

Aus der Klinik für Geburtsmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Geschlechtsspezifischer Effekt eines antenatalen Zyklus  
Betamethason auf den plazentaren Cortisolstoffwechsel

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Dawn Sophie Braun

aus Berlin

Datum der Promotion: 18.12.2020

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	3
Abstract .....	4
Manteltext .....	5
1. Darstellung des Forschungsstandes .....	5
2. Methodik .....	9
3. Relevante Ergebnisse .....	15
4. Klinische Relevanz und weiterführende Fragestellungen .....	18
5. Abbildungsverzeichnis .....	24
6. Literatur .....	24
Eidesstattliche Versicherung .....	28
Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation .....	29
Auszug aus der Journal Summary List 2016 .....	30
Publikation .....	31
Lebenslauf .....	46
Publikationsliste .....	47
Danksagung .....	48

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Zur Senkung der neonatalen Morbidität und Mortalität durch Frühgeburtlichkeit wird die antenatale Steroidgabe mit Betamethason (BET) zwischen der 24+0 und 34+0 Schwangerschaftswoche (SSW) empfohlen. Eine Ausweitung auf späte Frühgeburten nach der 34+0 SSW wird diskutiert. Allerdings gibt es Hinweise, dass insbesondere hohe Dosen antenatal verabreichter Glukokortikoide zu einer bleibenden Dysregulation der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) führen und somit Auswirkungen auf die Entwicklung von adulten Erkrankungen haben könnten. Bei der Transmission dieses Glukokortikoid-Effektes könnten die plazentaren 11 $\beta$ -Hydroxysteroidhydrogenasen (11 $\beta$ -HSD) von Bedeutung sein.

**Methoden:** An 86 mit einem antenatalen Zyklus BET (2x12 mg i.m. im Abstand von 24 Stunden) behandelten Schwangeren wurden die Auswirkungen auf die neonatale und plazentare Anthropometrie sowie auf das neonatale Outcome (pH, APGAR) im Vergleich zu 92 nach Gestationsalter gepaarten Kontrollen untersucht. Mittels ELISA wurden maternale und umbilikale ACTH- und Cortisolkonzentrationen bestimmt. Die plazentaren 11 $\beta$ -HSD1/2-Proteinlevel wurden mittels Western Blot gemessen. Darüber hinaus wurde durch einen radioaktiven Assay die 11 $\beta$ -HSD2-Enzymaktivität analysiert. Untergruppen wurden nach Gestationsalter und Geschlecht getrennt untersucht.

**Ergebnisse:** Bei weiblichen Reifgeborenen war der Kopfumfang nach BET-Behandlung verringert. In dieser Subgruppe war auch die plazentare 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge und -Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert. Bei männlichen mit BET-behandelten Frühgeborenen zeigten sich eine verringerte Körperlänge und erhöhte plazentare 11 $\beta$ -HSD2-Proteinwerte. Es ließen sich keine signifikanten Veränderungen bei den plazentaren Maßen, den 11 $\beta$ -HSD1-Proteinmengen oder den venösen ACTH- und Cortisolkonzentrationen feststellen.

**Diskussion:** Bereits ein antenataler Zyklus BET war mit geschlechtsspezifischen Veränderungen der 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge und der neonatalen Anthropometrie assoziiert. Die verminderte 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge und -Aktivität bei weiblichen Reifgeborenen könnte zu einer Dysregulation der fetalen HPA-Achse mit einem erhöhten Morbiditätsrisiko im Alter beitragen. Die potenziellen Konsequenzen einer erhöhten 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge bei männlichen Neugeborenen sind unerforscht. Als mögliche Ursache der geschlechtsspezifischen BET-Effekte wird eine unterschiedliche epigenetische Regulation von 11 $\beta$ -HSD2 diskutiert. In Anbetracht dieser offenen Fragen und den potenziellen negativen Langzeitauswirkungen ist die aktuelle Diskussion um eine BET-Gabe nach der 34+0 SSW mit Vorsicht zu führen.

## Abstract

**Introduction:** Antenatal administration of betamethasone (BET) is recommended between 24+0 and 34+0 weeks of gestation (wks) to reduce neonatal morbidity and mortality in preterm birth. Because of the documented benefits, using antenatal glucocorticoid-treatment for late preterm birth after 34+0 wks is currently being considered. However, antenatal administration of BET could lead to a persisting dysregulation of the fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis) and affect morbidity risk in later life. The placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid hydrogenases (11 $\beta$ -HSD) could play a decisive role in transmitting this BET effect.

**Methods:** The effects of one antenatal BET cycle (2x12 mg i.m. in 24 h) on outcome parameters (pH, APGAR), neonatal and placental anthropometry were investigated in 86 BET-exposed pregnancies and 92 gestational age-matched controls. Maternal and umbilical ACTH- and cortisol-levels were determined by ELISA. 11 $\beta$ -HSD1/2 protein levels were measured by Western blot and a radiometric conversion assay was used to examine 11 $\beta$ -HSD2 enzyme activity. Subgroups were analyzed according to gestational age and prematurity.

**Results:** Head circumference and placental 11 $\beta$ -HSD2 protein level and activity were reduced in BET-treated term born females. Preterm males treated with BET showed reduced body length and increased placental 11 $\beta$ -HSD2 protein levels. We found no differences in placental dimensions, 11 $\beta$ -HSD1 protein level or venous ACTH and cortisol levels between groups.

**Discussion:** We observed sex-specific alterations of placental 11 $\beta$ -HSD2-levels and neonatal anthropometry after one antenatal cycle of BET. The reduced 11 $\beta$ -HSD2 protein amount and activity in term born females could contribute to a dysregulation of the fetal HPA axis with increased morbidity and mortality risk in later life. The consequences of increased 11 $\beta$ -HSD2 protein levels in males are unknown. A potential mediator of this sex-specific BET-effect could be the epigenetic regulation of 11 $\beta$ -HSD2. Considering the remaining gaps of knowledge and the potential long-term effects, the current discussion on antenatal BET-treatment after 34+0 wks should be viewed with caution.

## **Manteltext**

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in dem Artikel „Sex-specific and lasting effects of a single course of antenatal betamethasone treatment on human placental 11 $\beta$ -HSD2“ publiziert [1]. Dieser Manteltext dient zur Einordnung, Darstellung der Methodik und Diskussion der sich aus dieser Publikation ergebenden wissenschaftlichen Fragestellungen.

### **1. Darstellung des Forschungsstandes**

#### **1.1. Antenatale Steroidtherapie mit Betamethason**

Bei drohender Frühgeburt zwischen der 24+0 und 34+0 Schwangerschaftswoche (SSW) wird ein Zyklus Betamethason (BET) zur Lungenreifeinduktion und Prävention weiterer neonataler Komplikationen empfohlen [2]. Dieser therapeutische Ansatz ist auf Sir Graham Liggins zurückzuführen, der 1969 nach antenataler, maternaler Steroidgabe (ANS) im Tiermodell eine verbesserte Lungenfunktion frühgeborener Schafe demonstrierte und diese 1972 auch in einer randomisierten, kontrollierten Studie am Menschen nachweisen konnte [3, 4]. Glukokortikoide regen hierbei sowohl die vorzeitige Surfactant-Bildung, als auch eine Reifung der Lungenstruktur an [5]. Darüber hinaus senkt die ANS-Gabe nachweislich die Frühgeborenenmortalität und –morbidity und zählt daher zu den entscheidenden Schritten in der Etablierung der modernen Perinatalmedizin [6]. 2017 lag der entsprechende Anteil von Frauen, die bei drohender Frühgeburt eine ANS-Therapie erhalten haben, bei 4,5 % aller Geburten an der Charité [7]. Von allen Frühgeborenen, die 2017 vor der 34+0 SSW geboren wurden, hatten 72,1 % eine ANS-Therapie erhalten [7]. Aktuell wird eine Ausweitung der ANS-Gabe auf späte Frühgeburten nach der 34+0 SSW und andere Indikationsstellungen, wie Kaiserschnittenbindungen am Termin, in Betracht gezogen [8, 9].

#### **1.2. Das Konzept der fetalen Prägung**

Die Therapie mit ANS führte in mehreren Studien jedoch auch zu einer Reduktion von Geburtsgewicht, Kopfumfang und Körperlänge, weshalb eine Glukokortikoidexposition des Fetus in der Schwangerschaft unter anderem als wichtiger Faktor der fetalen Prägung diskutiert wird [10-15]. Das Konzept der fetalen Prägung basiert hierbei auf Arbeiten von Günter Dörner und David Barker, die unabhängig voneinander die Hypothese aufgestellt haben, dass bestimmte Faktoren des intrauterinen Milieus Einfluss auf die fetale Entwicklung und damit auf das Morbiditätsrisiko im späteren Leben haben [16, 17]. Die daraus entwickelte „Developmental Origins of Health and Disease“ (DOHAD)-Hypothese nimmt an, dass bestimmte Faktoren zu vulnerablen Zeitpunkten in der Schwangerschaft zu nachhaltiger Veränderung der fetalen Organe und endokrinen Achsen führen [18]. Bedingt durch die

Fehlanpassung an das extrauterine Milieu könnten diese Veränderungen nach der Geburt zu Erkrankungen im höheren Lebensalter beitragen [15, 19]. In diesem Zusammenhang werden Auswirkungen auf die Entwicklung kardiovaskulärer und stoffwechselbedingter Erkrankungen diskutiert [14, 19, 20].

### **1.3. Der Effekt der ANS-Gabe auf die fetale HPA-Achse**

Aufgrund der Schlüsselrolle der Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) in der Stressregulation wird diese als bedeutsame Endstrecke der fetalen Prägung gesehen [10, 13]. Eine persistierende HPA-Achsendysregulation könnte zur Ausprägung kardiologischer, metabolischer oder psychischer Erkrankung im adulten Leben führen [13, 15, 21].

Untersuchungen an reifen Neugeborenen weisen darauf hin, dass eine ANS-Gabe die Entwicklung der fetalen HPA-Achse beeinflussen könnte, allerdings mit kontroversen Ergebnissen. Davis et al. demonstrierten dabei bereits nach einem Zyklus BET im Speichel der Neugeborenen eine gesteigerte Cortisolantwort auf Stress, während Schäffer et al. in einem ähnlichen Kollektiv eine im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen verminderte Cortisolantwort feststellten [22, 23]. Auch bei Grundschulkindern, die nach BET-Gabe reif geboren wurden, ließen sich im Vergleich zu Kontrollen sowohl ein flacheres Cortisol-Tagesprofil als auch eine gesteigerte Cortisolantwort auf Stressoren nachweisen [24, 25]

### **1.4. 11 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen und die Rolle der Plazenta**

Es gibt zahlreiche Theorien, wie die Gabe von ANS die fetale HPA-Achse modulieren und zu einer Wachstumsreduktion führen könnte [10, 15, 26]. Einen besonderen Stellenwert scheint hier die Rolle der Plazenta einzunehmen. So zeigten Jobe et al. in einer Schafsstudie, dass im Gegensatz zur maternalen Applikation von Glukokortikoiden bei einer fetalen Applikation weder die Lungenreifeinduktion noch eine Wachstumsreduktion eintreten, was auf eine Schlüsselfunktion der Plazenta bei der Vermittlung des ANS-Effektes hinweisen könnte [27]. Von besonderer Bedeutung ist dabei der plazentare Cortisolstoffwechsel, da er in die Entwicklung der fetalen HPA-Achse involviert ist. Die HPA-Achse bildet sich bereits in der Frühschwangerschaft, eine relevante fetale Cortisolproduktion beginnt jedoch erst um die 22.-24. SSW [13]. Die ungestörte Entwicklung der fetalen HPA-Achse wird durch ein plazentares Enzym, die sogenannte 11 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 (11 $\beta$ -HSD2), ermöglicht [13]. Dieses Enzym inaktiviert maternales Cortisol zu Cortison, sodass nur 10-20 % des maternalen Cortisols über die Plazenta zum Fetus gelangen (Abbildung 1) [15]. Bei Störungen dieser plazentaren Barriere durch Mangel an 11 $\beta$ -HSD2 käme es dementsprechend zu einem Cortisolüberschuss im fetalen Kreislauf, der zu einer

Wachstumsreduktion sowie einer Suppression der fetalen Hypophyse und Nebennierenrinde führen würde [13, 28, 29].

Als möglicher Gegenspieler der 11 $\beta$ -HSD2 gilt das zweite Enzym des placentaren Cortisolstoffwechsels, die 11beta-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 1 (11 $\beta$ -HSD1), die die Reduktion von Cortison zu Cortisol katalysiert (Abbildung 1). Die hierbei entstehende lokale Erhöhung des Cortisolspiegels ist vermutlich bei der fetalen Organreifung und endokrinen Einleitung des Geburtsmechanismus von Bedeutung [28].

