

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

Die Daten wurden in einer prospektiven Studie erhoben. Die Studienteilnehmerinnen waren Schwangere, die von niedergelassenen Gynäkologen in Berlin betreut wurden. Nach der Einwilligung zur Teilnahme an der vorliegenden Studie wurde den Studienteilnehmerinnen eine Blutprobe entnommen, zum gleichen Zeitpunkt füllten sie den Perceived Stress Questionnaire (PSQ) aus. Die Durchführung der Studie wurde durch die Ethikkommission genehmigt.

#### **2.1.1 Einschluss- und Ausschlusskriterien**

Eingeschlossen in die Studie wurden gesunde schwangere Frauen vor der 12. Schwangerschaftswoche mit einer intakten Schwangerschaft ohne Anzeichen oder Risiken für einen Abort oder andere Schwangerschaftskomplikationen.

Nicht berücksichtigt in dieser Arbeit wurden Teilnehmerinnen mit anatomischen Fehlbildungen der Genitalorgane, mit immunologischen oder endokrinologischen Vorerkrankungen (Ausnahme: substituierte Hypothyreose), mit einem Phospholipid-Antikörper-Syndrom oder habituellem Abort in der Anamnese sowie Studienteilnehmerinnen unter immunsuppressiver Therapie.

#### **2.1.2 Gruppen: Abort versus komplikationslose Schwangerschaft**

Nach dem Abwarten des Schwangerschaftsausganges wurden die Studienteilnehmerinnen in zwei Gruppen eingeteilt: Frauen mit konsekutivem Abort (Abortgruppe) und Frauen mit komplikationsloser Schwangerschaft (Kontrollgruppe). Auf Studienteilnehmerinnen mit anderen Schwangerschaftskomplikationen wird in der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen.

Um zwei etwa gleich große Gruppen zu erhalten und um die Einflüsse durch unterschiedliches Alter und unterschiedliche Schwangerschaftswochen möglichst gering zu halten, wurde ein „Gruppen-Matching“ durchgeführt. Das bedeutet, dass jedem Abort eine Kontrolle zugeordnet wurde, die in der Schwangerschaftswoche gleich war und sich im Alter um nicht mehr als drei Jahre unterschied.

Die Fallzahlen der vorliegenden Arbeit betragen in der Gruppe „Frauen mit konsekutivem Abort“  $n = 40$  und in der Gruppe „Frauen mit komplikationsloser Schwangerschaft“ ebenfalls  $n = 40$ . Die Auswertung erfolgte retrospektiv als Fall-Kontroll-Studie. Aus labortechnischen Gründen sind die Fallzahlen der beiden Gruppen für die verschiedenen Parameter nicht immer gleich groß.

### **2.1.3 Beschreibung des Studienkollektivs der vorliegenden Arbeit**

#### *Schwangerschaftswoche*

Die Studienteilnehmerinnen in der Gruppe „Frauen mit konsekutivem Abort“ sowie in der Gruppe „Frauen mit komplikationsloser Schwangerschaft“ befanden sich zum Zeitpunkt der Datenerhebung in der 5.-10. Schwangerschaftswoche (je Gruppe jeweils 6 Studienteilnehmerinnen in der 5. SSW, 7 Studienteilnehmerinnen in der 6. SSW, 16 Studienteilnehmerinnen in der 7. SSW, 4 Studienteilnehmerinnen in der 8. SSW, 4 Studienteilnehmerinnen in der 9. SSW und 3 Studienteilnehmerinnen in der 10.SSW).

