingeschlossen, diejenigen mit einer Wachstumsrestriktion bei Plazenta-insuffizienz wurden getrennt untersucht (Tabelle 10). Die Plazenten der SGA-Kinder zeigten in 7 Fällen eine schwache, in 2 Fällen eine moderate und in einem Fall eine starke IDO-Expression. Im Vergleich dazu waren in der Gruppe der eutrophen Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht zwischen der 10. und der 90. Perzentile 28 Plazenten mit einer schwachen, 9 mit einer moderaten und 13 mit einer starken Anfärbung vertreten. Die Plazenten der 2 LGA-Kinder zeigten beide eine starke IDO-Färbung. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse zeigte sich kein signifikanter (p=0,132) Unterschied in den Geburtsgewichten im Vergleich zu der vorliegenden IDO-Intensität (Tabelle 10).

Die Plazenten der Neugeborenen mit einer Wachstumsrestriktion bei Plazentainsuffizienz zeigten im Vergleich zu denjenigen ohne Plazentainsuffizienz keine signifikanten (p=0,08) Unterschiede in der Intensität der IDO-Färbung. Von den 11 Patientinnen, die eine Plazentainsuffizienz entwickelten, zeigten 10 eine schwache und eine Patientin eine moderate IDO-Färbung in der Plazenta (Tabelle 10).

		IDO						**p-Wert**
		schwach (1)		**moderat (2)**		**stark (3)**		
	N	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Gesamtkollektiv	73	45	(61.6)	12	(16.4)	16	(21.9)	
Plazentainsuffizienz (IUGR)	11	10	(22.2)	1	(8.3)	0	(0.0)	0.080
Gewichtsperzentile								0.132
<10. (SGA)*	10	7	(15.6)	2	(16.7)	1	(6.2)	
10.–90.	50	28	(62.2)	9	(75.0)	13	(81.3)	
>90. (LGA)	2	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(12.5)	
Schwangerschaftswoche								0.245
<35. SSW	8	7	(15.6)	0	(0.0)	1	(6.2)	
≥35. SSW	65	38	(84.4)	12	(100)	15	(93.8)	
Proteinurie	27	24	(53.3)	2	(16.7)	1	(6.2)	**0.001**

Tabelle 10: Univariate Analyse – IDO 2.
Die Daten sind dargestellt als n (Anzahl der Merkmalsausprägungen) und deren prozentualer Anteil an der jeweiligen Grundgesamtheit N. Ein p-Wert ≤ 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen und „fett“ hervorgehoben.
* SGA ist definiert als gesunde Neugeborene unter der 10. Perzentile. Die IUGR-Feten finden sich in der Gruppe der Patientinnen mit Plazentainsuffizienz.

Des Weiteren wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der IDO-Expression und einer verfrühten Beendigung der Schwangerschaft untersucht. Patientinnen deren Plazenta eine schwache IDO-Expression aufwies wurden durchschnittlich in der 39. SSW entbunden, die mit einer moderaten IDO-Expression in der 41. SSW und diejenigen mit einer starken Expression in der 40. SSW. Somit wurden die Patientinnen deren Plazenta eine schwache IDO-Färbung zeigte signifikant (p=0,007) früher entbunden (Abbildung 13 und Tabelle 9).

Wurde die Gruppe dahingehend unterteilt, ob die Patientinnen vor (n=8) bzw. nach (n=65) der 35. SSW entbunden wurden, ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Intensität der IDO-Expression feststellen (p=0,245). Es zeigte sich bei den 8 Patientinnen unter der 35. SSW bei 7 eine leichte und bei 1 eine starke Anfärbung. In der Gruppe der Patientinnen, die in der 35. SSW oder später entbunden wurden (n=65), wurden 38 mit einem IDO-Score von ’1’ bewertet, 12 mit IDO-Score von ’2’ und 15 mit einem IDO-Score von ’3’ (Tabelle 10).

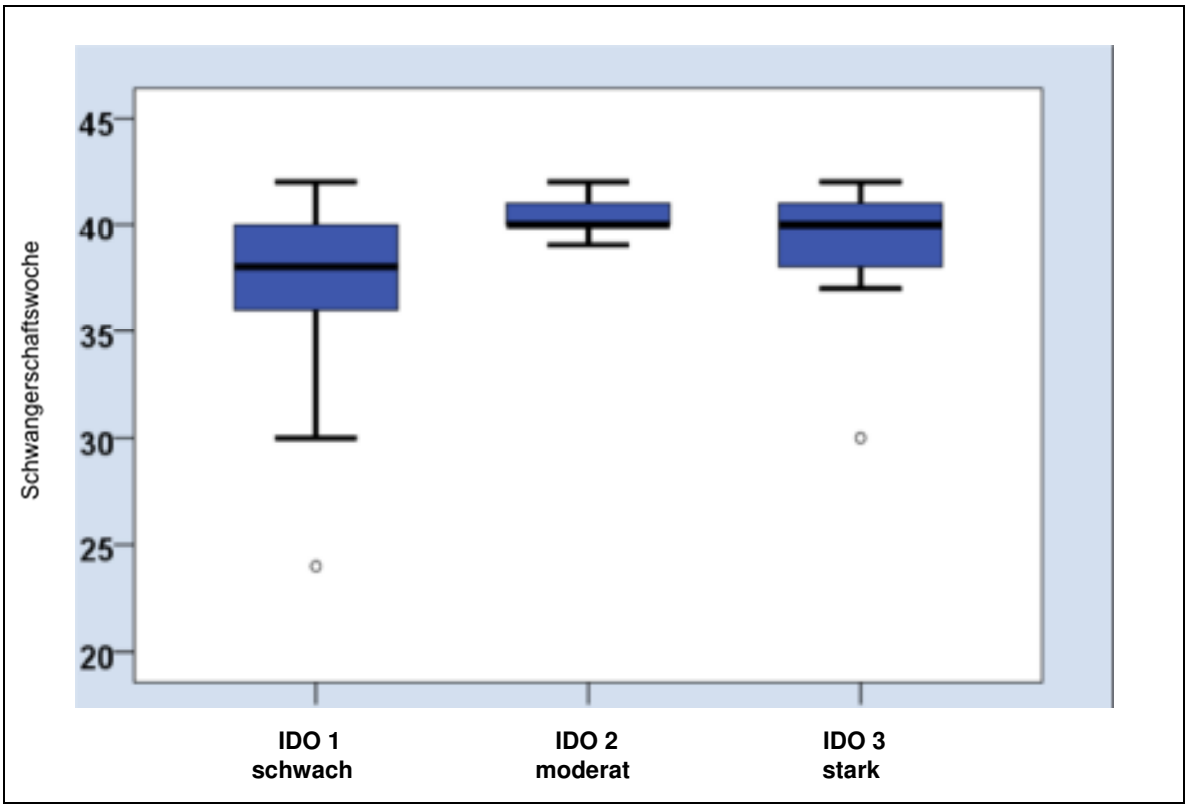


Abbildung 13: Schwangerschaftswoche bei Entbindung und IDO.
Darstellung der Schwangerschaftswoche, in Abhängigkeit von der IDO-Intensität, als Box-Plot mit dem Median und der 25.-75. Perzentile innerhalb der Box. Die T-Balken entsprechen dem kleinsten und dem größten Wert. Ausreißer, in der Grafik als Kreis dargestellt, liegen maximal 1,5-3 Boxenlängen außerhalb der Box. Extremwerte, als Sternchen dargestellt, liegen mehr als 3 Boxenlängen außerhalb der Box.

4.3 Tryptophanspiegel im Serum

Zur Bestimmung des Tryptophan-Spiegels im Serum wurden die präpartalen Blutproben aller Patientinnen mittels Tandem-Massenspektrometrie analysiert (siehe 3.2.2). Der mittlere Tryptophan-Spiegel im Gesamtkollektiv lag bei 7,15µmol/l (Tabelle 12).

	N	**Präeklampsie**	**HELLP**	**Kontrollkollektiv**	**p-Wert**
		Mittelwert (± SD)	Mittelwert (± SD)	Mittelwert (± SD)	
Tryptophanspiegel (in µmol/l)	72	7.17 (± 2.77)	6.27 (± 2.45)	7.37 (± 3.18)	0.622

Tabelle 11: Univariate Analyse – Tryptophan 1.
Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung der jeweiligen Grundgesamtheit N. Ein p-Wert ≤0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen und „fett“ hervorgehoben.

Im einem ersten Schritt wurde der Tryptophan-Spiegel in den drei Patientengruppen (Präeklampsie, HELLP-Syndrom und Patientinnen ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung) bestimmt (Tabelle 11).
Im Kollektiv der Patientinnen mit einer Präeklampsie zeigte sich ein mittlerer Tryptophan-Spiegel von 7,17µmol/l. Bei Patientinnen mit HELLP-Syndrom lag der durchschnittliche Tryptophanspiegel bei 6,27µmol/l. Im Vergleich dazu lag er bei Patientinnen ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung bei 7,37µmol/l. Im Vergleich zwischen den Patientinnen mit bzw. ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung konnte kein signifikanter (p=0,622) Unterschied des Tryptophanspiegels im maternalen Serum festgestellt werden.

	n	(%)	Tryptophanspiegel Mittelwert (± SD) (µmol/l)	p-Wert
Gesamtkollektiv N = 72		(100)	7.15 (± 2.97)	
IDO Score				0.123
1 = schwach	45	(62.5)	6.67 (± 2.76)	
2 = moderat	11	(15.3)	7.91 (± 4.18)	
3 = stark	16	(22.2)	8.0 (± 2.39)	
Schwangerschaftswoche				0.242
<35. SSW	8	(11.1)	6.5 (± 2.93)	
≥35. SSW	64	(88.9)	7.23 (± 2.99)	
Plazentainsuffizienz				0.954
ja	10	(13.9)	6.9 (± 3.25)	
nein	62	(86.1)	7.19 (± 2.95)	

Tabelle 12: Univariate Analyse – Tryptophan 2.
Die Daten sind dargestellt als n (Anzahl der Merkmalsausprägungen) und deren prozentualer Anteil an der jeweiligen Grundgesamtheit N. Ein p-Wert ≤0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen und „fett“ hervorgehoben.

Im Folgenden wurde analysiert ob es zwischen den drei IDO-Intensitäten signifikante Unterschiede im mittleren Tryptophanspiegel gibt.

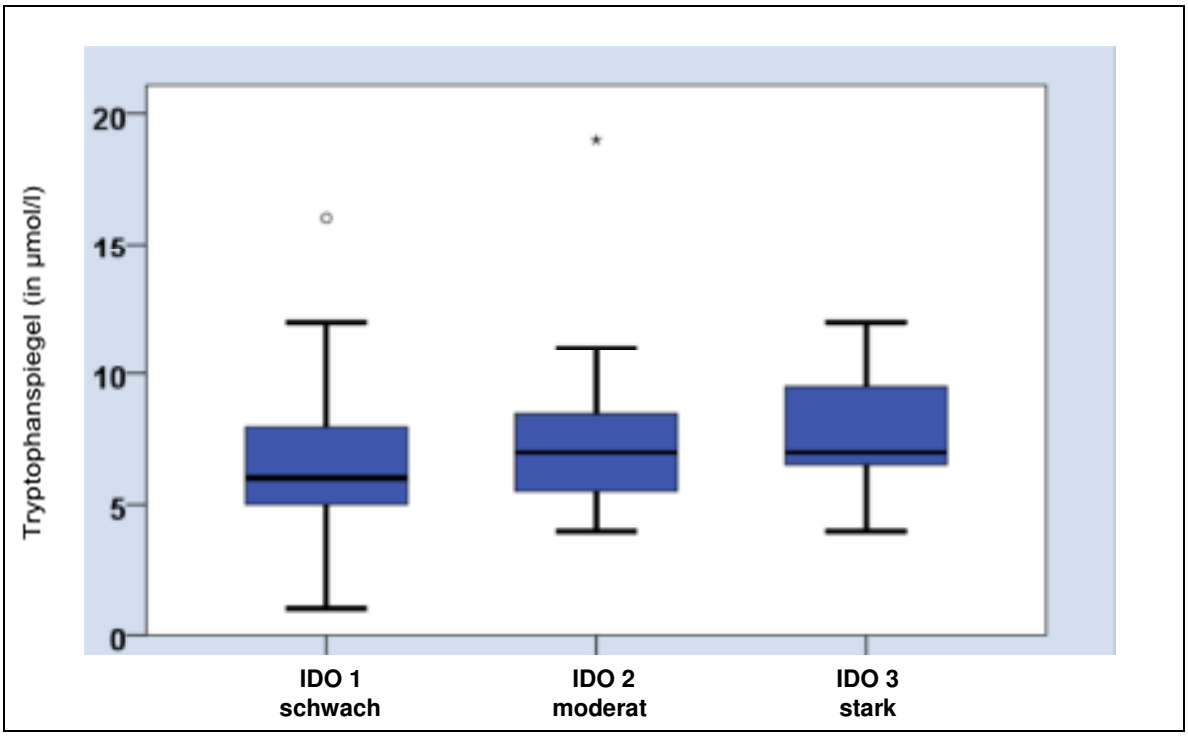


Abbildung 14: Verteilung des Tryptophanspiegels.
Darstellung des Tryptophanspiegels (in µmol/l), in Abhängigkeit von der IDO-Intensität, als Box-Plot mit dem Median und der 25.-75. Perzentile innerhalb der Box. Die T-Balken entsprechen dem kleinsten und dem größten Wert. Ausreißer, in der Grafik als Kreis dargestellt, liegen maximal 1,5-3 Boxenlängen außerhalb der Box. Extremwerte, als Sternchen dargestellt, liegen mehr als 3 Boxenlängen außerhalb der Box.