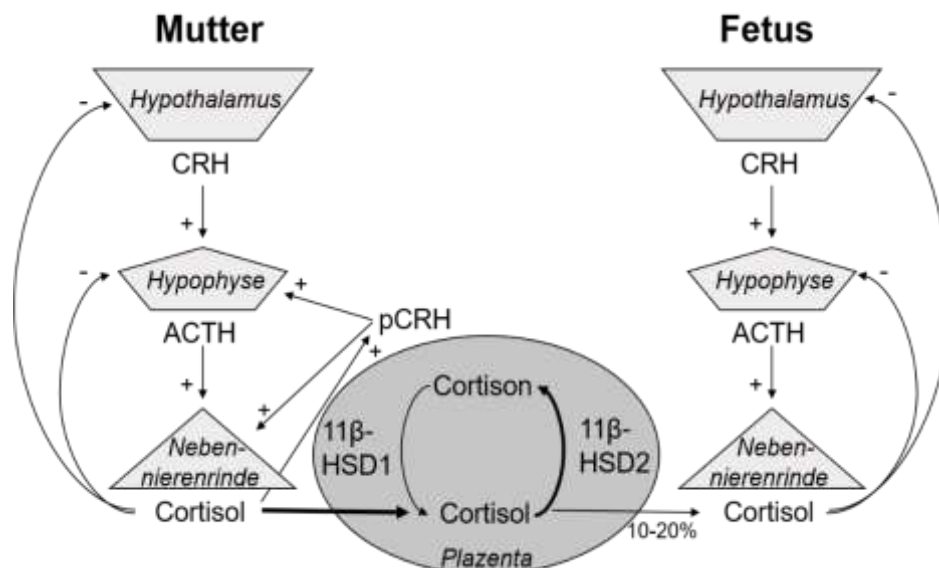


Abbildung 1. Die placentare Cortisol-Barriere zwischen maternaler und fetaler HPA-Achse. Nur 10-20 % des maternalen Cortisols passieren die Plazenta, der größte Teil wird durch die 11 $\beta$ -HSD2 in Cortison umgewandelt. Maternales Cortisol führt zur Ausschüttung von placentarem CRH (pCRH), das über Stimulation der maternalen Hypophyse und Nebennierenrinde zu einer verstärkten Bildung von ACTH und Cortisol im Sinne einer positiven Feedbackschleife führt [15].

### 1.5. Auswirkungen von BET auf den placentaren Cortisolstoffwechsel

Inwieweit BET oder die antenatale Gabe anderer Glukokortikoide eine Auswirkung auf den placentaren Cortisolstoffwechsel haben, wurde bislang vor allem in tierexperimentellen Studien, mit zum Teil kontroversen Ergebnissen, untersucht [30-32]. Die Applikation von Dexamethason führte in-vitro an humanen placentaren Trophoblasten zu einem Anstieg der 11 $\beta$ -HSD2-mRNA-Menge und -Aktivität [33]. In-vivo ließ sich andererseits im Rahmen einer Studie zum Amnioninfektionssyndrom nach antenataler Gabe von BET keine Veränderung im 11 $\beta$ -HSD1- und 11 $\beta$ -HSD2-Proteinlevel der Frühgeborenen nachweisen [34].

Allerdings fand in oben genannter Studie keine geschlechtsspezifische Analyse der möglichen BET-Effekte statt, obwohl es Hinweise für eine geschlechtsabhängige Anpassung der Plazenta an Veränderungen des intrauterinen Milieus gibt [35, 36]. So zeigte sich beispielsweise bei weiblichen Frühgeborenen, die weniger als 72h nach BET-Gabe geboren wurden, eine höhere placentare 11 $\beta$ -HSD2-Aktivität als bei den Frühgeborenen der

männlichen Vergleichsgruppe [37]. Sandman et al. vermuten, dass intrauterine Veränderungen grundsätzlich bei weiblichen Feten zu einer rascheren Adaptation der Plazenta mit fetaler Wachstumsreduktion führen, um deren initiales Überleben zu sichern [36]. Diese frühe Anpassung könnte jedoch postnatal einen Überlebensnachteil darstellen und mit einem erhöhten Morbiditätsrisiko im späteren Leben einhergehen [36]. Bei männlichen Feten werden hingegen weniger adaptive Vorgänge der Plazenta beobachtet, um nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip ein ungehindertes fetales Wachstum zu sichern; allerdings um den Preis eines höheren fetalen Mortalitätsrisikos [36].

Bei allen bisherigen Studien zur Auswirkung der ANS-Gabe auf den plazentaren Cortisolstoffwechsel fällt zudem der kurze Untersuchungszeitraum von wenigen Tagen zwischen Glukokortikoidgabe und Entbindung auf, obwohl in der Praxis die Mehrheit der Schwangeren nach mehr als 7 Tagen nach BET-Gabe entbindet und ungefähr ein Drittel sogar nach der 37+0 SSW [11].

### **1.6. Fragestellung und Hypothese der Dissertation**

Trotz der Hinweise für eine fetale Prägung mit möglichen negativen Auswirkungen auf das fetale Wachstum, die HPA-Achse und die neurokognitive sowie psychische Entwicklung, wird eine Ausweitung der Indikation für die ANS-Gabe diskutiert [8, 10, 14, 15]. Die fetale Prägung durch ANS könnte durch Veränderungen des plazentaren Cortisolstoffwechsels vermittelt werden [28, 35, 38]. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss eines einzelnen antenatalen Zyklus BET auf den plazentaren Cortisolstoffwechsel zu untersuchen. Aufgrund möglicher regionaler Unterschiede der Plazenta in Genexpression und Vaskularisation wurden dazu 11 $\beta$ -HSD1- und 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmengen aus peripheren und zentralen Plazentabiopsien bestimmt [39, 40]. Da etwa ein Drittel aller mit ANS behandelten Schwangeren nach der 37+0 SSW entbinden, wurde hier insbesondere auf die Einbeziehung Reifgeborener Wert gelegt [11]. Die vorliegende Studienlage legt außerdem einen geschlechtsspezifischen Effekt nahe, sodass eine Subgruppenanalyse nach Geschlecht durchgeführt wurde [35].

In dieser Arbeit wurde die Hypothese verfolgt, dass bereits ein einzelner antenataler maternaler Zyklus BET (2 x 12 mg i.m.) zur Reduktion der plazentaren 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge mit Anstieg des umbilikalen Cortisols und damit einhergehenden Wachstumsreduktion führt. Aufgrund der Theorie, dass Plazenten weiblicher Feten ein höheres Anpassungspotential an Veränderungen des intrauterinen Milieus aufweisen als Plazenten männlicher Feten, wurde eine stärkere Ausprägung der Effekte in Plazenten weiblicher Feten postuliert [35].



## **2. Methodik**

### **2.1. Studienkollektiv**

Die Durchführung dieser Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt (EA2-149-07). Schwangere, die einen antenatalen Zyklus BET bei drohender Frühgeburt zwischen 23+6 und 34+0 SSW erhalten hatten (n=86), wurden prospektiv vor Entbindung auf den präpartalen Stationen der Klinik für Geburtsmedizin der Charité am Campus Virchow-Klinikum und am Campus Charité Mitte rekrutiert. Ein antenataler Zyklus wurde als zwei Gaben von 12 mg BET intramuskulär im Abstand von 24 Stunden definiert. Als Kontrollgruppe wurden nach Schwangerschaftswochen gepaarte, unbehandelte und gesunde Schwangere (n=92) ausgewählt, die vor Entbindung bei Eintritt in die Geburtsräume rekrutiert wurden.

In die Studie eingeschlossen wurden nur Einlingsschwangerschaften mit einem vor BET-Gabe sonographisch geschätzten fetalen Gewicht zwischen der 5. und 95. Perzentile und einem mütterlichen Alter zwischen 18 und 45 Jahren. Ausschlusskriterien waren vielfältig und betrafen mütterliche präexistente Erkrankungen, wie arteriellen Hypertonus, Diabetes mellitus, Schilddrüsenerkrankungen ohne euthyreote Stoffwechsellage sowie in der Schwangerschaft aufgetretene Hypertonie, Präeklampsie, Eklampsie und Gestationsdiabetes. Auch fetale Erkrankungen, wie Fehlbildungen, intrauterine Wachstumsrestriktion oder pathologische Doppler der Aa. uterinae führten zum Studienausschluss. Ebenfalls ausgeschlossen wurden alle Schwangeren, die andere Glukokortikoide als BET oder mehrere Zyklen BET erhalten hatten. Bei Einschluss in die Studie wurden alle Teilnehmer pseudonymisiert, sodass eine Zuordnung zur Kontroll- oder BET-Gruppe anhand der Studien-ID nicht möglich war.

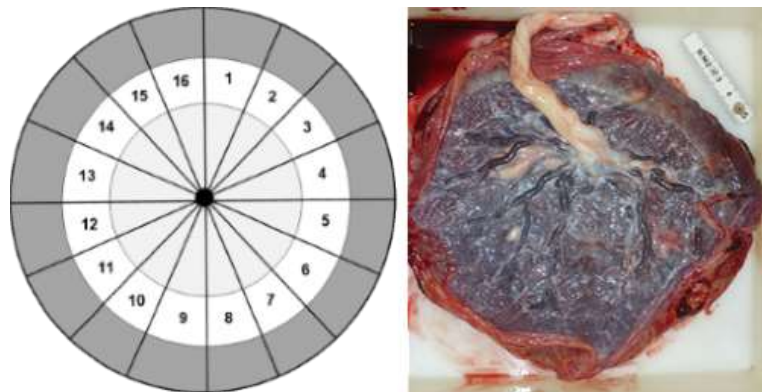
### **2.2. Datenerhebung**

Bei der Aufnahme in die Studie wurden der berechnete Entbindungstermin, der Zeitpunkt der BET-Gabe und die Eigen-, Medikamenten und Familienanamnese erhoben. Nach Entbindung wurde das Ergebnis der Nabelschnurblutgasanalyse, die APGAR-Werte, das Geburtsgewicht, der Kopfumfang und die Körperlänge des Kindes erfasst.

### **2.3. Probengewinnung**

Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Werte zu ermöglichen, erfolgte die mütterliche Blutentnahme unter der Geburt bei circa 5 cm Muttermundsweite in der Eröffnungsphase. Bei geplanten Kaiserschnittentbindungen wurde das Blut kurz vor Beginn der Operation abgenommen. Das umbilikale Blut wurde direkt nach der Geburt aus der abgenabelten Nabelschnur entnommen. Benutzt wurden hierzu handelsübliches Blutentnahmematerial und

10 ml EDTA-Röhrchen, die im Anschluss an die Entnahme für 10 Minuten bei 3500 g zentrifugiert wurden (Thermo Scientific Heraeus Labofuge 400, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland). Der Plasmabestandteil wurde aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Die Plazenta inklusive Nabelschnur wurde gewogen und vermessen. Die Entnahme der Plazentaprobe erfolgte mit Hilfe einer in 16 Sektoren eingeteilte Kreisschablone, randomisiert und systematisch, nach einem bereits etablierten Protokoll (Abbildung 2) [41, 42]. Innerhalb eines Sektors wurden dabei zwei circa 1 cm<sup>3</sup> große, die gesamte Dicke umfassende Plazentabiopsien aus jeweils zentraler und peripherer Lokalisation entnommen [39]. Je eine der Proben wurde zusammen mit der restlichen Plazenta an das Institut für Pathologie der Charité überstellt. Hier erfolgte die makroskopische und histologische Begutachtung, insbesondere hinsichtlich plazentarer Entzündungszeichen. Die zweite Probe wurde zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80 °C gelagert.



*Abbildung 2. 16-Sektoren Plazentaschablone: Auflage auf die Plazenta und Entnahme einer peripheren (dunkelgrau) und zentralen (hellgrau) Probe aus einem randomisierten Sektor.*

#### **2.4. Messung der ACTH und Cortisolkonzentrationen mittels ELISA**

Die ACTH-Konzentration in den venösen maternalen und umbilikalen Plasmaproben wurde mittels eines nicht-kompetitiven ELISA (EIA-3647, DRG Instruments GmbH, Marburg, Deutschland) analysiert. Dieser Assay besteht aus einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotitrierplatte, einem biotinylierten polyklonalen Ziegen-Antikörper gegen die C-terminale Region ACTH 34-39 und einem monoklonalen murinen Antikörper gegen die N-terminale Region ACTH 1-24, der mit Meerrettich-Peroxidase markiert ist. Die Bindung beider Antikörper führt nach einer Unterbrechung der Reaktion mittels saurer ELISA-Stopplösung zu einem Farbumschlag, dessen Farbintensität proportional zur ACTH-Konzentration ist. Um Messungen innerhalb der Standardreihe (7 pg/ml - 517 pg/ml) zu gewährleisten, wurden die Proben um den Faktor 2 verdünnt. Die ELISA-Platten wurden mittels FLUOStar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland) gemessen und ausgewertet.