#### *Alter*

Die Studienteilnehmerinnen der Gruppe „Frauen mit konsekutivem Abort“ waren 19 bis 38 Jahre alt (1 Studienteilnehmerin im Alter von 19 Jahren, 1 im Alter von 21 Jahren, 1 im Alter von 24 Jahren, 2 im Alter von 26 Jahren, 5 im Alter von 27 Jahren, 2 im Alter von 29 Jahren, 4 im Alter von 30 Jahren, 3 im Alter von 31 Jahren, 3 im Alter von 32 Jahren, 6 im Alter von 33 Jahren, 4 im Alter von 34 Jahren, 1 im Alter von 35 Jahren, 2 im Alter von 36 Jahren, 3 im Alter von 37 Jahren, 2 im Alter von 38 Jahren).

In der Gruppe „Frauen mit komplikationsloser Schwangerschaft“ waren die Studienteilnehmerinnen 21 bis 39 Jahre alt (1 Studienteilnehmerin im Alter von 21 Jahren, 1 im Alter von 22 Jahren, 2 im Alter von 24 Jahren, 1 im Alter von 25 Jahren, 3 im Alter von 27 Jahren, 2 im Alter von 28 Jahren, 3 im Alter von 29 Jahren, 6 im Alter von 30 Jahren, 3 im Alter von 31 Jahren, 1 im Alter von 32 Jahren, 3 im Alter von 33 Jahren, 3 im Alter von 34 Jahren, 5 im Alter von 35 Jahren, 1 im Alter von 36 Jahren, 2 im Alter von 37 Jahren, 1 im Alter von 38 Jahren, 2 im Alter von 39 Jahren).

#### *Größe und Gewicht*

In der Gruppe „Frauen mit konsekutivem Abort“ hatten 28 Studienteilnehmerinnen einen Body Mass Index (BMI) zwischen 19 und 25. 5 Studienteilnehmerinnen hatten einen BMI zwischen 17,5 und 19. 3 Studienteilnehmerinnen hatten einen BMI zwischen 25 und 30. 2 Studienteilnehmerinnen hatten einen BMI über 30. 2 Studienteilnehmerinnen machten keine Angaben zu Größe und Gewicht.

In der Gruppe „Frauen mit komplikationsloser Schwangerschaft“ hatten 27 Studienteilnehmerinnen einen BMI zwischen 19 und 25. 2 Studienteilnehmerinnen hatten einen

BMI zwischen 17,5 und 19. 9 Studienteilnehmerinnen hatten einen BMI zwischen 25 und 30. 2 Studienteilnehmerinnen machten keine Angaben zu Größe und Gewicht.

### *Chronische Erkrankungen*

In der Gruppe „Frauen mit konsekutivem Abort“ gaben 3 Studienteilnehmerinnen chronische Erkrankungen an (Pollenallergie, Neurodermitis). In der Gruppe „Frauen mit komplikationsloser Schwangerschaft“ gaben 6 Studienteilnehmerinnen chronische Erkrankungen an (Heuschnupfen, Bronchitis, Gluten-Unverträglichkeit, Thrombose, Schilddrüsenentfernung).

### *Medikamente*

In der Gruppe „Frauen mit konsekutivem Abort“ gaben 2 Studienteilnehmerinnen die Einnahme von Medikamenten an (L-Thyroxin). In der Gruppe „Frauen mit komplikationsloser Schwangerschaft“ gaben 3 Studienteilnehmerinnen die Einnahme von Medikamenten an (L-Thyroxin, Folsäure, Eisenpräparate, homöopathische Mittel).

## **2.2 Blutprobengewinnung und Materialaufbereitung**

Die Blutproben zur Bestimmung von CRH, Progesteron, CD8, CCR5, CCR4 und CD57 stammen von gesunden Schwangeren, die von gynäkologischen Arztpraxen in Berlin betreut wurden. In der Praxis wurden durch das Praxispersonal eine Serum-Monovette und eine EDTA-Monovette je Studienteilnehmerin mit Hilfe des Sarstedt-Entnahmesystems aus einer peripheren Vene abgenommen. Die Blutproben wurden umgehend durch einen Kurier zum Labor gebracht, so dass zwischen Entnahme und Verarbeitung nur wenige Stunden vergingen.

