

Aus der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. G. Bender

**Immunologische Zellen im peripher venösen Blut Schwangerer
unter dem Einfluss von Diabetes mellitus**

Dissertation

zur Erlangung der Grades eines Doktors der Medizin
Der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Linda Antony

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gezeichnet: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf, Dekan

Referentin: Priv. Doz. Dr. Ulrike Friebe-Hoffmann

Korreferent: Prof. Dr. Michael Roden

Inhalt

I. Einführung

1.1 Nidation und Schwangerschaft	5
-Schwangerschaftsvorsorge	6
1.2 Schwangerschaft und Glukosestoffwechsel	9
-Diabetes mellitus Typ I	12
-Gestationsdiabetes	14
-Diabetes mellitus in der Schwangerschaft	17
1.3 Schwangerschaft und Immunologie	21
- T-Zellen	23
- B-Zellen	25
- Dendritische Zellen	26
- Natürliche Killer Zellen	27
- Natürliche Killer T-Zellen	27
- Apoptose	29
- Schwangerschaftsimmunologie	30

II. Fragestellung und Zielsetzung

32

III. Material und Methoden

3.1 Studienaufbau	33
3.1.1 Patientinnen	33
3.1.2 Probengewinnung	36
3.1.3 Durchflusszytometrie	37
3.2.1 Färbung der dendritischen Zellen	38
3.2.2 Färbung der T-Zell Subpopulationen	42
3.2.3 Probenanalyse und Gating	44
3.2.4 TruCount™ Messung und Reagenzien	45
3.2.5 BD TriTest™ CD4/CD8/CD3 und HLA-DR II	46
3.2.6 BD MultiTest™ CD3/ CD16/CD56/CD45/CD19	48
3.2.7 Analyse mit TruCount™ Tubes	48

IV. Analyse und Statistik	50
V. Ergebnisse	51
5.1 Ergebnisse im Überblick	52
5.2 Ergebnisse der Patientinnengruppen	54
-Normalkontrollen	54
-Schwangere	58
-Diabetikerinnen	60
-Schwangere Diabetikerinnen	64
-Gestationsdiabetikerinnen	65
-Gestationsdiabetikerinnen und schwangere Diabetikerinnen	66
5.3 Statistische Auswertung	67
5.4 Schwerpunkte	68
VI. Diskussion	
6.1 Bestehende Studien	70
6.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihre Interaktionen	71
6.2.1 T-Helfer-1/T-Helfer-2 Imbalance des insulinpflichtigen Diabetes und Immunmodulation	74
6.2.2 Natürliche Killer-Zellen und natürliche Killer T-Zellen	75
6.2.3 Gestationsdiabetes und pathogenetische Faktoren	77
VII. Zusammenfassung	80
VIII. Literaturverzeichnis	81
IX. Anhang	
9.1 Lebenslauf	91
9.2 Einverständniserklärung	92
9.3 Abkürzungsverzeichnis	94
9.4 Danksagung	96

I. Einführung

1.1 Nidation und Schwangerschaft

Die immunologische Sondersituation, die eine Schwangerschaft für den mütterlichen Organismus darstellt, beginnt mit der Einnistung (Nidation) der befruchteten Eizelle, der sogenannten Blastozyste, in die Uterusschleimhaut (Endometrium).

Aus der befruchteten Eizelle bildet sich durch Zellteilung ein Zellhaufen von rund einhundert Zellen. Dieser ist in äußere und innere Zellen gegliedert. Die äußeren Zellen heißen Trophoblast und tragen bewegliche Härchen (Mikrovilli) auf ihrer Oberfläche. Aus dem Trophoblast gehen in weiteren Differenzierungsschritten die Plazenta und ein Teil der Eihüllen hervor. Die inneren Zellen der Blastozyste werden als Embryoblast bezeichnet, aus ihnen entwickelt sich der Embryo.

Mit seinen Mikrovilli haftet sich die Blastozyste an die Endometriumoberfläche der Uterushöhle. Der Trophoblast differenziert sich nun in eine innere sich lebhaft teilende Zellschicht (Zytotrophoblast) und eine äußere Zellschicht (Synzytiotrophoblast), deren Zellen unter Verlust der Zellgrenzen miteinander verschmelzen. Durch die Absonderung proteolytischer Enzyme baut der Synzytiotrophoblast das Oberflächenepithel des Endometriums ab und dringt ins subendotheliale Stroma des Endometriums ein. Der Zytotrophoblast füllt die dabei entstehenden Hohlräume aus.

So verlagert sich der Keim in die Uterusschleimhaut. Im Zytoplasma des Oberflächenepithels ist ein hoher Glykogen- und Glukoseanteil gespeichert. Diese Stoffe dienen solange der Ernährung des Keims, bis der Synzytiotrophoblast mütterliche Arterien eröffnet. Der Keim wird jetzt aus mütterlichem Blut mit Nährstoffen versorgt.

Durch weiteres Wachstum des Trophoblasten bildet sich eine Vielzahl von Plazentazotten, die das Ernährungsorgan des Kindes darstellen. Außerdem sezerniert die Plazenta eine Vielzahl von Hormonen (plazentares Lactogen, Progesteron, humanes Choriongonadotropin, Östrogene) und Hormonvorstufen der Steroidhormone. Via Plazenta findet ein Austausch mütterlicher und fötaler Hormone statt.

Die Plazenta stellt auch eine passive Filtermembran dar, die die Diffusion verschiedener, im Blut gelöster, Substanzen erlaubt oder verhindert (Plazentaschranke). Gase, Wasser, Vitamine

und Medikamente bis zu einer Größe von 10 Kilodalton können die Membranen passieren. Die treibende Kraft der Diffusion ist das Konzentrationsgefälle zwischen mütterlichem und fötalem Blut.

Größere Stoffe, zum Beispiel Laktat, überschreiten die Membranen mit Hilfe von Trägermolekülen (erleichterte Diffusion). Der aktive Transport ist ein weiterer Mechanismus zur Überwindung der Plazentaschranke. Aminosäuren und Elektrolyte werden so unter Energieverbrauch transportiert. Werden Stoffe von der Plasmamembran umschlossen und in kleinen Bläschen (Vesikel) durch die Zelle transportiert, spricht man von Pinozytose. Pinozytose ist ein wesentlicher Transportweg für Immunglobulin (Ig) G, das den passiven Immunschutz des ungeborenen Kindes gewährleistet. Dieser Schutz ist schon im Uterus wichtig, denn auch Bakterien, Viren und Einzeller können die Plazenta durchwandern (Diapedese).

Eine weitere Gefahr für den Embryo ist das mütterliche Immunsystem, für das die Plazenta genetisch fremdes Material im Sinne eines Allotransplantates darstellt. Sie besteht zur Hälfte aus väterlichem Erbgut und kann somit vom mütterlichen Immunsystem als Fremdgewebe erkannt werden.

Nicht nur die Implantation des semiallogenen Embryos widerspricht den Gesetzen der klassischen Abstoßungsreaktion, die sonst gegen genetisch fremdes Material beobachtet wird, auch zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft sind Veränderungen im mütterlichen Immunsystem nötig. Hierbei spielt die Plazenta als Grenzfläche zwischen mütterlichem Organismus und embryonalen allogenen Antigenen eine Schlüsselrolle für die Ausbildung der Immuntoleranz (Bulla, R. et al., 2003). Wie es genau zur immunologischen Toleranz des Föten im Rahmen der Schwangerschaft kommt, ist weiterhin Gegenstand der Forschung. Beobachtungen und Theorien hierüber werden in den folgenden Kapiteln erörtert.

Schwangerschaftsvorsorge

Im Rahmen einer Schwangerschaft passt sich der mütterliche Organismus auf vielen Ebenen den fötalen Bedürfnissen an: Hormon-, Stoffwechsel-, Kreislauf-, Wasser- und Elektrolythaushalt sowie andere Regelsysteme sind von den physiologischen Veränderungen betroffen. Gelingt diese Anpassung nur unvollständig, kann dies zu kindlichen und mütterlichen Komplikationen führen. Um diese frühzeitig zu erkennen, sollten kindliches und mütterliches Befinden in regelmäßigen Abständen kontrolliert werden.

Regelrechtes Wachstum des Föten im Uterus ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung des Schwangerschaftsverlaufes. An Hand der Relation zwischen Schwangerschaftsalter und Größe des Föten können Normabweichungen festgestellt werden. Im Regelfall wächst der Fötus stetig. Zu schnelles Wachstum kann aus mütterlicher Hyperglykämie resultieren, zu langsames Wachstum ist oft Folge einer Unterversorgung des Kindes mit Nährstoffen oder Sauerstoff.

Die Schwangerschaftsdauer beträgt im Mittel 281 Tage oder 40 Wochen.

Das Schwangerschaftsalter wird in vollendeten Schwangerschaftswochen (SSW) und Tagen der angebrochenen Woche angegeben. 35+5 bedeutet beispielsweise 35 abgeschlossene SSW und 5 Tage und entspricht der 36. SSW.

Die SSW werden bis zur Geburt in drei Trimeni aufgeteilt:

1. Trimenon : 1.-13. SSW post conceptionem
2. Trimenon: 14.-26. SSW post conceptionem
3. Trimenon 27.-39. SSW post conceptionem

Bei einer Schwangerschaft von 37 bis 42 vollendeten SSW wird die Geburt termingerecht bezeichnet.

Von Frühgeburtlichkeit spricht man bei einer Schwangerschaftsdauer von weniger als 37 vollendeten SSW. Dauert die Schwangerschaft länger als 42 vollendete Wochen, spricht man von Übertragung.

Die Fehlgeburt (Abort) bezeichnet eine vorzeitige Ausstoßung der Fruchtanlage mit einem Gewicht unter 1000g und dem Fehlen aller Lebenszeichen. Man unterscheidet den Frühabort bis zur 12. SSW vom Spätabort 13.-24. SSW. Ab der 24. SSW geborene Kinder werden im Allgemeinen als Frühgeburt bezeichnet.

Frühaborte sind häufiger als Spätaborte. Ihnen liegen meistens Chromosomenstörungen oder Trophoblastenabnormitäten zu Grunde. Spätaborte dagegen sind ätiologisch eher auf funktionelle oder anatomische Störungen zurückzuführen. Grundsätzlich sind viele Ätiologien eines Abortes möglich: mütterlicherseits können Infektionen, Diabetes mellitus, Hypothyreose, Anämien, Traumen, Tumoren, hormonelle Störungen (Gelbkörperinsuffizienz), fehlende Immuntoleranz und andere ursächlich sein. Weiterhin findet man fötoplazentare Ursachen: Chromosomenaberrationen, Trophoblasten- und Nidationsstörungen, spermatogene

Anomalien und artifizielle Ursachen wie Strahlen, Toxine oder Traumata. Bei drei aufeinander folgenden Aborten spricht vom habituellen Abort.

Um Komplikationen frühzeitig zu erkennen, werden bei jeder Schwangerschaft Vorsorgeuntersuchungen durchgeführt. In den ersten vier Monaten der Schwangerschaft sollten Vorsorgeuntersuchungen alle vier Wochen erfolgen. In den folgenden drei Monaten schließlich alle drei Wochen, dann zwei Monate lang vierzehntägig und im letzten Schwangerschaftsmonat jede Woche. Sobald der Entbindungstermin erreicht ist, sind engmaschige Kontrollen jeden zweiten Tag empfohlen. Die Untersuchungsbefunde werden im Mutterpass vermerkt. Folgende Parameter sind regelmäßig zu kontrollieren: Blutdruck, Gewicht, Blutbild, Ödeme, Urinuntersuchungen auf Eiweiß, Glukose, Leukozyten, Nitrit und Keton, sowie Lebenszeichen und Wachstum des Kindes.

Bei der Erstuntersuchung der Schwangeren wird eine ausführliche Anamnese zur Erfassung möglicher Risikofaktoren erhoben. Außerdem müssen Blutgruppe, Rhesusfaktor und ein Suchtest auf atypische Antikörper durchgeführt werden (dieser wird in der 26. SSW wiederholt). Bei Rhesus-negativen Schwangeren erfolgt die Rhesusprophylaxe in der 28.-29. SSW. Obligat wird bei jeder Schwangeren ein Chlamydienabstrich durchgeführt. Serologisch wird der Röteltiter und die Luesserologie bestimmt. Andere Infektionskrankheiten, die zur Schädigung des Kindes führen können, werden bei Risikokonstellationen mikrobiologisch oder serologisch ausgeschlossen. Dazu zählen beispielsweise Toxoplasmose, Listeriose, Cytomegalie und Herpes simplex. Bei allen Schwangeren wird ab der 32. SSW ein anti-HBsAg Suchtest durchgeführt. Ein HIV-Test kann ebenfalls sinnvoll sein.

Im Verlauf der Schwangerschaftsvorsorge sind drei Ultraschallscreenings vorgesehen.

1. Screening (9.-10. SSW)

- Überprüfung der intrauterinen Lage des Embryos
- Feststellung einer Einlings- oder Mehrlingsschwangerschaft
- Nachweis von Herzaktionen
- Bestimmung des Gestationsalters (Scheitel-Steiß-Länge)

2. Screening (19.-22. SSW)

- Überprüfung zeitgerechter Entwicklung (Abdomen-Thoraxdurchmesser, biparietaler Durchmesser des Kopfes, fronto-occipitaler Durchmesser des Kopfes, Femurlänge)

- Hinweise auf Fehlbildungen
- Beurteilung des Plazentasitzes
- Beurteilung der Fruchtwassermenge

3. Screening (29.-32. SSW)

- Überprüfung zeitgerechter Entwicklung
- Hinweise auf Fehlbildungen
- Beurteilung des Plazentasitzes
- Beurteilung der Fruchtwassermenge und gegebenenfalls Blutflussmessung der Umbilikalgefäße

Ab der 34. SSW sollten bei einer unauffälligen Schwangerschaft über das Kardiotokogramm (CTG) mögliche mütterliche Wehentätigkeit und die fötalen Herzschläge abgeleitet werden. Durch Herzfrequenzveränderungen in Abhängigkeit von der Wehentätigkeit kann der Verdacht auf eine vegetative Beeinträchtigung des Kindes (zum Beispiel Hypoxie) geäußert werden. So besteht die Möglichkeit rechtzeitig zu intervenieren.

1.2.1 Stoffwechsel und Glukosehomöostase der Schwangerschaft

Glukose ist ein wichtiger Energielieferant für den Körper. Besonders das Gehirn ist auf Glukose als Hauptenergiequelle angewiesen. Um seine Funktionen aufrechterhalten zu können, benötigt es 5 - 6 g Glukose pro Stunde. Dies entspricht einer arteriellen Blutglukosekonzentration von 50 mg/dl. Der gesamte Organismus verbraucht etwa 10 g Glukose pro Stunde. Durch Resorption aus dem Darm gelangen die mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate ins Blut. Damit Glukose als Energielieferant genutzt werden kann, muss es in die Körperzellen gelangen. Dort wird die Glukose entweder unter Energiegewinnung verstoffwechselt (Glykolyse), in Leber und Skelettmuskel als Glykogen gespeichert, oder in Fette (Triacylglycerin) umgewandelt und in Fettzellen gespeichert (Lipogenese). Glukose wird, sobald der Blutzucker unter 50 mg/dl abfällt, unter Glukagonwirkung aus Glukosespeichern in Leber und Muskulatur freigesetzt. Glukagon ist ein Peptidhormon, das von den α -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas gebildet, gespeichert und ins Blut sezerniert wird. Durch das in die Blutbahn abgegebene Glukagon

wird gespeichertes Glykogen (Speicherform des Zuckers) zu Glukose abgebaut und ins Blut abgegeben. Außerdem hemmt Glukagon den Glukoseverbrauch vieler Gewebe und steigert die Bildung von Glukose in Leber und Nieren. Mit dem Glukagon vergleichbare Stoffwechseleffekte haben auch Glukokortikoide und die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin. Glukagon wird bei normaler Ernährung relativ konstant ins Blut sezerniert. Physiologische Stimuli der Glukagonsekretion sind proteinreiche Nahrung, körperliche Arbeit und Stress.

Der physiologische Gegenspieler des Glukagons ist das Insulin. Insulin ist das wichtigste anabole Hormon des Körpers. Es wird von den β -Zellen des Pankreas gebildet und besteht, wie das Glukagon, ebenfalls aus Aminosäuren. Die anabolen Effekte des Insulins auf die verschiedenen Gewebe und den Stoffwechsel sind in den verschiedenen Geweben des Körpers unterschiedlich. Im Fettgewebe hemmt es die Lipolyse und fördert die Speicherung von Nahrungsfetten. In der Muskulatur wird durch den Einfluss des Insulins die Glykogensynthese gesteigert. Gleichzeitig kommt es zur Hemmung des Abbaus von Glykogen und zur Steigerung der Energieproduktion aus Zucker (Glykolyse). In der Leber wird unter Insulineinfluss die Glukosebildung aus Aminosäuren gehemmt.

Die Freisetzung des Insulins geschieht im Gegensatz zum Glukagon pulsativ. Da das Glukosemolekül sehr groß ist, kann es nicht durch Diffusion ins Zellinnere gelangen. Zur Aufnahme in die Zelle sind geeignete Transportproteine (Carrier) nötig. Derartige Hilfstransporter wurden in unterschiedlichen Geweben des Organismus identifiziert (beispielsweise Herz- und Skelettmuskulatur, Fett- und Nervengewebe, Erythrozyten). Die Transportproteine sind gewebespezifisch und unterscheiden sich in ihrer Verteilungshäufigkeit auf der Zellmembran sowie in ihren Transporteigenschaften für die Zuckermoleküle. Die Glukosetransporter in Fettgewebe, Herz- und Skelettmuskulatur arbeiten unter hormoneller Kontrolle. Sie werden als GLUT 4 (Glukosetransporter 4) bezeichnet. Die Glukoseaufnahme in diese Gewebe durch GLUT 4 funktioniert insulinabhängig. Durch das Insulin werden die GLUT 4 Transporter vom Zellinneren in die Zellmembran verlagert, dort eingebaut, und von der Zelle zum Glukosetransport genutzt.

Als Insulinresistenz bezeichnet man den Mehrbedarf an Insulin infolge einer Störung der Interaktion zwischen Insulin und seinem Rezeptor oder durch Störungen der Glukoseverwertung in der Zelle. Hauptursache für die Entstehung einer Insulinresistenz ist Übergewicht. Weitere Ursachen sind Hypertriglyzeriämie, Antikörper gegen Insulin, und die vermehrte Sekretion kontrainsulinärer Hormone bei Infektionen, Stress und Traumata.

Stoffwechselveränderungen während einer Schwangerschaft werden im Allgemeinen durch in der Plazenta gebildetes humanes Plazentalaktogen (HLP), Östrogen und Progesteron reguliert. Die Anpassung des Stoffwechsels geschieht mit dem Ziel, dem Fötus und der Plazenta zu jeder Zeit genügend Nährstoffe zur Verfügung zu stellen, um Wachstum und Reifung der Frucht zu ermöglichen.

Kohlenhydrat-, Aminosäure- und Lipidstoffwechsel der Schwangeren zeigen, ebenso wie die Hormonkonzentrationen im Blut, einen schwangerschaftstypischen Verlauf. Die erste Hälfte der Schwangerschaft ist durch Aufbaustoffwechsel (anaboler Stoffwechsel) gekennzeichnet. Die Fettsäuresynthese im Fettgewebe ist hoch und die Plasmakonzentration freier Fettsäuren niedrig. So speichert der Körper Energien in Form von Fettreserven, die er für die spätere Schwangerschaft braucht. Während der ersten Schwangerschaftsmonate sinkt der Nüchternblutzuckerspiegel der Schwangeren ab. Dies geschieht, da die Insulinsensitivität, also die Wirkung des Insulins am Insulinrezeptor, erhöht ist. Diabetische Schwangere brauchen in dieser Schwangerschaftsperiode weniger exogenes Insulin. Für Diabetikerinnen ist die Gefahr einer Unterzuckerung größer als sonst.

Mit fortschreitender Schwangerschaft entzieht der Konzeptus der Mutter unabhängig von deren Nahrungsaufnahme immer mehr Glukose und Aminosäuren. Die Mutter deckt ihren Energiebedarf daher vermehrt aus Lipiden und steigert, unter dem Einfluss lipolytischer Hormone, die Cholesterin- und Fettsäurekonzentration im Blut. Freie Fettsäuren und Ketonkörper steigen bei Nahrungskarenz besonders schnell an. Dadurch wird verhindert, dass der mütterliche Organismus vorschnell Aminosäuren zur Glukoseproduktion aus dem Muskel freisetzt und es zu Stickstoffverlusten kommt.

Im Verlauf der Schwangerschaft sinken die präprandialen Blutzuckerspiegel meist weiter ab, die postprandialen Blutzuckerwerte steigen jedoch an. Grund für diesen Blutzuckeranstieg ist die sich im zweiten und dritten Trimenon unter hormonellem Einfluss entwickelnde Insulinresistenz. Da die Rezeptoren nicht mehr so empfindlich auf Insulin reagieren, wird kompensatorisch die Insulinsekretion erhöht. Die Plasmainsulinkonzentration steigt an und hat sich bei stoffwechselgesunden Frauen am Ende der Schwangerschaft verdoppelt. Das Pankreas von schwangeren Diabetikerinnen (SD) kann diese hohen Insulindosen auf Grund der Grunderkrankung nicht sezernieren. Somit benötigen die Diabetikerinnen am Ende der Schwangerschaft erheblich mehr exogenes Insulin. Diese Veränderung macht eine gute Stoffwechseleinstellung oft schwierig.

Diabetes mellitus Typ I

Der Typ I Diabetes mellitus (T1D) ist als chronische Stoffwechselkrankheit definiert, die durch Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas zu einem Insulinmangelsyndrom führt. Als Folge des absoluten Insulinmangels steigt der Blutzuckerspiegel stark an. Ohne exogen zugeführtes Insulin entwickelt sich eine lebensgefährliche Stoffwechsellage.

Mit der Insulintherapie ist durch den Ersatz des fehlenden Hormons die Nachahmung des physiologischen Stoffwechsels möglich. Dabei muss die Menge des exogen zugeführten Insulins an die Nahrungsaufnahme angepasst werden. Der Insulinbedarf des Diabetikers hängt nicht nur von den zugeführten Kohlenhydraten ab. Infektionen, körperliche Anstrengung, Stress, Gewichtszu- oder Abnahme, Medikamenteneinnahme, Nieren- und Schilddrüsenerkrankungen bewirken Veränderungen in der Hormonausschüttung (besonders betroffen sind Glukokortikoide, Adrenalin, Noradrenalin und Schilddrüsen- und Wachstumshormone) und wirken als funktionelle Gegenspieler des Insulins.

Sehr straffe Stoffwechselführung birgt die Gefahr häufiger Unterzuckerungen (Hypoglykämie). Ist der Patient nicht streng genug eingestellt, wird er durch die lang anhaltenden hohen Blutzuckerwerte (Hyperglykämie) geschädigt.

Häufige Blutzuckerspitzen und andauernde hyperglykämische Phasen schädigen große und kleine Gefäße (Makro- und Mikroangiopathie) und führen zu Organschäden an Nieren, Augen, Herz und Nerven.

Die Ätiologie des Diabetes mellitus ist multifaktoriell. Es spielen offensichtlich genetische Faktoren und noch weitgehend unbekannter Umwelteinflüsse eine Rolle (Karges WJ et al., 1995).

Den größten Beitrag zur genetischen Prädisposition liefert die HLA-DR3 (HLA= human leukocyte antigen) oder HLA-DR4 Region der Chromosomen. Das Risiko einer Diabetes mellitus Erkrankung liegt für HLA-DR 3+ Personen bei 15 - 25 %, bei HLA-DR4+ Personen bei 20-35 %. Für doppelt positive Personen liegt das statistische Risiko bei 30 - 40 %. Etwa 10 % der Diabeteserstmanifestationen betreffen erstgradige Verwandte von Patienten mit T1D. Der Zusammenhang zwischen Verwandtschaftsbeziehung und Diabetesrisiko kann aus der nachfolgenden Tabelle entnommen werden:

Tabelle 1: *Verwandtschaftsbeziehung und Diabetesrisiko.*

Verwandtschaftsbeziehung	Diabetesrisiko
Keine, Bevölkerungsdurchschnitt	0,2 - 0,3 %
Kinder diabetischer Mütter	1 - 3 %
Kinder diabetischer Väter	5 - 7 %
Kinder diabetischer Eltern	20 - 40 %
Eineiige Zwillinge	30 - 40 %
Sonstige Geschwister	5 - 7 %

Quelle: Weiss, P.M.A. Diabetes und Schwangerschaft, 2002

Dem manifesten T1D geht eine unterschiedlich lange Phase der Inselzellentzündung (Insulinitis) voraus. Auch werden vorentzündliche Phasen (Präinsulinitis) beschrieben, die durch vermehrte Ansammlung von Entzündungszellen im Pankreasgewebe gekennzeichnet sind. Zu den klassischen Symptomen des Insulinmangels kommt es erst, wenn durch die chronisch-progressive Entzündung 80 - 90 % der β -Zellmasse zerstört worden ist. Die Zerstörung der insulinproduzierenden Zellen erfolgt im Rahmen einer Autoimmunreaktion. An der Zerstörung der β - Zellen sind unterschiedliche Immunzelltypen beteiligt, hauptsächlich jedoch autoreaktive T-Zellen und Makrophagen.

Inselzellantikörper, die in > 75 % bei Diabetikern gefunden werden können, aber auch bei gesunden Personen auftreten, können auf Grund ihrer Zielantigene differenziert werden in:

- Insulinautoantikörper
- Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase und Tyrosinphosphatase der β -Zellen

Epidemiologische Studien haben Zusammenhänge zwischen Umweltfaktoren und Diabetesmanifestation beschrieben. Dazu gehören protektive Faktoren wie Masernimpfungen, lange Stillzeit und proteinarme Ernährung. Diätetisch ungünstig sind Nahrungsbestandteile, die das Immunsystem des Darmes reizen. Beispielsweise Nitrosamine, Kuhmilch und Weizenbestandteile. Weiterhin scheinen viruspezifische zytotoxische T-Zellen in der Perinatalperiode und im Kindesalter durch Kreuzreaktionen mit β -Zellprotein zu einer Entzündungsreaktion gegen das Pankreas zu führen und die Entstehung eines T1D zu fördern. Dabei sind Virusinfektionen mit Rubella-, Cytomegalie-, Entero-, Rota- und Hepatitisviren beteiligt (Lonnrot, M. et al., 2000 und Yoon, J.W. 1990).