Zur Messung des Cortisol-Spiegels in venösen maternalen und umbilikalen Plasmaproben wurde ein kompetitiver ELISA (MS E-5000, Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG,

Nordhorn, Deutschland) verwendet. Dieser Assay besteht aus einer mit anti-Cortisol-Antikörpern beschichteten Mikrotitrierplatte und löslichem Cortisol-Antigen. Je mehr Cortisol in einer Probe vorhanden ist, desto mehr bindet es an die plattengebundenen Antikörper und verhindert die Bindung des löslichen Cortisol-Antigens, das mit Meerrettich-Peroxidase markiert ist. Das nicht gebundene Cortisol-Antigen wird in einem Waschschrift entfernt. Nach Unterbrechung der enzymatischen Reaktion entspricht die Farbintensität umgekehrt proportional der Cortisol-Konzentration der Probe. Die Proben wurden vor Messung um den Faktor 6 vorverdünnt (Standardbereich 0,5 µg/dl – 60 µg/dl) und ebenfalls mittels FLUOStar Omega analysiert.

## **2.5. Immunhistochemie zur Etablierung der 11β-HSD1 und 11β-HSD2-Antikörper**

Zur Überprüfung der Antigenspezifität der 11β-HSD1- und 11β-HSD2-Antikörper, die zur Proteinmessung im Western Blot eingesetzt werden sollten, wurden diese zunächst in der Immunhistochemie etabliert. Hierfür wurden 5 µm Plazenta-Paraffinschnitte entparaffiniert und dehydriert. Nach Antigendemaskierung wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 10 % Kaninchenserum für 60 Minuten blockiert. Hiernach wurden die Paraffinschnitte mit polyklonalem Ziegen-Antikörper 11β-HSD1 (AP16309PU-N, Acris Antibodies, Inc, San Diego, USA) beziehungsweise mit polyklonalem Schaf-Antikörper 11β-HSD2 (PC545, The Binding Site Group Ltd, Birmingham, UK) in einer Verdünnung von 1:250 über Nacht inkubiert. Nach Inkubation mit sekundären Antikörpern und Färbung mit Diaminobenzidin zeigte sich ähnlich den Vorbefunden in der Literatur beim 11β-HSD1-Antikörper eine Anfärbung von Synzytiotrophoblasten, extravillösem Trophoblasten und Gefäßendothel [34]. Der 11β-HSD2-Antikörper färbte vor allem Synzytiotrophoblasten sowie minimal das Gefäßendothel an [34].

## **2.6. Messung der 11β-HSD1- und 11β-HSD2-Proteinlevel mittels Western Blot**

Zur Proteinextraktion wurden 200 mg jeder Plazentaprobe mit einem Gewebehomogenisator (Tissuelyser, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) dreimal für 5 Minuten in 0,8 ml RIPA-Lysepuffer homogenisiert. Die Proteinkonzentrationen der Lysate wurden anschließend mit dem Bradford-Test (500-0006, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bestimmt.

Nach Beladung der Polyacrylamid-Gele mit jeweils 25 µl Probenflüssigkeit, wurden die Proteine in einer Western Blot-Kammer mittels Proteinelektrophorese getrennt (SDS-PAGE) und auf eine Trägermembran übertragen. Die Membranen wurden mit 5 % Pferdeserum für eine Stunde blockiert und dann mit dem 11β-HSD1-Antikörper in einer Verdünnung 1:1000 in PBS-Tween über Nacht inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären

Antikörper (horse anti-goat, 1:8000, PI-9500, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA), der an Merrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Nach Zugabe einer Chemilumineszenz-Substanz (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) führt dieser zu einer detektierbaren Reaktion und ermöglicht die Analyse der 11 $\beta$ -HSD1 Banden (34 kDa) mittels ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories GmbH). Nach einigen Waschschrritten wurden die Membranen über Nacht mit dem 11 $\beta$ -HSD2-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in 5 % Magermilchpulver inkubiert. Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Donkey Anti-Sheep, 1:5000, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Newmarket, UK), erfolgte die Messung der 11 $\beta$ -HSD2-Bande (42 kDa). Als Ladekontrolle und zur Eichung der Proteinkonzentration wurde die korrespondierende  $\beta$ -Actin-Bande gemessen.

Jedes Gel enthielt zusätzlich eine Referenzprobe, die eine Anpassung an die Gelleigenschaften ermöglichte. Die relativen optischen Dichteeinheiten (ROD) der Banden wurden mittels Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories GmbH) analysiert. Das Ergebnis einer Probe ist der arithmetische Mittelwert der Dreifachmessung der Probe, in Relation zum jeweiligen  $\beta$ -Actin-Bandensignal und zur Referenzprobe. Der arithmetische Mittelwert aus den gemessenen peripheren und zentralen Proben wurde als durchschnittlicher Proteinwert definiert.

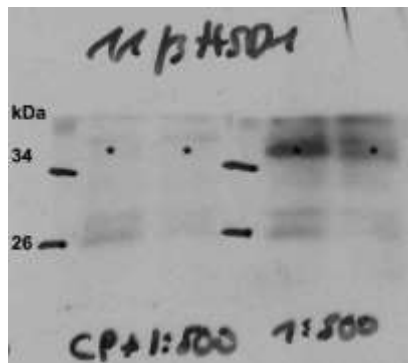


Abbildung 3. Spezifität des 11 $\beta$ -HSD1-Antikörpers (34-kDa-Bande, mit \* markiert) auf Röntgenfilm belichtet: Links das Ergebnis des Ansatzes mit Blockierungspeptid (CP), rechts ohne.

Nach Inkubation mit dem 11 $\beta$ -HSD1-Antikörper zeigten sich neben der Zielbande bei 34kDa weitere unspezifischen Banden. Um die Spezifität des Antikörpers nachzuweisen, wurde der Antikörper mit dem korrespondierenden Blockierungspeptid inkubiert und dann auf die Membran gegeben. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Blockierungspeptid. Hierbei ließ sich feststellen, dass der 11 $\beta$ -HSD1-Antikörper spezifisch die 34-kDa-Bande markiert und nach Inkubation mit dem Blockierungspeptid diese Bande nicht vorhanden ist (Abbildung 3).

## 2.7. 11 $\beta$ -HSD2-Enzymaktivitätsmessung

In Anbetracht der reduzierten peripheren 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge in der Gruppe der

weiblichen Reifgeborenen wurde zur Bestätigung in dieser Untergruppe (BET n=21, Kontrollen n=33) die Enzymaktivität gemessen. Als Methode wurde ein radioaktiver Konversionsassay ausgewählt, der auf der Messung der Konversionsrate von radioaktiv markiertem  $^3\text{H}$ -Cortisol zur  $^3\text{H}$ -Cortison beruht. Da die Methode in unserer Arbeitsgruppe noch nicht etabliert war, wurde, nach Korrespondenz mit deren Autoren, ein Protokoll in Anlehnung an bereits veröffentlichte Protokolle ausgearbeitet [43, 44].

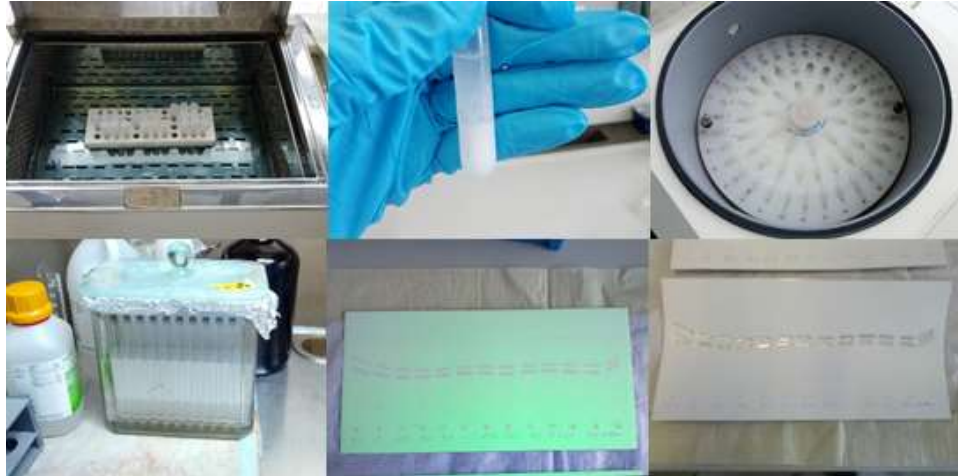


Abbildung 4. Durchführung des  $11\beta$ -HSD2-Aktivitätsassay: Reaktion im Wasserbad (A), Trennung der organischen Phase (B), Vakuumkonzentrator (C), Dünnschichtchromatographie (D), Visualisierung der Cortisol- und Cortisonbanden (E) und Abkratzen der Banden (F).

Hierzu wurden 500 mg einer Plazentaprobe in 1 ml Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) mit 1 g Keramik-Beads (Precellys 1,4 mm, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) mittels eines FastPrep24 Homogenisators (MP Biomedicals, LCC., Santa Ana, USA) dreimal für 30 Sekunden bei 6 m/s homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 10 Minuten mit 4000 g bei 4 °C zentrifugiert (Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc.). Anschließend wurde der Überstand bei 105.000 g für 60 min bei 4 °C zentrifugiert (Sorvall Ultra Pro 80, Du Pont Company, Delaware, USA). Das resultierende Pellet wurde in 1 ml Natriumphosphatpuffer suspendiert und in Aliquots bei -80 °C gelagert. Zu 75 µg/ml Protein jeder Probe wurde 1 mM NAD, 5 µM nicht-radioaktivmarkiertes Cortisol und 0,3 µCi [1,2,6,7- $^3\text{H}$ ]-Cortisol (LOT 2077604, PerkinElmer, Inc, Boston, USA) hinzugeben und für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad geschüttelt (Abbildung 4A). Die Reaktion wurde dann durch die Zugabe von 1,5 ml kaltem Ethylacetat zu jeder Probe unterbrochen. Nach dem Einfrieren der Proben für 15 Minuten bei -80 °C zur Trennung der Phasen, wurde die organische Phase in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und über Nacht in einem Vakuumkonzentrator (SC110 Speedvac Konzentration, Savant Instruments, Inc., Holbrook, USA) getrocknet (Abbildung 4B/C). Zur besseren Visualisierung der Banden wurde 10 µl 10 mM nicht-radioaktivmarkiertes Cortisol und 10 µl 10 mM Cortison zu den Proben gegeben. Dann wurden 25 µl der Probe

auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen und in einer 95:5 Mischung aus Chloroform und Ethanol chromatographiert (Abbildung 4D). Die Cortisol- und Cortisonbanden wurden mit 245 nm UV-Licht visualisiert und dann separat in Reaktionsgefäße mit 8 ml Szintillationsflüssigkeit eluiert (Insta Gel Plus, 6013391, PerkinElmer, Inc.; Abbildung 4E/F). Die Zerfallsrate der Cortison- und Cortisolanteile jeder Probe wurden pro Minute mittels einem Beta-Flüssigkeitsszintillationszähler (Wallac 1409, PerkinElmer, Inc.) gemessen. Die 11 $\beta$ -HSD2-Aktivität wurde als pmol Cortison pro mg Protein pro Stunde berechnet. Die Ergebnisse wurden als Verhältnis der 11 $\beta$ -HSD2-Aktivität zur entsprechenden Referenzprobe für das Experiment dargestellt, um für Variabilität zwischen Experimenten zu korrigieren. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen. Der Intra-Assay-Varianzkoeffizient betrug 10,92%, der Inter-Assay-Koeffizient 11,98%.

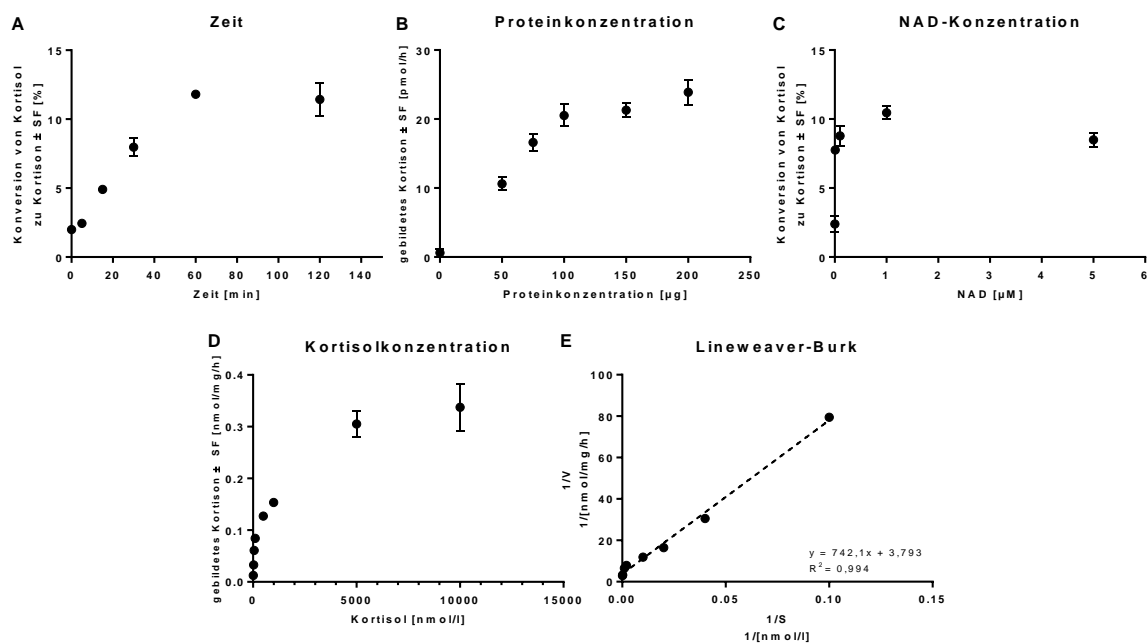


Abbildung 5. Optimierung des 11 $\beta$ -HSD2-Aktivitätsassays. Optimierung von Zeit (A), Proteinkonzentration (B), NAD-Konzentration (C) und Cortisolkonzentration (D). Beispiel eines Lineweaver-Burk-Diagramms (E) zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante. SF: Standardfehler des Mittelwertes aus der Dreifachmessung einer Probe. V: Reaktionsgeschwindigkeit. S: Substrat.

