

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

DISSERTATION

Auswirkungen maternaler Dexamethasontherapie in der
Frühschwangerschaft auf Morphologie und Stereologie der
Schafsplazenta

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Karolin Lange

aus Nauen

Datum der Promotion: 06.09.2019

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Braun T, Meng W, Shang H, Li S, Sloboda DM, Ehrlich L, Lange K, Xu H, Henrich W, Dudenhausen JW, Plagemann A, Newnham JP, Challis JR. Early dexamethasone treatment induces placental apoptosis in sheep. *Reproductive Sciences* 2015;22:47-59.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnisse	III
Abstract	IIX
1 Einleitung	1
1.1 Stress in der Schwangerschaft	1
1.2 Rolle der Plazenta.....	7
1.3 Tiermodell	8
1.4 Auswirkungen von Stress auf Morphologie u. Stereologie der Schafsplazenta	16
1.5 Auswirkungen von GC auf humane Plazenta und Schafsplazenta	17
1.6 Geschlechtsspezifische Unterschiede	19
1.7 Hypothesen und Ziel	21
2 Methodik	23
2.1 Tiermodell	23
2.2 Immunhistochemische Untersuchung	24
2.3 Bildanalyse	27
2.4 Berechnungen	34
2.5 Statistische Auswertung.....	37
2.6 Reagenzien, Lösungen, Geräte und Software	40
3 Ergebnisse	41
3.1 Morphologische Untersuchung	41
3.2 Stereologische Untersuchung	47
3.3 Korrelationsanalysen	68
4 Diskussion	70
4.1 Hintergrund	70
4.2 Morphologische Untersuchung	70
4.3 Stereologische Untersuchung	74
4.4 Studienlimitation.....	80

4.5	Zusammenfassung	81
5	Literaturverzeichnis	83
6	Eidesstaatliche Versicherung	91
7	Anteilerklärung	92
8	Lebenslauf	93
9	Publikationen.....	94
10	Danksagung.....	95
11	Anhang.....	96

Verzeichnisse

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse).....	2
Abb. 2:	Kortisolsynthese und Bezeichnung der Hormonbildungsstörung bei AGS	5
Abb. 3:	Übersicht der Interaktion zwischen Mutter, Plazenta und Fetus.....	8
Abb. 4:	Schafsuterus.....	10
Abb. 5:	Humane Plazenta und Schafsplazenta im Vergleich	12
Abb. 6:	Plazentome schematisch und im Bild	13
Abb. 7:	Plazentom (Typ D) mit schematischer Aufteilung in Level 1, 2 und 3.....	16
Abb. 8:	Auswirkungen früher maternaler DEX-Therapie auf das Fetalgewicht bei weiblichen und männlichen Feten, abhängig vom Gestationsalter	20
Abb. 9:	Behandlung und Probenentnahme mit Anzahl und Geschlecht der Feten ...	23
Abb. 10:	Mäanderförmige Rasteraufnahme für Plazentommosaik.....	27
Abb. 11:	Einzelaufnahme mit Gefäß	28
Abb. 12:	Gesamtaufnahme Plazentom mit Leveln	29
Abb. 13:	Anordnung der durch das Ausschnitts-Makro generierten Bilder.....	30
Abb. 14:	Übersicht ausgewertete Bilder pro Plazentom.....	31
Abb. 15:	Makro „Curve“	32
Abb. 16:	Makro „Grid“	33
Abb. 17:	Schematische Darstellung der einzelnen Parameter im Makro „Curve“ und des Funktionsprinzips des Makros.....	34
Abb. 18:	Übersichtsbild Summierung pro Plazentom.....	35
Abb. 19:	Bogenlänge (l) pro Rasterkreuz (p)	36
Abb. 20:	Darstellung der Entwicklung der Variationskoeffizienten der Parameter I_M , Pi_M , I_F und Pi_F	38
Abb. 21:	Prozentualer Anteil der Plazentomtypen an der Gesamtplazentomzahl zu vier Zeitpunkten der Schwangerschaft	45
Abb. 22:	Auswirkungen der frühen maternalen DEX-Therapie auf die prozentuale typspezifische Plazentomverteilung bei weiblichen und männlichen Feten zu vier Zeitpunkten der Schwangerschaft.....	46
Abb. 23:	Darstellung der Oberflächendichte des ges. Gewebes geschlechtsspezifisch in der Kontroll- und DEX-Gruppe in Abhängigkeit vom Gestationsalter.....	47