Dabei zeigte sich bei einer schwachen IDO-Färbung ein mittlerer Tryptophan-Spiegel von 6,67µmol/l, bei einer moderaten Färbung von 7,91µmol/l und bei einer starken IDO-Färbung von 8,0µmol/l. Die vorliegende Verteilung zeigt keine signifikanten (p=0,123) Unterschiede des mittleren Tryptophanspiegel im Vergleich zur Intensität der IDO-Färbung (Abbildung 14 und Tabelle 12).

Um zu ermitteln, ob es Unterschiede bezüglich des Tryptophanspiegels in frühen und späten Schwangerschaftswochen gibt, wurde das Kollektiv erneut in zwei Gruppen vor bzw. ab der 35. SSW eingeteilt. Der durchschnittliche Tryptophanspiegel lag vor der 35. SSW bei 6,5µmol/l und ab der 35. SSW bei 7,23µmol/l. Auch in diesen beiden Gruppen konnte kein signifikanter (p=0,242) Unterschied in der Höhe des Tryptophanspiegels festgestellt werden (Tabelle 12 und Abbildung 15).

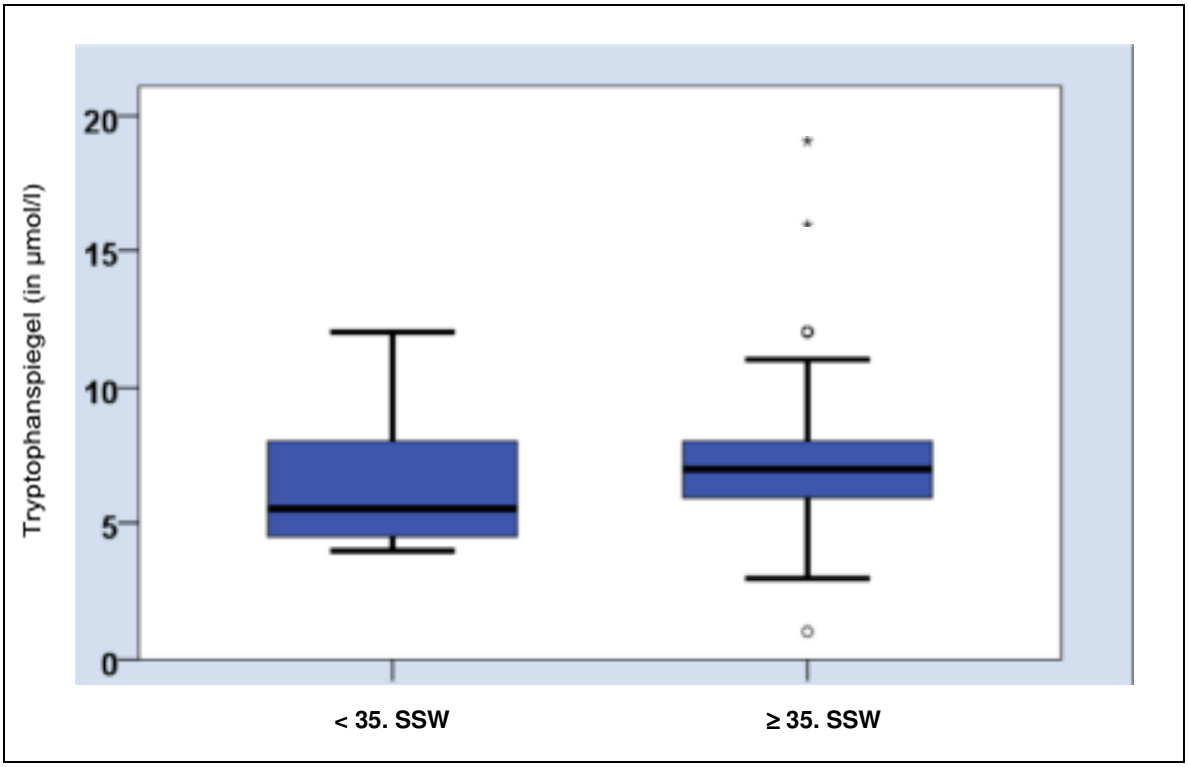


Abbildung 15: Entbindung vor bzw. ab der 35. SSW.
Darstellung des Tryptophanspiegels (µmol/l) in Abhängigkeit von einer Entbindung vor bzw. ab der 35. SSW als Box-Plot mit dem Median und der 25.-75. Perzentile innerhalb der Box. Die T-Balken entsprechen dem kleinsten und dem größten Wert. Ausreißer, in der Grafik als Kreis dargestellt, liegen maximal 1,5-3 Boxenlängen außerhalb der Box. Extremwerte, als Sternchen dargestellt, liegen mehr als 3 Boxenlängen außerhalb der Box.

In einem letzten Schritt wurde das Auftreten einer Plazentainsuffizienz in Abhängigkeit vom Tryptophanspiegel im maternalen Serum untersucht. Der mittlere Tryptophanspiegel von Patientinnen, die eine Plazentainsuffizienz entwickelten lag bei 6,9µmol/l, der Tryptophanspiegel der Patientinnen ohne Plazentainsuffizienz bei 7,19µmol/l. Anhand der vorliegenden Werte konnte kein signifikanter (p=0,954) Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Plazentainsuffizienz und der Höhe des Tryptophanspiegels festgestellt werden (Tabelle 12 und Abbildung 16).

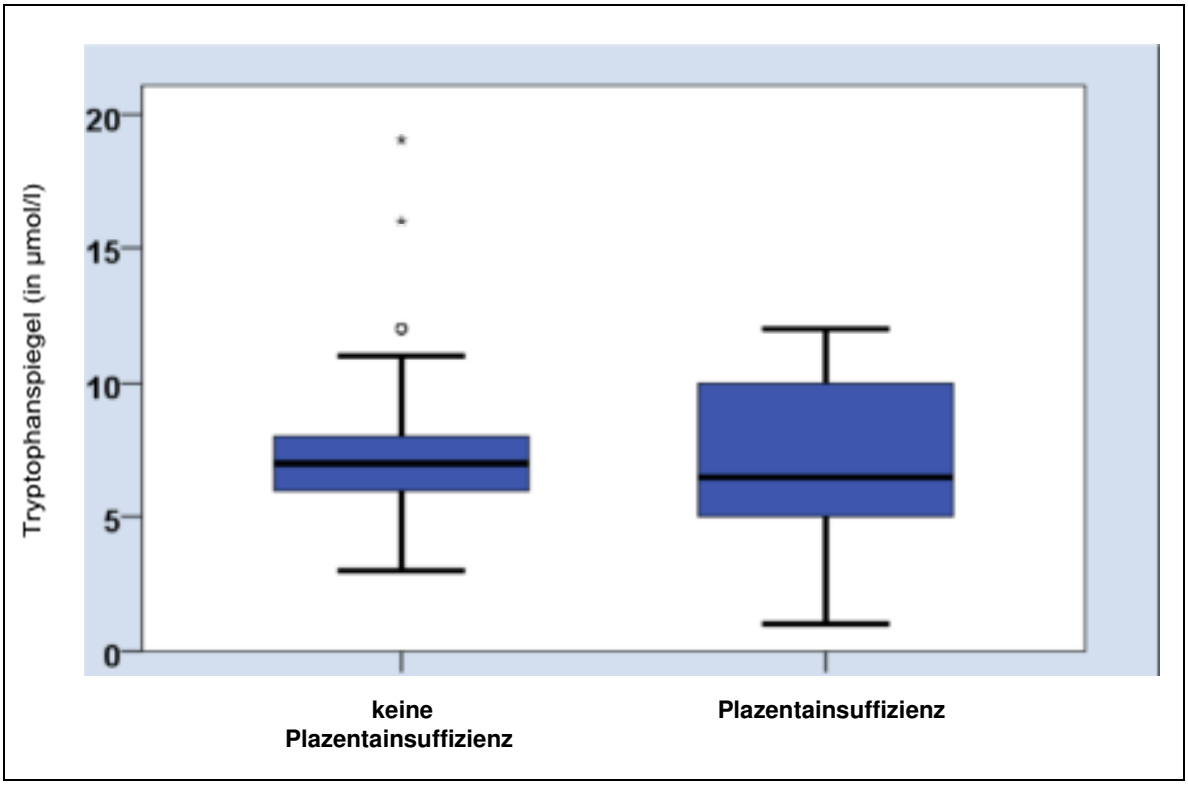


Abbildung 16: Plazentainsuffizienz.
Darstellung des Tryptophanspiegels (µmol/l), in Abhängigkeit vom Auftreten einer Plazentainsuffizienz, als Box-Plot mit dem Median und der 25.-75. Perzentile innerhalb der Box. Die T-Balken entsprechen dem kleinsten und dem größten Wert. Ausreißer, in der Grafik als Kreis dargestellt, liegen maximal 1,5-3 Boxenlängen außerhalb der Box. Extremwerte, als Sternchen dargestellt, liegen mehr als 3 Boxenlängen außerhalb der Box.

5 Diskussion

Die Präeklampsie und das HELLP-Syndrom sind geburtshilfliche Themen von hoher Relevanz. Die Präeklampsie ist nach den thromboembolischen Ereignissen die zweithäufigste Ursache für die maternale Mortalität (Lo 2013). Die Pathogenese der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen ist jedoch bis heute noch immer nicht abschließend geklärt (siehe 2.1.3.5).

Ursprünglich sollte diese Studie das Adhäsionsmolekül ALCAM und seinen Einfluss auf die Entstehung einer Präeklampsie bzw. eines HELLP-Syndroms untersuchen.

Leider konnte ALCAM in verschiedensten immunhistochemischen Färbungen nicht in der Plazenta nachgewiesen werden, weshalb eine Umstellung der Studie auf die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), die auch in immunologischen Zusammenhang mit der Entstehung einer Präeklampsie und eines HELLP-Syndroms gebracht wird, erfolgte.

Das Ethikvotum sowie die Aufklärung und Einverständniserklärung umfassten bereits eine Ausweitung der Untersuchung auf andere Moleküle, wodurch kein erneutes Ethikvotum oder weitere Aufklärungen erforderlich waren.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit die Rolle des Tryptophanstoffwechsels für das Krankheitsbild der Präeklampsie und des HELLP-Syndroms sowie in diesem Zusammenhang der Plazentainsuffizienz untersucht. IDO als eines der zentralen Enzyme im Tryptophanstoffwechsel baut Tryptophan zu Kynurenin ab. Deshalb wurde in einem ersten Schritt die IDO-Expression im Plazentagewebe von Patientinnen mit bzw. ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung untersucht und verglichen. Des Weiteren wurde der Tryptophanspiegel im Serum der Schwangeren untersucht und verglichen.

Die Studie kommt zu den folgenden Ergebnissen:

- In der Plazenta von Patientinnen mit einer Präeklampsie bzw. mit einem HELLP-Syndrom kommt es zu einer signifikant verminderten Expression von IDO im Vergleich zur Patientinnen ohne hypertensive Schwangerschafts-erkrankung.
- Der Tryptophanspiegel im präpartalen Serum zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen Schwangeren mit oder ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung.

