

3. Material und Methoden

3.1 Studienkollektiv

Die Probandinnen wurden über die Diabetes- Sprechstunde der Klinik für Geburtsmedizin der Charité, Campus Virchow Klinikum, sowie des Vivantes- Klinikums Neukölln rekrutiert.

Im Zeitraum von Januar 2000 bis Februar 2003 konnten zunächst 187 Patientinnen in die Studie eingeschlossen werden. Hauptkriterium für die Aufnahme in die Studie war das Vorhandensein eines Gestationsdiabetes, diagnostiziert durch den pathologischen Ausfall von mindestens zwei von drei Werten eines zuvor durchgeführten 75g oGTT. Maßgeblich waren die von Carpenter und Coustan aufgestellten Kriterien (siehe auch 2.1.4: Diagnose des GDM). Von 128 der initial in die Studie aufgenommen Frauen lag zum Auswertungszeitpunkt Nabelschnurblut in Kombination mit den weiteren zu betrachtenden Daten vor, so dass diese im Folgenden das Studienkollektiv darstellen.

Die Rekrutierung der Frauen erfolgte in der Regel eine Woche nach der obligaten Diätberatung der Schwangeren und der Erstellung von zwei Blutzucker- Tagesprofilen aus dem kapillären Blut der Fingerbeere, um die Ausschlusskriterien Nüchtern- BZ > 120 mg/dl und 2 h pp > 200 mg/ dl erfassen zu können. Werte in dieser Höhe sind mit einer hohen Wahrscheinlichkeit durch einen präexistenten Diabetes bedingt; diese Schwangerschaften galten als Hochrisikoschwangerschaften und waren von der Betreuung in der Studie ausgenommen.

3.2 Management des Gestationsdiabetes

Die diabetische Stoffwechsellage der Studienteilnehmerinnen wurde diagnostiziert anhand des Ausfalls des durchgeführten oralen Glukosetoleranztestes, des oGTT. Nur ein die Grenzwerte erreichender oder überschreitender Wert entspricht hierbei einer gestörten Glukosetoleranz (IGT = Impaired Glucose Tolerance), zwei oder mehr pathologische Werte bedeuten einen manifesten Gestationsdiabetes (GDM). Patientinnen mit einer IGT wurden von der Studie ausgenommen.

Der oGTT wurde teilweise durch die niedergelassenen Frauenärzte, teils durch die an der Studie beteiligten Schwangerenberatungen morgens nach einer mindestens achtstündigen Nahrungskarenz durchgeführt. Die Blutglukosewerte wurden nüchtern vor Durchführung des Tests sowie eine und zwei Stunden, evtl. auch drei Stunden nach dem Ende des Trinkens der

Testlösung (75g wasserfreie Glukose, gelöst in 300 ml Wasser) durch die Hexokinase-Methode bestimmt.

Alle Schwangeren erhielten bei Aufnahme in die Studie eine ausführliche Diätberatung sowie eine Einführung in die Blutzuckerselbstkontrolle. Des Weiteren wurden Blutproben gewonnen zur Bestimmung des HbA1c-Wertes, der Lipide und des maternalen Leptins, und es wurde ein erster Ultraschall durchgeführt. Blutentnahmen und sonografische Fetometrien wurden im weiteren Verlauf der Schwangerschaft in vierwöchigen Abständen in den folgenden Schwangerschaftswochen wiederholt:

16, 20, 24, 28, 32, 36, 39.

Die Randomisierung der Probandinnen erfolgte als Blockrandomisierung in Abhängigkeit von dem zum Rekrutierungszeitpunkt bestehenden Gestationsalter der Schwangerschaft. Insgesamt ergaben sich sechs verschiedene Blöcke:

< 16 SSW 16/0- 19/6 20/0- 23/6 24/0- 27/6 28/0- 31/6 32/0- 35/6.

Innerhalb eines jeden Blockes wurden die Probandinnen per Zufallsprinzip einer der beiden Therapieformen (Standardgruppe oder Ultraschallgruppe) zugewiesen.

Probandinnen, die ausschließlich mit Diät behandelt wurden, wurden angehalten, zwei Blutzuckertagesprofile pro Woche zu erstellen. Auf Insulin eingestellte Probandinnen hingegen mussten täglich ein Tagesprofil durchführen. Jedes Tagesprofil bestand aus sechs bis sieben Werten: einem morgendlichen Nüchternwert, zwei präprandialen und drei postprandialen Werten (jeweils zwei Stunden nach der Mahlzeit) sowie eventuell einem Spätwert.