Zur Optimierung des Assays wurden Vorversuche durchgeführt. Ein Ablauf der Reaktion im linearen Bereich der Reaktionszeit und der Proteinkonzentration wurde sichergestellt (Abbildung 5A/B). Zudem wurden die Sättigungskonzentrationen des NAD und des nicht-radioaktiv markiertem Cortisol bestimmt (Abbildung 5C/D). Über die Transformation der Sättigungskurve des nicht-radioaktiv markierten Cortisols in ein Lineweaver-Burk-Diagramm wurde eine Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) von  $230,10 \pm 30,39$  nM ( $n=5$ ) ermittelt (Abbildung 5E) [44]. Die Reaktion ließ sich durch Zugabe von 10  $\mu$ M Carbenoxolon (C4790-1G, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) hemmen, welches die gemessene Aktivität auf <1% reduzierte ( $n=6$ ).

## 2.8. Statistik und Graphen

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der IBM SPSS Statistics Software Version 21.0-24.0 (IBM Corp. Armonk, USA). Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als Evidenz für das Verwerfen der Nullhypothese betrachtet. Die Ergebnisse wurden als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Die Graphen wurden mittels Graphpad Prism Version 6.00 für Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA) erstellt.

Der primär zu untersuchende Zielparameter war der BET-Effekt, welcher nach Überprüfung auf Normalverteilung durch den Shapiro-Wilks-Test, mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests oder des Zweistichproben-t-Test analysiert wurde. Sekundär wurde zur Überprüfung eventueller Effekt-Modifikation die Analyse nach Aufteilung in Subgruppen nach Geschlecht und Frühgeburtlichkeit ( $< 37+0$  SSW und  $\geq 37+0$  SSW) wiederholt.

Die ACTH- und Cortisolkonzentrationen, die plazentaren 11 $\beta$ -HSD1- und 11 $\beta$ -HSD2-Proteinlevel wurden sowohl auf den BET-Effekt als auch auf Geschlechtsunterschiede mittels Kruskal-Wallis-Test (<sup>K</sup>) oder eines einfachen Varianzanalysen-Modells (<sup>O</sup>) untersucht. Ein p-Wert kleiner 0,05 führte zu einem Paarvergleich der Untergruppen mit dem Mann-Whitney U-Test (<sup>U</sup>) oder dem Zweistichproben-t-Test (<sup>t</sup>), um den Unterschied zu lokalisieren. Das Signifikanzniveau dieser p-Werte wurde, zur Vermeidung einer Alphafehler-Kumulierung wegen des multiplen Testens, mittels der Holm-Bonferroni-Methode korrigiert.

Alle Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner 0,05 wurden durch eine Kovarianzanalyse (ANCOVA) auf potenzielle Konfounder wie Geburtsbeginn, maternale Gewichtszunahme, Gestationsalter in Tagen und plazentare Entzündungszeichen überprüft. Potenzielle Konfounder waren zuvor nach Untersuchung des Patientenkollektivs definiert worden. Neben den oben genannten statistischen Methoden wurden hierbei auch der Chi-Quadrat-Test (<sup>X</sup>) und der exakte Test nach Fisher (<sup>F</sup>) verwendet.

## 3. Relevante Ergebnisse

### 3.1. Studienkollektiv

Das mittlere maternale Alter der Studienteilnehmer lag bei  $29,3 \pm 1,2$  Jahren. 38,4% der Behandelten wurden nach der 37+0 SSW entbunden (Abbildung 6A). Zudem lagen bei 76,6% aller Frühgeburten mehr als 7 Tage Abstand zwischen BET-Gabe und der Entbindung (Abbildung 6B). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der BET-Gruppe und Kontrollen hinsichtlich Nikotinkonsum, Gravidität oder Parität. Bei Frühgeborenen war das Gestationsalter in der BET-Gruppe niedriger ( $243,5 \pm 2,0$  Tage vs.  $222,5 \pm 3,8$  Tage,  $p=0,002^U$ ). Männliche Reifgeborene wurden häufiger durch einen primären Kaiserschnitt entbunden, wenn sie der Kontrollgruppe angehörten ( $23,1\%$  vs.  $4,3\%$ ,  $p=0,008^X$ ). Bei

weiblichen mit BET behandelten Frühgeborenen war der Anteil der Plazenten mit Entzündungszeichen höher als bei Kontrollen (0,0% vs. 56,3%,  $p=0,046^F$ ).

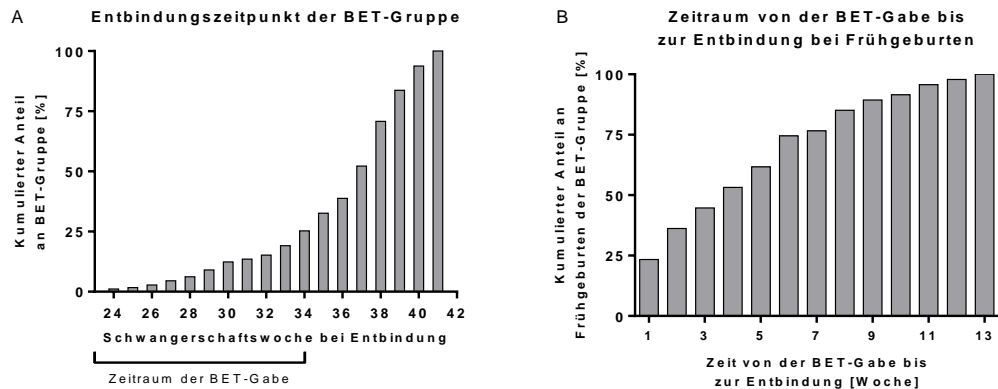


Abbildung 7. Kumulative Ansicht des Entbindungszeitpunktes in der BET-Gruppe (A) und kumulative Ansicht des Zeitraums von der BET-Gabe bis zur Entbindung bei Frühgeborenen (B). SSW: begonnene Schwangerschaftswoche.

### 3.2. Neonatale Anthropometrie

Das Geburtsgewicht der BET-Gruppe unterschied sich nicht von dem der Kontrollen. Auch bei männlichen Neugeborenen war das Geburtsgewicht nicht signifikant verändert ( $3125 \pm 71g$  vs.  $2474 \pm 125g$ ;  $p=0,078^U$ ). Allerdings war die Körperlänge bei männlichen Frühgeborenen der BET-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert (Abbildung 7B).

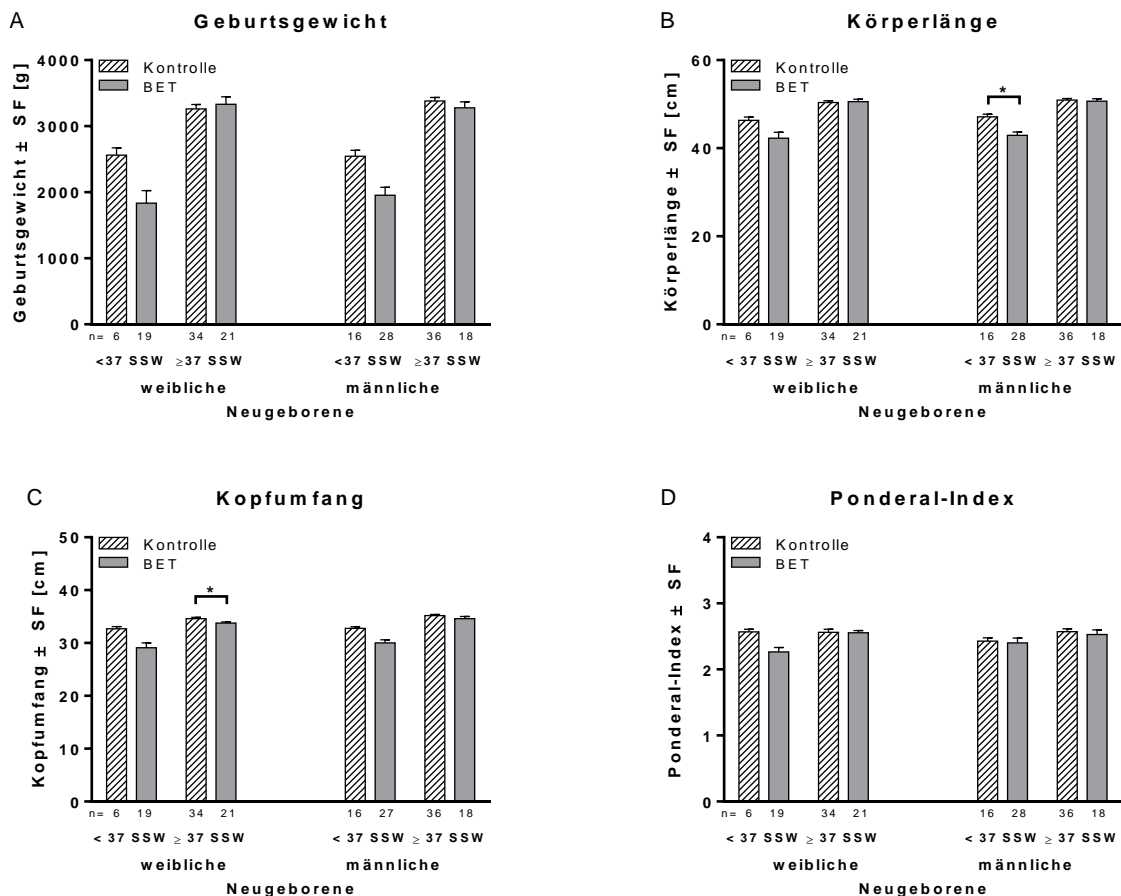


Abbildung 6. Neonatale Anthropometrie. Geburtsgewicht (A), Körperlänge (B), Kopfumfang (C) und Ponderal-Index (D) bei weiblichen und männlichen Neugeborenen aufgeteilt nach Frühgeburtlichkeit. Bei männlichen Frühgeborenen war die Körperlänge nach BET-Behandlung niedriger (\*,  $p=0,039^U$ ). Weiblichen Reifgeborenen ( $\geq 37+0$  SSW) zeigten in der BET-Gruppe eine Reduktion des Kopfumfanges (\*,  $p=0,022^U$ ). SF: Standardfehler. n: Probenanzahl.



Bei weiblichen Neugeborenen ließ sich in der BET-Gruppe eine Reduktion des Kopfumfangs um 7,9% ( $34,2 \pm 0,22$  cm vs.  $31,5 \pm 0,59$  cm;  $p=0,017^U$ ) feststellen, welche vor allem die weiblichen Reifgeborenen betraf (Abbildung 7C). Im Hinblick auf den Ponderal-Index (Geburtsgewicht/Körperlänge<sup>3</sup> x 100) fanden sich keine Veränderungen (Abbildung 7D).

### 3.3. Umbilikale und maternale ACTH- und Cortisolkonzentrationen

Ein Unterschied der maternalen venösen Cortisol- und ACTH-Konzentrationen zwischen mit BET Behandelten und Kontrollen ließ sich nicht feststellen. Auch die venösen ACTH-Konzentrationen im Nabelschnurblut waren nach BET-Gabe unverändert. Bei weiblichen Frühgeborenen der BET-Gruppe tendierten die ACTH-Werte dabei niedriger zu sein. Allerdings war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant ( $295,21 \pm 78,8$  pg/ml vs.  $95,01 \pm 39,85$  pg/ml;  $p=0,055^{KU}$ ). Zudem gab es keine Unterschiede in der venösen Cortisolkonzentration im Nabelschnurblut; auch nicht in der Gruppe der weiblichen Frühgeborenen ( $18,22 \pm 2,58$  µg/dl vs.  $39,86 \pm 5,94$  µg/dl;  $p=0,161^{Ot}$ ).