### **2.2.1 Serumgewinnung für die CRH- und Progesteron-Bestimmung**

Das Serumröhrchen wurde 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert und das Serum anschließend in 500 µl Portionen in Eppendorfgefäße aliquotiert. Das Serum wurde bis zur Verwendung bei minus 80°C aufbewahrt.

### **2.2.2 Separation mononukleärer Zellen für die FACS-Analyse**

Das EDTA-Röhrchen wurde 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Das Plasma (Überstand) wurde in ein 15 ml Falconröhrchen abpipettiert und auf Eis gestellt. Die Zellen (Unterstand) wurden gleichmäßig auf zwei Falconröhrchen aufgeteilt (3 ml Zellen je Falconröhrchen). Es wurde je Röhrchen das gleiche Volumen PBS (3 ml) zugegeben und durch Vortexen mit den Zellen vermischt. Das Zell-PBS-Gemisch wurde mit Ficoll (gleiches Volumen wie die Zellen, 3 ml)

vorsichtig unterschichtet und anschließend 20 min bei 2100 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Der entstandene Interphasering wurde aus beiden Röhrchen in ein neues Falconröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit PBS auf 12 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen durch Vortexen vom Boden gelöst. Das Zellgemisch wurde mit Plasma auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und in ein mit 450 µl 33,3%igem DMSO und 550 µl Plasma vorbereitetes Nunc-Röhrchen überführt. Nach vorsichtigem Schwenken des Nunc-Röhrchens wurden die Zellen anschließend bei minus 80°C eingefroren und später in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### **2.3 ELISA**

#### **2.3.1 Grundlagen**

Der Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung. Die Vertiefungen der ELISA-Platte sind mit einem Antikörper gegen die zu bestimmende Substanz beschichtet. Es werden eine Probe mit unbekannter Konzentration und eine definierte Menge Enzymkonjugatlösung in die Vertiefung gegeben, die um die freien Bindungsstellen des an der Platte gebundenen Antikörpers konkurrieren. Durch Zugabe eines chromogenen Substrats kommt es zu einem Farbumschlag, der photometrisch gemessen werden kann. Die Menge an gebundenem Enzymkonjugat ist umgekehrt proportional zur Konzentration in der Probe, die durch Vergleich mit Standards bekannter Konzentrationen bestimmt werden kann.

#### **2.3.2 CRH-ELISA**

Für die Bestimmung der CRH-Konzentration im Serum wurde ein Enzyme Immunoassay Kit der Firma Phoenix verwendet (Messbereich: 0-100 ng/ml). Zur Erstellung der Standardkurve wurden einige Verdünnungsstufen hinzugefügt, ansonsten wurde der Test gemäß Anleitung durchgeführt. Zunächst wurde das Puffer-Konzentrat mit 950 ml Aqua dest. verdünnt. Das Standard-Peptid wurde mit 1 ml Pufferlösung verdünnt und gut vermischt. Hieraus wurden die Verdünnungen zur Erstellung der Standardkurve vorbereitet. Wir haben andere Verdünnungen verwendet als in der Anleitung empfohlen, um eine genauere Standardkurve in dem Bereich zu erhalten, in dem die Mehrheit der Werte lag (etwa zwischen 1-4 ng/ml).

**Tab. 1 Verdünnungen für die Standardkurve des CRH-ELISA**

	verwendete Verdünnung	empfohlene Verdünnung
Standard 1	100	100
Standard 2	20	10
Standard 3	10	1
Standard 4	7,5	0,1
Standard 5	5	0,01
Standard 6	2,5	
Standard 7	1	
Standard 8	0,5	
Standard 9	0,1	
Standard10	0,01	