Die dabei anfallenden Werte wurden abhängig von dem jeweiligen Gestationsalter der Schwangerschaft in den sieben verschiedenen Schwangerschaftskategorien der Datei dokumentiert und in eine SPSS-Datei eingegeben:

12/0- 15/6 16/0- 19/6 20/0- 23/6 24/0- 27/6 28/0- 31/6 32/0- 35/6 36/0- 39/6.

Für jede dieser Kategorien wurden die Mittelwerte der Nüchtern- sowie die der postprandialen Messungen errechnet und in der Datenbank festgehalten.

Patientinnen der Standardgruppe wurden auf Insulin eingestellt, wenn trotz des Einhaltens der Diät je zwei Werte in zwei Tagesprofilen oder je ein Wert in vier Tagesprofilen die Grenzwerte (nüchtern < 90 mg/ dl, 2 h pp < 120 mg/ dl) überschritten.

Bei Patientinnen der Ultraschallgruppe hingegen erfolgte die Einstellung auf Insulin, wenn der aus drei Ultraschallmessungen gemittelte Abdominalumfang des Feten über der 75. Perzentile für das entsprechende Gestationsalter lag. Eine mütterliche Gefährdung wurde bei Nüchtern-Blutzuckerwerten ≥ 120 mg/ dl sowie 2 h pp ≥ 200 mg/ dl an mindestens zwei Tagen angenommen; in diesen Fällen wurde auch in der Ultraschallgruppe eine Insulintherapie mit der Indikation der mütterlichen Hperglykämie vorgenommen.

Die Insulineinstellung erfolgte in beiden Gruppen mit einem Basalinsulin sowie einem kurzwirksamen Insulin zu den Mahlzeiten unter täglicher Tagesprofilkontrolle. In Abhängigkeit von dem Ausfall der Tagesprofile wurden die Probandinnen zwei- bis vierwöchentlich zur Verlaufskontrolle wiedereinbestellt.

3.3 Erhebung und Dokumentation der Daten

Vor Rekrutierungsbeginn wurden Datenerhebungsbögen erstellt. Die im Verlauf erhobenen Daten wurden mit Zahlen kodiert und in vier verschiedenen Dateien (Anamnese, Glykämie, Ultraschall, Entbindung) des Statistikprogramms SPSS (siehe auch 3.7: Statistische Auswertung) gespeichert. Die Probandinnen mussten nach ausführlicher Aufklärung über den Studienablauf ihr Einverständnis an der Teilnahme schriftlich bestätigen.

3.3.1 Anamneseparameter

In der allgemeinen Anamnese wurden u.a. eine eventuelle diabetische familiäre Vorbelastung der Probandin sowie Gewicht und Größe vor und nach der Schwangerschaft erfasst. Daneben fand sich eine geburtshilfliche Anamnese mit Angaben zur aktuellen Gravidität und u.a. auch Daten aus früheren Schwangerschaften, die in Zusammenhang mit einer gestörten Glukosehomöostase stehen könnten, wie z.B. ein bereits aufgetretener GDM oder die Geburt makrosomer Kinder.

3.3.2 Parameter des Glukosestoffwechsels

Erfasst wurden der Zeitpunkt (abgeschlossene SSW) und der Ausfall des 50g- Screeningtestes sowie des ersten und, falls durchgeführt, auch des zweiten 75g oGTT mit der jeweiligen Indikation, unter der der Test durchgeführt wurde, sowie die Interpretation der Werte unter Berücksichtigung der Grenzwerte nach Carpenter und Coustan.

Bei Aufnahme der Patientin und parallel zu den Ultraschalluntersuchungen wurde in vierwöchigen Abständen der HbA1c- Wert bestimmt. Dieser Wert gibt den Anteil des glykierten Hämoglobins am Gesamt- Hämoglobin an und spiegelt die Blutzuckerstoffwechsellage der letzten bis zu acht Wochen wider.

Die Bestimmung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Gerät Variat Biop Rad und Reagentien der Firma Abbott.

Je nach Labormethode liegen die Referenzwerte für HbA1c < 6,5 %.

Die kapillären Blutzuckerwerte wurden erhoben durch Blutzuckerselbstkontrolle der Probandinnen mit dem Messgerät Accutrend Sensor ® der Firma Roche.