5.1 IDO im Plazentagewebe

In dieser Studie wurde das Plazentagewebe von 73 Patientinnen untersucht und daran immunhistochemische Färbungen durchgeführt (siehe 3.2.1.2).
Die Lokalisation von IDO in der Plazenta wurde schon in verschiedenen Studien untersucht. Erstmalig wurde IDO 1985 in der Plazenta beschrieben (Yamazaki et al. 1985). Seit 1998 wurde ein besonderes Augenmerk auf die immunologische Bedeutung von IDO in der Schwangerschaft gelegt (Munn et al. 1998, Mellor et al. 2001). Durch die Hemmung der Indolamin-2,3-Dioxygenase konnte die Abstoßung des allogenen, genetisch nicht identischen Fetus im Mausmodell induziert werden. Somit wurde angenommen, dass in einer unauffälligen Schwangerschaft hohe IDO Konzentrationen vorliegen.
Auch in der vorliegenden Arbeit konnte IDO im Plazentagewebe detektiert und die Annahme hoher IDO-Konzentrationen in der unauffälligen Schwangerschaft bestätigt werden.
In den verschiedenen Studien gibt es jedoch unterschiedliche Beschreibungen bezüglich der Lokalisationen von IDO. Im vorliegenden Kollektiv konnte IDO vor allem im Endothel der Zottengefäße angefärbt werden. Außerdem gab es einige Schnitte in denen sich eine Färbung innerhalb der Dezidua zeigte. Diese IDO-positiven Zellen sind auf das Endothel der Spiralarterien und den, die maternalen Spiralarterien auskleidenden, invasiven extravillösen Trophoblasten zurückzuführen. Eine Anfärbung des Synzytio- und Zytotrophoblasten wie bereits in anderen Studien (Kamimura 1991, Santoso et al. 2002) beschrieben, konnte nicht bestätigt werten.
In einer Arbeit von Hönig aus dem Jahre 2004 werden IDO-positive Zellen nicht nur im villösen Endothel und im Synzytio-/Zytotrophoblasten beschrieben, sondern wie auch in der vorliegenden Arbeit im invasiven extravillösen Trophoblast sowie in endometrialen Drüsen (Hönig et al. 2004).
In den beschriebenen Studien wurden unterschiedliche IDO-Antikörper verwendet. In der Arbeit von Hönig wurde ein Anti-IDO-Antikörper der Firma Chemicon verwendet. In der vorliegenden Studie wurde der Antikörper Anti-IDO-1 (HPA023072) der Firma Atlas verwendet. Andere oben beschriebene Studien haben den verwendeten Antikörper nicht namentlich genannt.

Ein aktuelles Review aus dem Jahr 2014 gibt einen Überblick über den humanen Tryptophanstoffwechsel. Auch hier wird die Anfärbung des villösen Endothels sowie des Endothels der Spiralarterien im 3. Trimenon hervorgehoben (Sedlmayr et al. 2014).

Vor allem die Anfärbung des invasiven extravillösen Trophoblasten und des Endothels der Spiralarterien sowie des villösen Endothels sind wichtig für die feto-maternale Interaktion. Der invasive extravillöse Trophoblast kleidet die maternalen Spiralarterien aus und steht somit in direktem Kontakt mit dem maternalen Gefäßsystem. Durch diese Funktion ist der invasive extravillöse Trophoblast ein möglicher Baustein in der Pathogenese hypertensiver Schwangerschafts-erkrankungen und der Plazentainsuffizienz (siehe 2.1.3.5).

5.2 IDO und Präeklampsie

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass in der Plazenta von Patientinnen mit einer Präeklampsie eine signifikant niedrigere Expression der Indolamin-2,3-Dioxygenase vorliegt (siehe 4.2.2). Die Expression von IDO wurde durch immunhistochemische Färbungen am postpartal gesammelten Plazentamaterial untersucht.

Damit werden die Ergebnisse von Kudo, Nishizawa und Santoso (Nishizawa et al. 2001, Kudo et al. 2002, Santoso et al. 2002) bestätigt. Auch in diesen Studien wurde die verminderte IDO-Expression im Plazentagewebe präeklamptischer Patientinnen – teils durch Immunhistochemie, teils mit Hilfe von Polymerase-Kettenreaktion (PCR) – beschrieben (Nishizawa et al. 2007). Im Vergleich zu den bereits vorhandenen Studien wurde nach unserem Kenntnisstand in der vorliegenden Arbeit das bisher größte Patientenkollektiv unter standardisierten Bedingungen zusammengestellt. Insgesamt zeigten 19 Patientinnen die Symptome einer Präeklampsie. Dem gegenüber standen 43 Patientinnen ohne hypertensive Erkrankung. Das bisher größte Kollektiv wurde durch Nishizawa 2007 zusammengestellt, damals wurden 18 Präeklamptikerinnen mit 23 unauffälligen Schwangerschaften verglichen (Nishizawa et al. 2007). Andere Studien erstellten meist Kollektive mit Fallzahlen von 10 Patientinnen (Santoso et al. 2002, Hönig et al. 2004).

Eine signifikant niedrigere IDO-Expression konnte bei den Patientinnen mit einer Präeklampsie festgestellt werden. Entsprechend dieser Ergebnisse zeigten Patientinnen mit niedriger IDO-Expression auch signifikant höhere Blutdruckwerte und eine deutliche Proteinurie – dies entspricht den Kriterien einer Präeklampsie.
Es zeigte sich außerdem, dass Patientinnen mit den Symptomen einer Präeklampsie signifikant früher als Patientinnen ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung entbunden wurden (Abbildung und Tabelle 4, sowie Abbildung 13 und Tabelle 9). Im Hinblick auf eine frühe bzw. späte Präeklampsie, die häufig mit einer unterschiedlichen Schwere des Krankheitsbildes einhergeht (siehe 2.1.3.3), konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Schwangeren, die vor oder nach der 35. Schwangerschaftswoche entbunden wurden, festgestellt werden (Tabelle 10).
Im Hinblick auf die Pathogenese der Präeklampsie (siehe 2.1.3.5) ist die Rolle von IDO einerseits in Zusammenhang mit oxidativem Stress und andererseits aus immunologischer Sicht und in Anbetracht inflammatorischer Aspekte von verstärktem Interesse.

5.3 IDO und HELLP-Syndrom

Im vorliegenden Kollektiv werden erstmalig explizit Patientinnen mit einem HELLP-Syndrom beschrieben und separat untersucht. Gerade Patientinnen mit einem HELLP-Syndrom sind besonders gefährdet durch die Hämolyse, die Leberzellzerstörung und die Möglichkeit einer DIG. Aktuell wird zur Beurteilung der Situation bei Patientinnen mit einem HELLP-Syndrom lediglich die regelmäßige Bestimmung bestimmter Hämolyse-Parameter, der Leberwerte und der Thrombozyten genutzt. Kommt es zu einer Verschlechterung der Werte ist die sofortige Entbindung die einzige kausale Therapie.
In der Literatur finden sich keine klar definierten Risikofaktoren für ein HELLP-Syndrom und es gibt keinerlei Marker zur Früherkennung. Lediglich die Präeklampsie und somit auch deren Risikofaktoren können auf ein HELLP hinweisen.
Das HELLP-Syndrom zeigt wie auch die Präeklampsie einen starken Zusammenhang zwischen der IDO-Expression und dem Auftreten der Symptome. Im Falle des HELLP-Syndroms ist die Signifikanz noch stärker ausgeprägt, da die

Plazenta von Patientinnen mit einem HELLP-Syndrom in allen Fällen eine schwache IDO-Färbung zeigt und es nicht zu einer moderaten oder starken Anfärbung kam.

5.4 IDO und Plazentainsuffizienz

In Zuge der Untersuchung an Plazentaproben der Patientinnen mit hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen wurde das Patientenkollektiv außerdem auf eine mögliche Plazentainsuffizienz untersucht. Dafür wurden Patientinnen mit pathologischen uterinen und umbilikalen Dopplerparametern und IUGR-Feten nochmals separat untersucht. Patientinnen mit einer hypertensiven Schwangerschaftserkrankung hatten signifikant häufiger eine Plazentainsuffizienz als die Patientinnen des Kontrollkollektivs (Tabelle 5).
Bei der Untersuchung der IDO-Intensität bei Schwangeren mit und ohne Plazentainsuffizienz zeigte sich jedoch keinen signifikanten Unterschied (Tabelle 10). Der hier vorliegende p-Wert liegt mit $p=0,08$ nah an der statistischen Signifikanz (in der vorliegenden Arbeit wurden p-Werte $\leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet). Man muss jedoch beachten, dass das vorliegende Kollektiv mit 11 Patientinnen, die eine Plazentainsuffizienz aufweisen, recht klein ist. Ein Einfluss von IDO ist aufgrund der vorliegenden Werte nicht komplett auszuschließen. Bisher gab es diesbezüglich noch keine weiterführenden Untersuchungen. Größere Studien mit zahlenstärkeren Kollektiven und klaren Ein- bzw. Ausschlusskriterien wären ein mögliches Projekt für die Zukunft.

5.5 Tryptophan als prädiktiver Marker

Im letzten Schritt wurde der Tryptophanspiegel im präpartalen Serum der Patientinnen untersucht. Zu Beginn der Studie wurde die Hypothese formuliert, dass der Tryptophanspiegel als potentieller prädiktiver Marker für eine Präeklampsie oder das HELLP-Syndrom genutzt werden könnte, da solche Marker bisher nur eingeschränkt zur Verfügung stehen.
Für diese Studie wurde die Bestimmung des Tryptophanspiegels im Stoffwechsellabor des Neugeborenenscreening am Universitätsklinikum Hamburg-

Eppendorf durchgeführt. Diese Einrichtung ist das norddeutsche Referenzlabor für Aminosäurebestimmung mittels Massenspektrometrie (Lukacs et al. 2004).

Im Serum der unauffälligen Schwangerschaften wurde im Gegensatz zu den Schwangerschaftsverläufen mit einem HELLP-Syndrom und mit einer Präeklampsie ein leicht erhöhter mittlerer Tryptophanspiegel gemessen. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Die univariate Analyse der IDO-Intensität im Plazentagewebe verglichen mit dem mittleren Tryptophanspiegel ergab einen verminderten durchschnittlichen Tryptophanspiegel bei niedrigerem IDO-Score, jedoch wiederum ohne statistische Relevanz. Auch im Falle der Plazentainsuffizienz zeigte sich ein erniedrigter Spiegel im Vergleich zu Patientinnen ohne Plazentainsuffizienz. Auch hier waren die Ergebnisse nicht statistisch signifikant.

Eine Studie von Kudo aus dem Jahre 2003 konnte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Tryptophan-Spiegel und der IDO-Intensität bei hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen im Vergleich zu unauffälligen Schwangerschaften vorweisen (Kudo et al. 2003). In der Studie von Kudo wurde das Plasma von jeweils 12 Patientinnen mit bzw. ohne Präeklampsie sowie von 9 gesunden nicht schwangeren Frauen untersucht. Außerdem wurde das Plazentagewebe von 14 Patientinnen mit einer Präeklampsie und 8 Patientinnen ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung in die Studie eingeschlossen. Es ist hervorzuheben, dass es sich in der Arbeit von Kudo bei den Spenderinnen von Gewebe- und Plasmaprobe nicht immer um die gleichen Patientinnen handelt. Die Spiegelbestimmung erfolgte in der oben erwähnten Studie mittels Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie.

Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse kann Tryptophan nicht als prädiktiver Serummarker zur Früherkennung oder Prävention der Präeklampsie bzw. des HELLP-Syndroms verwendet werden.

Wie bereits oben beschrieben (siehe 2.3.1), ist die Indolamin-2,3-Dioxygenase nicht das einzige Molekül, das Tryptophan im menschlichen Körper verstoffwechselt. In den Hepatozyten der Leber ist die absolut substratspezifische Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) für den Abbau von Tryptophan zuständig und einen geringen Anteil hat auch die IDO-2 am Abbau des Tryptophan.

Es ist möglich, dass durch die verminderte IDO-Aktivität in der Plazenta eine reflektorische Steigerung der TDO-Aktivität/-Expression induziert wird und der Tryptophanspiegel entsprechend relativ konstant gehalten wird.
Eine Untersuchung der TDO-Expression z.B. durch eine Leberbiopsie ist nicht realistisch, da die Invasivität und die Risiken in keiner Relation zur diagnostischen Relevanz der Untersuchung stehen.
Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass die Indolamin-2,3-Dioxygenase ausschließlich für den lokalen Tryptophanspiegel in der Plazenta verantwortlich ist und in diesem Fall keinen Einfluss auf die systemische Tryptophan-serumkonzentration hat. Dies könnte man durch weitere histologische Untersuchungen der Plazenta und durch die Tryptophanbestimmung im Nabelschnurblut analysieren. Wiederum stehen die Invasivität und die damit verbundenen Risiken dieser präpartalen Untersuchung aktuell in keinem Verhältnis zu einem potentiellen Nutzen.