T1D tritt nicht in den ersten sechs Lebensmonaten auf. Die Inzidenz steigt nach der Geburt kontinuierlich an, und erreicht das erste Plateau im Alter von 5-7 Jahren. Dann steigt die Inzidenz erneut an und hat ihren zweiten Gipfel im Pubertätsalter, bei Mädchen im Alter von

12 - 13 Jahren, bei Jungen zwischen 14 - 16 Jahren. Es existieren starke regionale Unterschiede in der Inzidenz des Diabetes. In Deutschland liegen die Raten bei 7 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner pro Jahr. In Skandinavien sind die Zahlen weitaus höher.

Gestationsdiabetes

Gestationsdiabetes (GDM) ist definiert als Glukosestoffwechselstörung, die erstmals in der Schwangerschaft diagnostiziert wird. Diese Definition trifft also auch auf Diabetikerinnen zu, deren Erkrankung schon vor der Schwangerschaft bestand, aber erst in der Schwangerschaft erkannt wurde. Die Stoffwechselstörung tritt meist in der 24.-28. SSW auf und ist im Allgemeinen umso schwerer, desto früher sie sich manifestiert.

Die Schwangerschaft begünstigt Glukosetoleranzstörungen, denn durch die in der Schwangerschaft vermehrte Ausschüttung und die erhöhte Aktivität der Hormone plazentares Laktogen, somatotropes Hormon, Thyroxin, Kortisol, Prolaktin, und Kortisol wird eine diabetogene Stoffwechsellaage bedingt. Östrogen, Choriongonadotropin und Progesteron wirken insulinsynergistisch beziehungsweise kortisolantagonistisch.

Ohne Gegenregulationsmechanismen würden in jeder Schwangerschaft erhöhte Blutglukosewerte entstehen. Der Anstieg des Blutzuckers wird bei der gesunden Schwangeren jedoch durch vermehrte Insulinausschüttung des Pankreas sowie transplazentare Glukoseabgabe an den Fötus kompensiert (Kühl, C. et al., 1991).

Kann das Pankreas die erforderliche vermehrte Insulinsekretion nicht leisten, entsteht ein relativer Insulinmangel und eine Glukoseintoleranz.

Der GDM wird durch Screeningtests mit oraler Glukosebelastung diagnostiziert (siehe Material und Methoden). Da diese Screeninguntersuchung nicht bei allen Schwangeren durchgeführt wird, werden in Deutschland nach Schätzungen nur 10 % der Gestationsdiabetikerinnen (GDMI) erkannt (Weiss, P.M.A., Diabetes und Schwangerschaft, Springer 2002).

Die Häufigkeit des GDM ist, wie der Diabetes mellitus, ethnischen und geographischen Einflüssen unterworfen (Dooley, S.L. et al., 1991). Nicht nur Lebensstandard und Ernährungsgewohnheiten, sondern auch deren Änderung durch Urbanisation oder Einwanderung, verändern die Prävalenz des GDM (Hamman, R.F. et al., 1989). Das Wissen über die variierenden Inzidenzen und die zusätzlichen Risikofaktoren ist hilfreich, um durch

gezieltes Risikoscreening möglichst viele erkrankte Frauen frühzeitig zu erkennen und zu behandeln.

Neben oben genannten Risikofaktoren bei der Entstehung des GDM gibt es weitere Risikohinweise:

- Übergewicht, besonders ein Body Mass Index > 27 kg/qm
- Alter der Mutter über 35 Jahre
- Diabeteserkrankungen bei erstgradigen Verwandten
- Glukosetoleranzstörung in einer vorausgehenden Schwangerschaft
- fötale Makrosomie in früheren Schwangerschaften (Geburtsgewicht $> 90.$ Perzentile)
- intrauteriner Fruchttod in früheren Schwangerschaften
- habituelle Aborte
- schwere kongenitale Fehlbildungen in der vorausgehenden Schwangerschaft

Häufigkeit des GDM

Für Nordamerika und Westeuropa beträgt die Inzidenz des GDM rund 3 % (Coustan, D.R. et al., 1991), dabei schwanken die Angaben der Publikationen zwischen 1 % - 20 %.

Weiss, P.M.A., 2002 spricht bei der Beurteilung des GDM Risikos von der „logischen Häufigkeit“ des GDM, die er aus der Prävalenz des Typ II Diabetes mellitus ableitet. Die Manifestation eines Typ II Diabetes mellitus nach GDM Schwangerschaft steigt mit der Zeit proportional an: nach acht Jahren haben ungefähr 30 % der Frauen mit GDM einen Typ-II-Diabetes (non insulin dependent diabetes, NIDDM). Nach 15 Jahren sind es 50 % und nach 20 Jahren 75 %. Längere Studien liegen nicht vor. In der Publikation wird vorgeschlagen, den GDM als einen unter der Belastung der Schwangerschaft passager vorweggenommenen Altersdiabetes zu betrachten, und anhand der epidemiologischen Daten des Diabetes mellitus die Häufigkeit des GDM zu kalkulieren. Da die mittlere Manifestationszeit des NIDDM nach GDM 27 Jahre beträgt und das mittlere Alter bei GDM 31 Jahre, würde die Häufigkeit des GDM etwa der Inzidenz des Altersdiabetes 58-jähriger Frauen entsprechen (31+27). Damit wären im deutschsprachigen Raum 7-10 % der Schwangeren vom GDM betroffen.

Wann sich nach einem GDM ein NIDDM manifestiert, korreliert unter anderem mit dem Alter der Patientin bei Erstmanifestation, und hängt auch von der ethnischen Abstammung der Patientin ab. Weitere Risikohinweise zur späteren Diabetesmanifestation sind Übergewicht, Gestationsalter bei Diagnosestellung, 1h- und 2h-Werte des oralen Glukose Toleranz Test

(oGTT), Geburtenzahl und Insulinbedarf im Rahmen der Schwangerschaft (Catalano, P.M. et al., 1991).

Jeder GDM birgt ein erhöhtes Morbiditätsrisiko für Mutter und Kind, und stellt somit eine Risikoschwangerschaft dar. Management und Screening der Schwangeren müssen daher unbedingt an das erhöhte Risiko angepasst werden. Alle zwei bis vier Wochen sollte sich die Schwangere beim Frauenarzt vorstellen. Wöchentliche CTG Kontrollen sind ab der 28. Woche, zweimal wöchentliche Kontrollen ab der 32. SSW empfohlen. Auf Grund der erhöhten Infektanfälligkeit muss bei der Untersuchung besonders auf asymptomatische Harnwegsinfekte und vaginale Infekte, die eine Frühgeburtslichkeit erhöhen können, geachtet werden.

Die Blutzuckereinstellung wird im Allgemeinen in Zusammenarbeit mit einem Diabetologen vorgenommen. Bei 90 % der betroffenen Frauen gelingt die Stoffwechselführung diätetisch. Angestrebte Zielwerte liegen nüchtern bei < 90 mg/dl, eine Stunde postprandial < 140 mg/dl. Die diabetische Schwangere sollte langsam resorbierbare Kohlenhydrate (z.B. Vollkornprodukte) in vielen kleinen Mahlzeiten zu sich nehmen. Der tägliche Kalorienmehrbedarf beträgt in der Schwangerschaft ab dem 4. Monat 300 Kalorien.

Zur Kontrolle des Blutzuckers kann anhand von Blutzuckertagesprofilen durchgeführt werden. Dabei misst die diätetisch eingestellte GDMI vor und nach jeder Mahlzeit, sowie morgens nüchtern und abends den Blutzucker aus kapillärem Blut. Je nach Stoffwechsellage werden diese Blutzuckertagesprofile unterschiedlich engmaschig wiederholt. Zusätzlich kann alle 4-6 Wochen der HbA1c (Hämoglobin A1c) Wert laborchemisch bestimmt werden. Der HbA1c ist diejenige Fraktion des Hämoglobins, in deren Membran Zuckerketten eingelagert worden sind. Je höher der durchschnittliche Blutzucker ist, desto größer ist diese Fraktion. Da die Glukose irreversibel gebunden wird, ist der Anteil des HbA1c proportional zum zeitlichen Mittelwert der Blutglukosekonzentration während 6-8 Wochen vor der Messung. Daher spricht man beim HbA1c auch vom Langzeit-Zuckerwert.

Bei der Stoffwechseleinstellung der Schwangeren müssen auch Hypoglykämien vermieden werden. Die Hypoglykämie wird von der Mutter als unangenehm empfunden und kann zu Vigilanzstörungen und so zu Unfällen führen. Das Wachstum des Fötus kann durch wiederholte Hypoglykämien beeinträchtigt werden. Schwere hypoglykämische Zustände beeinträchtigen die Organentwicklung des Fötus und führen zu Neuropathien.

Gelingt es durch Diät nicht, eine ausreichend stabile Stoffwechsellage zu erreichen, muss die Schwangere eine Insulintherapie beginnen. Die Insulintherapie kann zu jedem Zeitpunkt der Schwangerschaft begonnen werden.

Komplikationen des GDM ähneln denen des Diabetes und werden im nächsten Kapitel erläutert.

Diabetes mellitus in der Schwangerschaft

Die erste Kasuistik einer erfolgreich ausgetragenen Schwangerschaft bei Diabetes mellitus stammt aus dem Jahre 1824 und wurde damals auf Grund ihrer Seltenheit als Dissertation veröffentlicht (Hadden DR et al., 1989). Ende des 19. Jahrhunderts folgten weitere wissenschaftliche Publikationen über SD, so dass 1908 einen Überblick über 63 Fälle gegeben werden konnte. Trotz allem blieben diese Kasuistiken bis zur Entdeckung des Insulins im Jahre 1921 durch Frederick Grant Banting und Charles Herbert Best Raritäten. Schon im Jahre 1922 war eine erste, wirkungsvolle Insulintherapie der Krankheit möglich. Banting erhielt im Jahre 1923 für seine Entdeckung den Nobelpreis für Medizin.

Diabetische Frauen galten bis zu dieser Zeit als unfruchtbar. Von einer Konzeption wurde in der damaligen Zeit wegen der hohen mütterlichen und kindlichen Mortalität auch ärztlicherseits abgeraten. Die kindliche Mortalität wurde 1915 mit 30 %, die mütterliche Mortalität mit 44 - 60 % angegeben. Todesursache der Mütter waren in den meisten Fällen diabetesassoziierte Erkrankungen wie diabetisches Koma. Nach Einführung der Insulintherapie konnte die Müttersterblichkeit zwar auf 0,5 % -1 % gesenkt werden, sie blieb jedoch ein 20-faches über der Mortalitätsrate übriger Schwangerschaften. Weiterhin hoch blieben die Zahlen zur perinatalen Mortalität. Die perinatale Mortalität gilt auch heute als der Parameter zur Beurteilung der Qualität der Versorgung Schwangerer und Neugeborener. Die perinatale Mortalität umfasst alle vor, während und bis zum siebten Lebenstag nach der Geburt verstorbenen Kinder, die zum Zeitpunkt der Geburt mehr als 500 g gewogen haben. Die statistische Berechnung erfolgt auf 1000 geborene Kinder.

Um die perinatale Mortalitätsrate (PNM) bei Diabetesschwangerschaften zu senken, ist eine strenge Stoffwechselführung schon präkonzeptionell wünschenswert. Durch optimale Stoffwechseleinstellung kann die Schädigung des Fötus sowie die Abortrate deutlich gesenkt werden. Es gilt heute als erwiesen, dass eine nahe normoglykämische Stoffwechsellage mit

einem mittleren Blutzucker von $< 100 \text{ mg/dl}$ ($< 5,5 \text{ mmol/l}$) maßgeblich zur Senkung der PNM beiträgt und das Schwangerschaftsrisiko der Diabetikerin dem einer normalen Schwangerschaft angleicht (Roversi, GD et al., 1985). Die mütterliche Stoffwechsellage steht in direktem Zusammenhang mit der Art und dem Zeitpunkt der Entbindung. Bei ausreichend straffer Stoffwechselführung kann der Hyperinsulinismus des Föten, die Zottenreifungsstörung der Plazenta und die dadurch verursachte diabetogene Fötopathie mit Makrosomie verhindert werden.

Um die erforderliche Organreife des Fetus zu erzielen, sollte nahe am errechneten Geburtstermin entbunden werden. Dabei ist allerdings die Gefahr einer Plazentainsuffizienz zu beachten. Bei normal geschätztem Geburtsgewicht ist in jedem Fall primär eine vaginale Entbindung anzustreben. Kaiserschnittentbindungen bergen für Diabetikerinnen ein erhöhtes Risiko der Infektmorbidität. Für das Neugeborene kann kein Vorteil des Kaiserschnittes gegenüber einer vaginalen Geburt festgestellt werden. Im Gegenteil steigt für das Neugeborene das Risiko eines akuten Atemnotsyndroms nach Kaiserschnitt.

Da die Schwangere nicht direkt von der straffen Stoffwechseleinstellung profitiert, ist die optimale Betreuung der diabetischen Schwangeren an den fötalen Bedürfnissen orientiert. Die Voraussetzung für eine gelungene Schwangerschaftsbetreuung ist stark von der Motivation der Schwangeren abhängig. Sie erfordert ein hohes Maß psychologischer Betreuung und Motivation durch Ärzte und Hebammen. Bestmögliche Resultate der diabetischen Schwangerschaft sind in spezialisierten Arbeitsgruppen und interdisziplinären Zentren zu erwarten. Eine irische Studie konnte zeigen, dass perinatale Verluste bei dezentraler Betreuung der Diabetesschwangeren rund dreimal höher sind als bei zentraler Betreuung (Hadden, D.R. et al., 1999).

Da das Schwangerschaftsrisiko stark mit bestehenden diabetesassoziierten Organschäden der Patientin korreliert, wurde zur Klassifikation eine Zuordnung gewählt, die Diabetesdauer und das Vorliegen vaskulärer, diabetischer Folgeerscheinungen berücksichtigt. Die ursprüngliche Klassifikation beruht auf Priscilla White und stammt aus dem Jahr 1959. Die modifizierte Version ist heute gebräuchlich:

Tabelle 2: *White Klassifikation diabetischer Schwangerschaften.*

White A	Diätbehandelter Diabetes mellitus, vor der SS diagnostiziert, jeglicher Dauer und Manifestation
A1	Gestationsdiabetes nicht insulinpflichtig
A2	Gestationsdiabetes insulinpflichtig
White B	Manifestation > 20. Lebensjahr oder Dauer < 10 Jahre; keine Mikroangiopathie
White C	Manifestation 10.-19. Lebensjahr oder Dauer 10-19 Jahre
White D	Manifestation < 10. Lebensjahr oder Dauer > 20 Jahre oder Retinopathie
White R	präproliferative oder proliferative Retinopathie oder Glaskörperblutung
White F	Nephropathie mit Proteinurie > 500 mg/d oder reduzierte Kreatinin-Clearance und Hypertonie
White H	Klinisch relevante koronare Herzkrankheit
White RF	Kriterien für R und F koexistieren
White T	Zustand nach Nierentransplantation

Risiken:

Folgen und Risiken eines pathologischen Glukosestoffwechsels während der Schwangerschaft können in mütterliche, fötale und kindliche Risiken unterteilt werden, wobei bei mütterlichen und kindlichen Risiken akute, die Perinatalperiode betreffende, von prospektiven, also das weitere Leben betreffende Risiken unterschieden werden. Akute mütterliche Risiken sind beispielsweise Harnwegsinfekte und Zystitiden, (Ramos, E. et al., 1997) Präeklampsie, (Barden, A. et al., 2004) erhöhte Sektiorate als Resultat fötaler Makrosomie und atonische Nachblutungen des Uterus. Zu den prospektiven Risiken gehören für GDM die Entwicklung eines NIDDM beziehungsweise die sofortige Persistenz der Glukosetoleranzstörung nach Beendigung der Schwangerschaft. Diabetesassoziierte Erkrankungen wie Makro- und Mikroangiopathie können sich durch die Schwangerschaft fulminant verschlechtern. Schwere Angiopathien, die in dem Verlust der Nierenfunktion oder des Sehvermögens münden könnten werden unter Umständen als Kontraindikation für eine Schwangerschaft angesehen.

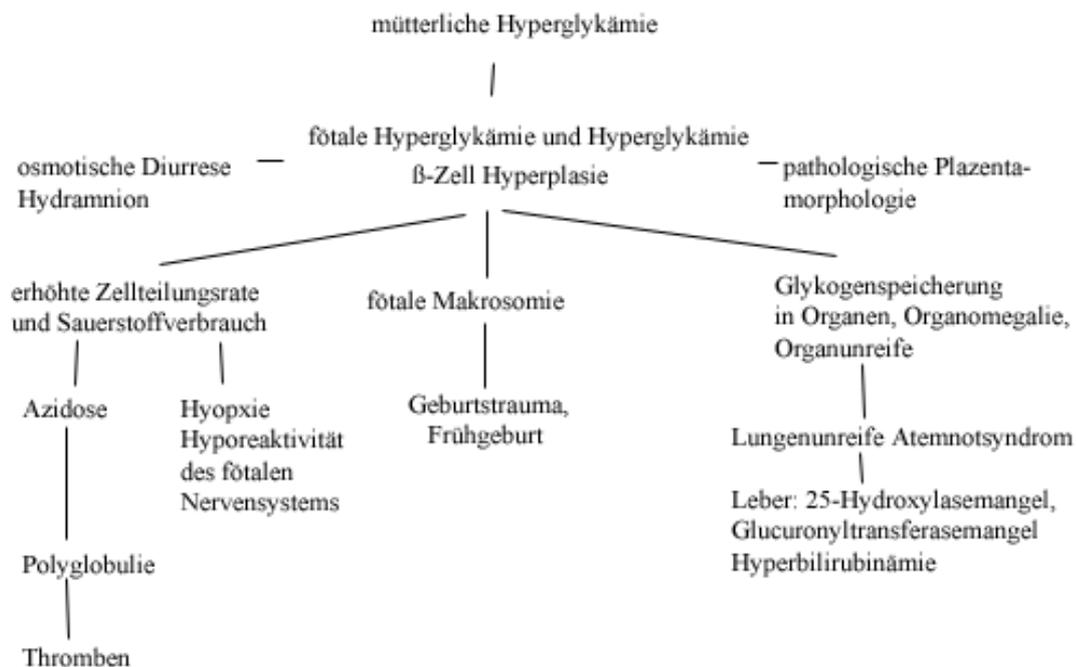
Fötale Komplikationen sind Frühgeburtlichkeit, erhöhte Missbildungsrate, Frühaborte und intrauteriner Fruchttod. Todgeburten treten bei Diabetikerinnen neunmal häufiger auf als bei Stoffwechselgesunden (La Vallie, DL et al., 2003). Anhaltende Hyperglykämien der Mutter führen zu Reifungsstörungen der Plazenta. Der Fötus kann nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden und kompensiert den Mangel durch Polyglobulie. Nach der Geburt kann die fötale Leber das anfallende Bilirubin nicht ausreichend schnell glukuronidieren. Die Kinder leiden häufiger an Hyperbilirubinämien mit der Gefahr des Kernikterus. Die andauernde

Hyperglykämie führt zum übersteigerten Wachstum des Fötus und zur Makrosomie. Bei der Entbindung treten vermehrt Geburtsverletzungen auf. Da das fötale Pankreas im Uterus große Mengen Insulin bildet und diese Sekretion nach der Geburt nicht sofort der neuen Stoffwechsellage angepasst werden kann, kommt es häufig nach der Geburt zu Unterzuckerungen mit möglichen Hirnschäden.

Adaptationsschwäche und Lungenunreife der Neugeborenen können eine maschinelle Beatmung notwendig machen. In jedem Fall ist jedoch gute postnatale Überwachung nötig.

Die Pathogenese der fötalen Komplikationen sind in der Übersicht „fötale Komplikationen“ veranschaulicht:

Tabelle 3: *fötale Komplikationen* nach Weiss, P.M.A., 2002.



Bei Nachkommen von T1D und GDMI konnte im späteren Lebensalter eine signifikant höhere Inzidenz für Diabetes mellitus nachgewiesen werden (Dahlquist, G. et al., 1985). Diese beruhen nicht nur auf genetischer Transmission, sondern auf intrauterinen Hyperglykämien, welche die Replikationsfähigkeit und die sekretorische Reifung der β -Zellen des Pankreas

beeinträchtigen (Boloher, J. et al., 2002). Ein so geschädigtes Pankreas wird oft später auf Glukosereize nicht adäquat reagieren können (Silverman B. et al., 1995).

1.3 Schwangerschaft und Immunologie

Die zellulären Bestandteile des Blutes werden im Knochenmark gebildet. Sie stammen alle von hämopoetischen, also blutbildenden, Stammzellen ab. Diese Stammzellen teilen sich im Knochenmark und befinden sich nur zu einem sehr geringen Prozentsatz im peripheren Blut. Die entstehenden Tochterzellen (Vorläuferzellen) können sich zu verschiedenen Zelllinien differenzieren.

1.) aus der myeloiden Vorläuferzelle entstehen Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen (Erythrozyten), die im Blut für den Sauerstofftransport verantwortlich sind, Vorläuferzellen der Blutplättchen (Thrombozyten), die bei der Hämostase eine wichtige Rolle spielen, sowie Zellen der Immunabwehr: Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen (DC).

2.) aus der lymphatischen Vorläuferzelle entwickeln sich auch Zellen mit immunologischer Funktion: B- und T-Lymphozyten und natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen).

Zellen werden aus dem Knochenmark ins periphere Blut ausgespült. Dort reifen sie, altern und sterben durch Apoptose (siehe unten). Im Blut können die Zellen sich nicht mehr teilen und vermehren.

Zur Abwehr krankmachender Keime hat der Mensch zwei eng miteinander zusammenarbeitende Abwehrsysteme entwickelt. Man unterscheidet die angeborene unspezifische Immunabwehr von der erworbenen, spezifischen Immunität. Bei beiden Formen können weiterhin humorale und zelluläre Faktoren unterschieden werden.

Zur angeborenen unspezifischen Abwehr gehören vor allem die mechanische Abwehr der Haut und Schleimhäute. Die zelluläre angeborene Immunabwehr stellen Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen, die durch Phagozytose Fremdpartikel (Antigene) aufnehmen und lysieren können. Die Oberflächenrezeptoren der Zellen erkennen die Antigene an allgemein vorkommenden Oberflächenstrukturen zum Beispiel Proteoglykane der Bakterienzellwände. Sobald der Rezeptor ein Antigen gebunden hat, nimmt er es auf. Makrophagen sezernieren nach Aktivierung durch ein Antigen Cytokine und Chemokine. Die Gefäße erweitern sich, werden durchlässiger und es kommt zum Austritt von Flüssigkeit ins

Gewebe. Durch Cytokine werden Lymphozyten aus dem Blut zur Wanderung ins Gewebe angeregt (Chemotaxis). Außerdem werden vermehrt Leukozyten aus dem Knochenmark in die Blutbahn freigesetzt (Leukozytose). Chemokine locken neutrophile Granulozyten und Monozyten aus dem Blut an den Ort des Entzündungsgeschehens. Chemokine, Zytokine und freigesetzte Gewebismetaboliten wie beispielsweise Kalium und Wasserstoff erzeugen an den Nervenendigungen eine Reizung und Schmerzempfinden. Dadurch entsteht eine Entzündungsreaktion, die durch Schwellung, Rötung, Schmerz, Funktionseinschränkung und lokale Wärme gekennzeichnet ist.

Zur angeborenen Abwehr gehören auch humorale Komponenten wie das Komplementsystem. Darunter versteht man ein System von Plasmaproteinen, das klassisch über Antigen-Antikörper-Komplexe, oder alternativ durch Bestandteile mikrobieller Erreger aktiviert wird. Das Fremdprotein führt zu einer Kaskade proteolytischer Reaktionen an deren Ende das Antigen mit Proteinfragmenten bedeckt wird (Opsonisierung). Opsonisierung macht das Antigen für die Phagozyten angreifbar. Die Zerfallsprodukte der Komplementfaktoren fördern die Bildung von Antikörpern und Adhäsionsmolekülen. Sie wirken chemotaktisch und rekrutieren Granulozyten und Monozyten. Die Degranulation von basophilen Zellen und Mastzellen wird durch die Komplementfaktoren verstärkt, so dass vasogene Amine die Entzündung unterstützen.

Zu weiteren Komponenten der angeborenen, humoralen Abwehr zählen Lysozym in Speichel und Tränenflüssigkeit, Akute-Phase Proteine und mikrobizide Säuren auf der Haut. Auf diese Mechanismen soll an diese Stelle nicht weiter eingegangen werden.

Die angeborene Immunität reagiert schnell und wenig spezifisch. Sie hält den Erreger so lange „in Schach“, bis das erworbene, spezifische Immunsystem, welches nicht so schnell reagiert, greift. Außerdem spielen Zellen der angeborenen Immunität eine große Rolle bei der Steuerung der erworbenen Immunität.

Das erworbene, spezifische Immunsystem lässt sich ebenfalls in zelluläre und humorale Mechanismen unterteilen: T-Zell Abwehr (zellulär) und durch spezialisierte B-Zellen (Plasmazellen) gebildete Antikörper (humoral). Die spezifischen T-Zellen (TZ) rekrutieren und konzentrieren unspezifische Effektormechanismen dort, wo Antigen vorkommt.

TZ können Antigene erkennen, die ihnen auf MHC Molekülen (major histocompatibility complex) präsentiert werden.

Im MHC Genkomplex, auch HLA (human leucocyte antigen) genannt, werden zwei MHC Klassen unterschieden. Diese zwei Gruppen unterscheiden sich zum einen in ihrer Verteilung auf Körperzellen, zum anderen in ihrem molekularen Aufbau und der Präsentation von Antigenen.