Anschließend wurden das primäre Antiserum und das biotinylierte Peptid mit je 5 ml Pufferlösung verdünnt und gut vermischt. Die erste Vertiefung wurde freigelassen als „Blank Well“. In die zweite Vertiefung wurden 50 µl Pufferlösung pipettiert als „Total Binding Well“. Danach wurden je 50 µl Standard-Peptid in den verschiedenen Verdünnungen sowie je 50 µl der Proben in die Vertiefungen pipettiert. Es wurden 25 µl primäres Antiserum und 25 µl biotinyliertes Peptid in jede Vertiefung hinzugefügt mit Ausnahme des „Blank Well“. Die Platte wurde mit Acetate Plate Sealer (APS)-Folie abgedeckt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Flasche mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase wurde 15 sec bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden 12 µl SA-HRP in 12 ml Pufferlösung gegeben und gut vermischt. Nach der Inkubationszeit wurde die APS-Folie entfernt und der Inhalt der Vertiefungen verworfen. Die Vertiefungen – mit Ausnahme des „Blank Well“ – wurden fünfmal mit je 300 µl Pufferlösung gewaschen. Danach wurden 100 µl SA-HRP-Lösung in jede Vertiefung gegeben außer in das „Blank Well“. Die Platte wurde wiederum mit APS-Folie abgedeckt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen sechsmal mit je 300 µl Pufferlösung gewaschen. In alle Vertiefungen, auch in das „Blank Well“, wurden 100 µl Substratlösung pipettiert. Die Platte wurde erneut mit APS-Folie abgedeckt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurden nach der Inkubationszeit in alle Vertiefungen, auch in das „Blank Well“, 100 µl 2N HCl gegeben. Der Boden der Platte wurde mit 70% Ethanol gereinigt und die Extinktion bei 450 nm innerhalb der nächsten 20 min gemessen. Mittels einer Messgerät-PC-Kombination wurde die Konzentration in den Proben ermittelt.

### **2.3.3 Progesteron-ELISA**

Für die Bestimmung der Progesteron-Konzentration im Serum wurde ein Mikrotiterplatten-Enzymimmunoassay der Firma DRG benutzt (Messbereich: 0-40 ng/ml) und der Test gemäß Anleitung durchgeführt.

Zunächst wurde die konzentrierte Waschlösung (30 ml) auf 1200 ml Aqua dest. verdünnt. Nachdem die Reagenzien Raumtemperatur erreicht hatten, wurden je 25 µl der Standards (0; 0,3; 1,25; 2,5; 5; 15; 40 ng/ml) und 25 µl der Proben in die Vertiefungen pipettiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl Enzymkonjugat in alle Vertiefungen gegeben. Die Platte wurde 10 sec vorsichtig geschüttelt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Inhalt der Vertiefungen wurde abgeschüttelt und die Vertiefungen dreimal mit je 400 µl Waschlösung gewaschen. Es wurden 200 µl Substratlösung in jede Vertiefung gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Stopplösung in alle Vertiefungen wurde die Extinktion bei 450 nm gemessen. Mittels einer Messgerät-PC-Kombination wurde die Konzentration in den Proben ermittelt.

## **2.4 Durchflusszytometrie**

### **2.4.1 Grundlagen**

Die Durchflusszytometrie dient der Analyse von Zelleigenschaften. Es lassen sich simultan Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzeigenschaften bestimmen. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die in Einzelzellsuspension vorliegenden Zellen beschleunigt, so dass sie einzeln einen Messpunkt passieren. Ein Laser, der auf den Messpunkt fokussiert, stellt im Forward Scatter (FSC) die Größe der Zellen und im Side Scatter (SSC) die Granularität der Zellen dar, so dass Subpopulationen unterschieden werden können. Weiterhin können mittels eines Argonlasers zwei bis drei verschiedene Fluoreszenzen angeregt und registriert werden, die weitere Aussagen über bestimmte Oberflächenmarker erlauben. Durch elektronische Eingrenzung (Gatung) können die Zellen nach verschiedenen Eigenschaften analysiert werden.