5.6 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Wie unter 2.1.3.8 beschrieben, arbeiten verschiedene Gruppen an Screeningtests zur Prädiktion der Präeklampsie. Einige dieser Screenings haben bereits Praxisrelevanz im klinischen Alltag.
Durch eine frühzeitige Risikostratifizierung können die Patientinnen entsprechend enger überwacht und der Blutdruck entsprechend frühzeitig eingestellt werden, um eine möglichst erfolgreiche Prolongation der Schwangerschaft zu erreichen.
Das Ziel der vorliegenden Arbeit war nach Bestätigung der signifikanten Unterschiede von IDO in der Plazenta von Schwangeren mit Präeklampsie, HELLP und Plazentainsuffizienz die Anwendbarkeit von Tryptophan als potentiellen Serummarker für eine hypertensive Schwangerschaftserkrankung oder für die Plazentainsuffizienz zu testen und ggf. im klinischen Alltag zu etablieren.
Durch die vorliegenden Ergebnisse kann jedoch Tryptophan als potentieller Serummarker für hypertensive Schwangerschaftserkrankungen ausgeschlossen werden.
Die Analyse der IDO-Expression ist nur durch die Untersuchung von Plazentagewebe möglich. Dieses könnte durch eine Chorionzottenbiopsie

gewonnen werden. Jedoch geht eine Chorionzottenbiopsie mit dem Risiko (0,22%) eines iatrogenen Abortes oder einer iatrogenen Frühgeburtlichkeit einher (Akolekar et al. 2015). Mit Hilfe der IDO-Expression könnte man bisher lediglich eine Aussage bezüglich des Risikos an einer hypertensiven Schwangerschafts-erkrankung zu erkranken, treffen.

5.7 Limitation der Studie

5.7.1 Patientenauswahl

Um generalisierte Schlussfolgerungen ziehen zu können, ist das Kollektiv mit insgesamt 73 Patientinnen (30 Patientinnen mit und 43 Patientinnen ohne eine hypertensive Schwangerschaftserkrankung) weiterhin recht klein, auch wenn es im Vergleich zu anderen Studien ein verhältnismäßig großes Kollektiv ist.
Bezüglich des HELLP-Syndroms ist es insgesamt das erste Kollektiv, das separat untersucht wurde. Aufgrund der geringen Fallzahl (insgesamt 11 Patientinnen, die an einem HELLP erkrankten) ist eine klare Aussage sehr schwierig, bzw. nicht machbar.
Die in dieser Studie ermittelte Sectiorate von 49% im Kollektiv der Patientinnen ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankungen entspricht nicht der klinischen Realität. Die aktuelle Sectiorate des UKE im Jahr 2015 beträgt 27,4% (Stand 20.09.2015). Die hier vorliegende Sectiorate resultiert aus der im Vergleich einfacheren Materialasservierung nach primärer Sectio, da diese in der Regel geplant wochentags im Verlauf des Vormittags stattfinden.

5.7.2 Probengewinnung

Die Zusammenstellung und Untersuchung des Plazentamaterials erfolgte weitgehend standardisiert (siehe 3.2.1).
Die Entnahme der präpartalen Blutproben erfolgte jedoch zum Teil zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Das Blut wurde nicht in einer standardisierten Schwangerschaftswoche gewonnen. Die Blutentnahme im Vergleichskollektiv ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung erfolgte zumeist bei Aufnahme in die Klinik und somit maximal 48 Stunden vor der Entbindung. Im Falle der

Patientinnen mit einer Präeklampsie, einem HELLP-Syndrom oder einer Plazentainsuffizienz wurde die Blutprobe bei Klinikaufnahme entnommen. Teilweise lagen die Patientinnen jedoch bis zu 37 Tage auf der Pränatalstation, bis die Schwangerschaft beendet wurde. Im Verlauf dieser Zeit kam es in der Regel zu einer Agravierung der Symptome.

Somit gibt es erhebliche Schwankungen zwischen der Schwere der Symptomatik während der Blutentnahme und auch im Zeitfenster zwischen Blutentnahme und Entbindungszeitpunkt.

Für eine Folgestudie ist ein standardisierter Blutentnahmezeitpunkt sinnvoll. Dieser wäre direkt vor Entbindung möglich, oder man erlaubt ein Zeitfenster von 48 Stunden vor Entbindung, sodass für die Patientinnen keine zusätzlichen Blutentnahmen anfallen, sondern diese bei Aufnahme oder im Rahmen wiederholter Kontrollen der Laborparameter im Hinblick auf ein HELLP-Syndrom erfolgen können.

Um den optimalen Entnahmezeitpunkt zu finden, könnten mehrere Proben einer Patientin in verschiedenen Abständen zur Geburt untersucht werden, um potentielle Schwankungen im Serum zu identifizieren.

6 Zusammenfassung

Die schwangerschaftsinduzierten hypertensiven Erkrankungen und speziell das HELLP-Syndrom und die Präeklampsie gehören auch heute noch zu den Hauptursachen maternaler und perinataler Mortalität. Die Pathogenese ist weiterhin nicht abschließend geklärt.

Die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist eine Dioxygenase, die vor allem im Abbau des Tryptophan eine entscheidende Rolle spielt und auch in der Plazenta vorkommt. Der Tryptophanstoffwechsel ist für die Pathogenese der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen durch seinen Einfluss bei der Entstehung von oxidativem Stress und immunologische Reaktionen im feto-maternalen Zusammenspiel von Interesse.

In die vorliegende Arbeit wurden 19 Patientinnen mit einer Präeklampsie und 11 mit HELLP-Syndrom sowie 43 Patientinnen ohne hypertensive Schwangerschafts-erkrankung eingeschlossen. Zum einen wurde die IDO-Expression und IDO-Lokalisation im Plazentagewebe zum anderen der Tryptophanspiegel im Serum der Frauen untersucht.

Die Expression von IDO im Plazentagewebe war signifikant niedriger bei Patientinnen mit einer Präeklampsie oder einem HELLP-Syndrom im Vergleich zu den Schwangeren ohne hypertensive Erkrankung. Dies beantwortet die erste zentrale Frage der vorliegenden Arbeit. Damit wurden die Ergebnisse anderer Studien, die einen signifikanten Unterschied in der plazentaren IDO-Expression bei Patientinnen mit einer hypertensiven Schwangerschaftserkrankung (Präeklampsie oder HELLP-Syndrom) und Patientinnen ohne hypertensive Schwangerschaftserkrankung beschrieben, bestätigt.

Der Tryptophanspiegel im Serum der Patientinnen, die an einer der hypertensiven Schwangerschaftserkrankung litten, war zwar reduziert, ein signifikanter Zusammenhang konnte aber nicht hergestellt werden. Dieses Ergebnis beantwortet die zweite zentrale Frage: Der Tryptophanspiegel im Serum ist kein potentieller Marker für eine hypertensive Schwangerschaftserkrankung.

7 Abkürzungsverzeichnis

Gebräuchliche Abkürzungen sowie SI- und Nicht-SI-Einheiten werden nicht gesondert aufgeführt.

A

A	Avidin
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AD	Aqua destillata
Ag	Antigen
AK	Antikörper
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ALCAM	Activated Leucozyte Cell Adhesion Molecule
ANOVA	Analysis of variance
AP	Alkalische Phosphatase
APgp	Plazentagewebe für IHC
aS	aktiviertes Substrat
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ASS	Aspirin
AU	Abdomenumfang

B

B	Biotin
BDSG	Bundesdatenschutzgesetz
bE	biotinyliertes Enzym
BIP	Biparietaler Durchmesser
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serum Albumin
bsAK	biotinylierter Sekundärantikörper

C

C	Complex
CK	Cytokeratin
CoA	Coenzym A
CRP	C-reaktives Protein
CTG	Cardiotokographie

D

D	Dezidua
DAB	Diaminobenzidin
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
DIG	Disseminierte intravasale Gerinnung
DV	Ductus venosus

E

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EVT	Extravillöser Trophoblast

F

FL	Femurlänge
FPR	Falsch-Positiv-Rate

G

GDM	Gestationsdiabetes
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase

H

H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff (bildet in Wasser gelöst Salzsäure)

HE	Hämatoxylin-Eosin
HELLP	Hemolysis – Elevated Liver Enzymes – Low Platelets
HL	Humeruslänge
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HT	Hydroxytryptamin

I

IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IGF-α	Insulin-like-growth-factor-α
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver Score
IUGR	Intrauterine Growth Restriktion
i.v.	intravenös

K

KU	Kopfumfang
KZV	Kurzzeitvariation

L

LCHAD	Langketten-3-hydroxyacyl-ht-Dehydrogenase
LDH	Lactatdehydrogenase
LGA	Large for Gestational Age

M

M	molare Masse
MAD	Mittlerer Arterieller Druck
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis

N

n	Anzahl der Merkmalsausprägungen
N	Grundgesamtheit

Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NO	Stickstoff

O

O_2	Sauerstoff
oGTT	oraler Glucose-Toleranz-Test

P

p	probability (Signifikanz; Wahrscheinlichkeit)
pAK	Primärantikörper
PAPP-A	Pregnancy associated Plasma Protein-A
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDA	Periduralanästhesie
PI	Pulsatility Index
PlGF	placental growth factor
PMS	Prämenstruelles Schmerzsyndrom
pp	post partum

R

RR	Blutdruck nach Riva Rocci

S

S	Substrat
SA	Spiralarterie
SD	Standardabweichung
sflt-1	soluble fms-like tyrosine kinase-1
SGA	Small for Gestational Age
SIH	Schwangerschaftsinduzierter Hypertonus
SS	Schwangerschaft
SSW	Schwangerschaftswoche

T

TBS	Tris-buffered Saline
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TEC	TRIS/EDTA/Citrate solution
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TRUFFLE	Trial of Randomized Umbilical and Fetal Flow in Europe

U

UKE	Universitätsklinikum Eppendorf (Hamburg)

V

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Z

Z	Zotten
ZE	Zottenendothel
ZG	Zottengefäße
Z.n.	Zustand nach
ZS	Zottenstroma
ZST	Zyto-/Synzytiotrophoblast

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Tryptophanstoffwechsel

Abbildung 2: Die ABC-Methode

Abbildung 3: Mittlerer arterieller Druck (MAD)

Abbildung 4: Schwangerschaftswoche bei Entbindung

Abbildung 5: Frühgeburtlichkeit

Abbildung 6: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Abbildung 7: Anti-Vimentin-Färbung und Anti-CK-7-Färbung

Abbildung 8: IDO-Expressionslevel

Abbildung 9: Anti-IDO-Färbung

Abbildung 10: Anti-IDO-Färbung – Dezidua

Abbildung 11: Verteilung der IDO-Intensitäten

Abbildung 12: Mittlerer arterieller Druck (MAD) und IDO

Abbildung 13: Schwangerschaftswoche bei Entbindung und IDO

Abbildung 14: Verteilung des Tryptophanspiegels

Abbildung 15: Entbindung vor bzw. ab der 35. SSW

Abbildung 16: Plazentainsuffizienz

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen

Tabelle 2: Präkonzeptionelle und chronische Risikofaktoren für eine Präeklampsie

Tabelle 3: Ursachen der Plazentainsuffizienz

Tabelle 4: Patientencharakteristik 1

Tabelle 5: Patientencharakteristik 2

Tabelle 6: Rangkorrelationskoeffizient Kendall-Tau-b

Tabelle 7: IDO-Expressionslevel

Tabelle 8: Verteilung der IDO-Intensitäten

Tabelle 9: Univariate Analyse – IDO 1

Tabelle 10: Univariate Analyse – IDO 2

Tabelle 11: Univariate Analyse – Tryptophan 1

Tabelle 12: Univariate Analyse – Tryptophan 2

10 Literaturverzeichnis

1. Abalos E, Duley L, Steyn DW, Henderson-Smart DJ (2001) Antihypertensive drug therapy for mild to moderate hypertension during pregnancy. Cochrane Database Syst Rev. (2):CD002252.

2. Abildgaard U, Heimdal K (2013) Pathogenesis of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP): a review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 166(2):117-23.

3. Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F (2015) Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. 45(1):16-26.

4. Akolekar R, Syngelaki A, Poon L, Wright D, Nicolaides KH (2013) Competing risks model in early screening for preeclampsia by biophysical and biochemical markers. Fetal Diagn Ther. 33(1):8-15.

5. Akolekar R, Syngelaki A, Sarquis R, Zvanca M, Nicolaides KH (2011) Prediction of early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. Prenat Diagn. 31(1):66-74.

6. Altman D, Carroli D, Duley L, Farrell B, Moodley J, Neilson J, Smith D, Magpie Trial Collaboration Group (2002) Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial. Lancet. 359(9321):1877-90.

7. Bahr U, Karas M (2002) Massenspektrometrie Tutorial. Institut für klinische Chemie, Universitätsmedizin Mannheim (Universität Heidelberg). www.umm.uni-heidelberg.de/inst/ikc/proteomics/downloads/ mstutorialkaras.doc [Stand 12.12.2013, 09:00].