MHC I Moleküle werden von Körperzellen exprimiert. Sie werden in HLA-A, B, C unterschieden. Zusätzlich gibt es nicht klassische HLA Moleküle wie z.B. auf Trophoblasten oder lymphohämoetischen Zellen, die Differenzierungsfunktion haben. Mit MHC Klasse I werden zellinterne Peptide assoziiert und CD8⁺ TZ (Cluster of differentiation, CD), also zytotoxischen TZ präsentiert. Die TZ kann so zwischen körpereigenen und -fremden Peptiden unterscheiden. Virale Infektionen führen zu Veränderungen der präsentierten Strukturen. So kann das Immunsystem auch eigene, infizierte Zellen eliminieren.

Über MHC Klasse II werden exogen aufgenommene Peptide CD4⁺ T-Helferzellen präsentiert. MHC II befindet sich auf lymphohämoetischen Zellen, Makrophagen, DC und TZ. MHC II wird in HLA-DR, DQ und DP mit vielen Untervarianten unterteilt.

Durch Antigenpräsentation wird die TZ zur Differenzierung und Vermehrung angeregt (aktiviert). Die zelluläre TZ Antwort der zytotoxischen TZ und der T-Helferzellen setzt ihre Aktivierung voraus. T-Helferzellen stehen über Zytokinseznierung und Oberflächenmoleküle mit den B-Zellen in Verbindung.

Schlussendlich führt die erworbene Immunität zur spezifischen Antikörperbildung durch Plasmazellen. Die Antikörper können bakterielle Toxine binden und neutralisieren, Bakterien opsonieren und so deren Aufnahme durch Makrophagen erleichtern. Die Antikörper können auch direkt das Komplementsystem aktivieren.

T-Zellen

Im peripher venösen Blut befinden sich bezogen auf alle mononukleären Zellen 65 - 84 % TZ. Der T-Zell Rezeptor (TZR) besteht aus einem CD3 Proteinkomplex, der sich aus drei Untereinheiten zusammensetzt, sowie zwei weiteren Ketten.

Man unterscheidet TZR mit einer Kombination aus α und β Kette von TZR bestehend aus je einer γ und einer δ Kette. Die α/β beziehungsweise γ/δ TZR erfüllen Funktionen im Rahmen

der Antigenerkennung, während der CD3 Proteinkomplex Signale nach intrazellulär weiterleitet und die Aktivierung der TZ einleitet.

Beide Ketten sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Sie bestehen aus Glykoproteinen und sind aus D(iversity)-, J(oining)- und V(ariablen)-Gensegmenten zusammengesetzt. Durch Splicing- und Rearrangement Vorgänge werden nur einige dieser Gensegmente zur Kette zusammengesetzt. So ergeben sich besonders viele Kombinationsmöglichkeiten für die variable Endregion des Rezeptors. Hier befindet sich die spezifische Antigen-Bindungsstelle. Da Millionen (rein rechnerisch 10^{12}) verschiedener TZR existieren, ist die Palette der Antigene, welche die TZ erkennen kann, sehr breit gefächert. Auf Grund ihres CD3 Rezeptors werden sie auch kurz als CD3+ bezeichnet. Die 65 - 84 % TZ sind zu 17 - 30 % CD8+ TZ und zu 41 - 55 % CD4+ TZ.

Tabelle 4: *Vorkommen der TZR α/β Kette und TZR γ/δ Kette.*

	<u>TZR α/β Kette</u>	<u>TZR γ/δ Kette</u>
Häufigkeit	~95 % aller TZR	~1 - 5 % alle TZR
Oberflächenmarker	65 % CD4+	~5 % CD4+
	35 % CD8+	~20 % CD8+
	< 1 % CD4- CD8-	~60 % CD4- CD8-

TZ können MHC I und II Moleküle nur mit Hilfe von TZR und Korezeptoren erkennen und binden. Als Korezeptor fungiert entweder CD4 oder CD8.

Subpopulation T-Helfer Zellen (CD 4+)

Nach Stimulation einer CD4+ TZ können sich unterschiedliche Immunreaktionen entwickeln. Diese sind durch verschiedene Cytokinsekretionsmuster der TZ charakterisiert und werden T-Helfer 1- (Th-1) und T-Helfer 2-Antwort (Th-2) genannt. Infektionen und intrazelluläre Parasiten induzieren eine starke Th-1 Antwort. Damit es zu dieser Polarisierung kommt, differenzieren sich naive Th-0 Zellen zu Interferon- γ (IFN- γ) sezernierenden Klonen und führen zu zellulärer Immunität. Das Antigen wird durch stärkere Phagozytoseaktivität der IFN- γ aktivierten Makrophagen, IgG2 Produktion, opsonierenden Antikörpern und toxischen TZ eliminiert. Interleukin (IL) -12 wirkt als wichtigster Förderer der Th-1 Zellen und hemmt die Th-2 Zellen. Die Th-2 Antwort ist durch Cytokine wie IL-4, IL-5, IL-10 und Transforming growth factor β 2 (TGF- β 2) charakterisiert. Sie wird hauptsächlich durch Parasiten angeregt

und führt zur Bildung von IgG1 und IgE Antikörpern, sowie zur Aktivierung eosinophiler Granulozyten. IL-4 fördert die Th-2 Antwort und unterdrückt Th-1 Differenzierung. Eine erfolgreiche Schwangerschaft wird schon seit einiger Zeit in Zusammenhang mit einer balanzierten Th-2 Reaktion gesehen (Wegemann, T.G. et al., 1993).

Subpopulation zytotoxische T-Zellen (CD8+)

Zytotoxische TZ töten körpereigene Zellen, die durch Viren oder Bakterien infiziert sind. Sie können diese Körperzellen durch sogenannte Granzyme zur Selbsttötung (Apoptose) veranlassen oder ihre Membranen durch zytotoxische Proteine (Perforine) schädigen. Außerdem können zytotoxische Zellen Interferon produzieren, und so eine virale Vermehrung hemmen und Makrophagen aktivieren.

Tabelle 5: Unterschiede CD4 und CD8 Zellen.

<u>CD 4+ Zelle „T-Helferzelle“</u>	<u>CD8+ Zelle „zytotoxische Zelle“ oder „Suppressor Zelle“</u>
Erkennt MHC II assoziierte, also exogene Antigene	Erkennt MHC I assoziierte, also endogene Antigene
In vivo nicht zytolytisch	In vivo zytolytisch, spezifische Zerstörung virusinfizierter Zellen
Makrophagenaktivierung	Werden von IL-2 der CD4+ zur Proliferation angeregt
Subpopulationen mit Th-1- oder Th-2 Antwort	Zytolyse durch Perforin oder nicht zytolytische Effektorfunktion

B-Zellen

Jede B-Zelle (BZ) ist auf der Zelloberfläche durch ihren spezifischen Immunglobulinrezeptor gekennzeichnet. Dieser Oberflächenrezeptor bindet Antigene, die in den Körper eingedrungen sind, spezifisch. Er hat wie jedes Immunglobulin eine große Variabilität, so dass Millionen verschiedener B-Zellrezeptoren existieren. Das gebundene Antigen wird von der BZ prozessiert und auf MHC II Molekülen von T-Helferzellen präsentiert. Erst durch sekretorische Stimulation der BZ durch die CD4+ Zellen beginnen diese gewaltig zu proliferieren und sich zur Antikörper produzierenden Plasmazelle umzuwandeln. Dieser Vorgang wird klonale Selektion genannt. Die dabei sezernierten Antikörper entsprechen dem oberflächlichen Immunglobulinrezeptor. Bei großen Antigenen mit repetitiven Strukturen (zum Beispiel Kollagen, DNA) kann sich die BZ auch CD4 unabhängig zur Plasmazelle umwandeln und IgM sezernieren. Nach der Antikörperbildung wandeln sich einige

Plasmazellen in Gedächtniszellen um. Diese können bei erneutem Auftreten des entsprechenden Antigens schneller ihre Abwehrfunktion wieder aufnehmen. Die Antikörper unterscheiden sich in ihrer Form und Größe. Sie werden in Ig -G, -A, -M, und -E unterteilt.

Dendritische Zellen

Die Gruppe der DC umfaßt Zellen unterschiedlicher Herkunft und Funktion. Benannt worden sind diese Zellen nach ihrem elektronenmikroskopischen Aussehen, das unzählige Zytoplasmaausläufer erkennen lässt. Gemeinsam ist den DC ihre starke Potenz zur Antigenpräsentation und zur TZ Aktivierung. DC befinden sich hauptsächlich in Geweben, welche mit der Außenwelt in Verbindung stehen (Haut, Verdauungstrakt). Einige gewebsspezifische DC tragen Eigennamen: die DC der Haut heißen Langerhanszellen, die der Leber Kupfersche Sternzellen.

Im Plazentagewebe sind DC die häufigsten antigenpräsentierenden Zellen (Oksenberg, J. et al., 1986). Im peripher venösen Blut machen sie jedoch weniger als 2 % der mononukleären Zellen aus.

Die im Gewebe angesiedelten DC können nach Phagozytose und Prozessierung eines Antigens in lymphatisches Gewebe wandern (Steinmann, R.M. et al., 1991). Die Migrationsbereitschaft und -geschwindigkeit der DC übertrifft die aller anderen Abwehrzellen. Zusammen mit den anderen antigenproduzierenden Zellen werden DC auch als antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cell, APC) bezeichnet.

Für die DC ist kein spezifischer Oberflächenmarker bekannt. Die Zellen zeigen eine starke Expression von HLA-DR. Zusätzlich können sie durch Fehlen von CD3, CD14, CD19, CD20 und CD56 charakterisiert werden. Weitergehend existieren zwei Subtypen der DC. Während der eine CD11c exprimiert, bildet die andere Untergruppe CD123 Oberflächenmoleküle aus. Die CD11c+ DC stammen von myeloiden Zellen ab. Die CD123+ exprimierenden Zellen sind lymphatischer Herkunft (Thomas, R. et al., 1994). CD11c+ DC führen stärker zu T-Zell Stimulation als CD123+. Sie sezernieren proinflammatorische Zytokine und bilden nach Antigenkontakt co-stimulatorische Moleküle aus, um einen intensiveren Zellkontakt mit den TZ zu erreichen (Reid, S.D. et al., 2000). CD123+ DC hingegen können keine Zytokine produzieren (Almeida, J. et al., 1999). Stattdessen wird ihnen die Bildung von IFN- α und - β zugeschrieben. In der Interaktion mit TZ unterstützen die 123+ DC die Polarisierung zu einer Th-2 Immunantwort. CD11c+ hingegen unterstützen eher die Ausbildung einer Th-1 Immunantwort (Vieira, P.L. et al., 2000).

Natürliche Killer Zellen

Sie stammen wie die B- und T-Lymphozyten von der lymphatischen Vorläuferzelle des Knochenmarks ab und zirkulieren im Blut. Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) besitzen große Granula, deren Funktion die Abtötung intrazellulärer Pathogene ist. Insbesondere töten NK-Zellen intrazelluläre Viren, Parasiten, aber auch Bakterien, zum Beispiel Listerien. Der Mechanismus ist dem der zytotoxischen TZ sehr ähnlich: sie binden an die Zielzelle und setzen ihre Granula frei. Der toxische Inhalt der Granula durchdringt die Zellmembran der Zielzelle und induziert bei dieser den programmierten Zelltod.

Die Rezeptoren der NK-Zellen sind nicht so variabel wie die anderer lymphatischer Zellen. Die Bindung ist daher eher unspezifisch. NK-Zellen können durch $\text{INF-}\alpha$ und $\text{INF-}\gamma$ aktiviert werden und ihre Aktivität unter INF Einfluss 20-100 mal verstärken. Gleiches gilt für IL-12, das bei der frühen Phase der Immunantwort entsteht. Über den früh einsetzenden Tötungsmechanismus helfen die NK-Zellen, Virusinfektionen einzudämmen (Malmgaard, L 2004). Die zytotoxische Aktivität der Zellen wird durch zwei Rezeptoren gesteuert. Der inhibitorische Rezeptor erkennt MHC-I Moleküle und verhindert die Tötung körpereigener, gesunder Zellen. Sind die Zellen infiziert, werden keine oder veränderte MHC-I Moleküle exprimiert. Die inhibitorischen Rezeptoren können nicht binden und ihre Funktion nicht ausführen.

Ein weiterer Rezeptor der NK-Zellen aktiviert die Tötung der Zelle. Wenn durch Glykosylierung bei einer Infektion Oberflächenmoleküle verändert werden, kann der „Aktivationsrezeptor“ binden. So kommt es zur Granulaausschüttung und zur Tötung der Zelle. Über diese Erkennungsmechanismen können NK-Zellen auch sehr gezielt Tumorzellen des lymphatischen Systems töten (Warren, HS et al., 1999).

Natürliche Killer T-Zellen

Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen) tragen phänotypische Eigenschaften sowohl der NK-Zellen als auch der TZ: den α/β T-Zell Rezeptor und den NK Rezeptor.

Sie erkennen Lipid- und Glykolipidantigene, die mit CD1d (MHC Klasse I Molekül) assoziiert sind (Brutkiewicz, R.R. et al., 2003). Als potenter Stimulator der NKT-Zellen wurde das aus dem Meeresschwamm gewonnene α -Galactosylcermid (α -GalCer) identifiziert

(Kawano, T. et al., 1997). Ein natürlicher Ligand, der mit CD1d die NKT-Zellen stimuliert ist bis dato nicht bekannt.

NKT-Zellen zeigen ein sehr beschränktes TZ-Rezeptor Repertoire. Die Art der bevorzugt exprimierten Rezeptoren differiert je nach Spezies. Als Subtypen sind CD4+, CD8+, doppelt negative und doppelt positive NKT-Zellen identifiziert. Die doppelt positiven NKT-Zellen scheinen eine unreife Population darzustellen. Über die genauen Differenzierungsabläufe und den Ursprung der Zellen ist jedoch nur wenig bekannt.

Eine Besonderheit der NKT-Zellen ist ihre Fähigkeit, nach Aktivierung schnell große Mengen IL-4 und INF- γ zu sezernieren. Dadurch werden NK-Zellen und TZ aktiviert, weshalb den NKT-Zellen eine Schlüsselrolle in der Immunregulation zugesprochen wird (Godfrey, D.I. et al., 2000). Die Zellen haben die Fähigkeit, über perforinabhängige Mechanismen Tumorzellen zu töten (Brutkiewicz, R.R. et al., 2002).

Durch ihre IL-4 Sekretion wird eine Th-2 Polarisation der TZ unterstützt. Die Th-2 Zellen werden weiter zur IL-4 Produktion angeregt (Yoshimoto, T. et al., 1995).

T1D wird mit einer Th-2 Hyporeaktivität in Zusammenhang gebracht. Die dominierende Th-1 Antwort kann die Autoimmunität immunologischer Zellen bewirken. Über diesen Mechanismus führen NKT-Zellen Defizite bei Mäusen mit Diabetesrisiko zur Erkrankung. Jedoch kann wiederholte Stimulation der NKT-Zellen mit Galactosylcermid das Defizit ausgleichen und die Erkrankung verhindern (Mi, Q.S. et al., 2003). Auch graft versus host Erkrankungen können durch NKT-Zellen vermindert werden (Zeng, D. et al., 1999). Weitere Untersuchungen über die gewebsprotektiven Einflüsse der NKT-Zellen sowie deren Beeinflussbarkeit durch DC werden durchgeführt (Onoé, K. et al., 2007).

Ein weiteres interessantes Feld ist die Abortinduktion durch NKT-Zellen, wie sie von Ito, K. (2000) bei Mäusen gezeigt werden konnte.

Apoptose

Bei der Apoptose handelt es sich um einen physiologischen Vorgang, der genetisch festgelegt ist, und zum Zelltod führt. Um dieses Charakteristikum zu verdeutlichen, werden häufig die

Synonyme „programmierter Zelltod“ oder „Selbstmord der Zelle“ verwendet. Ethymologisch leitet sich das Wort Apoptose allerdings vom griechischen „apo“- von herab und „ptosis“- Fall, Einsturz ab. Der Wortursprung soll an ein abfallendes Blatt erinnern. Dieses Bild verdeutlicht ein weiteres Charakteristikum der Apoptose, bei der einzelne Zellen schrumpfen und sich aus dem Gewebsverband und der Verbindung mit den Nachbarzellen ablösen. Schließlich kommt es zur Kondensierung des Chromatins im Zellkern, zum Kernzerfall (Karyorhexis) und zum Abbau der Zelle durch Phagozytose. Im Gegensatz zur Nekrose, die stets mit einer Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe verbunden ist, läuft die Apoptose energieabhängig, rasch und unbemerkt an vielen Stellen des Körpers und bei vielen einzelnen Zellen gleichzeitig ab. Da die apoptotischen Vorgänge nicht von inflammatorischen Prozessen begleitet sind, belasten sie den Organismus nicht. Der rasche Ablauf und das vereinzelte Auftreten der Apoptose erschwert jedoch deren Beobachtung und Erforschung. Für die Beschreibung apoptotischer Vorgänge bei Nematoden bekamen Sydney Brenner, H. Robert Horvitz und John E. Sulson 2002 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie. Dabei ist das Phänomen des programmierten Zelltods keinesfalls eine Neuentdeckung. Das Zellsterben wurde schon 1842 von Carl Vogt im Zusammenhang mit der Embryonalentwicklung beschrieben. Von „Apoptose“ spricht man allerdings erst seit 1972.

Die Bedeutung der Apoptose für menschliches und tierisches Wachstum betrifft viele Bereiche: die Organentwicklung, Ausbildung von Selbsttoleranz und Immunität, Organrückbildung (Involution der Brustdrüse) und ständige Elimination geschädigter, genetisch veränderter Zellen. Die Zellen im gesunden Gewebe unterliegen Kontrollmechanismen, die DNA-Schäden erkennen. Jede DNA-Schädigung stellt für den Organismus eine Gefahr dar, da tumoröse Entartung der Zelle potentiell möglich ist, und jede Weitergabe der falschen Erbinformation diese Gefahr verstärkt. Daher entwickeln sich aus Zellen, welche die Fähigkeit zur Apoptose, beispielsweise durch virale Infektionen, verloren haben, häufig Tumoren.

Bevor eine Zelle ihren normalen Wachstumszyklus verläßt und den Zelltod einleitet, werden Todesrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche aktiviert. Als Todesrezeptoren wurden unter anderem CD 95 (auch Fas), Tumor Nekrose Faktor (TNF) und TRAIL- (TNF-related apoptosis-inducing ligand) Rezeptoren identifiziert. Ihre Aktivierung führt zu einer ligandengesteuerten Signalkaskade. Diese Kaskade führt im Zytoplasma der Zelle über molekulare Veränderungen zur Spaltung der Kern-DNA. Die hier nur schematisch beschriebene Apoptosekaskade kann in all ihren Schritten durch Apoptosehemmende und

fördernde Gene moduliert werden. TZ können unter bestimmten Voraussetzungen die Apoptose anderer antigenpräsentierender Zellen verhindern oder verlangsamen. Sie können Einfluss nehmen auf den initialen Schritt der Immunantwort und die TZ-Aktivierung (De Smedt, T. et al., 1998).

Im frühen Stadium der Apoptose kommt es neben der Kondensation des Chromatins auch zur Schrumpfung des Zytoplasmas. Die Zelle verliert ihre Zellausläufer. Die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran verändert sich. Phosphatidylserin der inneren Lipidschicht wird in die äußere Lipidschicht verlagert. Die Zellmembran wird insgesamt instabiler und zeigt typische Ausstülpungen (Apoptosekörperchen). Dieser Schritt kann beim Apoptosenachweis durch Antikörper genutzt werden. Antikörper bindet an die Phosphatidylserine der veränderten Membran. Der Antikörper ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt und kann durch ein entsprechendes Zytometer gemessen werden. Nicht apoptotische Zellen bieten dem Farbstoff diese Bindungsmöglichkeit nicht und werden daher nicht markiert.

Von der physiologischen Apoptose muss die pathologische Nekrose von Zellen abgegrenzt werden. Bei der Nekrose kommt es zum Zelluntergang, der durch unterschiedliche Faktoren induziert werden kann (Hitze, Noxen, Sauerstoffmangel, Radioaktivität). Gewebnekrosen haben eine Entzündungsreaktion zur Folge. Zur Differenzierung nekrotischer und apoptotischer Zellen kann ein Antikörper verwendet werden, der an DNA bindet und von vitalen und apoptotischen Zellen nicht aufgenommen wird.

Schwangerschaftsimmunologie

Die komplexen Prozesse, welche die Einnistung des Embryos ermöglichen und seine Abstoßung verhindern, werden sowohl vom Trophoblasten als auch von der Decidua gesteuert. Welche Mechanismen schlussendlich zu einer erfolgreichen Schwangerschaft führen, und wodurch wiederholte Aborte induziert werden, ist nicht eindeutig zu beantworten. Es werden immunologische Theorien diskutiert, wobei die Balance zwischen Th-1 und Th-2 Antwort eine wichtige Rolle zu spielen scheint. So konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass Th-2 Cytokine wie IL-4, IL-5, IL-10 und TGF β 2 durch ihren immunsupprimierenden Effekt und durch gleichzeitige Unterdrückung einer Th-1 Antwort eine Schwangerschaft unterstützen (Wegemann, T.G. et al., 1993), während eine Th-1 Immunantwort und die damit verbundene Sezernierung von TNF- α und IFN- γ die Abortrate erhöhen kann (Clark, D.A. et al., 2001; Ito, K. et al., 2000).

Andere Forschungsergebnisse betreffen die Rolle des Trophoblasten. Er exprimiert nicht klassische HLA-A, -B oder -C Antigene, sondern atypische HLA-G und könnte hierdurch der potentiellen Schädigung durch das mütterliche Immunsystem entgehen (Kovats, S. et al., 1990). Der Trophoblast bildet Proteine, die das mütterliche Komplementsystem modulieren (Mellor A.L. et al., 2000) und sezerniert immunrelevante Zytokine wie Interleukin-10. IL-10 unterdrückt die IFN- γ Bildung durch Th-1 Zellen und unterstützt so die mütterliche Toleranz des allogenen Föten (Roth, I. et al., 1996).

Auf mütterlicher Seite spielt sich ein eben so großes Repertoire zellulärer Interaktionen ab. Die Veränderungen während der Schwangerschaft betreffen die Antikörperbildung und Antigenpräsentation, Interleukin- und Interferonbildung sowie Anzahl und Art der sich in der Plazenta und im Blut befindenden Immunzellen. Pathologische Veränderungen in diesem fein abgestimmten Zusammenspiel können zu zytotoxischen- und antikörpervermittelten Immunreaktionen gegen den Konzeptus und zu Spontanaborten führen (Christiansen O.B., 1996).

II. Fragestellung und Zielsetzung

In der vorliegenden Studie wurden immunologische Zellen unterschiedlicher Populationen im peripher venösen Blut von schwangeren Frauen mit und ohne Diabetes mellitus, GDMI, Typ I Diabetikerinnen und gesunden, nicht schwangeren Frauen quantitativ und qualitativ ausgewertet.

Zytologische und humorale Untersuchungen placentaren Gewebes sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die genauen Zusammenhänge der immunologischen Vorgänge an der Grenzfläche zwischen mütterlichem und fötalem Organismus sind noch weitgehend unklar und werden in vivo und in vitro an Mensch- und Tiermodellen untersucht. Das Blickfeld ist bei vielen immunologischen Untersuchungen auf lokale Abläufe an der placentaren Grenzfläche und weniger auf immunologische Veränderungen im peripher venösen Blut der Schwangeren gerichtet. Doch auch hier laufen während der Schwangerschaft Veränderungen ab, die die immunologische Sondersituation widerspiegeln, in der sich Mutter und Kind befinden (Watanabe, M. et al., 1997).

Durch den Diabetes mellitus besteht in der untersuchten Population eine Autoimmunerkrankung, die bei schwangeren Frauen zu Schwangerschaftskomplikationen wie Makrosomie oder erhöhter Abortrate führt, aber auch diabetische Komplikationen (beispielsweise periphere Polyneuropathie, Retinopathie, Nephropathie, Mikro- und Makroangiopathie) verstärkt. Als Ursache der vermehrten Aborte wird ein überreaktives Immunsystem diskutiert. Diabetes mellitus löst auch eine Veränderung des Immunsystems der Erkrankten aus und stellt im Zusammenhang mit einer Schwangerschaft eine bisher im peripheren Blut wenig untersuchte Situation dar. Studien, die ein großes Spektrum der immunologischen Zellen im peripheren Blut erfassen, liegen zur Zeit nicht vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Vier-Farben-Durchflusszytometrie eine ausgedehnte Leukozytendifferenzierung des peripheren Blutes in verschiedenen Patientenpopulationen unter Berücksichtigung der Parameter Schwangerschaft und Diabetes mellitus vorgenommen werden.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht als schnelles und präzises Werkzeug die Bestimmung immunologischer Subpopulationen in unterschiedlichen Patientengruppen und wird im Folgenden dargestellt.

III. Material und Methoden

3.1 Studienaufbau

In der dargestellten Studie wurde eine quantitative und funktionelle Analyse leukozytärer und monozytärer Zellen im peripher venösen Blut von schwangeren Frauen mit und ohne Diabetes mellitus sowie von Frauen mit GDM durchgeführt. Als Vergleichsgruppe wurden gesunde, nicht schwangere Frauen, nicht SD sowie gesunde Schwangere untersucht.

Um ähnliche Grundvoraussetzungen bei den untersuchten Patientinnen zu schaffen, wurden nur vergleichbare Altersgruppen einbezogen, auch Schwangerschaftsdauer und Stoffwechseleinstellung des Diabetes waren vergleichbar.

3.1.1 Patientinnen

Es wurden Blutproben von 114 altersadaptierten Frauen im reproduktionsfähigen Alter untersucht. Das mittlere Alter der Probandinnen betrug 32,8 Jahre, wobei die Altersspanne von 19 bis 44 Jahren reichte. Die Untersuchungsgruppen bestanden aus:

- a) 19 schwangeren Frauen mit T1D
- b) 20 Frauen mit GDM.

Zur Kontrolle der Untersuchungsergebnisse wurden drei Gruppen gebildet. Für diese Kontrollgruppen wurden:

- c) 24 gesunde, nicht schwangere Frauen
- d) 25 gesunde, schwangere Frauen ohne Begleiterkrankungen oder Risikokonstellation
- e) 25 nicht schwangere T1D ohne weitere Begleiterkrankungen untersucht.