### 3.4. Plazentarer Cortisolstoffwechsel

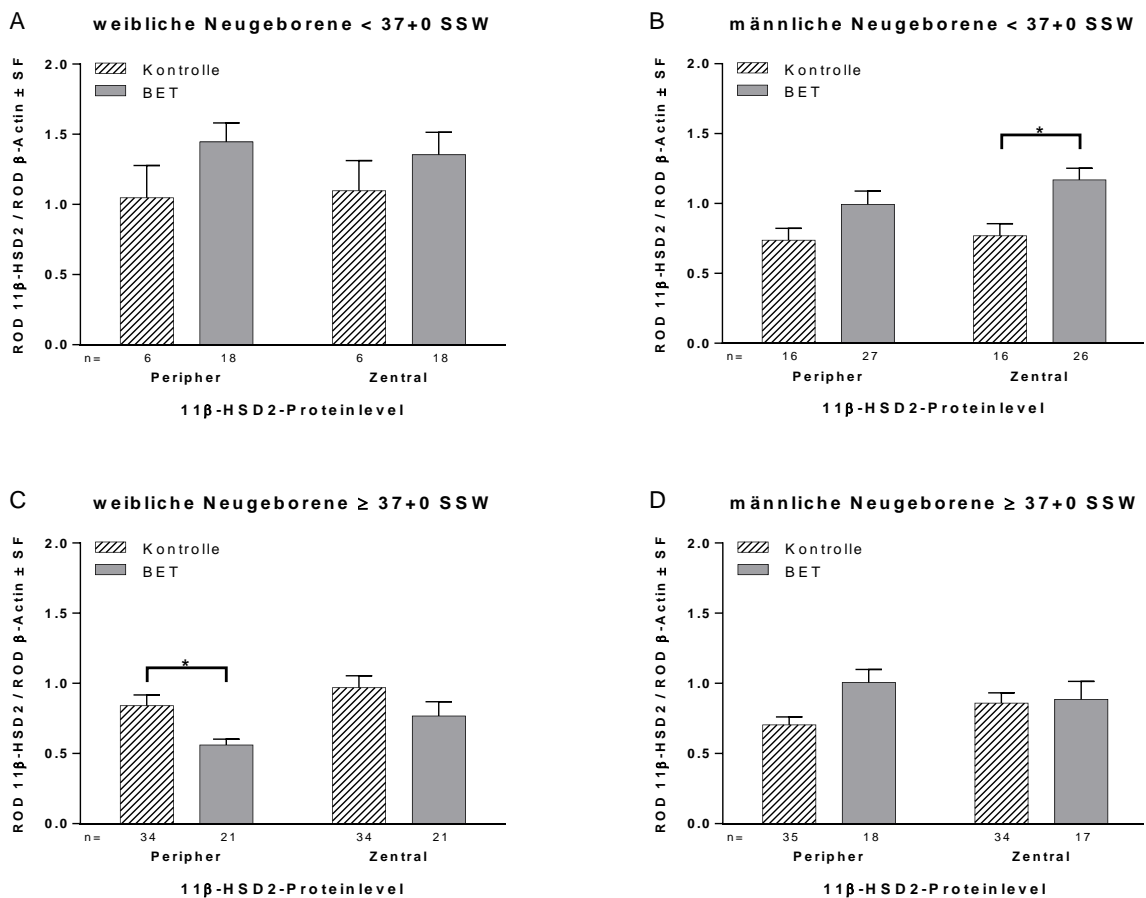


Abbildung 8. Plazentare 11β-HSD2-Proteinlevel von weiblichen und männlichen Neugeborenen. Während sich bei weiblichen Frühgeborenen (A) keine Unterschiede feststellen lassen, ist bei weiblichen Reifgeborenen (C) in der BET-Gruppe das periphere 11β-HSD2 erniedrigt (\*,  $p=0,030^{KU}$ ). Bei männlichen Frühgeborenen (B) zeigten sich höhere zentrale 11β-HSD2-Werte in der BET-Gruppe (\*,  $p=0,036^{KU}$ ). Kein Unterschied fand sich bei männlichen Reifgeborenen (D). ROD: relative optical density. SF: Standardfehler. n: Probenanzahl.

Die Menge an plazentarem 11 $\beta$ -HSD1-Protein unterschied sich nicht zwischen BET- und Kontrollgruppe. Weibliche, mit BET behandelte Neugeborene schienen dabei höhere zentrale 11 $\beta$ -HSD1-Proteinlevel zu haben, jedoch ohne statistische Signifikanz ( $0,82 \pm 0,04$  vs.  $1,02 \pm 0,05$ ;  $p=0,076^{KU}$ ).

Bei männlichen Neugeborenen der BET-Gruppe war die durchschnittliche 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge erhöht ( $0,77 \pm 0,04$  vs.  $1,04 \pm 0,07$ ;  $p=0,032^{KU}$ ). Zudem zeigten männliche Frühgeborene dieser Gruppe eine Erhöhung der zentralen 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge (Abbildung 8B). Bei weiblichen Reifgeborenen, die mit BET behandelt worden waren, fanden sich hingegen erniedrigte periphere 11 $\beta$ -HSD2-Proteinwerte (Abbildung 8C). Auch die 11 $\beta$ -HSD2-Aktivitätsrate war in dieser Gruppe reduziert ( $1,77 \pm 0,13$  vs.  $1,24 \pm 0,12$ ;  $p=0,039^U$ ). Zwischen den Geschlechtern zeigte sich bei Reifgeborenen der BET-Gruppe eine niedrigere periphere 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge der weiblichen im Vergleich zu männlichen Feten ( $0,56 \pm 0,04$  vs.  $1,06 \pm 0,13$ ;  $p=0,004^{KU}$ ; Abbildung 8C/D), während sich zwischen den Geschlechtern in der Kontrollgruppe kein Unterschiede der 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge zeigte.

## **4. Klinische Relevanz und weiterführende Fragestellungen**

### **4.1. Geschlechterspezifität der Ergebnisse**

Im Gegensatz zu Johnstone et al., die keine Veränderung des plazentaren 11 $\beta$ -HSD2-Proteins bei antenataler BET-Gabe im Vergleich zu Kontrollen feststellten, demonstriert diese Arbeit Veränderungen der plazentaren 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge, deren Effektrichtung vom Geschlecht abhängig war [34]. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse könnte durch die fehlende geschlechtsspezifische Analyse und der ausschließlichen Untersuchung von Frühgeborenen bei Johnstone et al. entstehen [34]. Für eine geschlechtsspezifische Reaktion auf die BET-Gabe spricht außerdem, dass sich in der Kontrollgruppe dieser Arbeit die 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge zwischen weiblichen und männlichen Neugeborenen nicht unterschied.

Die verminderten 11 $\beta$ -HSD2-Proteinlevel und -Aktivität bei reifgeborenen, mit BET behandelten Mädchen scheinen auf eine raschere Adaptation der weiblichen Plazenta und eine höhere Vulnerabilität weiblicher Feten für Stresssignale hinzuweisen [35, 36]. Bei einer reduzierten 11 $\beta$ -HSD2-Aktivität wäre eine vermehrte transplazentare Passage von maternalen Cortisol mit Wachstumsretardierung und fetaler HPA-Achsen-Dysregulation zu erwarten, die zu einem erhöhten Risiko für Morbidität im späteren Leben führen könnte [13, 15, 29]. Konkordant mit diesen Ergebnissen stellten Alexander et al. bei Grundschulkindern, die nach antenataler BET-Gabe reif geboren wurden, nur bei weiblichen Studienteilnehmern eine erhöhte Cortisolantwort auf Stress fest [24].

Welche Auswirkungen dahingegen die erhöhten 11 $\beta$ -HSD2-Proteinlevel bei männlichen Neugeborenen der BET-Gruppe auf den plazentaren Cortisolstoffwechsel haben könnten, ist bislang kaum untersucht, da sich bisherige Studien auf die Konsequenzen einer 11 $\beta$ -HSD2-Reduktion konzentrieren [15, 38, 45]. Eine 11 $\beta$ -HSD2-Erhöhung könnte hierbei ein protektiver Faktor gegenüber einem maternalen Cortisolüberschuss darstellen und ein ungehindertes Wachstum der männlichen Feten trotz widrigen extrauterinen Umständen ermöglichen [36]. Dagegen spricht die reduzierte Körperlänge bei BET-exponierten Frühgeborenen. In einer Studie zu Depression in der Schwangerschaft war eine erhöhte Menge plazentarer 11 $\beta$ -HSD2-mRNA zudem mit dem Auftreten von Hyperaktivität im Kleinkindalter assoziiert [46].

Trotz der veränderten 11 $\beta$ -HSD2-Proteinlevel waren in dieser Arbeit bei beiden Geschlechtern keine Veränderungen des umbilikalen ACTH- oder Cortisolspiegels festzustellen. Dies könnte auf eine bereits stattgehabte Adaptation der fetalen HPA-Achse an eine vermehrte oder verminderte Passage von maternalen Cortisol hinweisen [47]. Andererseits werden Cortisol und ACTH peripartal durch eine Reihe von Faktoren wie Wehentätigkeit, Nüchternheit, Narkosemittel und Geburtsdauer beeinflusst, die den Nachweis eines möglichen BET-Effektes erschweren [48-50]. Zudem wird die Aussagekraft der Hormonmessungen dadurch limitiert, dass keine Messung von Basalraten durchgeführt und die zirkadiane Rhythmik nicht berücksichtigt werden konnte. Studien an mit ANS behandelten Neugeborenen zeigen jedoch, dass diese postpartal eine veränderte Cortisolantwort auf Stress im Vergleich zu Kontrollen haben, was die Theorie einer Dysregulation der fetalen HPA-Achse unterstützt [22, 23].

#### **4.2. Mechanismus des BET-Effektes**

In einer tierexperimentellen Studie zu maternaler Proteinrestriktion in der Schwangerschaft bei Schweinen zeigte sich bei weiblichen Ferkeln ebenfalls eine Reduktion der plazentaren 11 $\beta$ -HSD2-Proteinlevel und -Aktivität, während bei männlichen Ferkeln die 11 $\beta$ -HSD2-Aktivität erhöht war, sodass die geschlechtsspezifische Expression von 11 $\beta$ -HSD2 eine standardisierte Adaptationsmöglichkeit der Plazenta an Stressoren darstellen könnte [51].

Bei der Regulation der plazentaren 11 $\beta$ -HSD2 spielen unter anderem Geschlechtshormone, Immunsignalwege, Hypoxie und die IGF-Achse eine Rolle [35, 52]. Da bei zahlreichen plazentaren Genen eine geschlechtsspezifische DNA-Methylierung beschrieben wurde, kommt als möglicher Mediator des BET-Effektes auch eine epigenetische Regulation von 11 $\beta$ -HSD2 in Frage [35, 53]. Dafür sprechen Hinweise auf eine geschlechtsspezifische Methylierung von CpG-Inseln im Promoter des 11 $\beta$ -HSD2-Gens (HSD11B2) [54].

Auch die Bindung von SP-1, Egr-1 und NF $\kappa$ B an Transkriptionsfaktorbindungsstellen des renalen HSD11B2-Promoters zeigte in einem Rattenmodell für intrauterine Wachstumsrestriktion eine geschlechtsspezifische Ausprägung [55]. Der Transkriptionsfaktor SP-1, der die 11 $\beta$ -HSD2-Expression fördert, könnte an der Vermittlung des BET-Effektes auf die 11 $\beta$ -HSD2-Proteinlevel bei männlichen Neugeborenen beteiligt sein [53, 56]. Denn die Bindung von SP-1 an den HSD11B2-Promoter wird durch einen Signalweg ermöglicht, der durch das Hormon hCG ausgelöst wird [57]. In einer in vitro Studie an Synzytiotrophoblasten führte Cortisol zu einer vermehrte hCG-Sekretion und darüber zu einer Heraufregulation von 11 $\beta$ -HSD2-mRNA [58].

Als weitere mögliche Mediatoren werden die geschlechtsspezifische Regulation von Methyltransferasen, der maternalen Folsäureaufnahme und des Enzyms O-GlcNAc-Transferase (OGT), welches x-chromosomal-gebunden Histonproteine modifiziert und die Aktivität der RNA Polymerase II beeinflusst, diskutiert [59-61]. Zur weiteren Aufklärung des BET-Effektes wären daher DNA-Methylierungsstudien am HSD11B2-Promoter und an Transkriptionsfaktorbindungsstellen nach BET-Gabe nötig.

### **4.3. Ergebnisse bei Reifgeborenen**

Bisherige Studien konzentrierten sich auf die Untersuchung des Effektes von BET auf den plazentaren Cortisolstoffwechsel von Frühgeborenen [34, 37]. Wenig untersucht sind die Effekte der ANS-Gabe auf Reifgeborene, obwohl etwa ein Drittel der behandelten Schwangeren erst nach der 37+0 SSW entbindet [11].

Daher haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bei den weiblichen Reifgeborenen, die durch das Fortbestehen der Schwangerschaft und die physiologische Lungenreifung nicht unmittelbar von der BET-Gabe profitieren, eine besondere klinische Relevanz [62]. Sie hatten im Vergleich zu den Kontrollen einen geringeren Kopfumfang und zeigten zudem erniedrigte plazentare periphere 11 $\beta$ -HSD2-Proteinlevel und -Aktivität. Der reduzierte Kopfumfang und die damit einhergehende Reduktion des Gehirnvolumens könnte dabei Einfluss auf die späteren kognitiven Fähigkeiten haben [63]. Auch hatten Grundschulkinder, die nach antenataler BET-Gabe reifgeboren waren, reduzierte Hirnrindenvolumina im anterioren cingulären Cortex, was mit affektiven Symptomen assoziiert war [64].