8. Baschat AA, Gembruch U, Reiss I, Gortner L, Weiner CP, Harmann CR (2000) Relationship between arterial and venous Doppler and perinatal outcome in fetal growth restriction. Ultrasound Obstet Gynecol. 16(5):407-13.

9. Baschat AA, Gembruch U, Weiner CP, Harmann CR (2003) Qualitative venous Doppler waveform analysis improves prediction of critical perinatal outcomes in premature growth-restricted fetuses. Ultrasound Obstet Gynecol. 22(3):240-5.

10. Benedetto C, Marozio L, Tancredi A, Picardo E, Nardolillo P, Tavella AM, Salton L (2011) Biochemistry of HELLP syndrome. Advan Clin Chem. 53:85-104.

11. Benyo DF, Miles TM, Conrad KP (1997) Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. J Clin Endocrinol Metab. 82:1582-1588.

12. Bergel E, Carroli G, Althabe F (2002) Ambulatory versus conventional methods for monitoring blood pressure during pregnancy. Cochrane Database Syst Rev (2):CD001231.

13. Blanford AT, Murphy BE (1977) In vitro metabolism of prednisolone, dexamethasone, betamethasone, and cortisol by the human placenta. Am J Obstet Gynecol. 127(3):264-7.

14. Bobrow CS, Soothill PW (1999) Fetal growth velocity: a cautionary tale. Lancet. 353(9163):1460.

15. Branchey L, Weinberg U, Branchey M, Linkowski P, Mendlewicz J (1982) Simultaneous study of 24-hour patterns of melatonin and cortisol secretion in depressed patients. Neuropsychobiology. 8(5):225-32.

16. Brosens IA (1995) The role of the uterine junctional zone in the pathogenesis of pre-eclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 63(2):199.

17. Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, van Assche A, Moutquin JM (2001) The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). Hypertens Pregnancy. 20(1):IX-XIV.

18. Buchbinder A, Sibai BM, Caritis S, Macpherson C, Hauth J, Lindheimer MD, Klebanoff M, Vandorsten P, Landon M, Paul R, Miodovnik M, Meis P, Thurnau G, National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units (2002) Adverse perinatal outcomes are significantly higher in severe gestational hypertension than in mild preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 186(1):66-71.

19. Bujold E, Morency AM, Roberge S, Lacasse Y, Forest JC, Giguère Y (2009) Acetylsalicylic acid for the prevention of preeclampsia and intra-uterine growth restriction in women with abnormal uterine artery Doppler: a systematic review and meta-analysis. J Obstet Gynaecol Can. 31(9):818- 26.

20. Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, Forest JC, Giguère Y (2010) Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. Obstet Gynecology. 116(2 Pt 1):402-14.

21. Campbell S, Thoms A (1977) Ultrasound measurement of the fetal head to abdomen circumference ratio in the assessment of growth retardation. Br J Obstet Gynaecol. 84:165-174.

22. Campell D, MacGillivray I, Carr-Hill R (1985) Pre-eclampsia in second pregnancy. Br J Obstet Gynaecol. 92(2):131-40.

23. Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BW, van der Post JA, Coomarasamy A, Zwinderman AH, Robson SC, Bindels PJ, Kleijnen J, Khan KS (2008) Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. CMAJ. 178(6):701-11.

24. Conde-Agudelo A, Villar J, Lindheimer M (2008) Maternal infection and risk of preeclampsia: Systemic review and metaanalysis. Am J Obstet Gynecol. 198(1):7-22.

25. Crispi F, Llurba E, Dominguez C, Martín-Gallán P, Cabero L, Gratacós E (2008) Predictive value of angiogenic factors and uterine artery Doppler for early- versus late-onset pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. Ultrasound Obstet Gynecol. 31(3): 303-9.

26. Cruz MO, Gao W, Hibbard JU (2012) What is the optimal time for delivery in women with gestational hypertension? Am J Obstet Gynecol. 207(3):214.e1-6.

27. Cunningham FG, Lindheimer MD (1992) Hypertension in pregnancy. New Engl J Med. 326(14):927-32.

28. Daley-Yates PT, Powell AP, Smith LL (1988) Pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase activity and its significance in the response of rats, mice, and rabbits to oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol. 96(2):222-32.

29. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat Rev Neurosci. 9(1):46–56.

30. Dawes GS, Houghton CR, Redman CW, Visser GH (1982) Pattern of the normal human fetal heart rate. Br J Obstet Gynaecol. 89(4):276-84.

31. Dekker G, Sibai B (2001) Primary, secondary, and tertiary prevention of pre-eclampsia. Lancet. 357(9251):209-15.

32. Derks JB, Mulder EJ, Visser GH (1995) The effects of maternal betamethasone administration on the fetus. Br J Obstet Gynaecol. 102(1):40-6.

33. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), Arbeitsgemeinschaft Schwangerenhochdruck/Gestose (2010) Diagnostik und

Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen. AWMF 015/018 (S2):1-22.

34. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) (2013) Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen. AVMF 015/018(S1):1-36.

35. Duckitt K, Harrington D (2005) Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. Br Med J. 330(7491):565-71.

36. Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner MO (2003) Sperm exposure and development of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 188(5):1241-43.

37. Ferrazzi E, Bozzo M, Rigano S, Bellotti M, Morabito A, Pardi G, Battaglia FC, Galan HL (2002) Temporal sequence of abnormal Doppler changes in the peripheral and central circulatory systems of the severely growth-restricted fetus. Ultrasound Obstet Gynecol. 19(2):140-6.

38. Ferrazzi E, Bulfamante G, Mezzopane R, Barbera A, Ghidini A, Pardi G (1999) Uterine Doppler velocimetry and placental hypoxic-ischemic lesion in pregnancies with fetal intrauterine growth restriction. Placenta. 20(5-6):389-94.

39. Fonseca JE, Méndez F, Catano C, Arias F (2005) Dexamethasone treatment does not improve the outcome of women with HELLP syndrome: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. Am J Obstet Gynecol. 193(5):1591-8.

40. Gangaram R, Ojwang PJ, Moodley J, Maharaj D (2005) The accuracy of urine dipsticks as a screening test for proteinuria in hypertensive disorders of pregnancy. Hypertens Pregnancy. 24(2):117-23.

41. Gómez O, Figueras F, Fernández F, Bennasar M, Martínez JM, Puerto B, Gratacós E (2008) Reference ranges for uterine artery mean pulsatility index at 11-41 weeks of gestation. Ultrasound Obstet Gynecol. 32(2):128-32.

42. Groome LJ, Owen J, Neely CL, Hauth JC (1991) Oligohydramnios: antepartum fetal urine production and intrapartum fetal distress. Am J Obstet Gynecol. 165(4 Pt 1):1077-80.

43. Gruenwald P (1963) Chronic fetal distress and placental insufficiency. Biol Neonat. 5:215-65.

44. Hafner E, Metzenbauer M, Höfinger D, Munkel M, Gassner R, Schuchter K, Dillinger-Paller B, Philipp K (2003) Placental growth from the first to the second trimester of pregnancy in SGA-foetuses and pre-eclamptic pregnancies compared to normal foetuses. Placenta. 24(4):336-42.

45. Haram K, Svendsen E, Abildgaard U (2009) The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. BMC Pregnancy Childbirth. 9:8.

46. Hecher K, Bilardo CM, Stigter RH, Ville Y, Hackelöer BJ, Kok HJ, Senat MV, Visser GH (2001) Monitoring of fetuses with intrauterine growth restriction: a longitudinal study. Ultrasound Obstet Gynecol. 18(6):564-70.

47. Hönig A, Rieger L, Kapp M, Sütterlin M, Dietl J, Kämmerer U (2004) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance. J Reprod Immunol. 61(2):79-86.

48. Hsu, SM, Raine, L (1981) Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. J Histochem Cytochem. 29(11):1349-53.

49. Huang SJ, Chen CP, Schatz F, Rahman M, Abrahams VM, Lockwood CJ (2008) Pre-eclampsia is associated with dendritic cell recruitment into the uterine decidua. J Pathol. 214(3):328-36.

50. Isler CM, Barrillequx PS, Magan EF, Bass JD, Martin JN Jr. (2001) A prospective, randomized trial comparing the efficacy of dexamethasone and betamethasone for the treatment of antepartum HELLP (hemolysis, elevated

liver enzymes, and low platelet count) syndrome. Am J Obstet Gynecol. 184(7):1332-7.

51. James JL, Whitley GS, Cartwright JE (2010) Pre-eclampsia: fitting together the placental, immune and cardiovascular pieces. J Pathol. 221(4):363-78.

52. Kahn B, Lumely LH, Zybert PA, Lorenz JM, Cleary-Goldmann J, D'Alton ME, Robinson JN (2003) Prospective risk of fetal death in singleton, twin, and triplet gestations: implications for practice. Obstet Gynecol. 102(4):685-92.

53. Kai S, Goto S, Tahara K, Sasaki A, Kawano K, Kitano S (2003) Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase suppresses NK cell activity and accelerates tumor growth. J Exp Ther Oncol. 3(6):336-45.

54. Kamimura S, Eguchi K, Yonezawa M, Sekiba K (1991) Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. Acta Med Okayama. 45(3):135–9.

55. Karumanchi SA, Lim KH, August P (2013) Pathogenesis of preeclampsia. UpToDate. http://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-preeclampsia [Stand 23.12.2013, 23:00].

56. Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC (2008) Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. Immunol Rev. 222:206-21.

57. Khoury MJ, Erickson JD, Cordero JF, McCarthy BJ (1988) Congenital malformations and intrauterine growth retardation: a population study. Pediatrics. 82(1):83-90.

58. Kiechle M (2007) Gynäkologie und Geburtshilfe. 1. Auflage, Elsevier Urban & Fischer Verlag, München. 351-4.

59. King NJ, Thomas SR (2007) Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. Int J Biochem Cell Biol. 39(12):2167-72.

60. Klockenbusch W, Fischer T (2005) Präeklampsie, 1. Auflage. UNI-MED, Bremen. 19.

61. Kudo Y, Boyd CA, Sargent IL, Redman CW (2000) Modulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon-gamma in human placental chorionic villi. Mol Hum Reprod. 6(4):369–74.

62. Kudo Y, Boyd CA, Sargent IL, Redman CW (2003) Decreased tryptophan catabolism by placental indoleamine 2,3-dioxygenase in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 188(3):719-26.

63. Kudo Y, Hara T, Katsuki T, Toyofuku A, Katsura Y, Takikawa O, Fujii T, Ohama K (2004) Mechanisms regulating the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase during decidualization of human endometrium. Hum Reprod. 19(5):1222-30.

64. Lachmeijer AM, Arngrímsson R, Bastiaans EJ, Frigge ML, Pals G, Sigurdardóttir S, Stéfansson H, Pálsson B, Nicolae D, Kong A, Aarnoudse JG, Gulcher JR, Dekker GA, ten Kate LP, Stéfansson K (2001) A genome-wide scan for preeclampsia in the Netherlands. Eur J Hum Genet. 9(10):758-64.

65. Lam C, Lim K-H, Karumanchi SA (2005) Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. Hypertension. 46(5):1077-85.

66. Lechtig A, Yarbrough C, Delgado H, Martorell R, Klein RE, Béhar M (1975) Effect of moderate maternal malnutrition on the placenta. Am J Obstet Gynecol. 123(2):191-201.

67. Lees C, Marlow N, Arabin B, Bilardo CM, Brezinka C, Derks JB, Duvekot J, Frusca T, Diemert A, Ferrazzi E, Ganzevoort W, Hecher K, Martinelli P, Ostermayer E, Papageorghiou AT, Schlembach D, Schneider KTM, Thilaganathan B, Todros T, van Wassenaer-Leemhuis A, Valcamonico A, Visser GHA, Wolf H on the behalf of the TRUFFLE Group (2013) Perinatal morbidity and mortality in early-onset fetal growth restriction: cohort outcomes

of the trial of randomized umbilical and fetal flow in Europe (TRUFFLE). Ultrasound Obstet Gynecol. 42 (4):400-8.

68. Lees C, Marlow N, van Wassenaer-Leemhuis A, Arabin B, Bilardo CM, Brezinka C, Calvert S, Derks JB, Diemert A, Duvekot J, Ferrazzi E, Frusca T, Ganzevoort W, Hecher K, Martinelli P, Ostermayer E, Papageorghiou AT, Schlembach D, Schneider KTM, Thilaganathan B, Todros T, Valcamonico A, Visser GHA, Wolf H, for the TRUFFLE study group (2015) 2 year neurodevelopmental and intermediate perinatal outcomes in infants with very preterm fetal growth restriction (TRUFFLE): a randomised trial. Lancet. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62049-3 [Stand 23.03.2015, 11:00].