Die Studienteilnehmerinnen waren Patientinnen der Sprechstunde für SD der Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf oder der Diabetessprechstunde des Deutschen Diabetes Forschungsinstitutes Düsseldorf (DDFI). Alle Patientinnen gaben ihr schriftliches Einverständnis (siehe Anhang).

Die Diagnose des GDM wurde nach den Richtlinien der Arbeitsgemeinschaft Diabetes und Schwangerschaft der Deutschen Diabetes Gesellschaft von 1993 mit dem oGTT gestellt. Die

Durchführung des oGTT war standardisiert und entsprach den Richtlinien der World Health Organisation. Die Glukosebelastung erfolgte mit 75 g Glucose aufgelöst in 300 ml Wasser und wurde der Patientin oral verabreicht.

Da die Glukosetoleranz tageszeitlichen Schwankungen unterliegt, wurde die Glukosebelastung morgens bei nüchternen Patientinnen begonnen. Vor der Glukosebelastung wurde als Ausgangswert der Nüchternblutzuckerwert der Patientin aus kapillarem Blut bestimmt. Weitere Blutzuckermessungen erfolgten eine Stunde sowie zwei Stunden nach Verabreichen der Glukoselösung.

Als Obergrenze galten Werte von:

nüchtern	90 mg/dl (5 mmol/l)
1 h	190 mg/dl (10,6 mmol/l)
2 h	160 mg/dl (8,6 mmol/l)

Bei zwei pathologischen Werten wurde ein GDM diagnostiziert und nach *White* klassifiziert. Ergab der oGTT nur einen pathologischen Wert, wurde er zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt. Patientinnen, die vom niedergelassenen Frauenarzt mit der Diagnose GDM zur Frauenklinik überwiesen wurden, wurden nicht erneut getestet soweit ein schriftlicher Befund des pathologischen oGTTs vorlag.

Bei allen Diabetikerinnen und GDMI wurde ein aktueller HbA1c Wert gemessen. Der Zielwert lag für alle Schwangeren bei 6,0 %. Bei nicht schwangeren Diabetikerinnen wurden HbA1c Werte von 6 - 8 % als ausreichend angesehen. Der mittlere HbA1c lag bei GDMI, Typ I Diabetikerinnen sowie nicht schwangeren Diabetikerinnen bei 5,51 %, 5,86 % sowie 7,1 %. Die Langzeit-Stoffwechsellage der Patientinnen konnte auf Grund dieser Werte insgesamt als sehr gut bezeichnet werden.

Die kurzfristige Blutzuckereinstellung wurde anhand von Blutzuckertagesprofilen beurteilt. Diese Werte lieferten ein genaues Bild über Blutzuckerspitzen und Hypoglykämien im Tagesverlauf sowie über die aktuelle Stoffwechselsituation.

Wurde zum Zeitpunkt der Blutentnahme die Erstdiagnose eines GDM gestellt, wurde die Patientin zunächst eingehend beraten und diätetisch behandelt. Bei unzureichendem Therapieerfolg wurde die Patientin in Zusammenarbeit mit dem DDFI unter stationären Bedingungen einer Schulung zur Insulintherapie unterzogen.

Wie bereits erwähnt, wurden sämtliche Patientinnen nur unter Ausschluss von Begleiterkrankungen in die Studie aufgenommen. Um akute oder chronische Einflüsse auf das Immunsystem zu vermeiden wurden folgende anamnestische Ausschlusskriterien festgelegt:

- ⇒ kürzlich durchgemachte oder bestehende Infektionen
- ⇒ Allergien
- ⇒ Präeklampsie oder HELLP-Syndrom
- ⇒ Gerinnungsstörungen
- ⇒ genetische Erkrankungen
- ⇒ Tumorerkrankungen
- ⇒ Autoimmunerkrankungen außer Diabetes mellitus
- ⇒ Medikamenteneinnahme außer Insulin, Vitamin- und Mineraliensubstitution

Zusätzlich zur aktuellen Anamnese und Familienanamnese wurden alle verfügbaren Daten über die aktuelle Schwangerschaft dokumentiert. Bei allen schwangeren Patientinnen ergaben sich weder im Schwangerschaftsverlauf noch während der Geburt Komplikationen.

Außerdem wurden der Zeitpunkt der Erstdiagnose der Glukosetoleranzstörung, aufgetretene diabetische Folgeerkrankungen und die Therapieform der Glukosetoleranzstörung festgehalten. Unter den Diabetikerinnen wurden von 25 Patientinnen 13 nach *White B*, jeweils fünf nach *White C* und *D* und eine Patientin nach *White R* diagnostiziert. In der Gruppe der schwangeren Diabetikerinnen wurden von 20 Patientinnen elf nach *White B*, sechs nach *White C* und zwei nach *White D* diagnostiziert.

Tabelle 6 : *Patientinnencharakteristika.*

Charakteristik	N (n=24)	SS (n=29)	T1D (n=25)	GDMI (n=21)	SD (n=20)
Altersdurchschnitt	31	34	32	33	34
Altersspanne	21 - 43	27 - 45	22 - 45	18 - 43	18 - 43
Schwangerschaftswoche		30+2		31+0	27+6
White Klassifikation					
nicht insulinpflichtig A1				27	
insulinpflichtig A2				4	
B			13		11
C			5		6
D			5		2
R			1		
Nicht klassifiziert			1		1
HbA1c Durchschnitt			7,10 %	5,10 %	5,86 %

N: gesunde Kontrollgruppe; SS: Schwangere; T1D: Typ I Diabetikerinnen; GDMI: Gestationsdiabetikerinnen; SD schwangere Typ I Diabetikerinnen

3.1.2 Probengewinnung

Den Probandinnen wurde zur durchflusszytometrischen Untersuchung 7 ml venöses Blut in ein Natrium-Heparin Blutentnahmeröhrchen (BD Vacutainersystem, Becton Dickinson, Heidelberg) entnommen.

Die Venenpunktion erfolgte unter aseptischen Bedingungen. Bei Diabetikerinnen und GDMI wurden zusätzlich 4 ml venöses Blut in EDTA Blutentnahmeröhrchen (BD Vacutainersystem Becton Dickinson, Heidelberg) zur HbA1c Bestimmung entnommen.

Die Natrium-Heparin Blutproben wurden innerhalb 2 - 6 Stunden nach Blutentnahme gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Das Blut wurde, wie vom Hersteller der Antikörper empfohlen, zu keiner Zeit gekühlt gelagert.

Aus dem peripher venösen Blut wurden mittels Vier-Farben-Durchflusszytometrie folgende Zellpopulationen differenziert:

T-Zell Subpopulationen:

- $\alpha\beta$ T-Lymphozyten mit Apoptosemarker
- $\gamma\delta$ T-Lymphozyten mit Apoptosemarker

Dendritische Zellen und Subpopulationen:

- myeloide CD 123+ Population mit Apoptosemarker
- lymphoide CD11c+ Population mit Apoptosemarker

Des Weiteren wurden mit direkter Vier-Farben-Durchflusszytometrie folgende Zellpopulationen analysiert:

- B-Zellen CD19+
- Natürliche Killerzellen CD16+/CD56+
- Natürliche Killer T-Zellen CD3+/CD16+/CD56+
- Monozyten
- T-Zellen CD3+
- Suppressor/ Zytotoxische T-Zellen CD8+ mit Aktivationsmarker DR
- T-Helferzellen CD4+ mit Aktivationsmarker DR

Im Unterschied zu den oben gelisteten Zellpopulationen standen für diese Messungen industriell vorgefertigte Analyseröhrchen, sogenannte TruCount™ Tubes, zur Verfügung (siehe unten).

3.1.3 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der direkten Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Zellen mittels fluoreszierender Antikörper, die gegen bekannte Oberflächenmoleküle der zu analysierenden Zelle gerichtet sind. Antikörper sind y-förmig. Der Fuß des Y wird als Fc-Fragment (fragment crystallizable) bezeichnet, die beiden oberen Arme als Fab-Fragmente (fragment antigen-binding). Die Fab-Fragmente sind hoch variabel und können an Antigenstrukturen binden.

Die bei der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper sind an ihrem Fc-Fragment mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen verbunden (konjugiert). In der Studie wurden vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet: Phycoerythrin (PE), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Allophycocyanin (APC), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerPc). Da die Fluoreszenzfarben direkt mit dem Antikörper verbunden sind, spricht man von direkter Durchflusszytometrie.

Vor der Analyse im Durchflusszytometer werden die Zellen mit den Antikörpern gefärbt. Die Antikörper binden an spezifischen Oberflächenmolekülen der Zelle (zum Beispiel Membranproteine, Rezeptoren) und erlauben die Differenzierung der Zellpopulationen der

Blutprobe. Um die Zelle eindeutig identifizieren zu können, werden verschiedene Antikörper, die an unterschiedlichen Strukturen der Zelle binden, verwendet.

Zur Messung wird eine kleine Menge der zu analysierenden Probe von dem Analysegerät eingesaugt, und im Zytometer an einem Laser vorbeigeleitet. In der Probe befindliche kleine Luftblasen und Partikel werden durch Filter entfernt, was eine Streuung des Lasers verhindert. Der verwendete Argon Laser sendet während der Messung konstant Licht mit 488 nm Wellenlänge aus. Durch Laserbeschuss der, auf der Zelloberfläche gebundenen, fluoreszierenden Antikörper, wird Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, welche durch die Emissionsmaxima der unterschiedlichen Farbstoffe definiert ist. Durch Lichtbrechung in einem Prisma können die unterschiedlichen Wellenlängen von getrennten Detektoren des Zytometers gemessen werden. Die Detektoren registrieren die Zahl der empfangenen Lichtsignale und zählen so die sich in der Probe befindenden Zellen. Durch die Größe der Zellen kommt es zur Lichtstreuung. Im sogenannten Forwardstreulicht (Forward Scatter, FSC) wird die unterschiedliche Zellgröße gemessen. Des Weiteren kann im sogenannten Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) die interne Differenzierung (Granulierung) der Zelle erfasst werden.

Zudem wird die relative Intensität der Fluoreszenz der Zelle gemessen, so dass verschiedene Informationen über den jeweiligen Zelltyp zusammengetragen werden können und die Zelle einer Population zugeordnet werden kann.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie werden sowohl quantitativ als auch qualitativ erfasst, und in einem Histogramm veranschaulicht.

Die Instrumenteneinstellung wurde so gewählt, dass sich die gemessene Fluoreszenzintensität im Bereich 10^0 – 10^4 befand und eine klare Abgrenzung der Zellpopulationen möglich war.

3.2.1 Färbung der dendritischen Zellen

Zur Färbung der DC wurden zunächst vier Proben angesetzt. Durch Markierung mit spezifischen Antikörpern sollten aus der Blutprobe die Subpopulationen der myeloiden CD123+ und lymphoiden CD11c+ DC differenziert werden. Isotypische Immunglobuline (Isotypkontrollen), die der Spezies des spezifischen Antikörpers entsprachen, dienten als Negativkontrollen und erfassten die unspezifische Bindung der Antikörper an die Oberflächenmoleküle (Epitope) der Zelle.

Um Interaktionen der Antikörper miteinander zu überprüfen und doppelt positive Zellen zu differenzieren wurden Doppelfärbungen durchgeführt.

Es ergaben sich folgende Färbeansätze:

1. Isotypkontrolle
2. Doppelfärbung zur Erfassung CD 123 und CD 11c doppelt positiver Zellen
3. CD 123+ Färbung zur Analyse der myeloiden DC
4. CD 11c+ Zellen zur Analyse der lymphoiden DC

Tabelle 7: *Antikörper für DC.*

Probe	Antikörper/ Menge in μl	Farbstoff	Klon	Isotyp
1. Isotypkontrolle	Lineage Cocktail 5 μ l	FITC	CD3: SK7	IgG
	Anti-CD3		CD14: M8 P9	
	Anti-CD14		CD16: NKP15	
	Anti-CD16		CD19 :4G7	
	Anti-CD19		CD20: L27	
Anti-CD20	CD56: NCAM16.2			
	Anti-DR 5 μ l	PercP	L243	IgG2a
	Isotype Maus δ 1 2,5 μ l	PE	X40	δ 1
	Isotype Maus δ 2a IgG 5 μ l	APC	X39	δ 2a
2. Doppelfärbung	Lineage Cocktail 5 μ l	FITC	s.o.	s.o.
	Anti-DR 5 μ l	PercP	s.o.	s.o.
	Anti-CD123 5 μ l	PE	9F5	IgG1
	Anti-CD11c 5 μ l	APC	S-HCL-3	IgG2
3. CD 123 Färbung	Lineage Cocktail 5 μ l	FITC	s.o.	s.o.
	Anti-DR 5 μ l	PercP	s.o.	s.o.
	Anti-CD123 5 μ l	PE	s.o.	s.o.
4. CD 11c Färbung	Lineage Cocktail 5 μ l	FITC	s.o.	s.o.
	Anti-DR 5 μ l	PercP	s.o.	s.o.
	Anti-CD11c 5 μ l	PE	s.o.	s.o.
3.1 CD 123 Apoptosemessung	Annexin 1 μ l	APC		
	7AAD 5 μ l			
4.1 CD 11c Apoptosemessung	Annexin 1 μ l	APC		
	7AAD 5 μ l			

Alle gelisteten Antikörper wurden von BD Bioscience, Heidelberg bezogen.

Abkürzungen: PercP: Peridinin-Chlorophyll-Protein; APC: Allophycocyanin; PE: Phycoerythrin; FITC:

Flourescein-Isothiocyanat; 7AAD :7-Amino-Actinomycin

Die aufgeführten Antikörper besitzen folgende Bindungseigenschaften:

Lineage Cocktail (Lin1): ist ein Kombinationspräparat und enthält mehrere unterschiedliche Antikörper gegen: CD3, welches auf allen Lymphozyten exprimiert wird. CD14, ein Marker für Monozyten, Makrophagen, neutrophile- und eosinophile Granulozyten. CD16, das auf ruhenden natürlichen Killer Zellen, Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert wird. CD19 und CD20 beides sind Marker für B-Zellen, sowie CD56 zur Markierung aktivierter und ruhender natürlicher Killer Lymphozyten. DC des peripher venösen Blutes und basophile Granulozyten werden durch Lin 1 nicht angefärbt.

Anti-HLA-DR: ist gegen Oberflächenmoleküle menschlicher MHC-II Komplexe gerichtet. Bei der Färbung kommt es zu keiner Kreuzreaktion mit HLA-DQ oder HLA-DP Epitopen. HLA-DR befindet sich im Blut auf B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, aktivierten TZ, aktivierten natürlichen Killer Lymphozyten und menschlichen Stammzellen. Es wird auf Gewebezellen exprimiert.

Anti-CD123: bindet an eine Untereinheit des Interleukinrezeptors $IL-3R\gamma$ und färbt im peripheren Blut die myeloide Untergruppe der DC, Monozyten, eosinophile und basophile Granulozyten. Die Bindung von Interleukin an den Rezeptor wird durch die Antikörperfärbung nicht verhindert.

Anti-CD11c: bindet an eine Untereinheit des Komplement-Rezeptors Typ 4. Das Antigen befindet sich im peripheren Blut auf DC lymphoider Abstammung, Monozyten, natürlichen Killer Lymphozyten und in geringer Menge auch auf Granulozyten. Es ist auch auf Gewebezellen zu finden.

Mouse $\gamma 1$ IgG PE und Mouse $\gamma 2a$ IgG-Antikörper: sind Antikörper, die der Spezies der spezifischen Antikörper entsprechen und zur Isotypkontrolle zur Verfügung stehen. Sie dienen als Negativkontrolle und erfassen die unerwünschte unspezifische Bindung der Antikörper.

Annexin V-FITC: Dieser Antikörper richtet sich gegen Phospholipid-Phosphatidylserine (PPS) der Zellmembran und kann an apoptotische Zellen binden. Annexin V hat eine sehr große Affinität zu PPS. Die Bindung ist jedoch kalziumabhängig, so dass bei allen Apoptosemessungen die Probe mit Kalziumbindungspuffer versetzt werden musste.

7-AAD: Der Antikörper richtet sich gegen DNA. Er hat eine hohe Bindungskonstante und wird durch intakte Zellen nicht aufgenommen.

DC lassen sich durch Lineage Cocktail nicht anfärben, binden jedoch HLA-DR Antikörper. Durch die Konstellation Lineage negativ und gleichzeitig HLA-DR positiv können DC von anderen Zellen unterschieden werden. Die Subpopulationen sind wie anfangs beschrieben entweder für CD 11c Antikörper oder für CD123 Antikörper positiv.

Zur Zellfärbung wurden die spezifischen Antikörper (siehe Tabelle 7) mit geeichten Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg) in Analyseröhrchen pipettiert und mit 100 µl Natrium-Heparin Blut der Patientin für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die vollständige Färbung der Blutprobe mit Antikörpern zu erreichen, wurden Blutprobe und Antikörper mit dem Vortexmischer gemischt. Nach der Färbung der Blutprobe mit Antikörpern wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 2 ml Ortho-Lyse (siehe Rezept Ortho-Lyse) und Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Die Ortho-Lyse Lösung ist ein besonders schonendes Verfahren zur Lyse erythrozytärer Membranen. Sie verursacht kaum Schäden an anderen Zellen und induziert bei Leukozyten keine Apoptose.

Die Proben wurden nach der Lyse bei 800 Umdrehungen pro Minute (auch rpm: rounds per minute) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand des entstandenen Pellets wurde vorsichtig abgeschüttet und anschließend der Bodensatz mit 2 ml eiskaltem, angesäuerten Phosphate-buffered saline (PBS, siehe Rezept PBS+Azide), resuspendiert. Danach wurden die Proben erneut bei 800 rpm für 8 Minuten zentrifugiert. Vor der Analyse im Zytometer wurde bei allen Proben der Überstand abgeschüttet und das durch die Zentrifugation entstandene Pellet durch heftiges Schütteln gelöst.

Bei der Probe 1. zur Isotypkontrolle sowie bei der 2. doppelgefärbten Probe erfolgte nach der Zentrifugation eine Suspension mit 200 µl PBS + Azide. Allen übrigen Proben wurde 300 µl eines Kalziumbindungspuffers in 1:10 Verdünnung zugeführt.

Im Anschluss erfolgte die Analyse der Proben, so dass keine längere Ruhezeit entstand und keine Fixation der Zellen benötigt wurde.

Alle Proben wurden auf Eis gelagert und vor der Analyse im Zytometer erneut durchmischt.

Nach der Analyse der Proben 1 - 4 wurden jeweils 200 µl der CD123+ Probe und der 11c+ Probe zur Apoptoseanalyse in ein neues Analyseröhrchen überführt. Die Apoptosemarker 7AAD (5 µl) und Annexin-FITC (1 µl) sowie 200 µl Kalziumbindungspuffer wurden zugegeben und nach Mischen für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Apoptoserate geschah ohne Verzögerung innerhalb der nächsten 15 Minuten.

Ortho-Lyse Rezept:

8,26 g Ammoniumchlorid (0,155 mol/l),
1,00 g Kaliumbicarbonat (0,01 mol/l),
0,037 g Tetrasodium EDTA (0,089 mmol/l),
Aqua dest ad 1000 ml

PBS + Azide Rezept:

1,0 g Rinderalbumin,
500 mg Natriumazid (7,691 mmol/l),
Hanks PBS ad 1000 ml (Hanks Phosphate-buffered saline der Firma Gibco, Karlsruhe)

Kalziumbindungspuffer bezogen durch BD Biosciences, Heidelberg.

3.2.2 Färbung der T-Zell Subpopulationen

Zur Färbung der T-Zell Subpopulationen wurde analog zur Färbung der DC verfahren. Mit Hilfe der Färbung sollten T-Zellen, ihre Subpopulationen:

- $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten
 - $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten
- sowie Apoptosemarker bestimmt werden.

Es wurden drei Proben angesetzt:

1. Isotypkontrolle
- 2 $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten
3. $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

Tabelle 8: *Antikörper T-Zell Färbung.*

Probe	Antikörper/ Menge in μl	Konjugierter Farbstoff	Klone	Isotyp
1. Isotypkontrolle	Anti-CD3 2,5 μ l	APC	SK 7	IgG1
2. $\alpha\beta$-T-Zell Färbung	Anti-CD3 2,5 μ l	APC	SK 7	IgG1
	Anti-TZR $\alpha\beta$ 5 μ l	PE	WT31	IgG1
3. $\gamma\delta$-T-Zell Färbung	Anti-CD3 2,5 μ l	APC	SK 7	IgG1
	Anti-TZR $\gamma\delta$ 5 μ l	PE	11F2	IgG1
1.1 Isotypkontrolle Apoptosemessung	Annexin 1 μ l,	FITC		
	7AAD 5 μ l			
2.1 $\alpha\beta$-T-Zell Färbung Apoptosemessung	Annexin 1 μ l,	FITC	s.o.	s.o.
	7AAD 5 μ l			
3.1 $\gamma\delta$-T-Zell Färbung Apoptosemessung	Annexin 1 μ l,	FITC	s.o.	s.o.
	7AAD 5 μ l			

Alle Antikörper wurden von BD Biosciences, Heidelberg bezogen.

Die verwendeten Antikörper besitzen folgende Bindungseigenschaften:

Anti-TZR- $\alpha\beta$ bindet an den $\alpha\beta$ -TZR auf CD3+ Lymphozyten. Der Rezeptor besteht aus zwei Ketten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Der Rezeptor wird auch auf Thymozyten gefunden.

Anti-TZR- $\gamma\delta$ markiert einen TZR, der mit dem CD3 Antigen assoziiert ist. Es handelt sich um einen, aus zwei Glykoproteinketten bestehenden Rezeptor, der auf 1 - 9 % der humanen T-Zellen im peripheren Blut exprimiert wird. Außerdem wird der $\gamma\delta$ -TZR auf Thymozyten exprimiert.

Anti-CD3: der Antikörper reagiert mit der ϵ -Kette des CD3 TZR Komplexes. Der Komplex besteht insgesamt aus sechs Proteinen und ist entweder mit einem $\alpha\beta$ - oder einem $\gamma\delta$ -Rezeptor assoziiert. Der CD3 Rezeptor befindet sich auch auf Thymozyten und bestimmten Zellen des Kleinhirns.

Der CD3 Rezeptor befindet sich im Blut ausschließlich auf T-Lymphozyten. Durch seine Markierung mit Antikörpern kann die TZ Population eindeutig identifiziert werden. Durch die Apoptosefärbung werden diejenigen Zellen detektiert, die sich im Anfangsstadium der Apoptose befinden.

Zur Färbung der Zellen wurden 100 µl der Natrium-Heparin Blutprobe in drei verschiedene Probenröhrchen überführt und mit den entsprechenden Antikörpern (siehe *Tabelle 8*) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurde den Proben 2 ml Ortho-Lyse Lösung zugegeben und so die erythrozytären Membranen der Blutprobe aufgelöst. Es folgte wie bei den DC eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 800 rpm und eine Waschung mit 2 ml eiskaltem PBS+Azide. Nach erneuter Zentrifugation für 8 Minuten bei 800 rpm wurde der Überstand abgossen, die entstandenen Pellets gelöst und die Probe mit 300 µl Kalzium Bindungspuffer (1:10 Verdünnung) suspendiert.

Im Anschluss begann die Analyse der Proben. Wie oben beschrieben wurden die Proben gekühlt und im Durchflusszytometer gemessen.

Nach der Analyse der Proben wurden jeweils 200 µl Material der Proben 1 bis 3 zur Apoptoseanalyse in je ein neues Analyseröhrchen überführt. Die Apoptosemarker 7AAD (5 µl) und Annexin-FITC (1 µl) sowie 200 µl Kalzium-Bindungspuffer wurden den Proben zugegeben. Proben und Apoptoseantikörper wurden gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Unmittelbar anschließend wurde die Apoptoserate im Zytometer gemessen.

3.2.3 Probenanalyse und „gating“

Bei allen in der Studie durchgeführten Messungen, wurde stets die Vier-Farben-Durchflusszytometrie angewendet. Das bedeutet, dass das Zytometer bei jeder Messung vier verschiedene Fluoreszenzantikörper in getrennten Kanälen detektiert. Das Zytometer FACS Calibur™ (Becton Dickinson, USA) war mit einem 488 nm Argon Laser ausgerüstet. Je Probe wurden 75.000 Ereignisse gemessen und anschließend mit dem Cell Quest™ Programm von BD Biosciences graphisch dargestellt und analysiert. Durch wiederholte Messungen desselben Spenders wurde sichergestellt, dass die Messabweichung unter 10 % lag.

Um aus allen detektierten Ereignissen die gesuchten Zellen herauszustellen, wurden nach einer bestimmten Strategie Fenster gesetzt.

- a) Zur Messung der DC wurden durch die charakteristische Lichtstreuung Granulozyten und nekrotische Zellen ausgeschlossen.
- b) Aus den verbleibenden wurden Zellen die DR+/LIN- Zellen ausgewählt.

c) Anschließend wurden CD11c+ bzw. CD123+ Zellen abgeleitet, welche gleichzeitig LIN-/DR+ waren. Dies wurde in getrennten Proben durchgeführt.

d) Nach Zugabe des Apoptosemarkers 7AAD und Annexin APC wurde durch das Setzen eines zusätzlichen Fensters die Apoptoserate der DC Subtypen 11c+/Annexin und 7AAD+ und 123+/Annexin und 7AAD+ betrachtet.

Zur Analyse der T-Zell Subtypen wurde ähnlich verfahren. Es wurden durch Forward- und Side Scatter alle Lymphozyten von anderen Zellen unterschieden (siehe Abbildung 1). Durch eine CD3+ Region konnte je nach Probenansatz weiter in CD3+ und $\alpha\beta$ + oder in CD3+ und $\gamma\delta$ + unterteilt werden (siehe Abbildung 2).

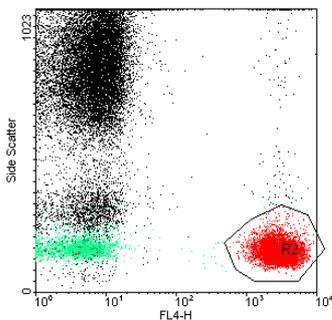


Abbildung 1 Zeigt im umrandeten Feld die CD3+ Zellen.