Verzeichnisse

Abb. 24:	Darstellung der Oberflächendichte des gesamten Gewebes plazentom-spezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung.	48
Abb. 25:	Darstellung der Oberflächendichte des maternalen Gewebeanteils (S_{VM}) in der Kontroll- und DEX-Gruppe in Abhängigkeit vom Gestationsalter.....	49
Abb. 26:	Darstellung der plazentomgewichtsspezifischen Oberflächendichte des ges. Gewebes an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung.....	50
Abb. 27:	Darstellung der plazentomgewichtsspezifischen Oberflächendichte des ges. Gewebes geschlechtsspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung..	51
Abb. 28:	Darstellung der plazentomgewichtsspezifischen Oberflächendichte des maternalen Gewebeanteils (S_{AM}) plazentomspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung..	52
Abb. 29:	Darstellung der plazentomgewichtsspezifischen Oberflächendichte des fetalen Gewebeanteils (S_{AF}) plazentomspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung	53
Abb. 30:	Darstellung der plazentomgewichtsspezifischen Oberflächendichte des gesamten Gewebes in der Kontroll- und DEX-Gruppe in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	54
Abb. 31:	Darstellung der plazentomgewichtsspezifischen Oberflächendichte des gesamten Gewebes geschlechtsspezifisch in der Kontroll- und DEX-Gruppe in Abhängigkeit vom Gestationsalter..	55
Abb. 32:	Darstellung der plazentagewichtsspezifischen Oberflächendichte des gesamten Gewebes an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung.....	56
Abb. 33:	Darstellung der plazentagewichtsspezifischen Oberflächendichte des gesamten Gewebes geschlechtsspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung.....	57
Abb. 34:	Darstellung der plazentagewichtsspezifischen Oberflächendichte des maternalen Gewebeanteils (S_{TM}) plazentomspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung.	58
Abb. 35:	Darstellung der plazentagewichtsspezifischen Oberflächendichte des fetalen Gewebeanteils (S_{TF}) plazentomspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung.	59

Verzeichnisse

Abb. 36: Darstellung der Ratio aus maternalen und fetalen Oberflächendichte ($\text{Ratio}_{\text{SVM/SVF}}$) an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung und des Geschlechts	60
Abb. 37: Darstellung der Ratio aus maternalen und fetalen Oberflächendichte ($\text{Ratio}_{\text{SVM/SVF}}$) geschlechtsspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung.....	60
Abb. 38: Darstellung der mittleren Oberflächendichte des maternalen (S_{VM}) und fetalen (S_{VF}) Gewebeanteils der DEX-Gruppe und der männlichen Gruppe in Abhängigkeit vom Gestationsalter	61
Abb. 39: Darstellung der mittleren Oberflächendichte des maternalen (S_{VM}) und fetalen (S_{VF}) Gewebeanteils der männl. DEX-Gruppe in Abhängigkeit vom Gestationsalter.....	61
Abb. 40: Darstellung der Gefäßdichte des gesamten Gewebes an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	62
Abb. 41: Darstellung der Gefäßdichte im maternalen Gewebeanteil (N_{VM}) an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung.....	63
Abb. 42: Darstellung der Gefäßdichte im maternalen Gewebeanteil (N_{VM}) geschlechtsspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung.	63
Abb. 43: Darstellung der Gefäßdichte im maternalen Gewebeanteil (N_{VM}) plazentom-spezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung.	64
Abb. 44: Darstellung der Gefäßdichte des gesamten Gewebes der weiblichen und männlichen Gruppe in Abhängigkeit von der Behandlung.	65
Abb. 45: Darstellung der VEGF mRNA expression bei Kontroll- und DEX-Gruppe in Abhängigkeit vom Gestationsalter.	66
Abb. 46: Darstellung der VEGF mRNA expression bei Kontroll- und DEX-Gruppe in Abhängigkeit vom Geschlecht.	67
Abb. 47: Darstellung der VEGF mRNA expression bei Kontroll- und DEX-Gruppe in Abhängigkeit von Gestationsalter und Geschlecht.	67
Abb. 48: Darstellung der A-Plazentomanzahl und der B- und C-Plazentomanzahl pro Tier der Kontroll- und BET-Gruppe	73
Abb. 49: Zusammenfassung plazentarer Anpassungsmechanismen bzgl. Morphologie und Stereologie nach Glukokortikoiden in der frühen Schafsschwangerschaft mit geschlechtsspez. Differenzierung	82