69. Lehnen H, Mosblech N, Reineke T, Puchooa A, Menke-Möllers I, Zechner U, Gembruch U (2013) Pränatale klinische Beurteilung der sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase-1)/PlGF (placental growth factor) Ratio als diagnostisches Instrument für Präeklampsie, schwangerschaftsinduzierten Hochdruck und Proteinurie. Geburtshilfe Frauenheilkd. 73(5): 440–5.

70. Levine RJ, Lam C, Quian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanch A, for the CPEP Study Group (2006) Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. N Engl J Med. 355(10):992-1005.

71. Levine RJ, Quian C, Maynard SE, Kai FY, Epstein FH, Karumanchi SA (2006) Serum sFlt1 concentration during preeclampsia and mid trimester blood pressure in healthy nulliparous women. Am J Obstet Gynecol. 194(4):1034-41.

72. Lindheimer MD, Kanter D (2010) Interpretin abnormal proteinuria in pregnancy: the need for a more pathophysiological approach. Obstet Gynecol. 115(2 Pt 1):365-75.

73. Lisonkova S, Joseph KS (2013) Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease. Am J Obstet Gynecol. 209(6):544.e1-12.

74. Lo JO, Mission JF, Caughey AB (2013) Hypertensive disease of pregnancy and maternal mortality. Curr Opin Obstet Gynecol. 25(2):124-32.

75. Lukacs Z, Santer R (2006) Evaluation of electrospray-tandem mass spectrometry for the detection of phenylketonuria and other rare disorders. Mol Nutr Food Res. 50(4-5):443-50.

76. Lukacs Z, Santer R, Stehn M, Kohlschütter A (2004) Neugeborenenscreening mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) – Potenzial, Probleme und Perspektiven. Kinder- und Jugendmedizin. 6(4):222-5.

77. Magee LA, Abalos E, von Dadelszen P, Sibai B, Easterling T, Walkinshaw S, for the CHIPS Study Group (2011) How to manage hypertension in pregnancy effectively. Br J Clin Pharmacol. 72(3):394-401.

78. Magee LA, Cham C, Waterman EJ, Ohlsson A, von Dadelszen P (2003) Hydralazine for treatment of severe hypertension in pregnancy: meta-analysis. BMJ. 327(7421):955-60.

79. Magpie Trial Follow-Up Study Collaborative Group (2007) The Magpie Trial: a randomised trial comparing magnesium sulphate with placebo for pre-eclampsia. Outcome for women at 2 years. BJOG. 114(3):300-9.

80. Martin JN, Rose CH, Criery CM (2006) Understanding and managing HELLP syndrome: the integral role of aggressive glucocorticoids for mother and child. Am J Obstet Gynecol. 195(4):914-34.

81. Martin JN Jr, May WL, Magann EF, Terrone DA, Rinehart BK, Blake PG (1999) Early risk assessment of severe preeclampsia: admission battery of symptoms and laboratory tests to predict likelihood of subsequent significant maternal morbidity. Am J Obstet Gynecol. 180(6 Pt 1):1407-14.

82. Martin JN Jr, Thigpen BD, Rose CH, Cushman J, Moore A, May WL (2003) Maternal benefit of high-dose intravenous corticosteroid therapy for HELLP syndrome. Am J Obstet Gynecol. 189(3):830-4.

83. Matchaba P, Moodley J (2004) Corticosteroids for HELLP syndrome in pregnancy. Cochrane Database Syst. Rev (1):CD002076.

84. Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA (2008) Preeclampsia and angiogenic imbalance. Annu Rev Med. 59(1):61-78.

85. Mellor AL, Sivakumar J, Chandler P, Smith K, Molina H, Mao D, Munn DH (2001) Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. Nat Immunol. 2(1):64–8.

86. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell. 31(1):11-24.

87. Moran P, Baylis PH, Lindheimer MD, Davison JM (2003) Glomerular ultrafiltration in normal and preeclamptic pregnancy. J Am Soc Nephrol. 14(3):648-52.

88. Moran P, Lindheimer MD, Davison JM (2004) The renal response to preeclampsia. Semin Nephrol. 24(6):588-95.

89. Mostello D, Kallogieri D, Tungsiripat R, Leet T (2008) Recurrence of preeclampsia: effects of gestational age at delivery of the first pregnancy, body mass index, paternity, and interval between births. Am J Obstet Gynecol. 199(1):55.e1-7.

90. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science. 281(5380):1191-3.

91. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy (2000) Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 183(1):S1-S22.

92. Nilsson E, Salonen Ros H, Cnattingius S, Lichtenstein P (2004) The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: a family study. BJOG. 111(3):200-6.

93. Nishizawa H, Hasegawa K, Suzuki M, Achiwa Y, Kato T, Saito K, Kurahashi H, Udagawa Y (2008) Mouse model for allogeneic immune reaction against fetus recapitulates human pre-eclampsia. J Obstet Gynaecol. 34(1):1-6.

94. Nishizawa H, Hasegawa K, Suzuki M, Kamoshida S, Kato T, Saito K, Tsutsumi Y, Kurahashi H, Udagawa Y (2007) The etiological role of allogeneic fetal rejection in pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol. 58(1):11-20.

95. Nishizawa H, Suzuki M, Pryor-Koishi K, Sekiya T, Tada S, Kurahashi J, Udagawa Y (2011) Impact of indoleamine 2,3-dioxygenase on the antioxidant system in the placentas of severely pre-eclamptic patients. Syst Biol Reprod Med. 57(4):174-8.

96. O'Brian JM, Shumate SA, Satchwell SL, Milligan DA, Barton JR (2002) Maternal benefit of corticosteroid therapy in patients with HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count) syndrome: impact on the rate of regional anesthesia. Am J Obstet Gynecol. 186(3):475-9.

97. Ott WJ (1988) The diagnosis of altered fetal growth. Obstet Gynecol Clin North Am. 15(2):237-63.

98. Papageorghiou AT, Leslie K (2007) Uterine artery Doppler in the prediction of adverse pregnancy outcome. Curr Opin Obstet Gynecol. 19(2):103-9.

99. Pathologie-Online (1997-2015) Immunhistologie. http://www.pathologie-online.de/methoden/immunhistologie/ [Stand 22.03.2015, 20:30].

100. Rath W, Bartz C (2004) Therapeutisches Vorgehen bei schwerer Präeklampsie und beim HELLP-Syndrom. Zentralbl Gynakol.126(5):293-8.

101. Rath W, Faridi A, Dudenhausen JW (2000) HELLP syndrome. J Perinat Med. 28(4):249-60.

102. Raymond D, Peterson E (2011) A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia. Obstet Gynecol Surv. 66(8):497-506.

103. Redman CW, Sargent IL (2005) Latest advances in understanding preeclampsia. Science. 308(5728):1592-4.

104. Reister F, Heyl W, Kaufmann P, Rath W (2008) The Etiology of Disturbed Trophoblast Invasion in Pre-Eclampsia. Geburtsh Frauenheilk. 58(12):625-31.

105. Remmele W, Stegner HE (1987) Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. Pathologe. 8(3):138-40.

106. Riihsinghani A, Yankowitz J, Strauss RA, Kuller JA, Patil S, Williamson RA (1997) Risk of preeclampsia in second-trimester triploid pregnancies. Obstet Gynecol. 90(6):884-8.

107. Roberge S, Villa P, Nicolaides K, Giguère Y, Vainio M, Bakthi A, Ebrashy A, Bujold E (2012) Early administration of low-dose aspirin for the prevention of preterm and term preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. Fetal Diagn Ther. 31(3):141-6.

108. Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A (1991) Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. Am J Hypertens. 4(8):700-8.

109. Robertson WB (1976) Uteroplacental vasculature. J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol). 10:9-17.

110. Robinson CM, Shire KA, Carlin JM (2003) Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. J Interferon Cytokine Res. 23(8):413-21.

111. Saito K, Nagamura Y Ohta Y, Sasaki E, Ishiguro I (1991) Characterization of the L-tryptophan transport system in the liver of growing rats. Life Sci. 49(7):527-34.

112. Santoso D, Rogers P, Wallace E, Manuelpillai U, Walker D, Subakir S (2002) Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase and 4-hydroxynonenal in normal and pre-eclamptic placentae. Placenta. 23(5):373-9.

113. Schmidt M, Kimming R (2007) Pathophysiology of preeclampsia. Gynakol Geburtshilfliche Rundsch. 47(4):199-204.

114. Schröcksnadel H, Steckel-Berger G, Dapunt O, Wachter H, Fuchs D (1996) Decreased plasma tryptophan in pregnancy. Obstet Gynecol. 88(1):47–50.

115. Sedlmayr P (2007) Indoleamine 2,3-dioxygenase in materno-fetal interaction. Curr Drug Metab. 8(3):205-8.

116. Sedlmayr P, Blaschitz A, Stocker R (2014) The role of placental tryptophan catabolism. Front Immunol. 5:230.

117. Seely EW, Ecker J (2011) Clinical practice. Chronic hypertension in pregnancy. N Engl J Med. 365(5):439-46.

118. Sibai BM (2004) Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. Obstet Gynecol 103(5 Pt 1):981-91.

119. Sibai BM (2013) HELLP Syndrome. UpToDate. http://uptodate.com/contents/hellp-syndrom [Stand 23.12.2013, 23:00].

120. Sibai BM, Ramadan MK, Usta I, Salama M, Mercer BM, Friedman SA (1993) Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome). AM J Obstet Gynecol. 169(4):1000-6.

121. Skjaerven R, Wilcox AJ, Lie RT (2002) The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. N Engl J Med 346(1):33-8.

122. Spencer K, Yu CK, Savvidou M, Papageorghiou AT, Nicolaides KH (2006) Prediction of pre-eclampsia by uterine artery Doppler ultrasonography and maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A, free beta-human chorionic gonadotropin, activin A and inhibin A at 22 + 0 to 24 + 6 weeks' gestation. Ultrasound Obstet Gynecol. 27(6):658-63.

123. Steegers E, van Dadelszen P, Duvekot J, Pijnenborg R (2010) Pre-eclampsia. Lancet. 376(9741): 631-44.

124. Stella CL, How HY, Sibai BM (2006) Thrombophilia and adverse maternal-perinatal outcome: controversies in screening and management. Am J Perinatol. 23(8):499-506.

125. Taylor MW, Feng GS (1991) Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. FASEB J. 5(11):2516–22.

126. Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G (2002) Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. J Exp Med. 196(4):447-57.

127. Thomas SR, Mohr D, Stocker R (1994) Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. J Biol Chem. 269(20):14457-64.

128. Tubbergen P, Lachmeijer AM, Althuisius SM, Vlak ME, van Geijn HP, Dekker GA (1999) Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparous women? J Reprod Immunol. 45(1):81-8.

129. Turner JA (2010) Diagnosis and management of pre-eclampsia: an update. Int J Womens Health. 2:327-37.

130. van Pampus MG, Wolf H, Mayruhu G, Treffers PE, Bleker OP (2001) Long-term follow-up in patients with a history of (H)ELLP syndrome. Hypertens Pregnancy. 20(1):15-23.

131. van Runnard Heimel PJ, Kavelaars A, Heinjnen CJ, Peters WH, Huisjes AJ, Franx A, Bruinse HW (2008) HELLP syndrome is associated with an increased inflammatory response, which may be inhibited by administration of prednisolone. Hypertens Pregnancy. 27(3):253-65.

132. Veille JC, Kanaan C (1989) Duplex Doppler ultrasonographic evaluation of the fetal renal artery in normal and abnormal fetuses. Am J Obstet Gynecol. 161(6 Pt 1):1502-7.

133. Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, Pape J, Dudenhausen JW, Denk B, Stepan H (2010) An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 202(2):161.e1-11.

134. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Moertl M, Zeisler H, Calda P, Holzgreve W, Galindo A, Engels T, Denk B, Stepan H (2012) The sFlt-1/PlGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. Am J Obstet Gynecol. 206(1):58.e1-8.

135. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Zeisler H, Calda P, Sabria J, Markfeld-Erol F, Galindo A, Schoofs K, Denk B, Stepan H (2014) New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. Hypertension. 63(2):346-52.

136. Visser W, Wallenburg HC (1995) Temporising management of severe pre-eclampsia with and without the HELLP syndrome. Br J Obstet Gynaecol. 102(2):111-7.

137. von Dadelszen P, Payne B, Li J, Ansermino JM, Broughton Pipkin F, Côté AM, Douglas MJ, Gruslin A, Hutcheon JA, Joseph KS, Kyle PM, Lee T, Loughna P, Menzies JM, Merialdi M, Millman AL, Moore MP, Moutquin JM, Ouellet AB, Smith GN, Walker JJ, Walley KR, Walters BN, Widmer M, Lee SK, Russell JA, Magee LA; PIERS Study Group (2011) Prediction of adverse maternal outcomes in pre-eclampsia: development and validation of the fullPIERS model. Lancet. 377(9761):219-27.