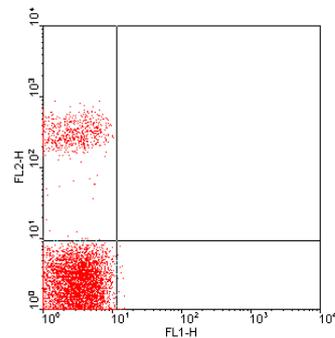


Abbildung 2 Zeigt links oben die Gruppe der $\alpha\beta$ + CD3+ Zellen.

Nach Zugabe der Apoptosemarker Annexin FITC und 7AAD wurde auch hier weiter in α/β + Annexin+/7AAD+ und γ/δ + Annexin+/7AAD+ unterteilt.

Zur Reinigung des Zytometers wurde der vom Hersteller empfohlene Reinigungsvorgang durchgeführt indem zwei Reinigungsdetergenzien durch das System gesaugt wurden: Clean- und Rinse-Lösung beide von Becton Dickinson, Heidelberg.

3.2.4 TruCount™ Messung und Reagenzien

Mit Hilfe der TruCount™ (Becton Dickinson, Heidelberg) Messung wurden folgende Zellen differenziert:

- B-Zellen CD19+
- Natürliche Killerzellen CD16+/CD56+

- Natürliche Killer T-Zellen CD3+/CD16+/CD56+
- Monozyten
- T-Zellen CD3+ und Untergruppen
- Suppressor/ Zytotoxische T-Zellen CD8+ mit Aktivationsmarker DR
- T-Helferzellen CD4+ mit Aktivationsmarker DR

Die TrueCount™ Messung wurde ebenfalls mit dem FACS Calibur™ von Becton Dickinson, mit Vier-Farben-Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Messung diente außerdem der Bestimmung der absoluten Leukozytenzahl im Probenblut.

Am Boden des BD TruCount™ Röhrchens befindet sich ein kleines Metallnetz und unter diesem das TrueCount™ Sediment.

Für die TruCount™ Messung wurden zwei Blutproben mit unterschiedlichen Antikörpern gefärbt und gemessen. Die Blutproben wurden unter aseptischen Bedingungen in Natrium-Heparin Röhrchen entnommen und vor der Färbung nicht länger als vier Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Mit der TruCount™ Technik wurden zwei Tests durchgeführt: TriTest™ und BD MultiTest™ beide von Becton Dickinson.

In der ersten Probe wurden im TriTest™ TZ, zytotoxische TZ, T-Helfer Zellen sowie die Aktivität der Zellen mittels HLA-DR Expression differenziert. Mit dem MultiTest™ konnten B-Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen differenziert werden.

3.2.5 BD TriTest™ CD4/CD8/CD3 und HLA-DR II

Für die TriTest™ Analyse wurden auf den Boden des TruCount™ Röhrchens, direkt oberhalb des Metallnetzes, 10 µl TriTEST Antikörper (BD), 5 µl HLA-DR II Antikörper und 50 µl der antikoagulierten Natrium-Heparin Blutprobe pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Sediment unter dem Metallnetz am Boden des Röhrchens nicht berührt wurde, das pipettierte Blutvolumen exakt 50 µl betrug und vollständig mit dem Antikörperreagenz gefärbt werden konnte.

Antikörper und Blutprobe wurden gut gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe von 500 µl Lyse-Lösung erneut gemischt, für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dadurch die Erythrozytenmembranen lysiert.

Die Lyselösung bestand aus 8,26 g Ammoniumchlorid (0,155 mol/l); 0,019 g Natrium-EDTA (0,0456 mmol/l); 1,0 g Kalium-Bicarbonat (0,01 mol/l) und Aqua dest ad 1000 ml.

Ein Waschen der Probe war bei der Messung nicht nötig. Die Proben konnten direkt im Durchflusszytometer analysiert werden. Vor der Messung wurde die Probe erneut durchmischt.

Die verwendeten Antikörper sind im folgenden genau beschrieben.

Tabelle 9: *Verwendete Antikörper beim TruCount™.*

Probe	Antikörper	Konjugierter Farbstoff	Klone	Isotyp
BD TriTest™ CD4/	CD3	PerCP	SK7	IgG1
CD8/CD3 und ein-	CD4	FITC	SK3	IgG1
	CD8	PE	SK1	IgG1
Farben Reagenz	HLA-DR	APC	L243	IgG2a
HLA-DR II				

Anti-CD3: färbt T-Lymphozyten durch Bindung an der Epsilon-Kette des CD3 T-Zell-Antigenrezeptor Komplexes.

Anti-CD4: der Antikörper erkennt T-Helfer-Lymphozyten. Das Antigen, an das der Antikörper bindet interagiert mit MHC der Klasse II, welches sich auch auf Makrophagen und Monozyten befindet.

Anti-CD8: bindet bei T-Suppressor/Zytotoxischen Lymphozyten an die α -Untereinheit des CD8 Komplexes. CD4-, CD3- und CD8-Antikörper bestehen aus schweren Ketten vom Typ γ 1 und aus leichten Ketten vom Typ κ der Maus.

Anti-HLA-DR: ist gegen Epitope menschlicher MHC II Komplexe gerichtet. Bei der Färbung kommt es zu keiner Kreuzreaktion mit HLA-DQ oder DP Epitopen. Das transmembrane Glykoprotein HLA-DR befindet sich im Blut auf B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, aktivierten TZ, aktivierten NK-Lymphozyten und menschlichen Stammzellen. Es ist auch auf Gewebezellen exprimiert. Durch diesen Antikörper kann die Aktivität der TZ festgestellt werden, denn MHC Komplexe werden von Zellen, die Antigenen prozessieren verstärkt exprimiert.

3.2.6 BD MultiTest™ CD3/ CD16/CD56/CD45/CD19

Mit der zweiten Probe der TruCount™ Messung wurde bei der Zellfärbung und der Erythrozytenlyse analog verfahren. Der Blutprobe wurden nur bei der Färbung andere Antikörper hinzugegeben. Die verwendeten Antikörper konnten als Kombinationspräparat von BD MultiTest™ bezogen werden. Das Kombinationspräparat enthält Antikörper gegen CD3/CD16/CD56/CD45/CD19. Durch die Färbung konnten mit vier-Farben Durchflusszytometrie B-Zellen, NKZ und NKT-Zellen differenziert werden. Die Antikörper sind im Folgenden genauer beschrieben.

Tabelle 10: *BD MultiTest™ CD3/CD16/CD56/CD45/CD19.*

Probe	Antikörper	Konjugierter Farbstoff	Klon	Isotyp
BD MultiTest™ CD3/CD16/ CD56/ CD45/CD19	CD3	PE	SK7	IgG1
	CD16	PE	B73.1	IgG1
	CD19	APC	SJ25C1	IgG1
	CD45	FITC	2D1	IgG1
	CD56	PerCP	NCAM 16.2	IgG2b

Anti-CD16: Der Antikörper erkennt den IgG Fc Rezeptor III auf menschlichen NK-Lymphozyten. CD16 wird auch auf neutrophilen Granulozyten exprimiert. Der verwendete Klon bindet allerdings viel schwächer als die anderen zur Verfügung stehenden Klone an neutrophile Granulozyten.

Anti-CD19: reagiert mit B-Zellen. Der Marker ist auf allen Reifestadien mit Ausnahme der entdifferenzierten Plasmazellen der B-Zellen vorhanden. CD19 reagiert nicht mit Monozyten, aktivierten TZ oder Granulozyten.

Anti-CD45: wird auf Leukozyten exprimiert und spielt eine Rolle in der Signaltransduktion indem es Signale anderer Oberflächenmoleküle modifiziert.

Anti-CD 56: wurde zur Markierung aktivierter und ruhender NK-Lymphozyten eingesetzt. Der Antikörper richtet sich gegen ein Molekül, das der Zelladhäsion dient.

3.2.7 Analyse mit TruCount Tubes

Durch die Lyselösung wurden aus dem TruCount™ Sediment eine bekannt Zahl fluoreszierender Mikropartikel freigesetzt. Diese Mikropartikel werden während der Messung

vom Zytometer detektiert und lassen durch Vergleich mit den Zellereignissen die Berechnung der absoluten Anzahl (Zellen/ μl) der positiven Zellen in der Probe zu. Für die manuelle Datenanalyse wurde das Programm CellQuest™ verwendet. Mit diesem Programm wurde die Anzahl der positiven Zellereignisse durch die Anzahl der Mikropartikelereignisse dividiert und anschließend mit der Konzentration der Mikropartikel im Sediment multipliziert. So konnte die absolute Zahl der sich in der Blutprobe befindlichen Zellen errechnet werden. Wichtig dabei ist, dass die genaue Konzentration der Mikropartikel bekannt ist. Jede Charge der TruCount Tubes™ enthält die gleiche Anzahl dieser Partikel. Daher wurde während eines Tests dieselbe Charge verwendet.

IV. Analyse und Statistik

Im Mittelpunkt der Arbeit stand der deskriptive Vergleich der immunologischen Subpopulationen der unterschiedlichen Patientengruppen. Um signifikante Unterschiede darstellen zu können wurde als geeignetes Testverfahren der Students t-Test für ungepaarte Parameter verwendet. Aus den durchflusszytometrischen Daten wurden hierfür der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet und miteinander verglichen. Zu diesem Zweck wurde das Statistikprogramm Instat (Innotech Software GmbH, Deutschland) verwendet. Da der Student t-Test für ungepaarte Parameter sowohl Gaussche Normalverteilung als auch nicht signifikant unterschiedliche Standardabweichungen voraussetzt, wurde bei signifikant abweichenden Standardabweichungen der Student t-Test für inhomogene Varianzen nach Welch angewendet. Durch die Korrektur nach Welch konnten die Daten transformiert werden, so dass die Signifikanzanalyse mittels Student t-Test zulässig war.

Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ galt der betreffende Wert als signifikant verändert.

V. Ergebnisse

Für die statistische Auswertung der Analyseergebnisse wurden aus jeweils zwei Probandinnengruppen sieben Vergleichspaare gebildet und auf statistisch signifikante Unterschiede überprüft.

Die Vergleichspaare wurden nach medizinisch begründbaren Gesichtspunkten zusammengestellt. Auf diese Weise konnte auf die zuerst durchgeführte one-way ANOVA Varianzanalyse zugunsten einer überschaubareren Darstellungsweise verzichtet werden. Es ergaben sich folgende Vergleichsgruppen:

1. Gesunde, nicht schwangere Frauen wurden mit Diabetikerinnen verglichen, um den Einfluss des T1D auf das Immunsystem zu dokumentieren.
 2. Gesunde, nicht schwangere Frauen wurden mit schwangeren Frauen verglichen, um schwangerschaftsbedingte Veränderungen darzustellen.
 3. SD wurden mit nicht schwangeren Diabetikerinnen verglichen. So konnten Veränderungen beobachtet werden, die durch das Zusammentreffen beider Faktoren entstanden sein konnten.
 4. Schwangere wurden mit GDMI verglichen um zu überprüfen, welche immunologische Rolle der GDM im Rahmen einer Schwangerschaft einnimmt.
 5. Die immunologischen Veränderungen der Schwangeren wurden des Weiteren mit denen bei SD verglichen. So konnten Unterschiede zur Gruppe 4. (Schwangere versus GDMI) dargestellt werden.
 6. Bei den letzten zwei Gruppen wurden die Werte der GDMI sowie der SD zusammengefasst und mit den Schwangeren, beziehungsweise mit den
 7. Diabetikerinnen verglichen. Diese Paarbildung erschien sinnvoll, da so die Fallzahl der schwangeren Patientinnen mit Glukosestoffwechselstörung erhöht werden konnte.
- Die zusammengefasste Gruppe aus SD und GDMI wird durch SGD (schwangerschaftsbedingte Diabetikerinnen und Gestationsdiabetikerinnen) abgekürzt.

Da die untersuchten Zellpopulationen durch ihre zytologischen Marker weiter in Untergruppen differenziert wurden, sind unterschiedliche Bezugsgrößen zu beachten: die Angaben der CD3+, CD19+, NKT-Zellen und NK-Zellen bezieht sich auf die Gesamtzahl der Lymphozyten. Die CD4+ und CD8+ Zellen, sowie die $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -TZ beziehen sich auf die

Gesamtzahl der CD3+ Zellen. Da die untersuchten T-Zelluntergruppen entweder $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ -Korezeptoren tragen, wurde bei der Analyse nur die kleinere $\gamma\delta$ -Gruppe berücksichtigt. Als DC werden alle Lin- und DR+ Zellen definiert. Diese Population wird wiederum in die Untergruppen CD11c+ und CD123+ gegliedert, welche die myeloide und die lymphatische Reihe der DC darstellen.

Tabelle 11: *Bezugszellpopulationen der jeweiligen Zelluntergruppe.*

Aus der Lymphozyten Population werden CD3, CD19, NKT- und NK-Zellen differenziert
Die CD3+Lymphozyten werden in CD4+ oder CD8+ Zellen differenziert
Außerdem werden CD3+ Lymphozyten in $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ -T-Zellpopulationen gegliedert
DC werden in CD11c+ oder CD123+ Subpopulationen unterteilt

5.1 Ergebnisse im Überblick

Um vorab einen Überblick über die untersuchten immunologischen Zellen und ihre Verteilung zu geben, kann in der Tabelle 12 Mittelwert, Standardabweichung und Probandenanzahl der jeweiligen Zellpopulation und der Probandengruppe abgelesen werden.

Der obere Wert bezeichnet den Mittelwert, der mittlere die Standardabweichung und der untere Wert die Probandenanzahl.

Tabelle 12: *Ergebnisse im Überblick. Relativer (prozentualer) Anteil der Zellen im peripher venösen Blut der Patientinnen.*

Zellpopulation	N	SS	T1D	GDMI	SD	SDG
T-Zellen CD3+	75,875 ±1,216 n=24	75,137 ±1,313 n=29	76,04 ±1,439 n=25	74,190 ±1,465 n=21	80,050 ±1,07 n=20	77,049 ±1,014 n=41
T-Zellen CD4+	47,625 ±1,248 n=24	47,62 ±1,352 n=29	48,28 ±1,512 n=25	43,857 ±1,411 n=21	48,28 ±1,516 n=25	46,634 ±1,116 n=41
T-Zellen CD8+	24,833 ±1,108 n=24	24,759 ±1,350 n=29	25,875 ±1,254 n=24	26,238 ±1,332 n=21	27,0 ±1,194 n=20	46,634 ±1,116 n=41
γδ-T-Zellen	6,416 ±0,855 n=24	3,896 ±0,02 n=29	3,920 ±0,341 n=25	6,809 ±1,086 n=21	3,470 ±0,022 n=17	5,316 ±0,696 n=38
γδ-T-Zellen Apoptose %	33,167 ±3,293 n=24	22,896 ±2,680 n=29	17,160 ±2,997 n=25	32,451 ±4,267 n=20	18,0 ±3,368 n=15	26,2571 ±3,053 n=35
B-Zellen CD19+	11,667 ±0,735 n=24	11,621 ±0,792 n=29	11,84 ±0,881 n=25	12,143 ±0,874 n=21	11,2 ±0,694 n=20	11,683 ±0,559 n=41
NK-Zellen	9,75 ±0,865 n=24	11,379 ±0,914 n=29	11,0 ±0,997 n=25	11,095 ±1,121 n=21	7,7 ±0,744 n=20	9,439 ±0,773 n=41
NKT-Zellen	3,875 ±0,515 n=24	3,483 ±0,349 n=29	3,52 ±0,595 n=25	4,762 ±0,552 n=21	5,7 ±0,744 n=20	5,219 ±0,468 n=41
DC	1,576 ±0,122 n=24	1,173 ±0,072 n=25	1,210 ±0,079 n=25	1,192 ±0,069 n=18	1,034 ±0,071 n=15	1,120 ±0,057 n=33
DC Apoptose %	38,521 ±3,567 n=24	39,006 ±3,912 n=24	22,166 ±3,329 n=25	33,909 ±4,991 n=18	32,049 ±2,991 n=15	33,064 ±3,004 n=33
DC CD11c+	23,535 ±2,114 n=24	19,729 ±1,45 n=25	25,722 ±2,122 n=25	18,673 ±1,6 n=18	20,386 ±1,6 n=15	19,452 ±0,995 n=33
DC CD11c+ Apoptose %	56,511 ±5,295 n=24	54,379 ±4,507 n=24	28,234 ±4,964 n=25	53,617 ±7,86 n=15	48,086 ±6,457 n=15	50,852 ±5,024 n=30
DC CD123+	25,390 ±1,726 n=24	18,909 ±1,54 n=24	22,109 ±1,466 n=25	20,034 ±1,568 n=18	22,378 ±1,591 n=15	21,099 ±1,122 n=33
DC CD123+ Apoptose %	55,766 ±5,218 n=24	54,203 ±4,984 n=24	30,876 ±4,56 n=25	53,826 ±7,247 n=18	49,331 ±4,954 n=15	51,782 ±4,5 n=33

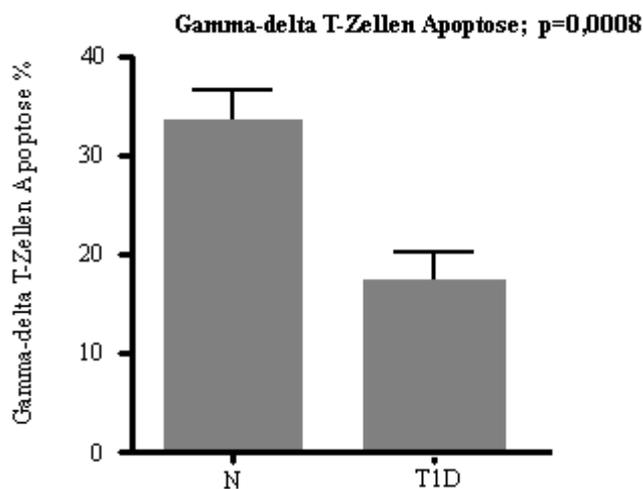
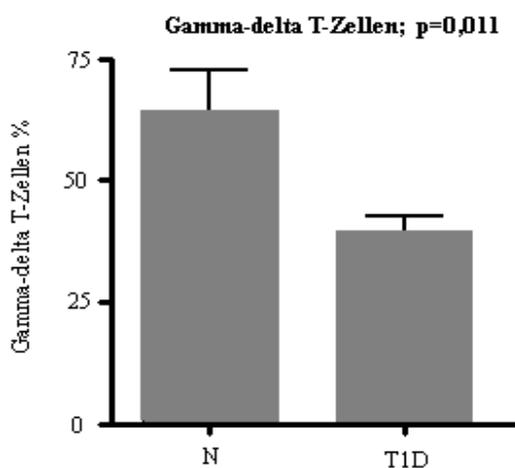
Oberster Wert: Mittelwert in %; Mitte: Standard error of mean; Unten: Anzahl Patientinnen

5.2 Ergebnisse der Patientinnengruppen

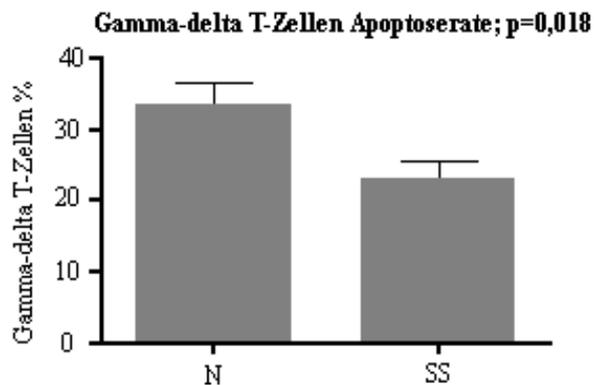
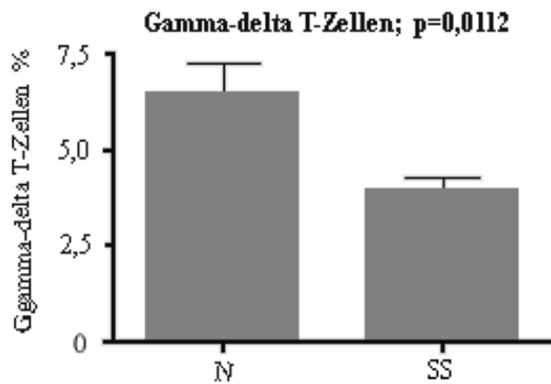
I. Normalkontrolle

Im Vergleich mit den verschiedenen Untersuchungsgruppen fanden sich bei den Normalkontrollen (N) folgende signifikante Veränderungen.

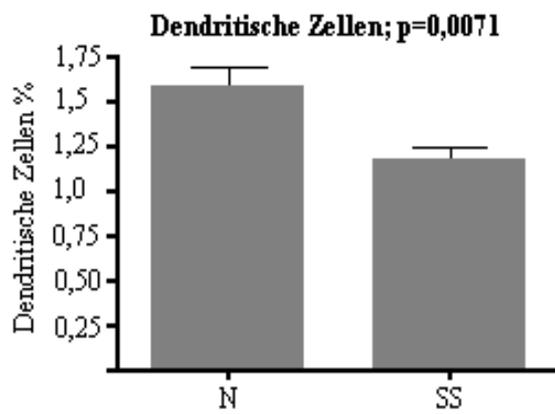
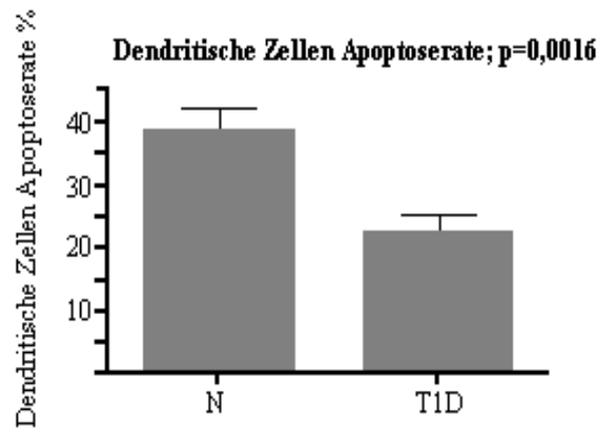
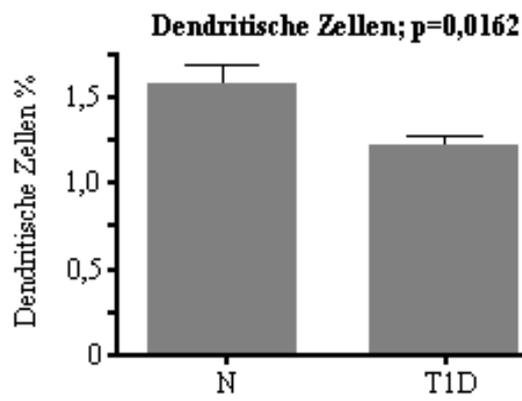
- 1., 2. Der Mittelwert der $\gamma\delta$ -TZ war bei den N mit $p= 0,011$ gegenüber den T1D signifikant erhöht. Der Mittelwert der Apoptoserate der $\gamma\delta$ -TZ war bei den N gegenüber den T1D mit $p=0,0008$ hochsignifikant erhöht.



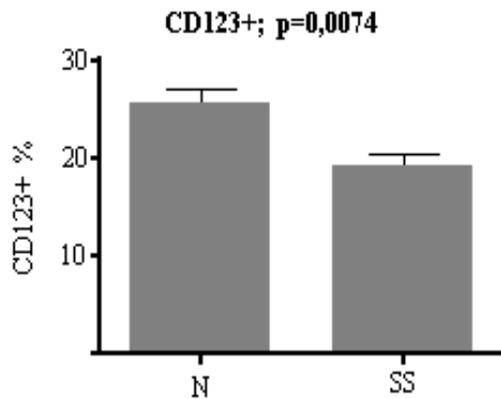
3., 4. Diese Zellpopulation zeigt auch bei den N gegenüber den Schwangeren (SS) eine signifikante Erhöhung mit $p=0,0112$. Die Apoptoserate der $\gamma\delta$ -TZ (N) war im Vergleich zu den SS mit $p=0,018$ signifikant erhöht.



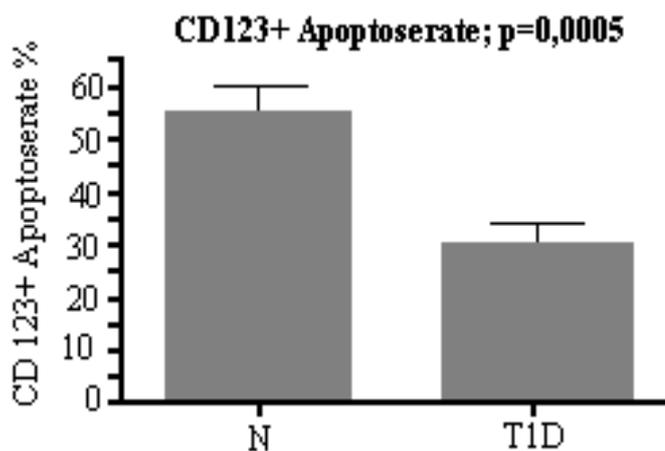
5., 6., 7. Der Mittelwert der DC fand sich bei den N im Vergleich zu den T1D signifikant erhöht ($p=0,0162$). Das Gleiche galt für den Mittelwert der Apoptoserate der DC war bei den N gegenüber den T1D mit $p=0,0016$ signifikant erhöht. Der Mittelwert der DC der N fand sich im Vergleich zu den SS mit $p=0,0071$ ebenfalls hochsignifikant erhöht.



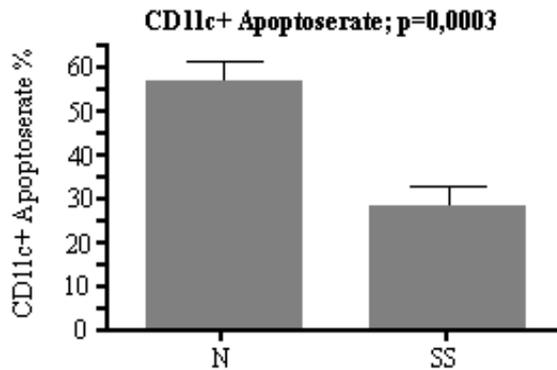
8. Bei der Analyse der spezifischen Untergruppen der CD11c+ und CD123+ DC zeigte sich der Mittelwert der CD123+ Untergruppe bei den N im Vergleich zu den SS mit $p=0,0074$ signifikant erhöht.