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Nebenwirkungen der Behandlung mit Kortikosteroiden	3
Tab. 2:	Allgemeine Effekte der antenatalen GC-Behandlung auf das Kind.....	4
Tab. 3:	Zusammenfassung der Folgen pränataler GC-Behandlung	5
Tab. 4:	Ausgewählte Aspekte zur konzeptionellen und semantischen Historie der entwicklungs- und umweltabhängigen Ontogenese.....	6
Tab. 5:	Untersuchungen zur Plazentomverteilung in der IUGR-Schafsplazenta.....	15
Tab. 6:	Veränderungen in der Schafsplazenta bei intrauteriner Wachstumsrestriktion unterschiedlichen Ursprungs.	17
Tab. 7:	Auswirkungen der frühen maternalen DEX-Therapie auf das Plazentagewicht bei weiblichen und männlichen Feten.....	41
Tab. 8:	Auswirkungen der frühen maternalen DEX-Therapie auf das Einzelplazentomgewicht bei weiblichen Feten.....	42
Tab. 9:	Auswirkungen der frühen maternalen DEX-Therapie auf das Einzelplazentomgewicht bei männlichen Feten.	42
Tab. 10:	Auswirkungen der frühen maternalen DEX-Therapie auf die Gesamtplazentomanzahl bei weiblichen und männlichen Feten.	43
Tab. 11:	Auswirkungen der frühen maternalen DEX-Therapie auf die typspezifische Plazentomanzahl bei weiblichen Feten.....	44
Tab. 12:	Auswirkungen der frühen maternalen DEX-Therapie auf die typspezifische Plazentomanzahl bei männlichen Feten.....	44
Tab. 13:	Zusammenfassung der Korrelationen des Fetalgewichts mit den Oberflächenparametern geschlechtsabhängig im Schwangerschaftsverlauf.....	69

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AGS	Adrenogenitales Syndrom
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase-Komplex
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AKV	Antikörperverdünner
BET	Betamethason
BNC	Binucleate cells (dt. Binukleäre Zellen)
CRH	Corticotropin-releasing-Hormone
DAB	3,3'Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DEX	Dexamethason
dG	day of gestation (dt. Schwangerschaftsalter in Tagen)
GC	glucocorticoid (dt. Glukokortikoid)
h	Stunde(n)
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal (axis) (dt. Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (-Achse))
HRP	horseradish peroxidase (dt. Meerrettichperoxidase)
IGF	insulin-like growth factors (dt. Insulinähnliche Wachstumsfaktoren)
IUGR	intrauterine growth retardation (dt. Intrauterine Wachstumsretardierung)
KI	Konfidenzintervall
KKE	Korrelationskoeffizient
KW-Test	Kruskall-Wallis-Test
LRI	Lungenreifeinduktion
MANOVA	Multivariate Varianzanalyse
mRNA	messenger ribonucleic acid (dt. Boten-Ribonukleinsäure)
MWU	Mann-Whitney-U-Test
n	Anzahl
NEC	necrotizing enterocolitis (dt. Nekrotisierende Enterokolitis)
PBS	phosphate buffered saline (dt. Phosphatpufferlösung)

Verzeichnisse

PGHS	Prostaglandinsynthase
RDS	respiratory distress syndrome (dt. Atemnotsyndrom)
RT	Raumtemperatur
SEM	standard error of means (dt. Standardfehler)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (dt. vaskulärer Endothelwachstumsfaktor)
11 β HSD	11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Abstract

Einleitung: Die Gabe antenataler Glukokortikoide (GC), u.a. zur Lungenreifeinduktion bei drohender Frühgeburtlichkeit in der Spätschwangerschaft oder bei Verdacht auf ein Adrenogenitales Syndrom (AGS) in der Frühschwangerschaft, kann, in sensiblen Entwicklungsphasen der Ontogenese appliziert, mit intrauterinen Beeinträchtigungen der Fetalentwicklung und postpartalen, sogar lebenslang anhaltenden Veränderungen von Organfunktionen einhergehen. Ein niedriges Fetalgewicht, als Surrogatmarker einer gestörten intrauterinen Entwicklung, ist dabei ein Indikator für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko im Lauf des Lebens. Die Plazenta, als Verbindung zwischen maternalem und fetalem Kreislauf, spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung des Kindes und stellt somit einen Schwerpunkt in der Ursachenforschung dar. Hierbei vermutet man unterschiedliche, u.a. geschlechtsspezifische Anpassungsstrategien, die zur fetalen Programmierung beitragen könnten. Das Schafsmodell wird seit Jahren zur Untersuchung der Auswirkungen der GC-Exposition auf die intrauterine Entwicklung und die potenziellen Langzeitfolgen verwendet. Hier zeigte sich nach Dexamethason(DEX)-Gabe in der Frühschwangerschaft lediglich bei weiblichen Feten eine transiente fetale Gewichtsreduktion. Eine geschlechtsspezifische Analyse der Auswirkungen maternaler GC-Gaben ist daher essentiell.