138. Wacker JR, Wagner BK, Briese V, Schauf B, Heilmann L, Bartz C, Hopp H (2006) Antihypertensive therapy in patients with pre-eclampsia: A prospective randomised multicentre study comparing dihydralazine with urapidil. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 127(2):160-5.

139. Wang JX, Knottnerus AM, Schuit G, Norman RJ, Chan A, Dekker GA (2002) Surgically obtained sperm, and risk of gestational hypertension and pre-eclampsia. Lancet. 359(9307):673-4.

140. Waugh JJ, Bell SC, Kilby MD, Blackwell CN, Seed P, Shennan AH, Halligan AW (2005) Optimal bedside urinalysis for the detection of proteinuria in hypertensive pregnancy: a study of diagnostic accuracy. BJOG. 112(4):412-7.

141. Weinstein L (1982) Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 142(2):159-67.

142. Werner ER, Werner-Felmayer G (2007) Substrate and cofactor requirements of indoleamine 2,3-dioxygenase in interferon-gamma-treated cells: utilization of oxygen rather than superoxide. Curr Drug Metab. 8(3):201-3.

143. Wilczynski JR (2006) Immunological analogy between allograft rejection, recurrent abortion and pre-eclampsia - the same basic mechanism? Hum Immunol. 67(7):492-511.

144. Wilke G, Rath W, Schutz E, Armstrong VW, Kuhn W (1992) Haptoglobin as a sensitive marker of hemolysis in HELLP-syndrome. Int J Gynaecol Obstet. 39(1):29-34.

145. Woudstra DM, Chandra S, Hofmeyr GJ, Dowswell T (2010) Corticosteroids for HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets) syndrome in pregnancy. Cochrane Database Syst Rev. (9):CD008148.

146. Xiong X, Fraser WD, Demianczuk NN (2002) History of abortion, preterm, term birth, and risk of preeclampsia: a population-based study. Am J Obstet Gynecol. 187(4):1013-8.

147. Yamazaki F, Kuroiwa T, Takikawa O, Kido R (1985) Human indolylamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. Biochem J. 230(3):635–8.

148. Yu CK, Smith GC, Papageorghiou AT, Cacho AM, Nicolaides KH, Fetal Medicine Foundation Second Trimester Screening Group (2005) An integrated model for the prediction of preeclampsia using maternal factors and uterine artery Doppler velocimetry in unselected low-risk women. Am J Obstet Gynecol. 193(2):429-36.

11 Anhang

11.1 Ethikvotum

ETHIK-KOMMISSION DER
ÄRZTEKAMMER
HAMBURG
Körperschaft des öffentlichen Rechts

Ärztekammer Hamburg · Postfach 76 01 09 · 22051 Hamburg

Frau
Dr. Maike Ihnen
Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe
und Pränatalmedizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistrasse 52
20246 Hamburg

01.07.2010

Bearb.-Nr.: **PV3426 (Bitte stets angeben!)**
Studie: ALCAM in Plazentagewebe von normalen Schwangerschaften und Schwangerschaftspathologien

Sehr geehrte Frau Kollegin Ihnen,

über Ihr oben bezeichnetes, zur Primärberatung vorgelegtes Projekt hat die Ethik-Kommission ausführlich beraten.

Das Vorhaben entspricht den berufsrechtlichen bzw. gesetzlichen Anforderungen. Die Ethik-Kommission stimmt dem Vorhaben zu.

Die Kommission weist darauf hin, dass die Verantwortung des Versuchsleiters für das Forschungsvorhaben und seine Durchführung durch das obige Votum der Kommission nicht berührt wird.

Sie werden gebeten, die Ethik-Kommission über alle schwerwiegenden oder unerwarteten Ereignisse, die während der Studie auftreten und die die Sicherheit der Studienteilnehmer gefährden, in Verbindung mit Ihrer Stellungnahme zu unterrichten.
Die Kommission geht davon aus, dass die personenbezogenen Daten der Probanden/ Patienten den datenschutzrechtlichen Vorschriften entsprechend behandelt werden.

Die Ethik-Kommission erwartet, dass Ihr nach Abschluss des Projektes unaufgefordert ein Abschluss-Bericht übersandt wird (unter Angabe der Bearb.-Nr.), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Mit verbindlicher Empfehlung
Im Auftrage der Kommission:

Prof. Dr. med. Th. Weber
- Vorsitzender -

P.S. Die Ethik-Kommission arbeitet auf der Grundlage deutschen Rechts und Berufsrechts sowie in Anlehnung an die ICH-GCP

Bankverbindung:
Deutsche Apoth. u. Ärztebank, BLZ 200 906 07, Konto-Nr. 000 1346 113
BIC DAAEDEDD, IBAN DE71 3006 0601 000 1346 113

Humboldtstraße 67a · 22083 Hamburg
Telefon 040 / 20 22 99-240 · Fax 040 / 70 77 99-410
ethik@aerztekh.de · www.aerztekammer-hamburg.de
Geschäftsführung: Dr. Silke Schrum

11.2 Aufklärung zur Studie

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin

Prof. Dr. med. Kurt Hecher
Direktor

Zentrum für Geburtshilfe-, Kinder- und Jugendmedizin
Martinistraße 52
20246 Hamburg
Telefon: (040) 7410-57832
Telefax: (040) 7410-46767
geburtshilfe@uke.uni-hamburg.de
www.uke.uni-hamburg.de

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Martinistraße 52
20246 Hamburg
Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin

Patientenaufkleber:

Prüfärzte
Frau Dr. med. Manuela Tavares
Telefon: (040) 7410-20321
Telefon: 0152 22816260
m.tavares-de-sousa@uke.de

Frau Dr. med. Maike Ihnen
m.ihnen@uke.uni-hamburg.de

Perinatalzentrum
Level 1

AUFKLÄRUNG ZUR STUDIE

Studientitel: ALCAM in Plazentagewebe von normalen Schwangerschaften und Schwangerschaftspathologien

Sehr geehrte Frau _____,

das Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, die Klinik für Pränatalmedizin und Geburtshilfe und die Klinik für Gynäkologie sind ein Teil der weltweiten Wissenschaftsgemeinde.
Um die Behandlung weiter zu verbessern, sind wir unter anderem auf Gewebe- und Blutproben sowie Behandlungsdaten angewiesen, die auch im Rahmen Ihrer Behandlung, ohne Nachteile für Sie, gewonnen werden können. Die Proben werden an der Universitäts-Frauenklinik (Klinik für Geburtshilfe und Klinik für Gynäkologie am UKE, Hamburg) oder in Forschungskooperationen unter Wahrung des Datenschutzes zu wissenschaftlichen Zwecken analysiert. Persönliche Daten werden nicht an Dritte weitergegeben. Die Untersuchungen können zum Beispiel zum Ziel haben, neue Informationen über die Erbsubstanz (Gene) oder Eiweißstoffe im Zusammenhang mit einer Erkrankung zu erlangen.

Da es sich um wissenschaftliche Fragestellungen handelt, haben diese Untersuchungen keinen Einfluss auf Ihre Behandlung. Möchten Sie Ergebnisse bestimmter Untersuchungen erfahren, können wir Ihnen diese - soweit möglich - mitteilen. Das Gewebe wird bis auf Weiteres gelagert, Sie können sich dieses auf Wunsch aushändigen oder vernichten lassen, die Daten werden dann ebenfalls nicht weiterverwendet.
Über Ihr Einverständnis zur wissenschaftlichen Auswertung würden wir uns sehr freuen. Sollten Sie sich nicht entschließen können, Ihr Einverständnis zu geben, wird hierdurch Ihre derzeitige Behandlung in keiner Weise beeinträchtigt.

Das derzeit aktuelle Projekt untersucht die Funktion von sog. "Adhäsionsmolekülen" namens "ALCAM" und „E-Cadherin“, welche vermutlich für die Einnistung der Fruchtanlage, Ausbildung von Gefäßen und immunologischen Prozessen während der Schwangerschaft eine Rolle spielen. Es soll untersucht werden, ob ALCAM und E-Cadherin bei Schwangerschaftserkrankungen, wie z.B. Präeklampsie, HELLP oder in Situationen wie Frühgeburtlichkeit, vorzeitiger Plazentalösung oder verspäteter Plazentalösung beteiligt sind und ggf. verstärkt oder abgeschwächt vom Körper in dieser Situation gebildet werden. Dafür würde bei Ihnen eine Blutprobe sowohl vor als auch nach der Geburt sowie Plazentaproben nach der Geburt entnommen und hinsichtlich des Vorhandenseins auf ALCAM und E-Cadherin analysiert werden. Hintergrund dieser Untersuchungen ist es zum einen, das Verständnis dieser Abläufe zu verbessern und zum anderen, daraus mögliche Therapieoptionen in der Zukunft abzuleiten.

Die Proben werden für eine Dauer von 10 Jahren aufbewahrt.
Sollte sich aus den Studienergebnissen eine weiterführende Fragestellung ergeben, können die Daten und Proben gegebenenfalls für eine weiterführende Studie verwandt werden. Es werden nur die anonymisierten Daten verwendet.

11.3 Aufklärung zum Datenschutz

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin

Prof. Dr. med. Kurt Hecher
Direktor

Zentrum für Geburtshilfe-, Kinder- und Jugendmedizin
Martinistraße 52
20246 Hamburg
Telefon: (040) 7410-57832
Telefax: (040) 7410-46767
geburtshilfe@uke.uni-hamburg.de
www.uke.uni-hamburg.de

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Martinistraße 52
20246 Hamburg
Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin

Patientenaufkleber:

Prüfärzte
Frau Dr. med. Manuela Tavares
Telefon: (040) 7410-20321
Telefon: 0152 22816260
m.tavares-de-sousa@uke.de

Frau Dr. med. Maike Ihnen
m.ihnen@uke.uni-hamburg.de

Perinatalzentrum Level 1

AUFKLÄRUNG ZUM DATENSCHUTZ

Studientitel: ALCAM in Plazentagewebe von normalen Schwangerschaften und Schwangerschaftspathologien

Sehr geehrte Frau _____,

die im Rahmen der Studie nach Einverständniserklärung erhobenen persönlichen Daten, insbesondere Befunde, unterliegen der Schweigepflicht und den datenschutzgesetzlichen Bestimmungen. Sie werden in Papierform und auf Datenträgern bei Frau Dr. Maike Ihnen, Frau Dr. Manuela Tavares und Frau Sarah Gumpert im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf aufgezeichnet bzw. gespeichert. Im Zeitraum der Datenerhebung erfolgt die Aufzeichnung pseudonymisiert[1]. Sobald die Datenerhebung nach ca. 3 Monaten abgeschlossen ist, werden die persönlichen Daten verworfen und die Daten somit anonymisiert[2]. Die Daten werden dann in anonymisierter Form weiterverarbeitet.

[1] Pseudonymisierung ist das Ersetzen der Namens und anderer Identifikationsmerkmale durch ein Kennzeichen zu dem Zweck, die Bestimmung des Betroffenen auszuschließen bzw. wesentlich zu erschweren (§ 3 Abs. 6a BDSG).

[2] Anonymisierung ist das Verändern personenbezogener Daten derart, dass die Einzelangaben über persönliche oder sachliche Verhältnisse nicht mehr oder nur mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten und Arbeitskraft einer bestimmten oder bestimmbaren natürlichen Person zugeordnet werden können (§ 3 Abs. 6 BDSG).

Die Proben werden in Paraffin und als Fresh Frozen Tissue (Frischgewebe) bzw. Serum aufbewahrt.
Eine Weitergabe der erhobenen Daten im Rahmen des Forschungszwecks erfolgt nur in anonymisierter Form. Gleiches gilt für die Veröffentlichung der Studienergebnisse.
Sie haben das Recht, über die von Ihnen stammenden personenbezogenen Daten Auskunft zu verlangen, und über möglicherweise anfallende personenbezogene Ergebnisse der Studie informiert oder nicht informiert zu werden. Gegebenenfalls wird der Leiter der Studie Ihre Entscheidung darüber einholen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass nur innerhalb der ersten 3 Monate eine entsprechende Auskunft möglich ist, da die persönlichen Daten nach dieser Zeit verworfen werden und keine Rückverfolgung mehr möglich ist.
Die Aufzeichnung bzw. Speicherung der Daten erfolgt für die Dauer von 10 Jahren.
Sollte sich aus den Studienergebnissen eine weiterführende Fragestellung ergeben, können die Daten und Proben gegebenenfalls für eine weiterführende Studie verwandt werden. Auch in diesem Fall werden nur die anonymisierten Daten verwendet.
Die Kodierungsliste sowie die Proben und Daten werden von Frau Dr. Maike Ihnen, Frau Dr. Manuela Tavares und Frau Sarah Gumpert verwahrt.
Bei Widerruf der Studienteilnahme wenden Sie sich an die Prüfärzte Frau Dr. Maike Ihnen und Frau Dr. Manuela Tavares (Kontaktdetails siehe oben).
Im Rahmen des Widerrufs des Einverständnisses werden die bereits erhobenen Daten auf Wunsch der Patientin gelöscht. Die bereits gesammelten Proben werden regelgerecht vernichtet und entsorgt.
Ein Widerruf der Studienteilnahme ist nur innerhalb der ersten 3 Monate möglich, da danach die Daten nur noch in anonymisierter Form vorliegen und man somit nicht mehr auf die persönlichen Daten zugreifen kann.