### **2.4.2 Antikörperfärbung und Probenmessung**

Die eingefrorenen Zellen wurden möglichst schnell aufgetaut, in ein 15 ml Falconröhrchen gegeben und zweimal mit 12 ml FACS-Puffer gewaschen (10 min zentrifugieren bei 1500 rpm). Für die Färbungen wurden Antikörper der Firma BD benutzt. Je Ansatz wurden 30 µl Zellen verwendet. Für die CD8-Färbung wurde der Antikörper in einer Verdünnung von 1:40 (2,5 µl CD8-PE-Antikörper, 67,5 µl FACS-Puffer, 30 µl Zellen), für die CD57-Färbung in einer

Verdünnung von 1:20 (5 µl CD57-Biotin-Antikörper, 5 µl PerCP, 60 µl FACS-Puffer, 30 µl Zellen), für die CCR5-Färbung in einer Verdünnung von 1:10 (10 µl CCR5-FITC-AK, 60 µl FACS-Puffer, 30 µl Zellen) und für die CCR4- Färbung in einer Verdünnung von 1:200 (0,5 µl CCR4-Biotin-AK, 5 µl PerCP, 64,5 µl FACS-Puffer, 30 µl Zellen) angewendet. Für die Isotypkontrolle (Negativkontrolle) wurden 10 µl  $\gamma_1/\gamma_1$ -Antikörper, 60 µl FACS-Puffer und 30 µl Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit den Antikörpern 30 min bei Raumtemperatur ohne Licht inkubiert, danach einmal gewaschen (5 min zentrifugieren bei 1500 rpm) und anschließend am Cytometer gemessen. Zur Messung wurde die Software CellQuest verwendet. In der FSC/SSC-Ansicht wurden die Leukozyten eingegrenzt (gated). Die Messung wurde bei 10000 Zellen (Events) gestoppt.

### **2.5 Verwendete Materialien und Geräte**

#### *Blutprobengewinnung*

Monovetten Serum 10 ml von Sarstedt  
Monovetten EDTA 10 ml von Sarstedt  
Blutentnahmesystem von Sarstedt

#### *Serumgewinnung für die CRH- und Progesteron-Bestimmung*

Pipette 10-1000 µl von Eppendorf  
Pipettenspitzen 1000 µl von Eppendorf  
Eppendorfgefäße 1 ml  
Zentrifuge Hettich Rotixa/RP

#### *Separation mononukleärer Zellen für die FACS-Analyse*

Pipette 10-1000 µl von Eppendorf  
Pipettenspitzen 1000µl von Eppendorf  
Falconröhrchen 15 ml  
Nunc-Röhrchen  
Spritze 5 ml von Braun  
Metallaufsatz mit langer Kanüle  
PBS von Dulbecco  
Ficoll von Biocoll  
DMSO 33,3% Apotheke Charité Campus Virchow-Klinikum  
Zentrifuge Hettich Rotixa/RP

## Material und Methoden

### *CRH-ELISA*

Enzyme Immunoassay Kit for CRH von Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (Belmont, California, USA)

#### Inhalt des Test-Kits:

- 20-fach konzentrierte Pufferlösung (50 ml)
- 96-Well-Elisa-Platte
- Acetate plate sealer (APS) (3 Folien)
- Primäres Antiserum (Kaninchen Anti-Peptid IgG) (1 Flasche)
- Standard-Peptid (1 µg)
- Biotinyliertes Peptid (1 Flasche)
- Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (SA-HRP) (30 µl)
- Substrat-Lösung (12 ml)
- 2N HCl (15 ml)

Destilliertes Wasser aus Eigenproduktion

Pipette 1-200 µl von Eppendorf

Pipette 10-1000 µl von Eppendorf

Pipettenspitzen 200 µl und 1000 µl von Eppendorf

Microtiter Plate Reader Dynatech MR 7000

Software von Dynatech

### *Progesteron-ELISA*

Progesteron Mikrotiterplatten-Enzymimmunoassay der Firma DRG Instruments GmbH (Deutschland)