Interessanterweise war die Reduktion des plazentaren 11 $\beta$ -HSD2-Proteins in den peripheren Anteilen der Plazenta nachweisbar, in denen die Sauerstoffkonzentration durch die geringere Vaskularisation der Plazenta niedriger ist [39]. Die hierdurch eher hypoxische Umgebung könnte den BET-Effekt auf 11 $\beta$ -HSD2 verstärken und unterstreicht die Bedeutung der Berücksichtigung des Entnahmeortes beim Studiendesign [43]. Aufgrund vorbeschriebener entgegengesetzter Regulationsmechanismen von 11 $\beta$ -HSD2 und 11 $\beta$ -HSD1 wurde in

diesem Kollektiv eine erhöhte Menge an 11 $\beta$ -HSD1-Protein erwartet, die Evidenz hierfür war jedoch gering [52]. Entwickelt sich durch die verminderte 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge in der Schwangerschaft eine persistierende Dysregulation der HPA-Achse, so könnte möglicherweise das Risiko für Erkrankungen im späteren Leben erhöht sein, ohne dass Reifgeborene deutlich von der BET-Gabe profitiert hätten [8, 10, 15].

Neben dem Fortbestehen der Schwangerschaft ist in dieser Arbeit der Zeitpunkt der BET-Gabe an sich in der Mehrheit der Fälle nicht optimal. Durch den nachlassenden Effekt auf die Surfactantbildung ist ein erneuter Anstieg der neonatalen Morbidität und Mortalität bei einer Geburt mehr als 7 Tage nach ANS-Gabe zu erwarten [5, 65]. In Analogie mit unseren Ergebnissen werden aber die Mehrheit der Frühgeburten erst nach diesem Zeitraum entbunden [65]. Um die Rate der zu früh behandelten Neugeborenen zu vermindern, ist eine Strategie zur präziseren Einschätzung des Frühgeburtsrisikos unter Einbezug der Indikation für die ANS-Gabe und weiterer potentiell prädiktiver Parameter, wie Biomarker oder prognostischer Algorithmen, notwendig [66, 67].

#### **4.4. Langzeitkomplikationen**

Allein aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich keine Aussagen über persistierende Langzeitveränderungen nach BET-Gabe ableiten. Hinweise auf eine bleibende HPA-Achsen-Dysregulation nach ANS-Gabe geben Studien, die eine veränderte Cortisolantwort im Speichel von reifen Neugeborenen auf die Fersenblutentnahme zum Stoffwechselltest zeigen [22, 23]. Im Grundschulalter ließen sich zudem bei reifgeborenen Kindern nach ANS in der Schwangerschaft ein flacheres Cortisol-Tagesprofil, sowie, insbesondere bei Mädchen, eine gesteigerte Cortisolantwort auf Stressoren nachweisen [24, 25].

Inwieweit die Veränderungen im Cortisolstoffwechsel nach ANS-Gabe das Risiko für Mortalität und Morbidität im späteren Leben erhöhen, ist jedoch weiterhin kaum untersucht. In der Kohorte der ältesten randomisierten, kontrollierten ANS-Studie (Auckland Steroid Trial) ließen sich bei den 30-jährigen Probanden im Vergleich zur Placebo-Gruppe zwar höhere morgendliche Cortisolkonzentrationen in der BET-Gruppe feststellen, diese waren jedoch nach Adjustierung auf Konfounder nicht mehr signifikant [21]. Allerdings war hier die Insulinkonzentration 30 Minuten nach Glukoseeinnahme bei exponierten Teilnehmern, insbesondere bei Frauen, höher als in der Placebogruppe. Dies könnte auf die Entwicklung einer Insulinresistenz hindeuten [21].

Räikkönen et al. untersuchten eine Kohorte aus Kindern, deren Mütter in der Schwangerschaft vermehrt Lakritze konsumierten, dessen Bestandteil Glycyrrhizin die 11 $\beta$ -HSD2 hemmt [45]. Im Grundschulalter zeigten diese Kinder Verhaltensauffälligkeiten und

Einschränkungen der kognitiven Leistung, sowie ein höhere Cortisolbasalrate und -stressantwort als Kinder von Mütter ohne vermehrten Lakritzkonsum [45, 68].

Dahingegen fanden Stutchfield et al. keine signifikant höhere Rate an Verhaltensauffälligkeiten bei reifgeborenen Kindern im Alter von 8-15 Jahren, deren Mütter BET vor einem geplanten Kaiserschnitt erhalten hatten (ASTECS-Trial) [69]. Allerdings ordneten Lehrkräfte die BET-exponierten Kinder bezüglich ihrer kognitiven Fähigkeiten signifikant häufiger im unteren Quartil ein als Kontrollen [69].

Die Nachverfolgung dieser Kohorten bis ins höhere Lebensalter könnte eine Antwort auf die Frage geben, inwieweit eine verminderte 11 $\beta$ -HSD2-Aktivität und HPA-Achsenveränderungen in der Schwangerschaft zu einem erhöhten Risiko für spätere Morbidität führen.

#### **4.5. Limitationen**

Die geringe Anzahl an Frühgeborenen vor der 32+0 SSW in der Kontrollgruppe limitiert die Aussagekraft dieser Arbeit in der Subgruppe. Aufgrund der leitliniengerechten Therapie kam es nur selten zu einer Frühgeburt vor der 34+0 SSW ohne vorher erfolgte BET-Gabe, sodass das Gestationsalter in dieser Subgruppe inhomogen verteilt ist. Die Aussagekraft der Ergebnisse bei weiblichen Reifgeborenen ist jedoch hiervon nicht betroffen und war einer der Schwerpunkte dieser Arbeit.

Ebenfalls aus ethischen Gründen war eine randomisierte Zuordnung der Studienteilnehmer nicht möglich. So wurden mit BET behandelte Schwangere weit vor der Geburt in die Studie eingeschlossen, Schwangere der Kontrollgruppe wurden dahingegen erst zu Geburtsbeginn rekrutiert, wodurch eine Verzerrung der Ergebnisse durch einen Selektionsbias beispielweise in Bezug auf sozioökonomische Faktoren nicht auszuschließen ist. Im Vordergrund stand hierbei das Matching der Studienteilnehmer in Hinsicht auf das Gestationsalter.

Eine komplette Verblindung in Bezug auf die BET-Exposition war trotz Pseudonymisierung der Studienteilnehmer nicht möglich, da dieselben Personen für Teilnehmerrekrutierung und Versuchsdurchführung zuständig waren, sodass eine Verzerrung mittels systematischer Fehler möglich wäre. Zwischen der Rekrutierung und den Experimenten lag jedoch in allen Fällen mindestens ein Jahr und die Entschlüsselung der Pseudonymisierungsliste wurde erst zur statistischen Auswertung durchgeführt.

Die Reduktion des 11 $\beta$ -HSD2-Proteins bei weiblichen Reifgeborenen könnte durch eine Inflammation der Plazenta hervor gerufen werden sein [34]. Jedoch unterschied sich die Rate der plazentaren Entzündungszeichen in dieser Subgruppe nicht. Ferner könnten die reduzierten 11 $\beta$ -HSD2-Proteinlevel auch durch maternalen Stress bei drohender Frühgeburt beeinflusst sein [70]. Erni et al. untersuchten jedoch bei reifgeborenen Zehnjährigen, deren

Mütter bei vorzeitiger Wehentätigkeit im zweiten Trimenon Tokolyse erhalten hatten, die Cortisolantwort auf Stress im Speichel. Hierbei stellten sie bei denjenigen, deren Mütter zusätzlich eine BET-Gabe erhalten hatten, eine höhere Stressantwort fest als bei alleiniger Tokolyse, was für einen unabhängigen BET-Effekt spricht [71]. Zudem würde man den größeren Konfoundereffekt durch maternalen Stress bei Frühgeborenen erwarten, jedoch waren die 11 $\beta$ -HSD2-Proteinlevel bei männlichen Frühgeborenen erhöht.

#### **4.6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung**

Zusammenfassend beobachteten wir bereits nach einem antenatalen Zyklus BET eine geschlechtsspezifische Veränderung von 11 $\beta$ -HSD2-Proteinleveln und neonataler Anthropometrie. Die möglichen Konsequenzen einer erhöhten 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge bei männlichen Neugeborenen sind noch nicht erforscht. Die verminderte 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmenge und -Aktivität bei weiblichen Reifgeborenen könnte zu einer vermehrten transplazentaren Passage von maternalem Cortisol mit Wachstumsreduktion und einer bleibenden Dysregulation der fetalen HPA-Achse führen, die ihrerseits wiederum Auswirkungen auf das adulte Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko haben könnte [13, 15, 29].

Besonders bedenklich sind die Ergebnisse bei weiblichen reifen Neugeborenen, die aufgrund der zwischenzeitlich eingetretenen physiologischen Lungenreifung nicht unmittelbar von der ANS-Gabe profitieren [9, 62]. Eine Strategie zur präziseren Einschätzung des Frühgeburtsrisikos und Optimierung des Zeitpunktes der BET-Gabe ist deswegen unbedingt erforderlich [66, 67]. Anhand dieser Arbeit lässt sich kein unmittelbarer kausaler Zusammenhang zwischen BET-Gabe und den in der Literatur beobachteten Langzeitveränderungen herstellen, genauso wenig sind mit der jetzigen Studienlage sichere Aussagen über persistierende Komplikationen möglich [10, 14, 45]. Um diese zu detektieren wäre eine konsequente Nachverfolgung der ANS-Kohorten bis ins höhere Lebensalter notwendig [21, 45].

Zukünftige Forschung sollte sich ferner mit einer möglichen geschlechtsspezifischen epigenetischen Regulation von 11 $\beta$ -HSD2 durch ANS beschäftigen [26, 57]. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen zudem die Bedeutung von Geschlecht, Probenlokalisierung und Gestationsalter bei der Durchführung von Studien an der Plazenta.

Neben den Ergebnissen dieser Arbeit und den hier erörterten Fragen bezüglich des optimalen Zeitpunktes und möglicher Langzeitkomplikationen der BET-Gabe, gibt es auch bezüglich der Dosierung der ANS und der Präparatauswahl weiteren Diskussions- und Forschungsbedarf [72]. In Anbetracht dessen ist die aktuelle Diskussion um die Ausweitung der ANS-Gabe auf spätere Frühgeburten oder andere Indikationsstellungen, wie Kaiserschnittentbindungen am Termin, mit Vorsicht zu betrachten [62].

## 5. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Die plazentare Cortisol-Barriere zwischen maternaler und fetaler HPA-Achse.....	7
Abbildung 2. 16-Sektoren Plazentaschablone.....	10
Abbildung 3. Spezifität des 11 $\beta$ -HSD1-Antikörpers (34-kDa-Bande, mit * markiert) auf Röntgenfilm belichtet.....	12
Abbildung 4. Durchführung des 11 $\beta$ -HSD2-Aktivitätsassays.....	13
Abbildung 5. Optimierung des 11 $\beta$ -HSD2-Aktivitätsassays.....	14
Abbildung 6. Kumulative Ansicht des Entbindungszeitpunktes in der BET-Gruppe (A) und kumulative Ansicht der Zeitspanne zwischen BET-Gabe bis zur Entbindung bei Frühgeborenen (B).....	16
Abbildung 7. Neonatale Anthropometrie.....	16
Abbildung 8. Plazentare 11 $\beta$ -HSD2 Proteinlevel von weiblichen und männlichen Neugeborenen.....	17

## 6. Literatur

- [1] F. Braun, A.K. Hardt, L. Ehrlich, D.M. Sloboda, J.R.G. Challis, A. Plagemann, W. Henrich, T. Braun, Sex-specific and lasting effects of a single course of antenatal betamethasone treatment on human placental 11 $\beta$ -HSD2, *Placenta* 69 (2018) 9-19.
- [2] DGGG, OEGGG, SGGG, Prevention and therapy of preterm labour. Guideline (S2k-Level, AWMF Registry No.015/025). <<http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-025.html>>, 2019 (accessed 21.06.2019.).
- [3] G.C. Liggins, Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids, *The Journal of endocrinology* 45(4) (1969) 515-23.
- [4] G.C. Liggins, R.N. Howie, A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants, *Pediatrics* 50(4) (1972) 515-25.
- [5] P.L. Ballard, R.A. Ballard, Scientific basis and therapeutic regimens for use of antenatal glucocorticoids, *American journal of obstetrics and gynecology* 173(1) (1995) 254-62.
- [6] D. Roberts, J. Brown, N. Medley, S.R. Dalziel, Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth, *Cochrane Database Syst Rev* 3 (2017) Cd004454.
- [7] BQS-Institut, Jahresauswertung 2017 der Geburtshilfe Charité - Universitätsmedizin Berlin, 2018.
- [8] C. Gyamfi-Bannerman, E.A. Thom, S.C. Blackwell, A.T. Tita, U.M. Reddy, G.R. Saade, D.J. Rouse, D.S. McKenna, E.A. Clark, J.M. Thorp, Jr., E.K. Chien, A.M. Peaceman, R.S. Gibbs, G.K. Swamy, M.E. Norton, B.M. Casey, S.N. Caritis, J.E. Tolosa, Y. Sorokin, J.P. VanDorsten, L. Jain, Antenatal Betamethasone for Women at Risk for Late Preterm Delivery, *The New England journal of medicine* 374(14) (2016) 1311-20.
- [9] A. Sotiriadis, G. Makrydimas, S. Papatheodorou, J.P.A. Ioannidis, E. McGoldrick, Corticosteroids for preventing neonatal respiratory morbidity after elective caesarean section at term, *Cochrane Database of Systematic Reviews* (8) (2018).
- [10] T. Braun, J.R. Challis, J.P. Newnham, D.M. Sloboda, Early-life glucocorticoid exposure: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, placental function, and long-term disease risk, *Endocrine reviews* 34(6) (2013) 885-916.
- [11] T. Braun, D.M. Sloboda, B. Tutschek, T. Harder, J.R. Challis, J.W. Dudenhausen, A. Plagemann, W. Henrich, Fetal and neonatal outcomes after term and preterm delivery following betamethasone administration, *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 130(1) (2015) 64-9.