11.4 Einverständniserklärung

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin

Prof. Dr. med. Kurt Hecher
Direktor

Zentrum für Geburtshilfe-, Kinder- und Jugendmedizin
Martinistraße 52
20246 Hamburg
Telefon: (040) 7410-57832
Telefax: (040) 7410-46767
geburtshilfe@uke.uni-hamburg.de
www.uke.uni-hamburg.de

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Martinistraße 52
20246 Hamburg
Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin

Patientenaufkleber:

Prüfärzte
Frau Dr. med. Manuela Tavares
Telefon: (040) 7410-20321
Telefon: 0152 22816260
m.tavares-de-sousa@uke.de

Frau Dr. med. Maike Ihnen
m.ihnen@uke.uni-hamburg.de

Perinatalzentrum Level 1

EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG

Studientitel: ALCAM in Plazentagewebe von normalen Schwangerschaften und Schwangerschaftspathologien

_____ (Name des aufklärenden Arztes) hat mich vollständig über das Wesen und die Bedeutung der geplanten Studie aufgeklärt. Ich konnte dabei alle mich interessierenden Fragen stellen. Ferner hatte ich Gelegenheit, die Aufklärungsblätter genau durchzulesen und auch dazu Fragen zu stellen.

Ein Exemplar der Aufklärung/Einverständniserklärung ist mir zum Verbleib ausgehändigt worden.

Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass die im Rahmen der Studie erhobenen persönlichen Daten der Schweigepflicht und den datenschutzgesetzlichen Bestimmungen unterliegen. Sie werden in Papierform aufgezeichnet und auf elektronischen Datenträgern zu Beginn pseudonymisiert und nach der vollständigen Datenerhebung anonymisiert gespeichert. Die Nutzung der Daten erfolgt anonymisiert. Eine Weitergabe im Rahmen des Forschungszwecks oder eine Veröffentlichung der Studienergebnisse erfolgt nur in anonymisierter Form. Die Speicherung der Daten und die Aufbewahrung der Gewebeproben ist für eine Dauer von 10 Jahren vorgesehen. Ich wurde darüber aufgeklärt, dass ich meine

Zustimmung widerrufen kann. In diesem Fall wende ich mich an Frau Dr. Maike Ihnen oder Frau Dr. Manuela Tavares (Kontaktdetails siehe oben). Bei Widerruf der Einverständniserklärung werden die bereits erhobenen personenbezogenen Daten gelöscht. Ein Widerruf ist jedoch nur während der ersten 3 Monate möglich, da dann die Daten anonymisiert werden und eine Rückverfolgung nicht mehr möglich ist.
Ich bin außerdem darüber aufgeklärt worden, dass meine Daten und Proben gegebenenfalls für eine Anschlussstudie, die sich aus den Studienergebnissen ergeben könnte, weiter genutzt werden.

Ich bestätige durch meine Unterschrift, dass ich die Aufklärung verstanden habe und mich mit der Durchführung der vorgenannten Studie einverstanden erkläre.

Datum:

_____ _____

Unterschrift des aufklärenden Arztes Unterschrift der Probandin

11.5 Datenblatt

Patientennummer _____

Name _____

Geburtsdatum _____

Gewicht (vor SS) _____ Größe_____ BMI _____

Zyklusanamnese

Dauer der Regelblutung (in Tagen) _____

Stärke der Regelblutung

- Normal ◻
- Hypomenorrhoe ◻
- Hypermenorrhoe (> 80ml) ◻

Intervall der Regelblutung

- normal ◻
- Amenorrhoe (Intervalle > 3 Monate/noch nie) ◻
- Oligomenorrhoe (Intervalle > 5 Wochen bis 3 Monate) ◻
- Polymenorrhoe (Zyklus < 25 Tage) ◻

Verhütungsmethode

_____ Hormonelle Verhütung ◻

PMS

Psychische Symptome	◻	Kopfschmerzen	◻
Brustspannen	◻	Abdominalbeschwerden	◻
Gewichtszunahme	◻		

Konzeption

Zeitraum von Planung bis Eintritt der SS (in Monaten) _____

Vorerkrankungen der Patientin

Diabetes Mellitus	□	Thromboseneigung	□
Hypertonus	□	Faktor-V-Leiden	□
Psychische Erkrankungen	□	Antiphospholipid-AK	□
Uterusoperationen	□	Antithrombin-III-Mangel	□
Allergien	□	Protein-S-Mangel	□
Hashimoto Thyreoditis	□	Protein-C-Mangel	□
Blutungsneigung	□		

Sonstige Vorerkrankungen _____

Medikamente

Blutdruckmedikamente	□	Immunsuppresiva	□
Insulin	□	Neuroleptika	□
Gerinnungsmedikamente	□	Psychopharmaka	□
Asthmamedikamente	□		

Sonstige Medikamente _____

Verlauf vorangegangener SS

Z.n. Gestationsdiabetes	□	Z.n. Uterusatonie	□
Z.n. Präeklampsie	□	Z.n. Nachblutungen	□
Z.n. HELLP	□	Z.n. Plazentainsuffizienz	□
Z.n. Plazentalösungsstörung	□	Z.n. Fruchtwasseranomalien	□
Z.n. Plazentaretention	□		

Sonstige Auffälligkeiten in vorangegangenen SS _____

Risikofaktoren Allgemein

Vielgebärende (> 4)	□	Z.n. Abort	□
Z.n. Sterilitätsbehandlung	□	Z.n. Frühabort (bis 13. SSW)	□
Z.n. Frühgeburt < 37. SSW	□	Z.n. Spätabort (14.-24. SSW, <500g)	□
Z.n. Sectio	□	Z.n. Todgeburt (>24. SSW, >500g)	□
Pathologische Abortneigung (> 4)	□	Z.n. Mehrlingsgeburt	□

Sonstige allgemeine Risikofaktoren _____

Risikofaktoren aktuell

Abusus □

Proteinurie (≥300mg/24h; U-Stix ++/+++) □

Ödeme □

Keine □

Beine □

Arme und Beine □

Gestationsdiabetes (75 g oGTT (nü ≥ 90mg/dl; 1h ≥ 180 mg/dl; 2h ≥ 155 mg/dl)

Kein Gestationsdiabetes (kein Wert erhöht) □

Gestörte Glucosetoleranz (1 Wert erhöht) □

Gestationsdiabetes (2 Werte erhöht) □

Schwangerschaftsinduzierter Hypertonus ≥140/90mmHg (≥20.SSW; <12 Wo pp) □

HELLP □

Thrombozyten _____ GOT _____ GPT _____ GLDH _____

LDH _____ AP _____ GGT _____ Bilirubin _____

Präeklampsie □

Plazenta praevia

Plazenta praevia totalis □

Plazenta praevia partialis □

Plazenta praevia marginalis □

Mehrlinge □

Cervixwirksame vorzeitige Wehentätigkeit und Hospitalisierung (vor 35.SSW) □

Plazentainsuffizienz

IUGR (erhöhte Widerstände der A uterina od fetaler Gefäße) □

SGA (Schätzgewicht < 10. Perzentile) □

Einstellungsanomalie □

Auffälligkeiten des Fruchtwassers

Anhydramnion □

Oligohydramnion □

Polyhydramnion □

Sonstige Risikofaktoren aktuelle SS _____

Aktuelle Schwangerschaft allgemein

SSW bei Geburt _____ Gravida _____ Para _____

Alter bei Entbindung _____

Blutgruppe _____ Rhesusfaktor _____

Rhesusinkompabilität □

Geburt allgemein

Spontan □

Sectio

Weiche Indikation □

Notsectio □

Medizinische Indikation □

Vaginal operativ □

Geburtsstillstand □

Pathologisches CTG mit Indikation zur medizinischen Indikation □

Analgesie unter der Geburt

Medikamentöse Analgesie □

PDA □

Kind

Lebendgeburt □

Frühabort (bis 13. SSW) □

Spätabort (14. - 24. SSW, bzw. < 500gr) □

Todgeburt (ab 24. SSW, bzw. >500gr) □

Anzahl Kind(er) _____

APGAR Wert Kind 1 _____ APGAR Wert Kind 2 _____

pH Kind 1 _____ pH Kind 2 _____

Gewichtsperzentile (eines Kindes) _____

Unter der Geburt

Wehenunterstützung (Oxytocin) □

Cervixpriming/Cytotec □

Vorzeitiger Blasensprung (vor regelmäßigen Wehen) □

Amnioninfektionssyndrom □

Dauer der Geburt (min)

Dauer d. Geburt – Wehen bis vollständige Plazentaaustreibung ___

Dauer d. Eröffnungsperiode – Wehen bis Muttermund vollständig offen ___

Dauer d. Austreibungsperiode – Muttermund vollständig offen bis Entbindung ___

Dauer d. Nachgeburtsperiode - Geburt d. Kindes bis Plazentaausstoßung___

Nachgeburtsperiode

Plazentalösung vollständig □ unvollständig □

Normale Plazentalösung innerhalb von 30 min □

Vorzeitige Plazentalösung □

Verzögerte spontane Plazentalösung 30-60 min □

Plazentalösung nach 60 min □

Interventionen in der Nachgeburtsperiode

Intervention bei unvollständiger Plazentalösung

- Kürettage □
- Manuelle Lösung und Kürettage □

Blutverlust in der Nachgeburtsperiode (in ml) _____

Intervention zur Blutstillung post partum

- Keine Intervention □
- Konservative Intervention (Akupunktur/Eis/Credé) □
- Oxytocin-Bolus + (Nalador) □
- Cytotec rektal □
- Ballonsonde □
- Hysterektomie □

12 Danksagung

Bei Herrn Prof. Hecher bedanke ich mich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die Förderung der vorliegenden Arbeit und die Begutachtung dieser Dissertation. Außerdem danke ich Frau Dr. Maike Ihnen, die die wissenschaftliche Betreuung meines Dissertationsprojektes übernommen und dessen Fortgang durch zahlreiche Treffen, Fachdiskussionen und Ideen grundlegend gefördert hat. Weiter gilt mein Dank Frau Dr. Karin Milde-Langosch und Herrn Prof. Jänicke, die die Untersuchungen im gynäkologischen Forschungslabor ermöglichten. Frau Dr. Milde-Langosch war mit wertvollen Ratschlägen, Anregungen und Gesprächen maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt. Katrin Beck, Maila Rosberg und Kathrin Eylmann waren mir bei der praktischen Umsetzung der Aufgaben im Labor eine große Hilfe. Ich danke ihnen für eine entspannte, angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, für die vielen hilfreichen Tipps und die unentwegte Unterstützung. Herrn Prof. Udo Schumacher danke ich für die große Unterstützung beim Umsetzten der Arbeit, die immer wieder inspirierenden Gespräche und die Möglichkeit zur Arbeit im Labor der Anatomie, in dem mich alle Mitarbeiter herzlich aufgenommen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt dem Team der Geburtshilfe des UKE. Die ärztlichen Kollegen wie die Hebammen und die Schwestern der Pränatal- und Wochenstation haben mich immer bei meiner Suche nach möglichen Probandinnen unterstützt. Ein weiterer Dank gilt Pia Schmidt-Roberts, einer Doktorandin aus der Pharmakologie, die sich perfekt mit mir abgestimmt hat.

Für die statistische Auswertung danke ich Frau Dr. med. Kottmann der Clinical Research Organisation in Hamm.

Den letzten Feinschliff durch konstruktive Kritik und Korrekturvorschläge verdanke ich meiner Oberärztin Frau Dr. Manuela Tavares De Sousa und meiner Cousine Frau Ute Gumpert.

Für die graphische Unterstützung danke ich Christopher Högner.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und auch für die nötige seelische, moralische und motivierende Unterstützung sorgten.

13 Lebenslauf

Entfällt aus Datenschutzgründen.

14 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 .....
(Sarah Gumpert)