9. Der Mittelwert der Apoptoserate der CD 123+ Zellen fand sich bei den N im Vergleich zu den T1D mit $p=0,0005$ hochsignifikant erhöht.



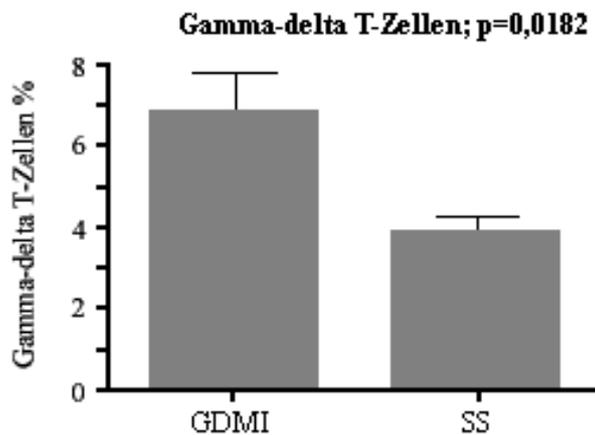
10. Die Apoptoserate der CD11c positiven DC zeigte im Mittelwert bei den N im Vergleich zu den SS eine extrem signifikante Erhöhung ($p=0,0003$).



II. Schwangere

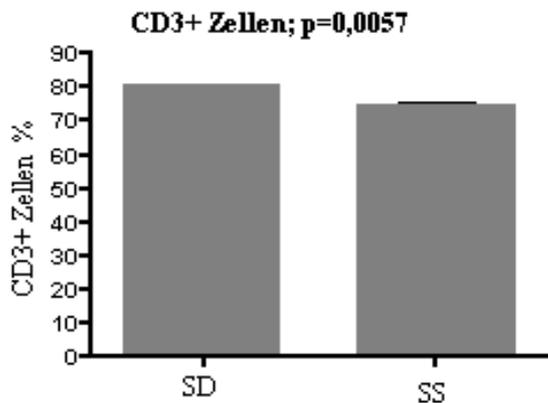
In der Gruppe der SS fanden sich folgende Ergebnisse:

1. Der Mittelwert der $\gamma\delta$ -TZ fand sich, verglichen mit den GDMI, signifikant vermindert $p=0,0182$. Die Apoptoserate in der Vergleichsgruppe zeigte sich bei den SS vermindert, verfehlte jedoch knapp das Signifikanzniveau ($p=0,0518$).



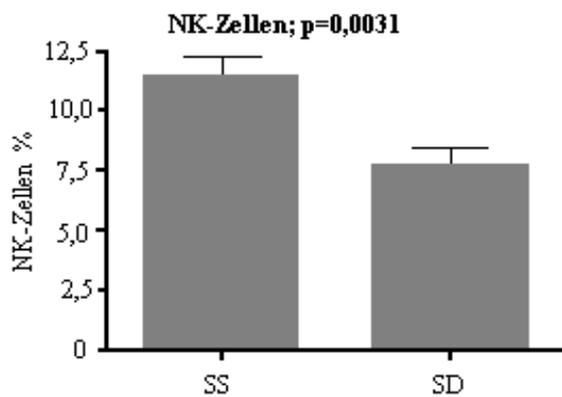
2.,3. Wie unter I. 3. und 4. beschrieben, fanden sich bei den SS die $\gamma\delta$ -TZ und ihre Apoptoserate Vergleich zu den N signifikant vermindert ($p=0,0112$) und ($p=0,018$).

4. In der Population der CD3+ Zellen fand sich eine hochsignifikante Verminderung der Zellen bei den SS im Vergleich zu den SD ($p=0,0057$).

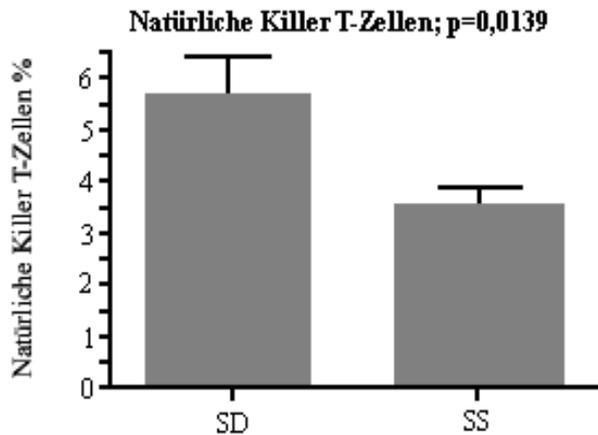


5. Der Mittelwert der CD4+ T-Helferzellen fand sich bei den SS im Vergleich zu den GDMI erhöht, konnte allerdings kein Signifikanzniveau erreichen ($p=0,065$).

6., 7. Der Mittelwert der NK-Zellen zeigte bei den SS im Vergleich zu den SD eine hochsignifikante Erhöhung ($p=0,0031$). Im Vergleich zu der zusammengefassten Gruppe aus GDMI und SD konnte jedoch kein Signifikanzniveau erreicht werden ($p=0,0969$).



8., 9., 10. Der Mittelwert der NKT-Zellen fand sich bei den SS im Vergleich zu den SD signifikant vermindert ($p=0,0139$). Diese Verminderung war ebenfalls signifikant in Bezug auf die GDMI ($p=0,0456$, siehe V.3.) und hochsignifikant in Bezug auf die zusammengefasste Gruppe aus GDMI und SD mit ($p=0,0041$), siehe IV.8.



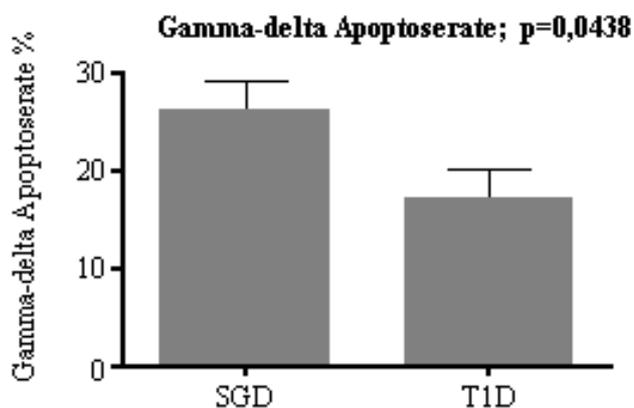
11. In der Analyse war der Mittelwert der DC in der Gruppe der SS im Vergleich mit den N hochsignifikant vermindert p=0,0071 (siehe I.7.).

12. Dabei fand sich der Mittelwert der DC123+ DC verglichen mit den N hochsignifikant vermindert p=0,0074 (siehe I.8.).

III. Diabetikerinnen

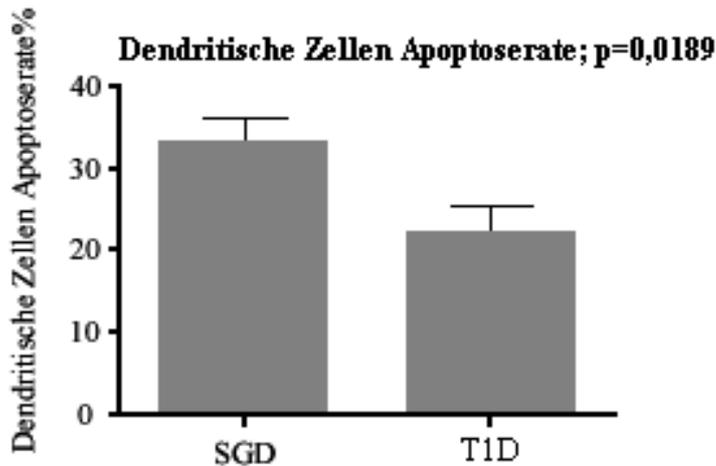
1., 2. Der Mittelwert der $\gamma\delta$ -TZ zeigte sich im Vergleich zu den N signifikant vermindert (p=0,011, siehe I.1.). In dieser Konstellation zeigte sich mit p=0,0008 eine hochsignifikant verminderte Apoptoserate (siehe I.2.).

3. Im Vergleich zur zusammengefassten Gruppe aus GDMI und SD (SGD) war die Zellzahl der apoptotischen $\gamma\delta$ -TZ signifikant vermindert (p=0,0438).

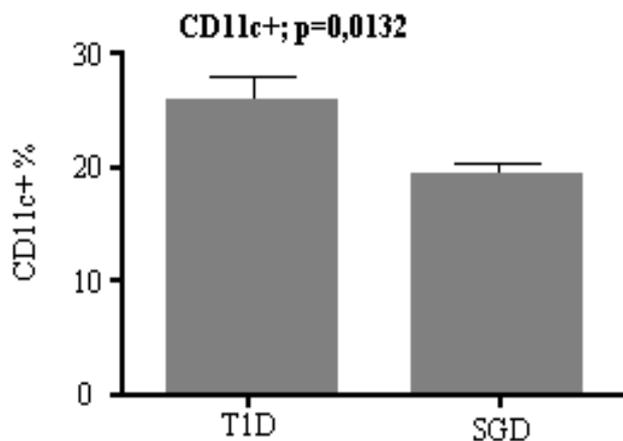


4., 5., 6. Die DC fanden sich bei den T1D verglichen mit der N signifikant vermindert $p=0,0162$ (siehe I.5.) bei ebenfalls verminderter Apoptoserate $p=0,0016$ (siehe I.6).

Der Mittelwert der Apoptoserate der DC fand sich ebenfalls im Vergleich zur zusammengefassten Gruppe aus SD und GDMI vermindert ($p=0,0189$) und erreichte bei den SD mit $p=0,0505$ nicht ganz das erforderliche Signifikanzniveau.

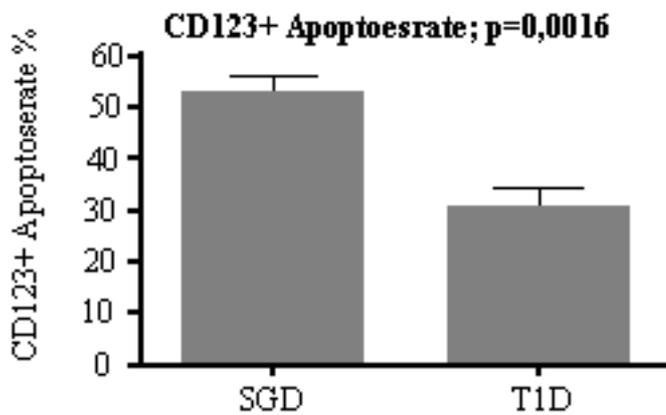
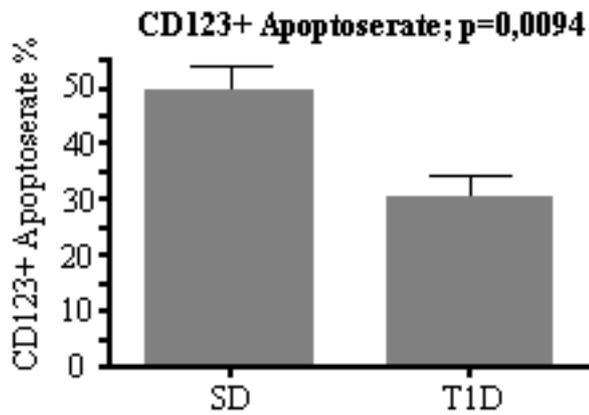


7., 8. Die Subpopulation der CD11c+ Zellen fand sich bei den T1D im Vergleich zur zusammengefassten Gruppe aus SD und GDMI mit $p=0,0132$ signifikant vermehrt. Gleichzeitig wies die Gruppe der T1D einen niedrigeren Mittelwert der Apoptoserate der CD11c+ Zellen auf ($p=0,0025$).



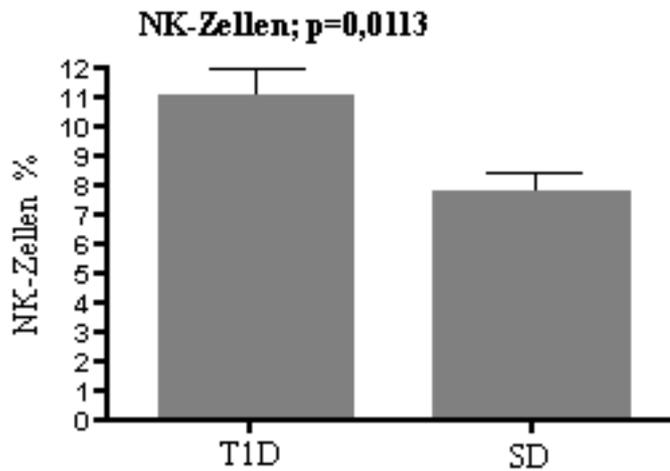
9., 10. Auch verglichen mit den N und den SD war der Mittelwert der Apoptoserate der CD11c + Zellen signifikant vermindert ($p=0,0003$ und $0,0194$, siehe I.10. und IV.1.).

11., 12., 13. Die Subpopulation der CD 123+ DC zeigte im Mittelwert bei den T1D die niedrigste Apoptoserate. Ein Signifikanzniveau konnte im Vergleich zu den N mit $p=0,0005$ (siehe I.9.), den SD ($p=0,0094$) und der zusammengefassten Gruppe aus SD und GDMI mit $p=0,0016$ erreicht werden.

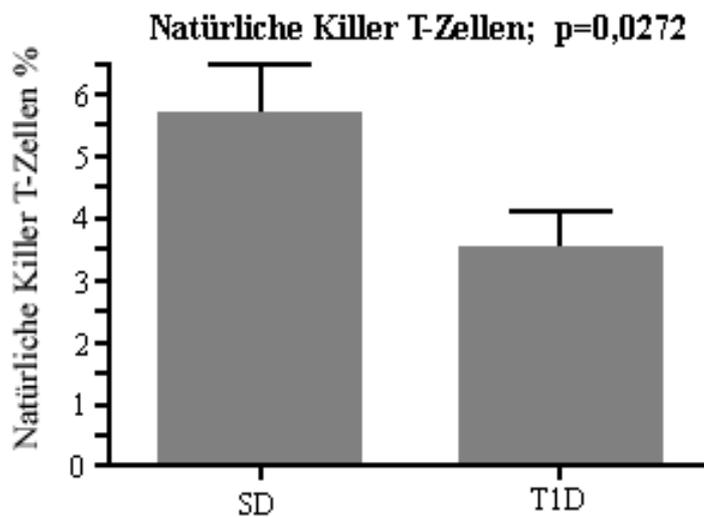


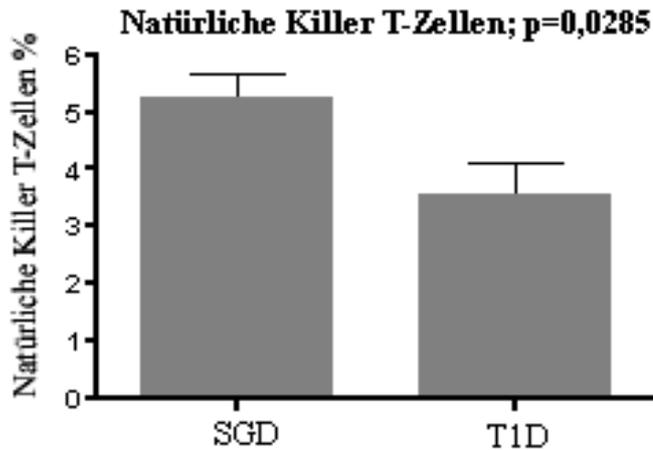
14. Die T1D zeigten verglichen mit den SD eine signifikant verminderte Anzahl CD3+ TZ $p=0,0309$ (siehe IV.4).

15. Der Mittelwert der NK-Zellen fand sich gegenüber den SD mit $p=0,0113$ signifikant vermehrt.



16., 17. Der Mittelwert der NKT-Zellen war bei den T1D sowohl gegenüber den SD mit $p=0,0272$ als auch gegenüber der zusammengefassten Gruppe aus SD und GDMI mit $p=0,0285$ signifikant vermindert.

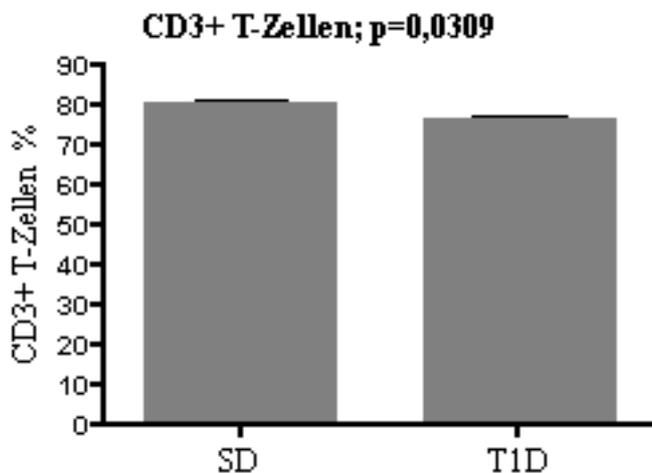




IV. Schwangere Diabetikerinnen

In der Gruppe der SD zeigten sich folgende Veränderungen:

1. Die Apoptoserate der CD11c + DC fand sich gegenüber den T1D mit $p=0,0194$ signifikant vermindert (siehe III.10.). Die Zellgruppe selbst war im Mittel ebenfalls vermindert, es wurde aber mit $p=0,0918$ kein Signifikanzniveau erreicht.
2. Auch in der Untergruppe der CD123+ DC fand sich eine hohe Apoptoserate. Diese war gegenüber den T1D mit $p=0,0094$ hochsignifikant verändert (siehe III.12.).
- 3., 4. Der Mittelwert der CD3+ T-Zellpopulation war bei den SD am höchsten. Es ergaben sich im Vergleich mit den SS und mit den T1D signifikante Unterschiede mit $p=0,0057$ (siehe II.4.) und $p=0,0309$.



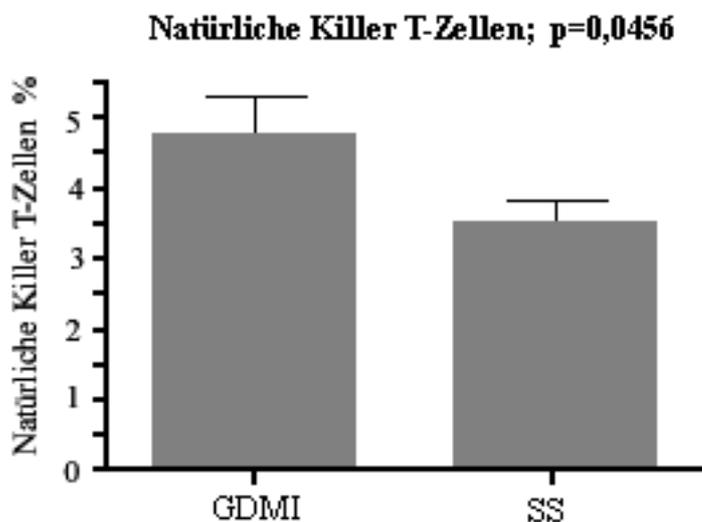
5., 6. Der Mittelwert der NK-Zellen zeigte bei den SD im Vergleich zu den T1D eine signifikante Erhöhung mit $p=0,0113$. Im Vergleich zu den SD betrug das Signifikanzniveau $p=0,0031$ (siehe auch III.15. und II. 6.).

7., 8. Die statistische Auswertung ergab in der Gruppe der NKT-Zellen eine signifikante Erhöhung des Mittelwertes der Zellpopulation im Vergleich zu den SS mit $p=0,0139$. Verglichen mit den T1D betrug der signifikante Unterschied $p=0,0272$ (siehe auch II.8. und III.16.).

V. Gestationsdiabetikerinnen

Bei den untersuchten GDMI fanden sich folgende Unterschiede:

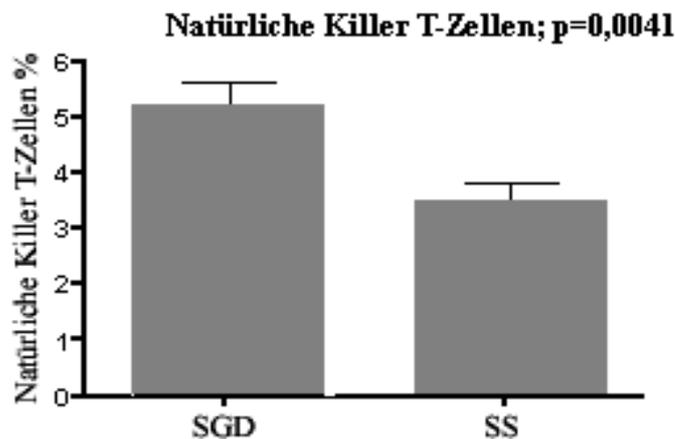
1. Der Mittelwert der $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation war mit $p=0,0182$ im Vergleich zu den SS hochsignifikant erhöht (siehe II.1). In dieser Konstellation war die gemessene Apoptoserate der $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation tendenziell erhöht ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.
2. Der Mittelwert der CD4+ T-Helferzellen zeigte ebenfalls nur eine tendenzielle Erhöhung. Das Signifikanzniveau betrug $p=0,065$.
3. Der Mittelwert der NKT-Zellen zeigte bei den GDMI verglichen mit den SS eine signifikante Erhöhung mit $p=0,0456$.



VI. Gestationsdiabetikerinnen und schwangeren Diabetikerinnen

In der zusammengefassten Gruppe der GDMI und der SD fanden sich signifikant erhöhte Mittelwerte der Apoptoserate der

1. $\gamma\delta$ -TZ gegenüber den T1D ($p=0,0438$ siehe III.3).
2. der apoptotischen DC gegenüber den T1D ($p=0,0189$, siehe III.6).
3. Die Apoptoserate der CD 123+ DC fand sich gegenüber den T1D mit $p=0,0016$ hochsignifikant erhöht (siehe III.13.).
- 4., 5. In der Population der CD11c+ DC fand sich der Mittelwert gegenüber den T1D vermindert mit einem Signifikanzniveau von $p=0,0132$ (siehe III.7.), bei gleichzeitig vermehrter Apoptoserate von $p=0,0025$ (siehe III.8.).
6. Die NK-Zellen zeigten sich gegenüber den SS tendenziell vermindert. Ein Signifikanzniveau konnte nicht erreicht werden.
- 7., 8. Der Mittelwert der NKT-Zellen fand sich gegenüber den T1D statistisch mit $p=0,0285$ (siehe III.17) und gegenüber den SS mit $p=0,0041$ (siehe II.10.) erhöht.



Bei einigen der untersuchten Zellpopulationen konnten in keiner der untersuchten Gruppen signifikante Veränderungen oder tendenzielle Veränderungen festgestellt werden. Dazu gehörten die

- CD 8+ zytotoxischen TZ
- aktivierten CD8+ TZ
- aktivierten CD4+ T-Helferzellen und
- CD 19+ B-Zellen

5.3 Statistische Auswertung

Da die statistische Aufarbeitung schwerpunktmäßig die Faktoren Schwangerschaft und Diabetes mellitus als Einflüsse auf das Immunsystem betrachtet, ist die Auswertung der durchgeführten Untersuchung in Form einer “Screeninguntersuchung” angelegt.

Dennoch werden durch die Ergebnisse klinische Bezüge ersichtlich, deren Deutung im Kontext der bisherigen wissenschaftlichen Ergebnisse die schlüssige Einordnung des Phänomens der diabetischen Schwangerschaft und des GDM zulassen und weiterführende Fragen entwickeln helfen.

5.4 Schwerpunkte

I.) Der Vergleich der N mit den T1D zeigte signifikante Veränderungen der $\gamma\delta$ -TZ sowie der DC. Bei der N waren sowohl der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen als auch deren Apoptoserate signifikant erhöht. Diese Konstellation des vermehrten Zellumsatzes durch Apoptose muss demnach durch verstärkte Proliferation der Zellpopulation kompensiert worden sein. Andernfalls wäre eine Verminderung der $\gamma\delta$ -TZ zu erwarten.

Diese Konstellation zeigte sich ebenfalls bei den N im Vergleich mit den T1D in der DC Population und ihrer Apoptoserate.

II.) Im Vergleich der N mit den SS bestand der immunmodulierende Faktor der Gravidität. Hier beobachtete man wie in der vorangegangenen Vergleichsgruppe signifikante Unterschiede im Mittelwert der $\gamma\delta$ -TZ sowie der DC. Es zeigte sich auch hier bei den N eine erhöhte $\gamma\delta$ -TZ-Population und eine erhöhte Apoptoserate. Auch die DC fanden sich bei den N statistisch erhöht. Im Vergleich der DC Untergruppen stellte sich eine signifikante Erhöhung

der CD123+ DC, aber nicht der CD11c+ DC dar. Hinsichtlich der Apoptoserate fand sich bei den DC kein signifikanter Unterschied.

III.) Vergleicht man Schwangere mit schwangeren T1D, so trifft die immunologische Sondersituation der Schwangerschaft zwar auf beide Gruppen zu, der Diabetes fügt allerdings der einen Patientinnengruppe einen weiteren potentiell immunkompromittierenden Faktor hinzu. In dieser Vergleichsgruppe waren die beobachteten Veränderungen anders gelagert als in den vorangegangenen Gruppen. Man fand NKT-, NK- sowie CD3+ T-Zellen verändert. Der Mittelwert der CD3+ TZ war bei den SS niedriger als bei den schwangeren Diabetikerinnen. Auch der Mittelwert der NKT-Zellen war bei den SS niedriger. Die Population der NK-Zellen, die in der Immunantwort schnell reagierende Abwehrzellen darstellen, waren bei den SS im Vergleich zu den diabetischen SS als einzige Population erhöht. Inwieweit die Ausbildung einer Th-1- oder Th-2 Immunantwort durch diese Zellen und damit die Beeinflussung der Schwangerschaft durch diese Zellpopulationen stattfinden kann, wird in der Diskussion vertiefend dargestellt.