#### Inhalt des Test-Kits:

- Mikrotiterstrips (8 x 12 Wells), beschichtet mit Kaninchen-anti-Progesteron Antikörpern
- Progesteron Serum-Standards (0,3; 1,25; 2,5; 5; 15; 40 ng/ml) je 1 ml
- Enzym-Konjugat, 25 ml, enthält Progesteron, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP)
- Nullstandard, 1 ml
- Waschlösung (40-fach konzentriert), 30 ml
- Substratlösung, 25 ml, enthält Tetramethylbenzidine
- Stopplösung, 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14 ml

Destilliertes Wasser aus Eigenproduktion

Pipette 1-200 µl von Eppendorf

Pipette 10-1000 µl von Eppendorf

Pipettenspitzen 200 µl und 1000 µl von Eppendorf

Microtiter Plate Reader Dynatech MR 7000

Software von Dynatech



### *Durchflusszytometrie*

Falconröhrchen 15 ml

FACS-Röhrchen

Pipette 1-200 µl von Eppendorf

Pipettenspitzen 200 µl von Eppendorf

FACS-Puffer: PBS mit 10 g/l BSA 1% von Sigma, 1,86 g/l EDTA 5 mmol von Sigma, 1 g/l Na-Acid 0,1% von Sigma, pH 7,2

PBS von Dulbecco

Monoklonaler Antikörper gegen CD8 (PE-labeled) von Becton Dickinson

Monoklonaler Antikörper gegen CD57 (FITC-labeled) von Becton Dickinson

Monoklonaler Antikörper gegen CCR5 (FITC-labeled) von BD Biosciences PharMingen

Monoklonaler Antikörper gegen CCR4 (Biotin-labeled) von BD Biosciences PharMingen

PerCP von Becton Dickinson

Simultest Control  $\gamma_1/\gamma_1$  von Becton Dickinson

Cytometer FACS Calibur von Becton Dickinson

Software CellQuest

Zentrifuge Hettich Rotixa/RP

## **2.6 Perceived Stress Questionnaire (PSQ)**

Um das Ausmaß des Stresses zu beurteilen wurde der etablierte Levenstein Perceived Stress Questionnaire (Fragebogen zum wahrgenommenen Stress) benutzt. Der PSQ misst den subjektiv empfundenen Stress unabhängig von einer spezifischen oder objektivierbaren Situation. Der 1993 von Levenstein et al. entwickelte Perceived Stress Questionnaire (PSQ) enthält 30 Aussagen zu sieben verschiedenen Skalen: „Schikanie“ (Harassment), „Überlastung“ (Overload), „Reizbarkeit“ (Irritability), „Mangel an Freude“ (Lack of Joy), „Erschöpfung“ (Fatigue), „Sorgen“ (Worries), „Anspannung“ (Tension). Auf einer 4-Punkte-Skala soll angegeben werden, ob die Aussage fast nie, manchmal, oft oder normalerweise zutrifft. Aus allen Skalen wird ein Stress-Score errechnet, der zwischen 0 und 1 liegt und im Ergebnisteil mit 100 multipliziert dargestellt ist.

Die Aussagen sind so formuliert, dass sie unbeeinflusst von Alter, Geschlecht, Beschäftigung und Lebensphase verglichen werden können. Dabei sind die Aussagen sehr allgemein gehalten, z. B. „Sie fühlen sich durch Fristen unter Druck gesetzt“, so dass individuell die Lebenssituation bewertet werden kann, die als stressreich empfunden wird. Der PSQ stellt die individuelle kognitive Verarbeitung mehr in den Vordergrund als den Gemütszustand oder Lebensereignisse

(Levenstein et al. 1993). Der ursprüngliche Levenstein Perceived Stress Questionnaire wird im Folgenden als PSQ-Score bezeichnet.