Dafür wurde jeweils ein Tropfen kapilläres Vollblut aus der Fingerbeere auf den entsprechenden Accutrend Sensor ® Comfort Glukose Teststreifen aufgebracht. Testprinzip ist das der Bioamperometrie: Durch das Enzym Glukose- Dehydrogenase, das im Teststreifen enthalten ist, wird die Glukose in der Blutprobe in Glukonolakton umgesetzt. Diese Reaktion erzeugt einen schwachen Strom, dessen Stärke abhängig ist von der umgesetzten Substratmenge – also von der vorhandenen Menge an Glukose - und mit Hilfe dessen der Blutzuckerwert berechnet wird.

Der Messbereich des Gerätes wird vom Hersteller angegeben zwischen 10 und 600 mg/ dl Glukose (Accutrend Sensor ®).

Dokumentiert wurden die Indikation für die Einstellung auf Insulin, die anfängliche Dosierung und die Enddosis. Dabei erfolgte eine Zusammenfassung der Einzeldosen des basalen langwirksamen und des kurzwirksamen Insulins.

3.3.3 Ultraschallparameter

Verwendet wurde das Gerät Acuson 128 XP/ 10 mit 3 bzw. 4 MHz Transducer.

Bestimmt und dokumentiert wurden bei der fetalen Biometrie jeweils biparietaler Durchmesser des Kopfes (BIP) , Kopfumfang (KU), querer fetaler Abdominaldurchmesser (AC), Abdominalumfang (AU) mit der dem Gestationsalter entsprechenden Perzentile,

Femurlänge (FL), das Vorliegen eines Poly- bzw. Oligohydramnions, die fetale Lage sowie dopplersonografisch der RI (resistance index) in der Arteria umbilicalis.

Der abdominale Umfang wurde auf der Höhe des Eintrittes der Umbilikalvene in den Sinus venae portae gemessen (Hansmann 1976). Es erfolgten jeweils drei Messungen, deren Werte anschließend gemittelt wurden. Als makrosom wurden Abdominalumfangswerte gleich der oder über der 75. Perzentile (nach Hadlock) gewertet.

Des Weiteren wurde das subkutane Fettgewebe am ventralen Abdomen auf Höhe der Messung des Abdominalumfangs (siehe oben) und am Oberschenkel in der Mitte des Femurknochens gemessen. Am Femur wurde zusätzlich der prozentuale Anteil des subkutanen Fettgewebes am Gesamtumfang bestimmt.

3.3.4 Entbindungsparameter

Die Entbindungsdaten lassen sich unterteilen in Daten, die die Entbindung an sich betreffen, und solche, die das Kind betreffen.

Unter ersteren wurden Geburtenbuchnummer, Entbindungsdatum, die Aufnahmeindikation, eventuell aufgetretene Komplikationen, der Entbindungsmodus und bei operativer Entbindung die Indikation für diese dokumentiert.

Die neonatalen Parameter umfassten Outcome, Geschlecht, Geburtsgewicht samt Perzentile nach Voigt, Länge, BMI samt BMI- Perzentile nach Voigt, das längenbezogene Geburtsgewicht samt Perzentile nach Voigt, APGAR- Score und das rechnerische wie auch das Gestationsalter nach Reifezeichen sowie kongenitale Fehlbildungen.

Des Weiteren wurden im Nabelschnurblut der pH- Wert und Base Excess, der Laktat- sowie der Hämoglobin- und der Hämatokritwert erfasst.

Dokumentiert wurden auch die neonatalen Blutzuckerwerte 1, 2, 6 und 8 Stunden nach der Geburt und eventuell aufgetretene Hypoglykämien (≤ 40 mg/dl bzw. ≤ 30 mg/dl) sowie die Notwendigkeit einer intravenösen Glukoseinfusion.

Weitere erfasste Parameter waren der höchste aufgezeichnete Bilirubinwert und eine bei Hyperbilirubinämie erfolgte Phototherapie.

Bei Verlegung des Neugeborenen in die Kinderklinik wurden die Indikation für die Verlegung, die Diagnose und die Dauer des Aufenthaltes dort erfragt.

Innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Geburt wurden bei den Neugeborenen anthropometrische Messungen durchgeführt. Vermessen wurden Länge und Umfang des Femurs und die Umfänge von Kopf und Abdomen.