IV.) In der Vergleichsgruppe SD versus T1D war die Autoimmunerkrankung Diabetes mellitus der verbindende Faktor. So ließen sich indirekt Aussagen über den hinzukommenden Faktor der Schwangerschaft treffen. In den besagten Vergleichsgruppen waren die Mittelwerte folgender Zellpopulationen verändert: NK-, NKT-, CD3+T-Zellen sowie die Apoptoserate der DC Untergruppen.

Die Mittelwerte der NKT- sowie der CD3+ T-Zellen waren bei den diabetischen Patientinnen niedriger als bei den SD. Der Mittelwert der NK-Zellen war bei den T1D gegenüber den SD erhöht. Die SD zeigten höhere Mittelwerte der Apoptoserate der CD11c+ und CD123+ DC. Der vermehrte Zellumsatz dieser Populationen geht allerdings nicht mit dem in anderen Konstellationen beobachteten Effekt einer generellen Erhöhung der DC einher, sondern es zeigte sich nur eine tendenzielle Vermehrung der DC bei den SD.

V.) In der Vergleichsgruppe der SS versus GDMI kommt ein neu zu berücksichtigender Faktor hinzu. Denn der GDM ist eine Glukosestoffwechselstörung, die nicht auf einem Typ 1 Diabetes, also einer Autoimmunerkrankung basiert. Neben dem Mittelwert der $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation und den NKT-Zellen waren erstmals die CD4+ TZ verändert. Ihr Mittelwert

zeigte sich bei den GDMI im Verhältnis zu den SS vermindert. Dabei konnte allerdings kein Signifikanzniveau erreicht werden.

Der Mittelwert der $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation und der der NKT-Zellen waren bei den GDMI erhöht.

VI.) Die letzten beiden Vergleichsgruppen betreffen die zusammengefasste Gruppe aus GDMI und schwangeren Diabetikerinnen im Vergleich mit Schwangeren und Diabetikerinnen.

Gegenüber den Schwangeren fand sich nur eine Zellpopulation signifikant verändert: die NKT-Zellen. Der Mittelwert dieser Zellpopulation war bei den SS signifikant vermindert. Die NK-Zellen waren bei den SS lediglich tendenziell vermehrt.

VII.) In der Vergleichsgruppe "GDMI und SD" gegenüber T1D zeigten sich viele signifikante Unterschiede, die auffälligerweise zu einem großen Teil den Mittelwert der Apoptoserate betrafen. Bei allen Apoptosemessungen: $\gamma\delta$ -TZ, DC, CD123+ und CD11c+ war die Apoptoserate in der zusammengefassten Gruppe gegenüber der Apoptoserate bei den T1D erhöht. Gegenüber den T1D fand sich eine im Mittelwert verminderte Population an CD11c+. Auf die Rolle der CD11c+ wird im Zusammenhang mit der T-Helfer-1 Antwort in der Diskussion eingegangen.

Weiterhin war in der beschriebenen Vergleichsgruppe eine signifikante Erhöhung des Mittelwertes der NKT-Zellen zu verzeichnen.

VI. Diskussion

Die hier vorgestellte Arbeit betrachtet in Form einer quantitativen Analyse unterschiedlicher Immunzellen des peripher venösen Blutes eine Vielzahl immunologischer Faktoren. Weiterhin werden von einigen Zellpopulationen qualitative Funktionsparameter wie die Apoptoserate überprüft.

Da zur Bestimmung dieser Parameter auf wissenschaftlich erprobte Methoden zur Zellfärbung durch standardisierte Antikörper, sowie mit der Durchflusszytometrie auf bewährte Messmethoden zurückgegriffen werden konnte, entstanden im Zusammenhang mit der Datengewinnung keine unvorhersehbaren Schwierigkeiten, was durch wiederholte Messungen derselben Probe, Isotypkontrollen und Doppelfärbungen bestätigt wurde.

6.1 Bestehende Studien

In der Literatur finden sich eine Vielzahl immunzytologischer Untersuchungen der humanen und murinen Dezidua zu unterschiedlichsten Schwangerschaftszeitpunkten.

Studien über das Auftreten immunologischer Zellen in der humanen Plazenta zeigen Unterschiede zwischen der lokalen Immunabwehr und der Immunsituation im peripheren Blut. 50-90% der decidualen Lymphozyten sind während einer Schwangerschaft NK-Zellen, allerdings nur 5-10% der peripheren Immunzellen (Koopman, L.A. et al., 2003). Dabei besteht ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem kumulierten Auftreten decidualer NK-Zellen und der Invasion des Trophoblasten. Es kommt zu einer Poolung und Reifung der decidualen NK-Zellen, die auf eine Interaktion des Trophoblasten mit den Immunzellen, sowie auf hormonelle Einflüsse zurückzuführen sind.

Obwohl die Rolle der decidualen NK-Zellen noch nicht abschließend geklärt ist, konnte gezeigt werden, dass sie durch Chemokine die Invasion des Trophoblasten regulieren können. Diese Fähigkeit zeigen periphere NK-Zellen nicht. Des Weiteren sezernieren die decidualen NK-Zellen potente Angiogenesefaktoren und haben so Einfluss auf das Wachstum der Plazenta. Eine Störung dieser Funktion kann im Rahmen einer Schwangerschaft das Risiko einer Präeklampsie steigern (Hiby, S.E., et al., 2004).

Größere immunologische Studien mit peripher venösem Blut schwangerer Frauen und nicht schwangeren Frauen mit wiederholten Aborten, deren Fokus auf $\gamma\delta$ -TZ lag, wurden von Barakonyi und Polgar 1999 publiziert. Sie fanden die $\gamma\delta$ -TZ im peripheren Blut der SS gegenüber den nicht schwangeren Frauen mit wiederholten Aborten erhöht. Lapolla et al. führten 2000 eine Studie über $\gamma\delta$ -TZ im venösen Blut von GDMI und SS durch und fanden die Anzahl der $\gamma\delta$ -TZ im venösen Blut der GDMI erhöht. 1997 veröffentlichten Watanabe M. et al. eine Studie zu T-, B- und NK-Zellveränderungen während und nach einer normalen Schwangerschaft. Dabei konnten quantitative Veränderungen der untersuchten Immunzellen noch ein Jahr nach der Entbindung nachgewiesen werden.

Besonders im Bereich der Reproduktionsmedizin findet man in der Literatur Fragestellungen, die sich im Besonderen mit dem Einfluss unterschiedlicher Immunzellen und dem Einfluss der von ihnen sezernierten Zytokinmuster auf Th-1 und Th-2 Immunantworten und deren Bedeutung für Abortinduktion und Fruchtbarkeit beschäftigen (Raghupathy, R. et al., 2001). Ein Vorteil des hier gewählten Studienaufbaus war die Möglichkeit, durch die vielen Patientengruppen Vergleichspaare mit unterschiedlichen immunologischen Konstellationen bilden zu können, und so den Einfluss der variablen Faktoren Schwangerschaft und Diabetes zu veranschaulichen. Außerdem konnte durch die große Anzahl der gleichzeitig beobachteten Immunzellen Interaktionsmöglichkeiten der Zellen untereinander aufgezeigt werden.

6.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihre Interaktionen

Eine Studie, welche die Rolle der $\gamma\delta$ -TZ bei schwangeren Frauen im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen untersucht, wurde von Szekeres-Bartho J. et al. (2001) veröffentlicht. Sie beschreibt eine vermehrte Anzahl von $\gamma\delta$ -TZ sowohl in der Dezidua als auch im peripher venösen Blut bei schwangeren Frauen. Anders als in der oben genannten Studie, stellten sich in der vorliegenden Untersuchung die $\gamma\delta$ -TZ im Blut der SS im Vergleich zu den N signifikant vermindert dar.

Mincheva-Nilsson (2003) weist in seiner Übersichtsarbeit darauf hin, dass die Rolle der von Szekeres-Bartho nachgewiesenen $\gamma\delta$ -TZ unklar bliebe, da ihr Auftreten im peripheren Blut durch das Übertreten von deciduellen $\gamma\delta$ -TZ in das Blut entstanden sein könne. Periphere und deciduale $\gamma\delta$ -TZ unterscheiden sich in ihrer Th-1 beziehungsweise Th-2 Reaktionsweise, also

auch ihrem Zytokinsekretionsmuster und der Zytotoxizität, sowie in ihrer Fähigkeit, HLA-E auf Trophoblasten zu erkennen. Die $\gamma\delta$ -TZ des peripher venösen Blutes sind in der Lage, den HLA-E Rezeptor des Trophoblasten zu erkennen, während deciduale $\gamma\delta$ -TZ dies auf Grund der unterschiedlichen Ketten ihrer Rezeptoren nicht vermögen (Barekonyi, A. et al., 2002). Konkrete Aussagen über die Th-1 oder Th-2 Reaktionsweise der $\gamma\delta$ -TZ der Normalprobandinnen können in der Studie nicht getroffen werden. Wohl aber bleibt festzuhalten, dass bei gleicher TZ-Zahl die $\gamma\delta$ -TZ bei SS gegenüber den Normalprobandinnen anteilig und in ihrer Apoptoserate vermindert sind. Die Zellen erfahren möglicherweise durch ihre geringere Apoptoserate eine verminderte Erneuerung des Zellpools. Dies könnte darauf hinweisen, dass die $\gamma\delta$ -TZ der SS in ihren zytotoxischen Immunantworten weniger aktiv an der Immunabwehr beteiligt sind als bei den Normalpatientinnen. So ist das „Herunterfahren“ der Immunabwehr bei SS zum Schutz des allogenen Föten besonders an der Grenzschicht zwischen Mutter und Kind nötig und verhindert Abstoßungsreaktionen. Immunologische Reaktionen können sich auf eine Körperregion konzentrieren. Über den Blutweg können diese lokalen Geschehen auch in der Körperperipherie als qualitative und quantitative Veränderung messbar sein.

In der Vergleichsgruppe SS mit GDMI bestätigt sich in der Studie die Vermehrung der $\gamma\delta$ -TZ bei den GDMI ($p=0,018$), wie sie 2000 von Lapolla et al. beschrieben wurde, und eine erhöhte Apoptoserate der $\gamma\delta$ -TZ der GDMI. Durch das breite Spektrum der analysierten Zellen fanden sich weiterhin die NKT-Zellen bei GDMI im Vergleich zu den SS mit einem $p=0,0456$ vermehrt. Gemeinsam ist diesen Zellpopulationen, dass sie im Rahmen der angeborenen Immunität starke zytotoxische Reaktionen vermitteln können und so in wissenschaftlichen Fragestellungen bezüglich Tumormunität, Allergie und Infektion Interesse finden.

Relevant erscheint in dieser Betrachtung, dass die Fähigkeit der NKT-Zellen zur exzessiven IL-4 Produktion (Chen Y.H. et al., 1997), die zu einer Th-2 Immunreaktion führen würde, (Yoshimoto, T. et al., 1995) durch die IL-12 Produktion der $\gamma\delta$ -TZ wieder in eine Th-1/Th-2 Balance gebracht werden kann (Kawakami, K. 2004). Bei der Betrachtung des Verhältnisses der NKT-Zellen zu den $\gamma\delta$ -TZ soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass auch eine Blockierung der Th-2 Immunreaktion durch NKT-Zellen selbst via INF- γ Sekretion möglich ist (Cui, J. et al., 1999). Durch Zytokineinfluß der NKT-Zellen kann die Apoptoserate der $\gamma\delta$ -TZ verstärkt werden. Dieser Mechanismus könnte erklären, weshalb bei GDMI sowohl eine

erhöhte Anzahl von NKT-Zellen als auch eine verstärkte Apoptoserate der $\gamma\delta$ -TZ beobachtet wird.

Mit der gleichzeitigen Veränderung der NKT-Zellen und der $\gamma\delta$ -TZ bei den GDMI sind Zellpopulationen betroffen, die in ihrer Wirkung auf T-Helfer-Zellen gegensätzlich sind.

Die Immunreaktion kann durch diese Konstellation eine Th-1/Th-2 Balance ausbilden und wird nicht so leicht in Richtung Th-2- oder Th-1-Reaktion gelenkt. Dies geschieht, obwohl das Überwiegen der Th-2-Immunreaktion günstiger für einen erfolgreichen Schwangerschaftsverlauf sein soll (Makhseed, M. et al., 2001). Denn durch die Th-2-Reaktion können zytotoxische Reaktionen der Th-1 Effektorzellen unterdrückt werden. Man könnte bei der beschriebenen Zellverteilung bei den GDMI bezüglich der Schwangerschaft von einer pathologischen, oder zumindest „gefährlichen“ Verteilung sprechen. Da die in der Studie untersuchten GDMI alle ihre Schwangerschaft erfolgreich ausgetragen haben, kann im Screening der genannten Immunzellen keine eindeutig schwangerschaftsgefährdende Immunkonstellation beschrieben werden. Bei den GDMI könnte eine schwangerschaftsgefährdende Situation entstehen, wenn die Th-1/Th-2 Balance gestört wird und sich eine Th-1 Antwort ausbildet.

Veränderungen der $\gamma\delta$ -TZ zeigt die vorliegende Studie auch in der Vergleichsgruppe der Normalkontrollen gegenüber den Diabetikerinnen. Hier ist neben dem Anstieg der $\gamma\delta$ -TZ bei den Normalkontrollen auch ein Anstieg der DC zu verzeichnen. Auch bei dieser Vergleichsgruppe könnte die dargestellte immunologische Veränderung als Folge einer Interaktion verschiedener Zellpopulationen interpretiert werden. Die durch $\gamma\delta$ -TZ induzierte Reifung der DC wurde 2002 von Ismaili et al. beschrieben, und stellt eine Verbindung des angeborenen Immunsystems mit dem erworbenen Immunsystem dar. Ismaili zeigte in seiner Arbeit eine solche Interaktion im Sinne einer effektiven Abwehrreaktion Gesunder. Durch Stimulation der $\gamma\delta$ -TZ kann MHC II unabhängig in kurzer Zeit ein großer Pool adulter DC reifen und durch Th-1 Polarisation zur Bildung antigenspezifischer TZ des erworbenen Immunsystems führen (Leslie, DS. et al., 2002).

Bezüglich der Interaktionsmöglichkeiten der $\gamma\delta$ -TZ wurde von Conti et al. (2005) eine Interaktion zwischen $\gamma\delta$ -TZ und DC beschrieben. Aktivierte $\gamma\delta$ -TZ können via INF- γ - und TNF- α -Sekretion DC zur Proliferation und Reifung stimulieren.

Die Reifung der DC kann von den $\gamma\delta$ -TZ nur in Abhängigkeit vom CD1d Rezeptor vermittelt werden. Der CD1d Rezeptor gehört zur Untergruppe der MHC-I Rezeptoren und wird auf DC

besonders stark exprimiert. Auch NK-Zellen tragen vermehrt CD1d Rezeptoren und können durch sie mit $\gamma\delta$ -TZ interagieren.

In der Vergleichsgruppe der Normalkontrollen mit den Diabetikerinnen ist diese Konstellation durch die gleichzeitige Erhöhung der $\gamma\delta$ -TZ und der DC nachzuweisen.

Die CD1d abhängige Stimulation der NK-Zellen durch die $\gamma\delta$ -TZ, wie sie bei den GDMI gezeigt wurde, läuft bei den Diabetikerinnen möglicherweise über CD1d abhängige Stimulation durch die DC.

Weiterhin findet man bei den $\gamma\delta$ -TZ, den DC und ihren Untergruppen CD11c+ und CD123+ bei den Normalkontrollen gegenüber den Diabetikerinnen eine erhöhte Apoptoserate. Wodurch die DC genau zur Apoptose stimuliert werden ist auch in der Literatur nicht beschrieben. Schließlich ist nicht gänzlich auszuschließen, dass die DC in ihrer Funktion als phagozytierende Zellen verstärkt den Apoptosefarbstoff aufnehmen und binden, womit es zu Artefakten im Sinne einer starken Anfärbung kommen könnte. Unterschiede der Apoptoserate zwischen den untersuchten Gruppen würden allerdings nicht entstehen.

6.2.1 T-Helfer-1/T-Helfer-2 Imbalance des insulinpflichtigen Diabetes und Immunmodulation

Ein T1D wird in seiner Entstehung mit einer Th-1/Th-2 Imbalance mit überwiegender Th-1 Reaktion in Zusammenhang gebracht (Kotani R. et al., 2004). Durch die Th-1 Reaktion werden Makrophagen aktiviert, die eine Entzündungsreaktion in Gang setzen und die Bildung autoreaktiver Antikörper induzieren. Der Einfluss einer Th-2 Immunantwort hat eher Diabetes protektiven Einfluss. Dieser konnte im Tiermodell nicht nur beim T1D, sondern auch bei anderen experimentell induzierten Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden, beispielsweise der autoallergischen Enzephalomyelitis (Janeway C. 2005). Die Zerstörung des pankreatischen Gewebes läuft phasenhaft ab und beginnt mit der Infiltration des pankreatischen Gewebes mit Makrophagen und DC. Schließlich führen von zytotoxischen TZ freigesetzte Enzyme zur Apoptose der mit Antikörpern besetzten β -Inselzelle (Yoon J.W. et al., 2001).

Die pathophysiologische Erklärung des schädigenden Einflusses der Th-1 Zellen liegt in der Aktivierung zytotoxischer TZ, deren pathologische autoreaktive Zerstörung gegen die

Inselzellen des Pankreas gerichtet ist. Allerdings kann trotz der vielen Forschungsergebnisse auch im Bereich der Diabetesforschung an Tiermodellen wie „Biobreeding rat“ und „nonobese diabetic mouse“ (NOD) die Th-1/Th-2 Hypothese nicht uneingeschränkt übertragen werden. Berücksichtigt werden müssen auch die passiven Immuneffekte der Zytokine auf andere TZ. So hat man TZ gefunden, die durch bestimmte Zytokinmuster die Aktivierung anderer CD4+ TZ unterdrücken. Man spricht von regulatorischen TZ (Janeway C., 2005).

Immunmodulatorische Eigenschaften werden auch NKT-Zellen zugeschrieben. Auf Antigenpräsentation via MHC-I ähnlichen Molekülen (sogenannte CD1) können NKT-Zellen mit IL-4 Sekretion und Th-2 Stimulation reagieren.

Diese Beobachtung ist auch im Hinblick auf die NKT-Zellen und ihre Veränderung in der vorliegenden Arbeit bedeutsam. Weiterhin wurden NKT-Zellen im Tierversuch eine Rolle bei der Abortinduktion sowie ein protektiver Einfluss bei der Entstehung des T1D zugesprochen. Es konnte von der Forschungsgruppe um Naumov, et al. (2001) im Tiermodell gezeigt werden, dass durch aktivierte NKT-Zellen ein Diabetes-protektiver Effekt besteht. Dieser Effekt beruht zumindest teilweise auf der Produktion noch nicht genauer definierter Faktoren, die zur Reifung von DC und deren Subpopulationen führen (Chen, Y.G. et al., 2005).

6.2.2 Natürliche Killer-Zellen und Natürliche Killer T-Zellen

Die Populationen der NK- und NKT-Zellen in der Patientinnengruppe der SD zeigen sowohl gegenüber den SS als auch den Diabetikerinnen signifikante, allerdings gegenläufige Veränderungen.

Im Vergleich der SD mit Diabetikerinnen konnte der Einfluss der Schwangerschaft bei gleichzeitig bestehender Autoimmunerkrankung beobachtet werden. Hier finden sich bei den SD NKT-Zellen signifikant vermehrt. Die NK-Zellen sind in derselben Vergleichsgruppe bei den SD vermindert.

Die Beobachtung, dass beim Zusammentreffen der Faktoren Schwangerschaft und Diabetes die NKT-Zellen ansteigen, wirft Fragen auf. Die NKT-Zellen haben in diesem Fall sicherlich primär keinen schützenden Effekt auf das Pankreasgewebe, denn eine Schwangerschaft verzögert nicht den Zerstörungsprozess des pankreatischen Gewebes, wie es bei der multiplen

Sklerose beobachtet wird (Kaaja, R.J. et al., 2005). Es stellt sich die Frage, was den Anstieg der NKT-Zellen bedingt und welche Effekte und Funktionen damit zusammenhängen.

Um die Abstoßung des teilweise allogenen Feten zu verhindern setzt eine erfolgreiche Schwangerschaft eine herabgesetzte Reaktivität des mütterlichen Immunsystems voraus. Besonders zytotoxische Th-1 Reaktionen gehen mit einer Gefährdung des Föten und einer erhöhten Abortrate einher. Doch ist nicht anzunehmen, dass die Th-2 Reaktionslage gesunder Schwangerer bei einer SD noch verstärkt wird, da beim T1D die Th-1 Immunantwort dominiert. Dagegen sprechen auch die klinischen Probleme (Aborte), wie sie bei diesen Patientinnen gehäuft beschrieben werden.

Wahrscheinlich liegt der Grund der beobachteten NKT-Zell Erhöhung bei SD gegenüber SS und gegenüber Diabetikerinnen in einer immunmodulatorischen Reaktionsweise der NKT-Zellen, deren Effekt noch nicht bekannt ist, die jedoch unter Umständen eine Gefährdung der Schwangerschaft darstellt. Unterstützung erhält diese Interpretation durch eine Studie von Ito et al., 2000. Hier wurden bei Mäusen die in der Dezida befindlichen NKT-Zellen stimuliert und eine vermehrte Abortrate herbeigeführt. Schwangerschaftsgefährdende Einflüsse durch die NKT-Zellen sind demnach nachweisbar.

Die von den NKT-Zellen sezernierten Zytokine INF- γ und TNF- α zeigten sich für den Abort essenziell. Bei Mäusen, die diese Zytokine nicht sezernieren können, konnte auch keine vermehrte Abortrate erzielt werden. Da in der vorliegenden Studie Zellen des peripher venösen Blutes untersucht wurden, kann gerade was die Abortinduktion betrifft, nur eine sehr eingeschränkte Aussage getroffen werden. Denn lokale Immunvorgänge an der Plazenta können nicht mit Veränderungen des peripheren Blutes gleichgesetzt werden.

Auch die NK-Zellen zeigten in den Vergleichsgruppen der SD versus SS und der Gruppe SD versus Diabetikerinnen Veränderungen. Der Mittelwert der NK-Zellen ist in beiden Vergleichsgruppen bei den SD stark herabgesetzt.

Die NKT-Zellen der SD sind gegenüber den Diabetikerinnen signifikant hochreguliert. Die Fähigkeit der NKT-Zellen, die NK-Zellen zu stimulieren, wurde von Carnaud, C. et al., 1999 in einem Mausmodell beschrieben. Neuere Forschungsergebnisse gelangen allerdings zu der Vorstellung, dass NKT-Zellen sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Stimulationsmöglichkeiten besitzen, und dass NK-Zellen besonders bei Infektionen in ihrer Schutzfunktion und Aktivierung unabhängig von den NKT-Zellen sind (Duthie, M.S. et al., 2005).

Betrachtet man die NKT-Zellen als Immunmodulatoren und spricht ihnen eine Schlüsselrolle im Zusammenspiel zwischen zellulärer (angeborener) und humoraler (erworbener) Immunität zu, sollten sich auch auf Seiten der erworbenen Immunabwehr Hinweise auf durch NKT-Zellen indizierte Anpassungsvorgänge oder Anpassungsstörungen finden. Den Einfluss der NKT-Zellen auf Ebene der erworbenen Immunität zeigt sich durch entsprechende Veränderungen der CD3+ TZ. Die Zellpopulation der CD3+ TZ sind bei SD gegenüber den SS und den Diabetikerinnen signifikant erhöht. Die NKT-Zellen könnten für diese Zunahme maßgeblich verantwortlich sein. Erstaunlicherweise finden sich aber weder Veränderungen der CD3+ Zellen in Richtung CD4+ oder CD8+, noch weisen die B-Zellen, die ja besonders beim Diabetes gegen körpereigenes Gewebe gerichtete Antikörper bilden können, Veränderungen auf.

6.2.3 Gestationsdiabetes und seine pathogenetischen Faktoren

GDM scheint als Resultat auf ein breites Spektrum unterschiedlicher genetischer und physiologischer Veränderungen zu entstehen. Es lassen sich drei Hauptursachen unterscheiden, die zum Verlust der β -Zellfunktion führen:

- 1.) autoimmunologische Ursachen. Bei dieser Patientinnengruppe werden Autoimmunantikörper gefunden
- 2.) genetische Veränderungen, welche beispielsweise die Insulinrezeptoren in der Peripherie betreffen und
- 3.) eine Insulinresistenz, die im Gegensatz zur physiologischen Insulinresistenz während der Schwangerschaft zu pathologischen Hyperglykämien führt.

Diese Beispiele sollen nur verdeutlichen, wie weit gefächert die Ätiologie des GDM ist. Hinzu kommen weiterhin Risikofaktoren wie Übergewicht, familiäre Disposition und andere, sodass sich bisher kein zuverlässiger Marker finden ließ, der das Risiko der Entwicklung eines GDM einschätzen lässt.

Da in vielen Fällen nach einem GDM ein Diabetes Typ 2 folgt, wird der GDM häufig als Frühphase des Diabetes Typ 2 verstanden. Die Suche nach geeigneten Risiko- und Screeningfaktoren bezieht sich nicht nur auf die Entstehung des GDM, sondern auch auf

dessen Prognose. Immunologische Faktoren scheinen sowohl ätiologisch als auch prognostisch von Relevanz zu sein.

In der vorliegenden Arbeit werden GDMI hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Immunzellpopulationen mit schwangeren Frauen verglichen. Des Weiteren wurden die Gruppen GDMI und SD zusammengelegt, was aus formalen und statistischen Erwägungen sinnvoll war. Die zusammengelegte Gruppe wurde mit Diabetikerinnen und SS verglichen und wurde vereinfacht als SGD dargestellt. Durch dieses Zusammenfügen entstand eine Vergleichsgruppe, deren Patientinnen eine Glukosestoffwechselerkrankung unterschiedlicher Genese aufwiesen.

Dass auch bei optimaler Stoffwechseleinstellung sowohl bei GDMI als auch bei Diabetikerinnen Unterschiede zu gesunden SS bestehen, ist allgemein bekannt. Diabetische Folgeerkrankungen schreiten bei SS schneller fort als gewöhnlich. Schwangerschaftskomplikationen wie Plazentainsuffizienz, Frühgeburtlichkeit und Aborte können auf eine Störung an der feto-maternalen Grenzfläche durch immunologische Veränderungen entstehen.