Ziel: Analyse der morphologischen und stereologischen Veränderungen der Schafsplazenta im Schwangerschaftsverlauf nach früher maternaler DEX-Therapie unter Beachtung geschlechtsspezifischer Unterschiede.

Methoden: Merinoschafe mit Einlingsschwangerschaften ($n = 111$) wurden randomisiert und erhielten am Schwangerschaftstag 40 und 41 im Abstand von 12 h vier intramuskuläre Injektionen DEX ($0,14 \text{ mg/kg}$ maternalem Körpergewicht, $n = 50$) oder, in der Kontrollgruppe, Natriumchlorid (entsprechend $2 \text{ ml NaCl/Injektion}$, $n = 61$). Am Tag 50, 100, 125 und 140 wurde fetales und plazentares Gewebe gewonnen und das maternale und fetale Gewebe sowie das Gefäßendothel mittels immunhistochemischer Doppelfärbung mit Cytokeratin und von-Willebrand-Faktor identifiziert. Mit neu generierten Auswertungsalgorithmen wurden die 5 wichtigsten stereologischen Parameter anhand computergestützter Bildanalyse untersucht. Differenziert in maternalen und fetalen Gewebeanteil wurden die Oberflächendichte (S_V), die plazentom (S_A)- und

plazentagewichtsspezifische (S_T) Oberflächendichte, die Ratio der Gewebeanteile sowie die Gefäßdichte (N_V) ausgewertet.

Ergebnisse: Die frühe maternale DEX-Behandlung führt nicht zur Reduktion des Plazentagewichts, allerdings veränderten sich die Plazentomsubgruppenanteile im Schwangerschaftsverlauf. Bei männlichen Feten zeigt sich nach DEX-Behandlung eine Zunahme des C-Plazentomanteils am Tag 125, bei weiblichen Feten eine Gewichtszunahme der C-Plazentome an den Tagen 100 und 140.

Nach DEX-Behandlung wird bei weiblichen Feten die Zunahme der Oberflächenparameter S_V , S_A und S_T im Schwangerschaftsverlauf inhibiert. Am Tag 100 kommt es zur gesteigerten S_V und S_A . Männliche Feten weisen einen S_V - und S_A -Anstieg sowie einen Ratio-Abfall im Schwangerschaftsverlauf auf. C-Plazentome zeigen eine Zunahme von S_V und S_T im Schwangerschaftsverlauf. Die Abnahme der Gefäßdichte mit Zunahme der Austauschfläche wird ausgesetzt.

Schlussfolgerung: Nach maternaler DEX-Therapie in der frühen Schafsschwangerschaft kommt es zu geschlechtsabhängigen Veränderungen von Anteil und Gewicht der C-Plazentome sowie der Oberflächen- und Gefäßdichte. Diese können ursächlich für die beobachteten kurzzeitigen Beeinträchtigungen der Fetalentwicklung und die langfristigen Folgen von GC in der frühen Schafsschwangerschaft sein.

Abstract

Antenatal glucocorticoid (GC) therapy, e.g. for lung maturation at risk of preterm birth in late pregnancy or suspected congenital adrenal hyperplasia (CAH) in early pregnancy, given in sensitive windows of plasticity, may lead to intrauterine, postpartal and lifetime impairments for the child. Low fetal birth weight, seen with abnormal intrauterine development, is a marker for high risk of affection during lifetime at that. The placenta, as a link of maternal and fetal circulation, has a special impact on fetal growth and is in focus of causal investigation. Different, including sex specific, ways of adaption are assumed, lastly leading to “fetal programming”. For years the sheep is used as a model to study the effect of GC on intrauterine development and long-term consequences. Thereby only females had transient reductions of weight after early dexamethasone (DEX) treatment. This makes sex specific analyses after maternal GC necessary.

Objectives: Sex specific investigation of morphological and stereological changes in sheep placenta after early maternal DEX therapy in course of pregnancy.

Methods: Pregnant ewes carrying singleton fetuses (n = 111) were randomized to DEX treatment (four intramuscular injections of 0.14 mg/kg ewe weight per 12 hours, n = 50) or control (accordingly 2 ml saline per injection, n = 61) at 40 to 41 days of gestation (dG). Fetal and placental tissue was collected at 50, 100, 125 and 140 dG. Identification of maternal and fetal tissue and endothelium was realized with immunohistochemical double staining of cytokeratin and von-Willebrand-Faktor. With new-generated algorithms of evaluation 5 stereological parameters were raised in computerized analyses of images. Surface density (S_V), total placentomal (S_A) and total placental surface area (S_T), maternal over fetal surface density and vessel density (N_V) were evaluated for maternal and fetal part of tissue.