Fliege et al. haben kürzlich den ursprünglichen PSQ erneut übersetzt, revidiert und standardisiert. Der neue PSQ enthält nur noch vier Unterskalen („Sorgen“, „Anspannung“, „Mangel an Freude“ und „Anforderungen“) mit jeweils fünf Fragen zu jeder Skala. Die Skala „Sorgen“ umfasst die Zukunft betreffende Sorgen, Gefühle von Verzweiflung und Frustration. Die Skala „Anspannung“ betrifft Unruhe, Erschöpfung und Mangel an Entspannung. Die Skala „Mangel an Freude“ bzw. „Freude“ ist positiv formuliert und fragt nach positiven Gefühlen der Herausforderung, Freude, Energie und Sicherheit. Die Skala „Anforderungen“ umfasst die empfundenen Anforderungen aus der Umgebung, Mangel an Zeit und Überlastung. Dabei repräsentieren die drei Skalen „Sorgen“, „Anspannung“ und „Mangel an Freude“ intrapersonelle Stressreaktionen, während die Skala „Anforderungen“ einen externalen Stressor darstellt (Fliege et al. 2005). Der Perceived Stress Questionnaire wurde von den Studienteilnehmerinnen selbst ausgefüllt und ergab einen Punktwert, der den selbst beurteilten Stress quantifizierte.

### **2.7 Datenbank**

Zur elektronischen Speicherung und Verarbeitung der Studiendaten wurde das Programm „Access“ (Windows) benutzt.

### **2.8 Statistische Tests**

Für die statistische Analyse wurde das Programm „SPSS“ verwendet. An statistischen Tests wurden der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben und die binäre logistische Regression mit der Methode „Rückwärts Schrittweise“ angewendet.

Den Studienteilnehmerinnen der Gruppe „Frauen mit konsekutivem Abort“ wurden bezüglich Schwangerschaftswoche und Alter jeweils eine Kontrolle zugeordnet, um zwei etwa gleich große Gruppen zu erhalten. In allen anderen Parametern sind die beiden Gruppen jedoch nicht übereinstimmend, so dass sie als unverbundene Stichproben betrachtet werden. Da die Werte keiner Normalverteilung folgen, wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben zum Vergleich der Werte von CRH, Progesteron, CD8, CCR5, CCR4, CD57 und PSQ-Score in den beiden Gruppen angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $P < 0,05$  festgelegt und ist grafisch durch einen Stern gekennzeichnet.  $P < 0,01$  ist durch zwei bzw.  $P < 0,001$  durch drei Sterne gekennzeichnet. Durch den Boxplot sind Median, 25. Perzentile, 75. Perzentile, Minimum und Maximum dargestellt.

## Material und Methoden

Die logistische Regression prüft, inwieweit die Ausprägung der abhängigen Variable auf die Ausprägung einer oder mehrerer unabhängiger Variablen zurückzuführen ist. Da die abhängige Variable in dieser Studie nur zwei Ausprägungen annehmen kann (Abort: ja / nein), wurde die binäre logistische Regression mit der Methode: Rückwärts Schrittweise (Likelihood-Quotient) verwendet.

Da die Fallzahlen zu gering sind, um alle unabhängigen Variablen in einen Schritt einzubeziehen, wurde die logistische Regression gebietsweise mit je drei unabhängigen Variablen pro Schritt durchgeführt. Als signifikant wurde eine Wahrscheinlichkeit bis  $P \leq 0,1$  angesehen. Variablen ohne signifikanten Einfluss auf die Zielvariable wurden in jedem Schritt eliminiert. Mit den Variablen, die einen signifikanten Einfluss auf die Zielvariable hatten, wurde erneut die logistische Regression durchgeführt.

So lässt sich anhand der binären logistischen Regression ein Vorhersagemodell darstellen, mit dem die Wahrscheinlichkeit, einen Abort zu erleiden, mit Hilfe der vorhandenen Parameter abgeschätzt werden kann.