- [12] D.M. Sloboda, J.P. Newnham, J.R. Challis, Effects of repeated maternal betamethasone administration on growth and hypothalamic-pituitary-adrenal function of the ovine fetus at term, *The Journal of endocrinology* 165(1) (2000) 79-91.
- [13] M.A. Howland, C.A. Sandman, L.M. Glynn, Developmental origins of the human hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 12(5) (2017) 321-339.
- [14] V.G. Moisiadis, S.G. Matthews, Glucocorticoids and fetal programming part 1: Outcomes, *Nature reviews. Endocrinology* 10(7) (2014) 391-402.
- [15] R.M. Reynolds, Glucocorticoid excess and the developmental origins of disease: two decades of testing the hypothesis--2012 Curt Richter Award Winner, *Psychoneuroendocrinology* 38(1) (2013) 1-11.
- [16] G. Dorner, Problems and terminology of functional teratology, *Acta biologica et medica Germanica* 34(6) (1975) 1093-5.
- [17] D.J. Barker, A.R. Bull, C. Osmond, S.J. Simmonds, Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life, *BMJ* 301(6746) (1990) 259-62.
- [18] P.D. Gluckman, M.A. Hanson, C. Pinal, The developmental origins of adult disease, *Maternal & child nutrition* 1(3) (2005) 130-41.
- [19] A. Plagemann, 'Fetal programming' and 'functional teratogenesis': on epigenetic mechanisms and prevention of perinatally acquired lasting health risks, *Journal of perinatal medicine* 32(4) (2004) 297-305.
- [20] D.J. Barker, J. Gelow, K. Thornburg, C. Osmond, E. Kajantie, J.G. Eriksson, The early origins of chronic heart failure: impaired placental growth and initiation of insulin resistance in childhood, *European journal of heart failure* 12(8) (2010) 819-25.
- [21] S.R. Dalziel, N.K. Walker, V. Parag, C. Mantell, H.H. Rea, A. Rodgers, J.E. Harding, Cardiovascular risk factors after antenatal exposure to betamethasone: 30-year follow-up of a randomised controlled trial, *Lancet* 365(9474) (2005) 1856-62.
- [22] L. Schaffer, F. Luzi, T. Burkhardt, M. Rauh, E. Beinder, Antenatal betamethasone administration alters stress physiology in healthy neonates, *Obstetrics and gynecology* 113(5) (2009) 1082-8.
- [23] E.P. Davis, F. Waffarn, C.A. Sandman, Prenatal treatment with glucocorticoids sensitizes the hpa axis response to stress among full-term infants, *Developmental psychobiology* 53(2) (2011) 175-83.
- [24] N. Alexander, F. Rosenlocher, T. Stalder, J. Linke, W. Distler, J. Morgner, C. Kirschbaum, Impact of antenatal synthetic glucocorticoid exposure on endocrine stress reactivity in term-born children, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97(10) (2012) 3538-44.
- [25] M.N. Edelmann, C.A. Sandman, L.M. Glynn, D.A. Wing, E.P. Davis, Antenatal glucocorticoid treatment is associated with diurnal cortisol regulation in term-born children, *Psychoneuroendocrinology* 72 (2016) 106-12.
- [26] V.G. Moisiadis, S.G. Matthews, Glucocorticoids and fetal programming part 2: Mechanisms, *Nature reviews. Endocrinology* 10(7) (2014) 403-11.
- [27] A.H. Jobe, J. Newnham, K. Willet, P. Sly, M. Ikegami, Fetal versus maternal and gestational age effects of repetitive antenatal glucocorticoids, *Pediatrics* 102(5) (1998) 1116-25.
- [28] J.R. Challis, D. Sloboda, S.G. Matthews, A. Holloway, N. Alfaidy, F.A. Patel, W. Whittle, M. Fraser, T.J. Moss, J. Newnham, The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health, *Molecular and cellular endocrinology* 185(1-2) (2001) 135-44.
- [29] K. Sun, S.L. Adamson, K. Yang, J.R. Challis, Interconversion of cortisol and cortisone by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases type 1 and 2 in the perfused human placenta, *Placenta* 20(1) (1999) 13-9.
- [30] L.S. Kerzner, B.S. Stonestreet, K.Y. Wu, G. Sadowska, M.P. Malee, Antenatal dexamethasone: effect on ovine placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression and fetal growth, *Pediatric research* 52(5) (2002) 706-12.
- [31] X.H. Ma, W.X. Wu, P.W. Nathanielsz, Gestation-related and betamethasone-induced changes in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in the baboon placenta, *American journal of obstetrics and gynecology* 188(1) (2003) 13-21.
- [32] Z. Vackova, K. Vagnerova, A. Libra, I. Miksik, J. Pacha, F. Staud, Dexamethasone and betamethasone administration during pregnancy affects expression and function of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the rat placenta, *Reprod Toxicol* 28(1) (2009) 46-51.
- [33] J.P. van Beek, H. Guan, L. Julan, K. Yang, Glucocorticoids stimulate the expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cultured human placental trophoblast cells, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89(11) (2004) 5614-21.
- [34] J.F. Johnstone, A.D. Bocking, E. Unlugedik, J.R. Challis, The effects of chorioamnionitis and betamethasone on 11beta hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 and the glucocorticoid receptor in preterm human placenta, *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 12(4) (2005) 238-45.

- [35] V.L. Clifton, Review: Sex and the human placenta: mediating differential strategies of fetal growth and survival, *Placenta* 31 Suppl (2010) S33-9.
- [36] C.A. Sandman, L.M. Glynn, E.P. Davis, Is there a viability-vulnerability tradeoff? Sex differences in fetal programming, *J Psychosom Res* 75(4) (2013) 327-35.
- [37] M.J. Stark, I.M. Wright, V.L. Clifton, Sex-specific alterations in placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 activity and early postnatal clinical course following antenatal betamethasone, *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 297(2) (2009) R510-4.
- [38] V.E. Murphy, R. Smith, W.B. Giles, V.L. Clifton, Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus, *Endocrine reviews* 27(2) (2006) 141-69.
- [39] S.M. Wyatt, F.T. Kraus, C.R. Roh, U. Elchalal, D.M. Nelson, Y. Sadovsky, The correlation between sampling site and gene expression in the term human placenta, *Placenta* 26(5) (2005) 372-9.
- [40] H. Fox, The Pattern of Villous Variability in the Normal Placenta, *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 71 (1964) 749-58.
- [41] T. Braun, A. Husar, J.R. Challis, J.W. Dudenhausen, W. Henrich, A. Plagemann, D.M. Sloboda, Growth restricting effects of a single course of antenatal betamethasone treatment and the role of human placental lactogen, *Placenta* 34(5) (2013) 407-15.
- [42] T.M. Mayhew, Taking tissue samples from the placenta: an illustration of principles and strategies, *Placenta* 29(1) (2008) 1-14.
- [43] N. Alfaidy, S. Gupta, C. DeMarco, I. Caniggia, J.R. Challis, Oxygen regulation of placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2: physiological and pathological implications, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87(10) (2002) 4797-805.
- [44] V.E. Murphy, P.G. Gibson, W.B. Giles, T. Zakar, R. Smith, A.M. Bisits, C.G. Kessell, V.L. Clifton, Maternal asthma is associated with reduced female fetal growth, *American journal of respiratory and critical care medicine* 168(11) (2003) 1317-23.
- [45] K. Raikkonen, J.R. Seckl, K. Heinonen, R. Pyhala, K. Feldt, A. Jones, A.K. Pesonen, D.I. Phillips, J. Lahti, A.L. Jarvenpaa, J.G. Eriksson, K.A. Matthews, T.E. Strandberg, E. Kajantie, Maternal prenatal licorice consumption alters hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis function in children, *Psychoneuroendocrinology* 35(10) (2010) 1587-93.
- [46] K. Räikkönen, A.K. Pesonen, J.R. O'Reilly, S. Tuovinen, M. Lahti, E. Kajantie, P. Villa, H. Laivuori, E. Hämäläinen, J.R. Seckl, R.M. Reynolds, Maternal depressive symptoms during pregnancy, placental expression of genes regulating glucocorticoid and serotonin function and infant regulatory behaviors, *Psychological Medicine* 45(15) (2015) 3217-3226.
- [47] J. Dy, H. Guan, R. Sampath-Kumar, B.S. Richardson, K. Yang, Placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is reduced in pregnancies complicated with idiopathic intrauterine growth Restriction: evidence that this is associated with an attenuated ratio of cortisone to cortisol in the umbilical artery, *Placenta* 29(2) (2008) 193-200.
- [48] S.E. Vogl, C. Worda, C. Egarter, C. Bieglmayer, T. Szekeres, J. Huber, P. Husslein, Mode of delivery is associated with maternal and fetal endocrine stress response, *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 113(4) (2006) 441-5.
- [49] A.F. Bell, R. White-Traut, E.C. Wang, D. Schwertz, Maternal and umbilical artery cortisol at birth: relationships with epidural analgesia and newborn alertness, *Biological research for nursing* 14(3) (2012) 269-76.
- [50] G. Bacigalupo, K. Langner, S. Schmidt, E. Saling, Plasma immunoreactive beta-endorphin, ACTH and cortisol concentrations in mothers and their neonates immediately after delivery--their relationship to the duration of labor, *Journal of perinatal medicine* 15(1) (1987) 45-52.
- [51] Y. Shang, Y. Jia, Q. Sun, W. Shi, R. Li, S. Wang, S. Sui, R. Zhao, Sexually dimorphic effects of maternal dietary protein restriction on fetal growth and placental expression of 11beta-HSD2 in the pig, *Animal reproduction science* 160 (2015) 40-8.
- [52] K. Chapman, M. Holmes, J. Seckl, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action, *Physiological reviews* 93(3) (2013) 1139-206.
- [53] E. Martin, L. Smeester, P.A. Bommarito, M.R. Grace, K. Boggess, K. Kuban, M.R. Karagas, C.J. Marsit, T.M. O'Shea, R.C. Fry, Sexual epigenetic dimorphism in the human placenta: implications for susceptibility during the prenatal period, *Epigenomics* 9(3) (2017) 267-278.
- [54] B.B. Green, D.A. Armstrong, C. Lesseur, A.G. Paquette, D.J. Guerin, L.E. Kwan, C.J. Marsit, The Role of Placental 11-Beta Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and Type 2 Methylation on Gene Expression and Infant Birth Weight, *Biology of reproduction* 92(6) (2015) 149.