Results: Early DEX treatment does not cause reductions of placental weight but shifts in fraction of placentome subtypes in course of pregnancy. After DEX in male fetuses fraction of C-placentomes increases at 125 dG, in female fetuses C-placentome weight rises at 100 dG and 140 dG. DEX inhibits natural rise of S_V , S_A and S_T in female fetuses in course of pregnancy. In 100 dG DEX leads to higher S_V and S_A . Male fetuses have increased S_V and S_A and decreased maternal over fetal surface densities after DEX. Furthermore, C-placentomes show raised S_V and S_T and DEX intermitted natural reduction of vessel density with gained exchange area.

Abstract

Conclusion: Early maternal DEX therapy in pregnant ewes causes sex specific changes of fraction and weight of C type placentomes as well as modifications of surface- and vessel density. These might contribute to the observed short-term impairments of fetal development and long-term effects of GC in early sheep pregnancy.

1 Einleitung

1.1 Stress in der Schwangerschaft

1.1.1 Glukokortikoide

Die körpereigenen Glukokortikoide (GC) zählen zu der Gruppe der Steroidhormone und werden in der Nebennierenrinde aus Cholesterin synthetisiert.^{1,2} Das bedeutendste GC ist das Stresshormon Kortisol.³ GC beeinflussen nahezu jedes Organ und Gewebe des Körpers und steuern vielfältig lebenswichtige Funktionen. Sie prägen die Aktion und die Reaktionsrichtung des zugrundeliegenden Intermediärstoffwechsels sowie die Aufrechterhaltung eines adäquaten kardiovaskulären Tonus. Außerdem werden die Aktivität, die Art von Immun- und Entzündungsreaktionen und zahlreiche Funktionen des Zentralnervensystems, einschließlich Wachheit, Wahrnehmung, Stimmungslage und Schlaf durch GC reguliert. Eine physiologische GC-Konzentration ist zudem unerlässlich für eine normale Nierentubulusfunktion und die Homöostase im Wasser- und Elektrolythaushalt. GC passieren problemlos die Zellmembran und interagieren mit den zytoplasmatischen und nukleären Glukokortikoidrezeptoren. Sie haben somit Anteil an nahezu allen molekularen und zellulären Prozessen innerhalb eines Organismus.⁴

An der Hormonfreisetzung sind im Wesentlichen drei Komponenten beteiligt. Der Hypothalamus gibt „Corticotropin-releasing-hormon“ (CRH) ab. Dies induziert in der Hypophyse die Sezernierung von adrenokortikotrophem Hormon (ACTH), welches wiederum an der Nebennierenrinde die Ausschüttung von Kortisol bewirkt (Abb. 1).⁵ Durch einen steigenden Kortisolspiegel wird, über negative Rückkopplung, die CRH- und ACTH-Ausschüttung in Hypothalamus und Hypophyse gehemmt. Die Freisetzung erfolgt in zirkadianem Rhythmus mit einem Maximum am Morgen sowie Minima am späten Abend und in den frühen Morgenstunden. Zusätzliches Kortisol kann stressabhängig durch ACTH-Freisetzung sezerniert werden.⁵

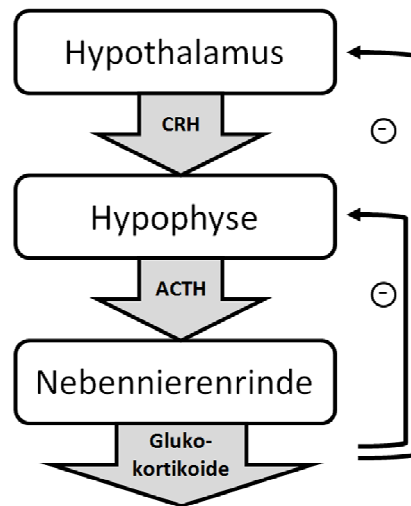


Abb. 1: Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse), ⊖ = negative Rückkopplung, mod. nach Mazurek et al.⁵

Seit der Einführung synthetischer GC in den 1940ern zur Behandlung von rheumatoider Arthritis hat sich ihr Einsatzgebiet rasant erweitert. Entzündliche Erkrankungen wie Asthma, allergische Rhinitis, Autoimmunkrankheiten, chronisch entzündliche Darm-erkrankungen sowie etliche dermatologische, ophthalmologische und neurologische Erkrankungen werden heute mit GC behandelt.⁶