Als Maß für den Anteil des Fettgewebes am Geburtsgewicht erfolgte zudem die Messung der Hautfaltendicke der Neugeborenen mit einem Wilken Skinfold Caliper an vier Lokalisationen: 1. im Bereich des M. triceps brachii in der Mitte zwischen Akromion scapulae und Olecranon humeri, 2. Im Bereich der Flanke oberhalb des Beckenkamms in der mittleren Axillarlinie, 3. subscapular und 4. in der Mitte des Oberschenkelknochens. Dabei wurde die Haut mit Daumen und Zeigefinger vom darunterliegenden Muskel abgehoben und der Skinfold Caliper an die entstandene Hautfalte angesetzt. Es wurden je drei Messungen über ca. 20 Sekunden durchgeführt, aus denen ein Mittelwert errechnet wurde.

3.4 Leptinbestimmung

3.4.1 Probensammlung

Jeweils bei Studienaufnahme sowie parallel zu den in vierwöchigem Abstand erfolgenden Ultraschalluntersuchungen wurde aus der Kubitalvene der Patientin Blut entnommen, aus dem EDTA-Plasma- sowie Serumproben gewonnen wurden. Die Proben wurden über zehn Minuten bei 3500 U/ min zentrifugiert, und der verbleibende Überstand wurde bis zur Messung der Stoffwechselfparameter bei -80°C gelagert.

Unmittelbar nach der Entbindung entnahmen wir aus der Nabelschnur Blut, das wie oben beschrieben weiterbehandelt wurde.

3.4.2 Methodik der Leptinbestimmung

Verwendet wurde der Quantikine Human Leptin ELISA (= Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) der Firma R & D. Das Prinzip des ELISA beruht auf einer Kettenreaktion. Zunächst wird dabei ein für humanes Leptin spezifischer monoklonaler Antikörper an eine feste Phase gebunden und dann mit dem Probenmaterial inkubiert. Ist in diesem humanes Leptin enthalten, so wirkt es als Antigen und wird in einer Antigen- Antikörper- Reaktion an die immobilisierten Antikörper der festen Phase gebunden.

Nachgewiesen wird das gebundene Leptin durch Hinzufügen eines weiteren für Leptin spezifischen monoklonalen Antikörpers, an den ein Enzym gebunden ist. Dieses Enzym katalysiert seinerseits eine Reaktion, bei der ein Farbstoff entsteht, dessen Intensität proportional zu der im ersten Schritt gebundenen Menge an Leptin ist. Die Intensität wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

3.5 Insulin- und Glucosebestimmung

Als Methode angewendet wurde zur Bestimmung des Insulins sowohl im maternalen als auch im Nabelschnur- EDTA- Plasma des Neugeborenen ein Radioimmunoassay (RIA) der Firma Pharmacia.

Die Glukosewerte wurden mit der Hexokinasemethode bestimmt.

3.6 Bestimmung der Fette

Für die Bestimmung sowohl des Gesamt- Cholesterins als auch der Triglyceride benutzten wir unter Verwendung von Lithium- Heparin- Plasma einen enzymatischen Farbttest. Die LDL- Berechnung erfolgte nach der Friedewald- Formel, die Berechnung des HDL per Immuninhibitionstest, dessen Prinzip auf einem enzymatischen Farbttest nach immunologischer Maskierung beruht.

3.7 Statistische Auswertung

Die Gesamtheit der erhaltenen Daten wurde in SPSS 12.0 (Statistical Package for the Social Sciences), einem Programmsystem zur statistischen Datenanalyse, in vier verschiedenen Datenbanken gespeichert. Diese enthielten 1. maternale Anamneseparameter sowie Angaben zur aktuellen Schwangerschaft, 2. Parameter des Glukosestoffwechsels , 3. Ultraschall-Parameter und 4. Entbindungsdaten und neonatale Parameter.

Die Auswertung der Charakteristika zur Beschreibung des Studienkollektivs erfolgte mittels statistischer Häufigkeitsverteilungen.

An statistischen Testverfahren wurden die bivariate Korrelation und die lineare Regression verwendet, mittels derer der Grad des Zusammenhanges zwischen der Nabelschnurleptinkonzentration einerseits und den verschiedenen Variablen andererseits untersucht und durch den Korrelationskoeffizienten jeweils als signifikant oder nicht signifikant beschrieben wurde.

Zur Evaluation eines signifikanten Unterschiedes der Nabelschnurleptinkonzentration zwischen zwei Untergruppen (z.B. männlich/ weiblich, AGA-/ LGA) kam der t- Test zum Einsatz.

Als Signifikanz- Niveau wurde ein p- Wert $< 0,05$ definiert.