Im Vergleich mit den Diabetikerinnen zeigte die Gruppe SGD hauptsächlich auffällige Veränderungen in den gemessenen Apoptosetraten der $\gamma\delta$ -TZ, DC, CD123+ und CD11c+ DC. Im Vergleich zu den Diabetikerinnen fanden sich die Mittelwerte der Apoptoseraten signifikant erhöht. Ein eventueller Zusammenhang zwischen hoher Apoptoserate und verstärktem Zellumsatz wurde schon an anderer Stelle angesprochen. Schlussendlich bleibt die Bedeutung im Rahmen der Immunreaktion spekulativ. Zu wenig ist über den Ablauf der Apoptose bei DC und ihren Untergruppen bekannt.

Betrachtet man jedoch die anderen Zellpopulationen, so findet sich außerdem eine signifikante Erhöhung der NKT-Zellen in der Gruppe SGD gegenüber den Diabetikerinnen und im Vergleich zu den SS.

NKT-Zellen und DC können gegenseitig Aktivations- und Proliferationsreize aufeinander ausüben: NKT-Zellen werden besonders stark von Antigenen aktiviert, die ihnen myeloide DC auf ihren CD1d Oberflächenmolekülen präsentieren. NKT-Zellen wiederum führen durch ihre Sekretionsprodukte zur Rekrutierung und Differenzierung der DC. Um eine Überreaktion des Immunsystems verhindern zu können, existieren auch suppressorische Einflüsse, die von den DC auf die aktivierten NKT-Zellen ausgeübt werden können. Dabei kommt es zur Lyse

der DC und das Th-1/Th-2 Gleichgewicht kann wieder hergestellt werden (Yang, O.O. et al., 2000). Diese Interpretation würde auch die übermäßige Apoptoserate der DC erklären.

In der vorliegenden Studie konnten vielfältige und komplexe Veränderungen der Immunzellen des peripher venösen Blut SS mit und ohne T1D gezeigt werden. Ausgehend von den hier dargestellten Untersuchungsergebnissen sind weitere Untersuchungen denkbar, die beispielsweise Zytokine mit einbeziehen, um die Funktionen der einzelnen Zelltypen gezielter zu untersuchen.

VII. Zusammenfassung

Die komplikationslose Schwangerschaft nimmt eine immunologische Sonderstellung ein, da es nicht zur Abstoßung des semiallogenen Embryos kommt. Gleichzeitig stellt der Diabetes mellitus als immunkompromittierende Erkrankung eine im Rahmen der Schwangerschaft immunologisch bislang nur wenig untersuchte Konstellation dar.

In der vorliegenden prospektiven Studie wurden aus venösem Blut von 114 altersadaptierten weiblichen Individuen (1. Normalkontrolle (N), 2. Schwangere (SS), 3. Diabetikerinnen (T1D), 4. schwangere Diabetikerinnen (SD), 5. Gestationsdiabetikerinnen (GDMI)) verschiedene Immunzellen (B-Zellen, T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen (TZ), NK-Zellen, NKT-Zellen, $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -CD3+-Zellen, CD11+ und CD123+ dendritische Zellen (DC)), sowie Aktivierungs-, Apoptose- und Nekrosemarker mittels Vier-Farben-Durchflusszytometrie differenziert. Die 14 erhobenen Parameter ergaben ein komplexes immunologisches Bild:

Es zeigte sich eine signifikant verminderte Anzahl der $\gamma\delta$ -TZ und DC im Blut der SS und T1D im Vergleich zur N. $\gamma\delta$ -TZ können schwangerschaftsprotective Th-2 Immunantworten supprimieren, und DC kommt eine Bedeutung in der TZ vermittelten Immuntoleranz zu. Diese potentiell schwangerschaftsgefährdenden Veränderungen konnten bei SD und GDMI nicht nachgewiesen werden. Bei den GDMI zeigten sich NKT-Zellen und $\gamma\delta$ -TZ im Vergleich zu den SS vermehrt. Einerseits führen NKT-Zellen zu einer Th-2-Immunantwort mit schwangerschaftsprotectiven Eigenschaften, andererseits haben $\gamma\delta$ -TZ Th2-supprimierende Eigenschaften, so dass im genannten zellulären Wechselspiel eine gewisse Th2-Balance entsteht.

In den Vergleichsgruppen SD mit T1D und SD mit SS zeigten sich die CD3+ und NKT-Zellen bei den T1D und SS signifikant vermindert, die NK-Zellen bei T1D und SS signifikant erhöht. Diese Konstellation könnte aus der Fähigkeit der NKT-Zellen zur TZ-Stimulation resultieren. Die signifikante Erhöhung der NKT-Zellen spiegelt sicherlich ein starkes inflammatorisches Potential der SD wieder.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass bei Schwangeren unter dem Einfluss von Diabetes mellitus im peripheren Blut eine Vielzahl komplexer Immunkonstellationen beobachtet werden können. Ob sich aus den einzelnen „immunologischen Mustern“ Risikoprofile ableiten lassen, die das Outcome einer Schwangerschaft vorhersagen könnten, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

VIII. Literaturverzeichnis

Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sanchez ML, Canizo MC, Fernandez ME, Vaquero JM, Laso FJ, Escribano L, San Miguel JF, Orfao A.

Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II+/lineage- cells.

Clin Exp Immunol. 1999 Dec;118(3):392-401

Barakonyi A, Kovacs KT, Miko E, Szereday L, Varga P, Szekeres-Bartho J.

Recognition of nonclassical HLA class I antigens by gamma delta T cells during pregnancy.

J Immunol. 2002 Mar 15;168(6):2683-8

Barden A, Singh R, Walters BN, Ritchie J, Roberman B, Beilin LJ.

Factors predisposing to pre-eclampsia in women with gestational diabetes.

J Hypertens. 2004 Dec;22(12):2371-8

Boloker J, Gertz SJ, Simmons RA.

Gestational diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat.

Diabetes. 2002 May;51(5):1499-506

Brutkiewicz RR, Lin Y, Cho S, Hwang YK, Sriram V, Roberts TJ.

CD1d-mediated antigen presentation to natural killer T (NKT) cells.

Crit Rev Immunol. 2003;23(5-6):403-19

Brutkiewicz RR, Sriram V.

Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity.

Crit Rev Oncol Hematol. 2002 Mar;41(3):287-98

Bulla R, Bossi F, Radillo O, de Seta F, Tedesco F.

Placental trophoblast and endothelial cells as target of maternal immune response.

Autoimmunity. 2003 Feb;36(1):11-8

Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A.

Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells.
J Immunol. 1999 Nov 1;163(9):4647-50

Catalano PM, Vargo KM, Bernstein IM, Amini SB.
Incidence and risk factors associated with abnormal postpartum glucose tolerance in women with gestational diabetes.
Am J Obstet Gynecol. 1991 Oct;165(4 Pt 1):914-9

Chen YG, Choisy-Rossi CM, Holl TM, Chapman HD, Besra GS, Porcelli SA, Shaffer DJ, Roopenian D, Wilson SB, Serreze DV.
Activated NKT cells inhibit autoimmune diabetes through tolerogenic recruitment of dendritic cells to pancreatic lymph nodes.
J Immunol. 2005 Feb 1;174(3):1196-204

Chen YH, Chiu NM, Mandal M, Wang N, Wang CR.
Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice.
Immunity. 1997 Apr;6(4):459-67

Christiansen OB.
A fresh look at the causes and treatments of recurrent miscarriage, especially its immunological aspects.
Hum Reprod Update. 1996 Jul-Aug;2(4):271-93

Clark DA, Croitoru K.
Th-1/Th-2,3 imbalance due to cytokine-producing NK, gammadelta T and NK-gammadelta T cells in murine pregnancy decidua in success or failure of pregnancy.
Am J Reprod Immunol. 2001 May;45(5):257-65

Conti L, Casetti R, Cardone M, Varano B, Martino A, Belardelli F, Poccia F, Gessani S.
Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines.
J Immunol. 2005 Jan 1;174(1):252-60

Coustan DR.

Screening and diagnosis of gestational diabetes.

Baillieres Clin Obstet Gynaecol. 1991 Jun;5(2):293-313. Review

Cui J, Watanabe N, Kawano T, Yamashita M, Kamata T, Shimizu C, Kimura M, Shimizu E, Koike J, Koseki H, Tanaka Y, Taniguchi M, Nakayama T.

Inhibition of T helper cell type 2 cell differentiation and immunoglobulin E response by ligand-activated Valpha14 natural killer T cells.

J Exp Med. 1999 Sep 20;190(6):783-92

Dahlquist G, Blom L, Holmgren G, Hägglöf B, Larsson Y, Sterky G, Wall S.

The epidemiology of diabetes in Swedish children 0-14 years--a six-year prospective study.

Diabetologia. 1985 Nov;28(11):802-8

De Smedt T, Pajak B, Klaus GG, Noelle RJ, Urbain J, Leo O, Moser M.

Antigen-specific T lymphocytes regulate lipopolysaccharide-induced apoptosis of dendritic cells in vivo.

J Immunol. 1998 Nov 1;161(9):4476-9

Dooley SL, Metzger BE, Cho N, Liu K.

The influence of demographic and phenotypic heterogeneity on the prevalence of gestational diabetes mellitus.

Int J Gynaecol Obstet. 1991 May;35(1):13-8

Duthie MS, Kahn SJ.

NK cell activation and protection occur independently of natural killer T cells during Trypanosoma cruzi infection.

Int Immunol. 2005 May;17(5):607-13

Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG.

NKT cells: facts, functions and fallacies.

Immunol Today. 2000 Nov;21(11):573-83. Review.

Hadden DR, Hillebrand B.

The first recorded case of diabetic pregnancy (Bennewitz HG, 1824, University of Berlin)

Diabetologia. 1989 Aug;32(8):625

Hadden DR

How to improve prognosis in type 1 diabetic pregnancy. Old problems, new concepts.

Diabetes Care. 1999 Mar;22 Suppl 2:B104-8. Review

Hamman RF, Marshall JA, Baxter J, Kahn LB, Mayer EJ, Orleans M, Murphy JR, Lezotte DC.

Methods and prevalence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in a biethnic Colorado population. The San Luis Valley Diabetes Study.

Am J Epidemiol. 1989 Feb;129(2):295-311

Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A.

Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success.

J Exp Med. 2004 Oct 18;200(8):957-65.

Ismaili J, Orlislagers V, Poupot R, Fournie JJ, Goldman M.

Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation.

Clin Immunol. 2002 Jun;103:296-302

Ito K, Karasawa M, Kawano T, Akasaka T, Koseki H, Akutsu Y, Kondo E, Sekiya S,

Sekikawa K, Harada M, Yamashita M, Nakayama T, Taniguchi M.

Involvement of decidual Valpha14 NKT cells in abortion.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jan 18;97(2):740-4.

Janeway Charles A.

Immunobiology

6. Auflage New York, Garland Verlag 2005

Kaaja RJ, Greer IA

Manifestations of chronic disease during pregnancy

JAMA. 2005 Dec 7;294(21):2751-7

Karges WJ, Ilonen J, Robinson BH, Dosch HM.

Self and non-self antigen in diabetic autoimmunity: molecules and mechanisms.

Mol Aspects Med. 1995;16(2):79-213

Kawakami K.

Regulation by innate immune T lymphocytes in the host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*.

Jpn J Infect Dis. 2004 Aug;57(4):137-45

Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M.

CD1d-restricted and TCR-mediated activation of α 14 NKT cells by glycosylceramides.

Science. 1997 Nov 28;278(5343):1626-9

Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, Masch R, Lockwood CJ, Schachter AD, Park PJ, Strominger JL.

Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential.

J Exp Med. 2003 Oct 20;198(8):1201-12

Kotani R, Nagata M, Imagawa A, Moriyama H, Yasuda H, Miyagawa J, Hanafusa T, Yokono K.

T lymphocyte response against pancreatic beta cell antigens in fulminant type 1 diabetes.

Diabetologia. 2004 Jul;47(7):1285-91

Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R.

A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts.

Science. 1990 Apr 13;248(4952):220-3

Kühl C.

Insulin secretion and insulin resistance in pregnancy and GDM. Implications for diagnosis and management.

Diabetes. 1991 Dec;40 Suppl 2:18-24. Review

Lapolla A, Sanzari M, Betterle C, Dalfrà MG, Masin M, Zanchetta R, Zancanaro F, Capovilla F, Toniato R, Plebani M, Fedele D.

Evaluation of T-cell receptor CD3+ gamma delta in gestational diabetes mellitus.

Acta Diabetol. 2000;37(4):207-11

LaVallie DL, Gabbe SG, Grossman DC, Larson EB, Baldwin LM, Andrilla CH.

Birth outcomes among American Indian/Alaska Native women with diabetes in pregnancy.

J Reprod Med. 2003 Aug;48(8):610-6

Leslie DS, Vincent MS, Spada FM, Das H, Sugita M, Morita CT, Brenner MB.

CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells.

J Exp Med. 2002 Dec 16;196(12):1575-84

Lonnrot M, Korpela K, Knip M, Ilonen J, Simell O, Korhonen S, Savola K, Muona P, Simell T, Koskela P, Hyoty H.

Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention

Diabetes. 2000 Aug;49(8):1314-8

Makhseed M, Raghupathy R, Azizieh F, Omu A, Al-Shamali E, Ashkanani L.

Th-1 and Th-2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions.

Hum Reprod. 2001 Oct;16(10):2219-26

Malmgaard L.

Induction and regulation of IFNs during viral infections

J Interferon Cytokine Res. 2004 Aug;24(8):439-54

Mellor AL, Munn DH.

Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression.

Annu Rev Immunol. 2000;18:367-91

Mi QS, Ly D, Lamhamedi-Cherradi SE, Salojin KV, Zhou L, Grattan M, Meagher C, Zucker P, Chen YH, Nagle J, Taub D, Delovitch TL.

Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice

Diabetes. 2003 Aug;52(8):1967-75.

Naumov YN, Bahjat KS, Gausling R, Abraham R, Exley MA, Koezuka Y, Balk SB, Strominger JL, Clare-Salzer M, Wilson SB.

Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Nov 20;98(24):13838-43

Onoé K, Yanagawa Y, Minami K, Iijima N, Iwabuchi K.

Th1 or Th2 balance regulated by interaction between dendritic cells and NKT cells.

Immunol Res. 2007;38(1-3):319-32. Review

Oksenberg JR, Mor-Yosef S, Persitz E, Schenker Y, Mozes E, Brautbar C.

Antigen-presenting cells in human decidual tissue.

Am J Reprod Immunol Microbiol. 1986 Jul;11(3):82-8

Polgar B, Barakonyi A, Xynos I, Szekeres-Bartho J.

The role of gamma/delta T cell receptor positive cells in pregnancy.

Am J Reprod Immunol. 1999 Apr;41(4):239-44

Raghupathy R.

Pregnancy: success and failure within the Th-1/Th-2/Th3 paradigm.

Semin Immunol. 2001 Aug;13(4):219-27

Ramos E, Gaudier FL, Hearing LR, Del Valle GO, Jenkins S, Briones D.

Group B streptococcus colonization in pregnant diabetic women.
Obstet Gynecol. 1997 Feb;89(2):257-60.

Reid SD, Penna G, Adorini L.

The control of T cell responses by dendritic cell subsets.
Curr Opin Immunol. 2000 Feb;12(1):114-21

Roth I, Corry DB, Locksley RM, Abrams JS, Litton MJ, Fisher SJ.

Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10.
J Exp Med. 1996 Aug 1;184(2):539-48

Roversi GD.

Intensive treatment of diabetes during pregnancy
Diabetes Care. 1985 Sep-Oct;8(5):522-3

Silverman BL, Metzger BE, Cho NH, Loeb CA.

Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers. Relationship to fetal hyperinsulinism.

Diabetes Care. 1995 May;18(5):611-7

Steinman RM.

The dendritic cell system and its role in immunogenicity.
Annu Rev Immunol. 1991;9:271-96

Szekeres-Bartho J, Barakonyi A, Miko E, Polgar B, Palkovics T.

The role of gamma/delta T cells in the feto-maternal relationship.
Semin Immunol. 2001 Aug;13(4):229-33

Thomas R, Lipsky PE.

Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells.

J Immunol. 1994 Nov 1;153(9):4016-28

Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P.

Development of Th-1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction.

J Immunol. 2000 May 1;164(9):4507-12

Warren HS, Smyth MJ.

NK cells and apoptosis.

Immunol Cell Biol. 1999 Feb;77(1):64-75

Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T, Hidaka Y, Mitsuda N, Morimoto Y, Amino N.

Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy.

Am J Rep Imm. 1997 May;37(5):368-77

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR.

Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th-2 phenomenon?

Immunol Today. 1993 Jul;14(7):353-6

Weiss, Peter A. M.

Diabetes und Schwangerschaft

2002, Springer, Wien

Yang OO, Racke FK, Nguyen PT, Gausling R, Severino ME, Horton HF, Byrne MC,

Strominger JL, Wilson SB.

CD1d on myeloid dendritic cells stimulates cytokine secretion from and cytolytic activity of V alpha 24J alpha Q T cells: a feedback mechanism for immune regulation.

J Immunol. 2000 Oct 1;165(7):3756-62

Yoon JW, Jun HS.

Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus.

Ann N Y Acad Sci. 2001 Apr;928:200-11

Yoon JW.

The role of viruses and environmental factors in the induction of diabetes.

Curr Top Microbiol Immunol. 1990;164:95-123

Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE.

Role of NK1.1+ T cells in a Th-2 response and in immunoglobulin E production.

Science. 1995 Dec 15;270(5243):1845-7

Zeng D, Lewis D, Dejbakhsh-Jones S, Lan F, Garcia-Ojeda M, Sibley R, Strober S.

Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease.

J Exp Med. 1999 Apr 5;189(7):1073-81

IX. Anhang

9.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Antony, Linda

Geburtsdatum, -ort: 28.01.1980, Mönchengladbach

Nationalität: deutsch/ luxemburgisch

Familienstand: ledig

Schul- und Universitätsausbildung

- 1986-1990 katholische Grundschule in Mönchengladbach
- 1990-1999 Gymnasium Am Geroweier, Mönchengladbach
- ab Wintersemester 1999 Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- PJ-Tertial Innere und Dermatologie am Universitätsklinikum Düsseldorf, Chirurgie Tertial Professor J. Leteneur Universitätsklinikum Nantes, Frankreich
- seit 08/2006: Assistenzärztin Marienhospital Düsseldorf
Abteilung für Onkologie und Hämatologie, Prof. Dr. J. Schütte

9.2 Einverständniserklärung



Universitätsklinikum Düsseldorf
Frauenklinik
Direktor: Universitätsprofessor Dr. H. G. Bender

Patienten-/Probandeninformation und Einverständniserklärung zur Studie:

Charakterisierung immunologischer Zellen im Blut Schwangerer mit oder ohne Diabetes mellitus

Projektleitung: Priv. Doz. Dr. U. Friebe-Hoffmann, Priv. Doz. Dr. T. Hoffmann

Informationen zur Studie

Die Verknüpfung einer Schwangerschaft mit einem Diabetes der Mutter bringt eine erhöhte Gefährdung des Feten sowie der Mutter mit sich. Der Schwangerschaftsverlauf zeichnet sich durch ein erhöhtes Risiko aus an einer Frühgeburt, einer Präeklampsie oder einer Infektionen zu leiden. Bei schlecht eingestelltem Diabetes steigt zudem die fetale Fehlbildungsrate an.

Schwangerschaft an sich ist ein immunologisch interessantes Phänomen. Während im nicht schwangeren Zustand Fremdkörper im menschlichen Körper wie Bakterien, Viren oder aber übertragene Antikörper bei einer Bluttransfusion durch das Immunsystem bekämpft werden, toleriert dieses in aller Regel das Heranwachsen eines anderen Menschen im Mutterleib.

Die immunologische Stoffwechsellage bei Diabetikerinnen gibt viele Rätsel auf. Zum einen beobachtet man bei diabetischen Schwangeren eine erhöhte Rate an Frühaborten, was darauf hinweist, dass hier das mütterliche Immunsystem kindlichen Zellen als Fremdkörper identifiziert und bekämpft. Zum anderen zeigen Diabetes Patientinnen eine geschwächte Immunabwehr, was zu einer vermehrte Infektionsrate im Rahmen der Grunderkrankung führen kann.

Das Ziel der vorliegenden Studie ist neben einer Auszählung verschiedener Immunzellen (z.B. T-Zellen), die genau Charakterisierung von hochspezialisierten dendritischen Zellen (DC) im Blut schwangerer und nicht schwangerer Probandinnen mit oder ohne Diabetes mellitus.

Dendritische Zellen gehören in die Gruppe der Makrophagen und haben die Aufgabe im menschlichen Organismus Fremdkörper aufzunehmen, zu prozessieren und sie anderen Immunzellen zu präsentieren, die diese dann beseitigen. Die Untersuchung dieser Zellen soll uns Aufschluss geben über die besonderen Immunverhältnisse der schwangeren Diabetikerin.

Aufklärung der Patientin

Sehr geehrte Patientin/Probandin,

Sie haben sich freundlicherweise bereit erklärt, an einer wissenschaftlichen Untersuchung teilzunehmen, die uns Aufschluss geben soll über die besondere Immunitätslage der Schwangeren bzw. der schwangeren Diabetikerin. Mit ihrer Hilfe wollen wir erforschen, wie bestimmte immunologische Parameter im Blut sich im Rahmen der Schwangerschaft verändern und ob es Unterschiede zwischen Schwangeren, bzw. nicht schwangeren Probanden mit und ohne Diabetes gibt. Die Studie untersucht u.a. verschiedene Reifestadien spezieller immunologischer Zellen im Blut. Um unsere Untersuchungen durchführen zu können, benötigen wir eine relativ geringe Menge Blut (ca. 20 ml) von Ihnen. Alle Proben werden nach Abschluss der Studie vernichtet. Die Untersuchung dient ausschließlich wissenschaftlichen Zwecken und nicht der Diagnosestellung oder der Behandlung.

Einverständnis der Patientin

Hiermit bestätige ich, dass ich über die Zielsetzung der Untersuchungen unterrichtet worden bin und damit einverstanden bin, dass mir im Rahmen der zuvor beschriebenen Studie Blut abgenommen wird. Mir ist insbesondere bekannt, dass ich meine Einwilligung zur Teilnahme an der Untersuchung jederzeit zurücknehmen kann, ohne dass mir daraus irgendwelche Nachteile entstehen. Ich habe alles verstanden und derzeit keine weiteren Fragen.

Ich bin mit der Teilnahme an der Studie (Zutreffendes bitte ankreuzen)

einverstanden

nicht einverstanden

Name, Vorname: Geburtsdatum:

Datum: Unterschrift:

Unterschrift eines Dolmetschers:.....

Erklärung des behandelnden Arztes

Der Patient wurde von mir darauf hingewiesen, dass er sein Einverständnis jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für die medizinische Versorgung widerrufen kann.

Datum..... Unterschrift.....

9.3 Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Amino-Actinomycin
α -GalCer	α -Galactosylcermid
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen presenting cell
BZ	B-Zelle
CD1d	MHC Klasse I Molekül
CD	Cluster of differentiation
CTG	Kardiotokogramm
DC	dendritische Zellen
DDFI	Deutsches Diabetes Forschungsinstitut
Fab	Fragmente fragment antigen-binding
Fc-Fragment	Fragment crystallizable
FITC	Flourescein-Isothiocyanat
FSC	Forward-Scatter
GDM	Gestationsdiabetes
GDMI	Gestationsdiabetikerin
GLUT 4	Glukosetransporter 4
HbA1c	Hämoglobin A1c
HLA	human leucocyte antigen
HLP	humanes Plazentalaktogen
Ig	Immunglobulin
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
Lin	Lineage Cocktail
MHC	Major histocompatibility complex
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NIDDM	non insulin dependent diabetes
N	Normalkontrolle
oGTT	Oraler Glukose Toleranz Test
PBS	Phosphat-buffert
PerPc	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PNM	perinatale Mortalitätsrate
PPS	Phospholipid-Phosphatidylserine
PE	Phycoerythrin
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Schwangere Diabetikerin
SGD	Gruppe der schwangere Diabetikerinnen und Gestationsdiabetikerinnen
SS	Schwangere
SSW	Schwangerschaftswochen
SSC	Side Scatter
Th	T-Helfer
TRAIL	Tumor Nekrose Faktor -related apoptosis-inducing ligand
TGF- β 2	Transforming growth factor β 2
TNF	Tumor Nekrose Faktor

T1D
TZ
TZR

Typ I Diabetes mellitus/ Typ I Diabetikerin
T-Zellen
T-Zell Rezeptor

9.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit einen Beitrag geleistet haben.

Mein besonderer Dank gilt den Patientinnen, die sich für die Studie zur Verfügung gestellt haben.

Für die Überlassung des Themas, die nette Betreuung, die vielen Ratschläge und das mir geschenkte Vertrauen danke ich Frau Priv. Doz. Dr. Ulrike Friebe-Hoffmann und Herrn Priv. Doz. Dr. Thomas Hoffmann.

Für die Ermöglichung der Arbeit seitens der Frauenklinik danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Bender, Frau Prof. Dr. U. Koldovsky sowie Herrn Priv. Doz. Dr. Krüssel und seitens der HNO-Klinik Herrn Univ.-Prof. Dr. J. Schipper.

Frau Depke vom immunologisch-onkologischen Labor der Frauenklinik und Herrn Dr. Murat Bas, HNO-Klinik danke ich für die Hilfe bei der praktischen Arbeit am Durchflußzytometer.

Für Hilfe von Seiten des Deutschen Diabetes Forschungsinstitut danke ich Frau Dr. Pawlowski. Für Unterstützung danke ich ganz herzlich dem Pflegepersonal des Deutschen Diabetes Forschungsinstitut und der Frauenklinik.

Große statistische Hilfestellungen bekam ich von Herrn Dr. Hafner vom Institut für Pharmakologie.

Besonders Danke ich meinen Eltern Romain Antony und Ursula Wozniak-Antony, sowie Gertrud Wozniak für ihr offenes Ohr während all meiner Studiumsabschnitte.