Trotz ihres hohen therapeutischen Nutzens haben synthetische GC zum Teil schwere Nebenwirkungen. Diese sind vielfältig und fast alle Organsysteme können betroffen sein (Tab. 1). Die Nebenwirkungen sind abhängig von der Behandlungsdauer und der Dosierung (> 5 mg pro Tag). Außerdem besteht bei einer Langzeittherapie die Gefahr einer Glukokortikoidresistenz, die den therapeutischen Effekt einschränken kann.⁶

Organ	Nebenwirkungen
Haut	Atrophie, Striae rubrae distensae, verzögerte Wundheilung, Steroidakne, Periorale Dermatitis, Vollmondgesicht, Erytheme, Teleangiektasien, Petechien, Hypertrichose
Skelett und Muskeln	Muskelatrophie/Myopathie, Osteoporose, Knochennekrosen
Auge	Glaukom, Katarakt
Zentralnervensystem	Störungen in Verhalten, Gedächtnis, Wahrnehmung, Gemütslage (Euphorie, Unruhe, Aggressivität, Schlafstörungen, Appetitsteigerung), "Steroidale Psychose", Steroidabhängigkeit
Elektrolyte, Metabolismus, Endokrines System	Cushing-Syndrom, Hyperglykämie, Diabetes mellitus, Nebennierenatrophie, Wachstumsstörung, Hypogonadismus, verspätete Pubertät, gesteigerte Na ⁺ Retention und K ⁺ Exkretion
Kardiovaskuläres System	Hypertonie, Thrombose, Vaskulitis, Fettstoffwechselstörung
Immunsystem	Immunsuppression: erhöhtes Infektionsrisiko (z. B. Candida), Reaktivierung früherer latenter Viren (z. B. CMV)
Gastrointestinales System	Magengeschwür, gastrointestinale Blutung, Pankreatitis

Tab. 1: Nebenwirkungen der Behandlung mit Kortikosteroiden, mod. nach Schacke et al.⁷

1.1.2 Glukokortikoide in der Schwangerschaft

1.1.2.1 Indikationen und Effekte

In der Schwangerschaft sind endogene GC für das fetale Wachstum, die Gewebeentwicklung und die Organreifung (im Besonderen Lunge, Leber und Gastrointestinaltrakt) und damit die Vorbereitung des Fetus auf das extrauterine Leben essentiell.^{8,9} Dabei ist ein präpartaler Kortisolanstieg physiologisch, um einen harmonischen Übergang zwischen Reifungsprozess und Geburtseinleitung zu ermöglichen.⁹⁻¹¹ Mütterlicher Stress durch kritische Lebensumstände, schwere psychische oder physische Traumata oder Angst vor der Geburt führt ebenso zu verstärkter endogener maternaler Kortisolausschüttung wie Frühgeburtlichkeit, Hypoxie oder maternale Unterernährung.^{11,12}

Exogene, synthetische GC spielen eine wichtige therapeutische Rolle in der Geburtmedizin. Schwangere Frauen werden bei drohender Frühgeburt mit Betamethason (BET) oder Dexamethason (DEX) behandelt. Primäres Ziel ist dabei, ein Atemnot-

Einleitung

syndrom (RDS) des Frühgeborenen zu verhindern, indem die Surfactantproduktion (und folglich die Lungenreifung) induziert wird. Diese Praxis verringert, laut aktuellster Erhebung von 2017, das Risiko ein RDS zu entwickeln signifikant um 33,05 % (95 % Konfidenzintervall (KI) 0,56 – 0,77).¹³⁻¹⁵ Für das moderate/ schwere RDS sinkt das Risiko gar um 40,05 % (95 % KI 0,38 – 0,91). Neben der direkten Stimulation der Surfactantproduktion gibt es noch zahlreiche andere positive Effekte der antenatalen GC-Behandlung. So kann das Auftreten einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) signifikant um 50 % (95 % KI 0,32 – 0,78), die Rate intraventrikulärer Blutungen um 45 % (95 % KI 0,40 – 0,76), die Rate an neonatalen Infektionen innerhalb der ersten 48h um 40 % (95 % KI 0,41 – 0,88) und insgesamt die neonatale Mortalität um 30,05 % (95 % KI 0,59 – 0,81) gesenkt werden¹⁵ (Zusammenfassung: Tab. 2).