- [55] M. Baserga, R. Kaur, M.A. Hale, A. Bares, X. Yu, C.W. Callaway, R.A. McKnight, R.H. Lane, Fetal growth restriction alters transcription factor binding and epigenetic mechanisms of renal 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in a sex-specific manner, *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299(1) (2010) R334-R342.
- [56] J.N. Li, Z. Yang, K. Sun, T. Duan, Y.C. Ge, C.M. Guo, L. Myatt, H. Guan, K. Yang, The Sp1 Transcription Factor Is Crucial for the Expression of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in Human Placental Trophoblasts, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96(6) (2011) E899-E907.
- [57] P. Zhu, W. Wang, R. Zuo, K. Sun, Mechanisms for establishment of the placental glucocorticoid barrier, a guard for life, *Cellular and Molecular Life Sciences* 76(1) (2019) 13-26.
- [58] X.T. Ni, T. Duan, Z. Yang, C.M. Guo, J.N. Li, K. Sun, Role of Human Chorionic Gonadotropin in Maintaining 11 $\beta$ -hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Expression in Human Placental Syncytiotrophoblasts, *Placenta* 30(12) (2009) 1023-1028.
- [59] B.M. Nugent, T.L. Bale, The omniscient placenta: Metabolic and epigenetic regulation of fetal programming, *Frontiers in neuroendocrinology* 39 (2015) 28-37.
- [60] C. Jensen Peña, C. Monk, F.A. Champagne, Epigenetic Effects of Prenatal Stress on 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase-2 in the Placenta and Fetal Brain, *PloS one* 7(6) (2012) e39791.
- [61] R. Penailillo, A. Guajardo, M. Llanos, S. Hirsch, A.M. Ronco, Folic acid supplementation during pregnancy induces sex-specific changes in methylation and expression of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 in rats, *PloS one* 10(3) (2015) e0121098.
- [62] A.H. Jobe, R.L. Goldenberg, Antenatal corticosteroids: an assessment of anticipated benefits and potential risks, *American journal of obstetrics and gynecology* 219(1) (2018) 62-74.
- [63] R.B. Jensen, A. Juul, T. Larsen, E.L. Mortensen, G. Greisen, Cognitive ability in adolescents born small for gestational age: Associations with fetal growth velocity, head circumference and postnatal growth, *Early human development* 91(12) (2015) 755-760.
- [64] E.P. Davis, C.A. Sandman, C. Buss, D.A. Wing, K. Head, Fetal glucocorticoid exposure is associated with preadolescent brain development, *Biological psychiatry* 74(9) (2013) 647-55.
- [65] J. Frandberg, J. Sandblom, M. Bruschetti, K. Marsal, K. Kristensen, Antenatal corticosteroids: a retrospective cohort study on timing, indications and neonatal outcome, *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 97(5) (2018) 591-597.
- [66] H.A. Watson, J. Carter, P.T. Seed, R.M. Tribe, A.H. Shennan, The QUIPP App: a safe alternative to a treat-all strategy for threatened preterm labor, *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 50(3) (2017) 342-346.
- [67] Z.A. Oskovi Kaplan, A.S. Ozgu-Erdinc, Prediction of Preterm Birth: Maternal Characteristics, Ultrasound Markers, and Biomarkers: An Updated Overview, *J Pregnancy* 2018 (2018) 8367571-8367571.
- [68] A.-L. Järvenpää, A.-K. Pesonen, J. Lahti, J.G. Eriksson, J.R. Seckl, K. Heinonen, N. Komsj, T.E. Strandberg, K. Räikkönen, Maternal Licorice Consumption and Detrimental Cognitive and Psychiatric Outcomes in Children, *American journal of epidemiology* 170(9) (2009) 1137-1146.
- [69] P.R. Stutchfield, R. Whitaker, A.E. Gliddon, L. Hobson, S. Kotecha, I.J.M. Doull, Behavioural, educational and respiratory outcomes of antenatal betamethasone for term caesarean section (ASTECS trial), *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* 98(3) (2013) F195-F200.
- [70] K.J. O'Donnell, A. Bugge Jensen, L. Freeman, N. Khalife, T.G. O'Connor, V. Glover, Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11beta-HSD2, *Psychoneuroendocrinology* 37(6) (2012) 818-26.
- [71] K. Erni, L. Shaqiri-Emini, R. La Marca, R. Zimmermann, U. Ehlert, Psychobiological Effects of Prenatal Glucocorticoid Exposure in 10-Year-Old-Children, *Frontiers in Psychiatry* 3 (2012) 104.
- [72] C.L. Dixon, G. Too, G.R. Saade, C. Gyamfi-Bannerman, Past and Present: A Review of Antenatal Corticosteroids and Recommendations for Late Preterm Birth Steroids, *American journal of perinatology* 35(13) (2018) 1241-1250.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Franziska Braun, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Geschlechtsspezifischer Effekt eines antenatalen Zyklus Betamethason auf den plazentaren Cortisolstoffwechsel“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

21.08.2020

Datum

---

Unterschrift

## **Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation**

Publikation: F. Braun, A.K. Hardt, L. Ehrlich, D.M. Sloboda, J.R.G. Challis, A. Plagemann, W. Henrich, T. Braun, Sex-specific and lasting effects of a single course of antenatal betamethasone treatment on human placental 11 $\beta$ -HSD2, Placenta 69 (2018) 9-19.  
Erscheinungsdatum: 09.07.2018

Beitrag im Einzelnen:

Die Idee zu dieser Publikation wurde durch TB in Zusammenarbeit mit JRGC, DMS und AP entwickelt. Die Arbeitshypothese habe ich nach der Literaturrecherche aufgestellt. Mit zwei weiteren Doktorandinnen (AKH und Frau Dr. A. Gusarova) war ich für die Rekrutierung der 178 Probanden, die Datenerhebung und die Sammlung der Plazenta- und Blutproben zuständig.

LE half mir beim Pipettieren für die ACTH- und Cortisol-ELISA-Messungen, die ich ausgewertet habe. Zur Testung der 11 $\beta$ -HSD1- und 11 $\beta$ -HSD2-Antikörper habe ich die beschriebenen immunhistochemischen Experimente an Plazenta-Paraffinschnitten nach initialer Anleitung durch LE selbstständig durchgeführt. Gemeinsam mit LE und AKH wurden Proteine aus den Plazentaprobe für die Western Blot-Versuche extrahiert. Die Etablierung, Durchführung und Auswertung der Messung des 11 $\beta$ -HSD1- und 11 $\beta$ -HSD2-Proteins an derselben Membran mittels Western Blot erfolgte durch mich. Zudem habe ich eigenständig den 11 $\beta$ -HSD2-Aktivitätsassay etabliert, die Messungen durchgeführt und ausgewertet.

Nach Beratung durch TB und Herrn Dr. Th. Harder (RKI) habe ich die ACTH- und Cortisolkonzentrationen, die 11 $\beta$ -HSD1- und 11 $\beta$ -HSD2-Proteinmengen und den 11 $\beta$ -HSD2-Aktivitätsassay statistisch ausgewertet. Die statistische Berechnung der plazentaren und neonatalen Maße, der Studienpopulation und möglicher Konfounder erfolgte gemeinsam mit AKH.

Alle Abbildungen (Abb. 1, 2, S1-4) und alle Tabellen (Tabelle 1-4) habe ich erstellt. Das Manuskript für die Publikation wurde hauptsächlich von mir verfasst und von allen Ko-Autoren, insbesondere TB, AKH und DMS, überarbeitet.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## Auszug aus der Journal Summary List 2016

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2016** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"OBSTETRICS and GYNECOLOGY"** Selected Category  
 Scheme: WoS

**Gesamtanzahl: 79 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	HUMAN REPRODUCTION UPDATE	7,768	11.748	0.016000
2	AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY	39,185	5.574	0.050440
3	OBSTETRICS AND GYNECOLOGY	32,073	5.426	0.055840
4	BJOG-AN INTERNATIONAL JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY	15,315	5.051	0.026890
5	HUMAN REPRODUCTION	29,721	5.020	0.041030
6	GYNECOLOGIC ONCOLOGY	22,924	4.959	0.038520
7	ULTRASOUND IN OBSTETRICS & GYNECOLOGY	11,611	4.710	0.019350
8	FERTILITY AND STERILITY	33,098	4.373	0.050470
9	Pregnancy Hypertension-An International Journal of Womens Cardiovascular Health	527	3.930	0.002540
10	MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION	5,130	3.585	0.007070
11	MATURITAS	5,826	3.255	0.011900
12	REPRODUCTIVE BIOMEDICINE ONLINE	5,775	3.249	0.012310
13	CLINICS IN PERINATOLOGY	2,140	3.233	0.005440
14	SEMINARS IN PERINATOLOGY	2,814	3.185	0.005540
15	Journal of Gynecologic Oncology	813	3.140	0.002190
16	Journal of Minimally Invasive Gynecology	3,451	3.061	0.007420
17	CONTRACEPTION	6,141	2.879	0.015800
18	BREAST	3,749	2.801	0.010270
19	PLACENTA	8,159	2.759	0.012650
20	BEST PRACTICE & RESEARCH CLINICAL OBSTETRICS & GYNAECOLOGY	2,584	2.755	0.003250

## Publikation

### **Sex-specific and lasting effects of a single course of antenatal betamethasone treatment on human placental 11beta-HSD2**

F. Braun, A.K. Hardt, L. Ehrlich, D.M. Sloboda, J.R.G. Challis, A. Plagemann, W. Henrich, T. Braun

Placenta 69 (2018) 9-19.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.07.007>

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## Publikationsliste

1. F. Braun, A.K. Hardt, L. Ehrlich, D.M. Sloboda, J.R.G. Challis, A. Plagemann, W. Henrich, T. Braun, Sex-specific and lasting effects of a single course of antenatal betamethasone treatment on human placental 11beta-HSD2, *Placenta* 69 (2018) 9-19. Impact factor 2,434
2. H. Gutling, M. Bionaz, D.M. Sloboda, L. Ehrlich, F. Braun, A.K. Gramzow, W. Henrich, A. Plagemann, T. Braun, The importance of selecting the right internal control gene to study the effects of antenatal glucocorticoid administration in human placenta, *Placenta* 44 (2016) 19-22. Impact factor 2,759
3. F. Braun, A.K. Gramzow, L. Ehrlich, A. Husar, D.M. Sloboda, J.R.G. Challis, W. Henrich, A. Plagemann, T. Braun, Sex-specific effects of a single course of antenatal betamethasone treatment on maternal and fetal ACTH and cortisol levels in humans *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* Volume 4 (Supplement 2) (2013) S51–S339. Poster für den 8th World Congress on DOHAD, Singapur
4. F. Braun, A.K. Gramzow, L. Ehrlich, A. Husar, D.M. Sloboda, J.R.G. Challis, W. Henrich, A. Plagemann, T. Braun, Untersuchungen zu den Effekten der antenatale Lungenreifeinduktion mit Betamethason auf die maternalen und fetalen ACTH- und Cortisol-Spiegel, *Z Geburtshilfe Neonatol* 217(S 01) (2013) V08\_3. Vortrag auf dem 26. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Perinatale Medizin in Berlin
5. T. Braun, F. Braun, A.K. Gramzow, L. Ehrlich, A. Husar, D.M. Sloboda, J.R.G. Challis, A. Plagemann, W. Henrich, Long-term sex-specific effects of a single course of antenatal betamethasone treatment on placental cortisol barrier. Abstracts of the 2014 SGI 61st Annual Scientific Meeting, March 26-29, 2014, Florence Italy, *Reprod Sci* 21 (3 Suppl) (2014) 71A-418A.
6. A.K. Gramzow, F. Braun, L. Ehrlich, A. Husar, D.M. Sloboda, J.R.G. Challis, W. Henrich, A. Plagemann, T. Braun, Lungenreifeinduktion mit Betamethason – Effekte auf das fetale Wachstum und die Glukosehomöostase, *Z Geburtshilfe Neonatol* 217(S 01) (2013) V01\_5.
7. A.K. Gramzow, F. Braun, L. Ehrlich, A. Husar, D.M. Sloboda, J.R.G. Challis, W. Henrich, A. Plagemann, T. Braun, Single course of antenatal betamethasone administration decreased fetal growth and altered maternal-fetal glucose homeostasis *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* Volume 4 (Supplement 2) (2013) S51–S339.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thorsten Braun, der mein Promotionsvorhaben engagiert und zuverlässig betreute und mir genügend Raum für eigene Ideen ließ. Nicht nur die konstruktiven Diskussionen, sondern auch das kontinuierliche Herausfordern meiner Fähigkeiten war immer wieder motivierend.

Ich möchte Anne-Katrin Hardt danken, mit der ich die aufregende und anstrengende Zeit im „Plazenta-Dienst“ teilen durfte. Durch ihre Kooperation, tatkräftigen Beistand und Gelassenheit war die Zeit im Labor nicht nur spannend, sondern angenehm.

Sehr dankbar bin ich auch Loreen Ehrlich für ihre kompetente fachliche Hilfe, aber auch für ihr immer offenes Ohr und ihre warmherzige Unterstützung.

Ebenso gilt mein Dank den Probandinnen, die sich trotz der besonderen und intimen Lebenssituation bereit erklärten, an dieser Studie teilzunehmen. Außerdem möchte ich den Pflegerinnen der präpartalen Stationen, den Ärzten und Ärztinnen und insbesondere den Hebammen der Kliniken für Geburtsmedizin der Charité herzlich für ihre Unterstützung bei der Realisierung der Studie danken. Wertvolle Unterstützung im zentralen Radioaktivlabor der Charité erhielt ich von Frau Rita Geppert und Herrn Dr. Hugo Sanchez. Mein Dank gilt auch der Studienstiftung des deutschen Volkes, deren Kongressreisestipendium mir die Posterpräsentation und Teilnahme am 8. DOHAD Weltkongress in Singapur ermöglicht hat.

Bereichernde Diskussionen mit Anregungen zu Hypothesen, Experimentaufbau und Statistik führte ich mit Sanne Burkert. Anja Garbe, Linda Burmeister, Helen und Johanna Braun bin ich für ihr schnelles und kompetentes Korrekturlesen und die vielen Verbesserungsvorschläge sehr dankbar. Bei meinen Eltern bedanke ich mich für ihre Geduld und ihren Glauben an die Fertigstellung der Arbeit. Abschließend möchte ich mich bei João Tavares bedanken, der mir bei allen Rückschlägen zur Seite gestanden und mir für das Schreiben dieser Arbeit den Rücken freigehalten hat.