Effekt	Vorteil
↓	Mortalität
↓	Morbidität
↓	RDS
↓	Intraventrikuläre Blutungen
↓	Periventrikuläre Leukomalazie
↓	Neonatale Infektionen
↓	Nekrotisierende Enterokolitis (NEC)
↓	Bedarf an Atmungsunterstützung
↓	Behinderung
↓	Zerebralparese
↑?↓	Intelligenzquotient

Tab. 2: Allgemeine Effekte der antenatalen GC-Behandlung auf das Kind, mod. nach Braun et al.¹¹

Neben dieser intermittierenden GC-Behandlung müssen während der gesamten Schwangerschaft, abhängig vom Schweregrad, mütterliches Asthma bronchiale oder Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis kontinuierlich mit GC behandelt werden.^{16,17} Eine weitere Indikation für eine kontinuierliche Therapie ist der Verdacht auf ein Adrenogenitales Syndrom (AGS) des Ungeborenen, einer rezessiv vererbten Störung der Steroidogenese. Diese zeigt sich in über 90 % der Fälle in einem Mangel des Enzyms 21 β -Hydroxylase (Abb. 2), der zu einer partiellen bis vollständigen Blockade der Kortisol-Synthese und reflektorisch vermehrten Kortisol-Vorstufen (Abb. 1) führt.¹⁸ Eine Behandlung mit GC kann die Virilisierung (Vermännlichung) der äußeren Genitalien betroffener Mädchen minimieren oder verhindern.¹⁸

Einleitung

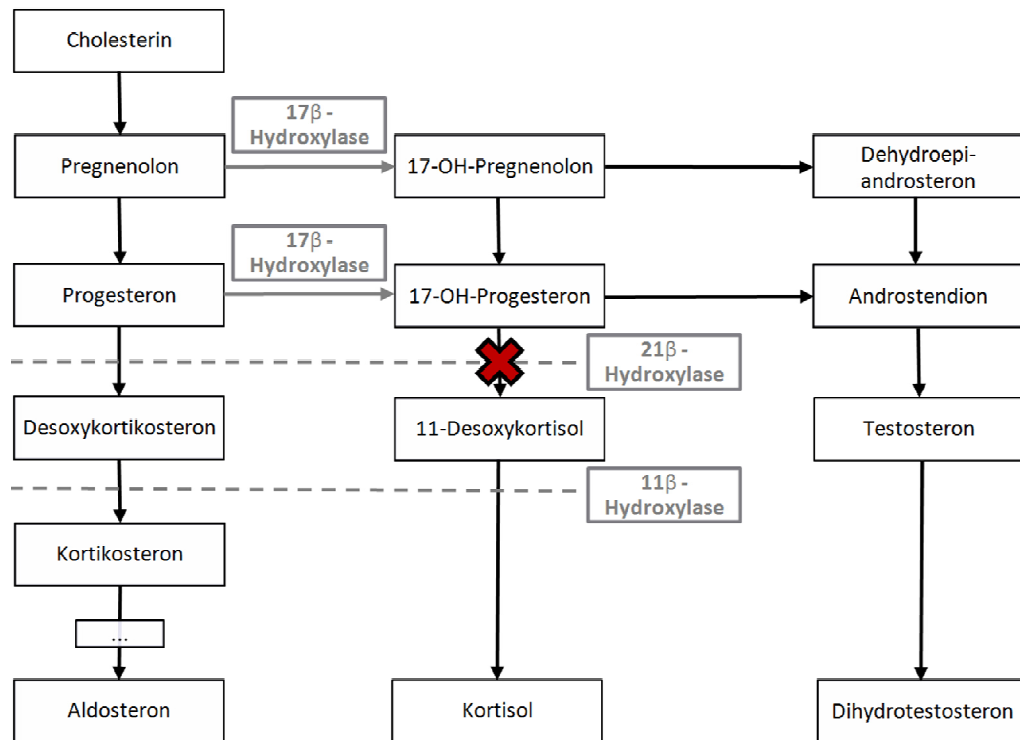


Abb. 2: Kortisolsynthese und Bezeichnung der Hormonbildungsstörung bei AGS, mod. nach Lajic et al.¹⁸

1.1.2.2 Negative Folgen der Glukokortikoid-Behandlung

Neben den Folgen einer Glukokortikoid-Langzeitbehandlung für die Mutter (Tab. 1) gibt es, insbesondere bei hohen repetitiven Gaben von antenatalen GC, gravierende Auswirkungen auf die Entwicklung des Fetus (Tab. 3).

Effekt	Folgen der GC-Behandlung in der Schwangerschaft	Referenz
↓	Fetales Wachstum (Geburtsgewicht, Kopfumfang, Körpergröße, etc.)	14,19-26
↓	Plazentagröße	21
↑	Beeinträchtigung der HPA-Achse	27-30
↑	Neuropsychiatrische- und Verhaltensänderungen	20,30,31
↑	Metabolische Beeinträchtigungen (Adipositas, Hyperinsulinämie, Hyperglykämie, etc.)	22,32
↑	Kardiovaskuläre Veränderungen	8,22,30,32-35
↑	Abweichende fetale Pulsfrequenz	36,37
↓	Nierenfunktion (Glomeruläre Filtrationsrate)	38

Tab. 3: Zusammenfassung der Folgen pränataler GC-Behandlung, mod. nach Braun et al.¹¹

Nach intrauterinen Beeinträchtigungen (reduziertes Wachstum (IUGR), veränderte Herzfrequenz etc.) und einem daraus resultierenden niedrigeren Geburtsgewicht sind die Kinder des Weiteren oft lebenslang mit metabolischen, kardiovaskulären und

Einleitung

neuropsychiatrischen Erkrankungen belastet (siehe Tab. 3). Das Ausmaß der Folgen ist von der Anzahl der Dosierungen und dem Zeitpunkt der Applikation abhängig.²³

Die kausalen Zusammenhänge zwischen diesen weitreichenden Auswirkungen und Stress bzw. GC-Behandlung in der Schwangerschaft sind noch nicht vollständig geklärt. Dabei weist der Gedanke einer umweltabhängigen Ontogenese und Phylogenese im Allgemeinen bereits eine lange Historie auf (Tab. 4). Hier wird ein Erklärungsansatz in der These zur Fetalen Programmierung beschrieben, wonach ein Stimulus in einem sensiblen Zeitfenster der Schwangerschaft eine permanente oder langzeitige Veränderung in der Struktur oder Funktion des Organismus bedingt.³⁹

Autor(en)	Jahr	Konzept/ Begriff
Lamarck	1809	Vererbung erworbener Eigenschaften
Saint-Hilaire	1837	Teratologie (Teratomorphogenese)
Haeckel	1866	Ökologie
Stockard	1921	Kritische Periode in der Entwicklung
Spemann und Mangold	1924	Organisatoreffekt in der Embryogenese
Lorenz	1935	Verhaltensprägung
Waddington	1942	Epigenetik
Ashby	1947	Biologische Selbstorganisation
Werboff und Gottlieb	1963	Verhaltensteratologie
Dubos	1966	Biologischer Freudianismus
Dörner	1974/1975	Funktionelle Teratologie (Hormonale Prä-Programmierung)
Burchfield	1979	Prädiktive Adaptive Reaktion
Freinkel	1980	Nährstoffvermittelte Teratogenese
Dörner und Plagemann	1987/1994	Epigenetische materno-fetale Transmission erworbener Eigenschaften
Lucas	1991	Nutritionale Programmierung
Hales und Barker	1992	<i>Small-Baby-Syndrome-Hypothese</i>
Gluckman und Hanson	2004	<i>Match-Mismatch-Hypothese</i>
Plagemann	2011	Vegetative Prägung und Distress-Disnutrition-Hypothese

Tab. 4: Ausgewählte Aspekte zur konzeptionellen und semantischen Historie der entwicklungs- und umweltabhängigen Ontogenese nach Plagemann.⁴⁰

Das bedeutet, dass schon intrauterine Milieuveränderungen, die zu unterschiedlichen fetalen Adaptionsprozessen führen, lebenslange Folgen haben können. In den weltweiten Fokus gelangten diese ursprünglich bereits durch Dörner⁴¹ postulierten Zusammenhänge durch die Arbeiten von Barker und Hales. Sie zeigten, dass ein geringes Fetal- und Geburtsgewicht („small baby syndrome“) zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko für die koronare Herzkrankheit,⁴² das metabolische Syndrom und Typ II Diabetes⁴³ führt. Sie bezeichneten dies als „thrifty phenotype hypothesis“, die

Einleitung

Hypothese vom sparsamen Phänotyp, die z.B. eine nach maternalen Nahrungsrestriktion verminderte fetale und neonatale Insulinsekretion zum „Sparen“ von Energie einschließt.⁴⁴ Dies wäre postnatal unter erwarteten schlechten Ernährungsbedingungen von Vorteil. In wohlhabenden Gesellschaften, in denen Nahrung im Überfluss vorhanden ist, wendet sich dieser evolutionäre Vorteil jedoch in einen Nachteil und führt zu Krankheiten (Bsp. Diabetes).⁴⁵

Als Konzept der „Vegetativen Prägung“ beschreibt Plagemann, in Ergänzung der Lorenzschen „Verhaltensprägung“, die frühe umweltabhängige Konditionierung der vegetativen Grundfunktionen in einem vorgegebenen Entwicklungsfenster. Der werdende Organismus „verinnerlicht“ unbewusst die herrschenden Bedingungen als Norm (auf epigenomischer und mikrostruktureller Ebene).⁴⁰ Unter „Perinataler Programmierung“ versteht man, laut Plagemann, dagegen längere Entwicklungsphasen in denen Prägung stattfindet (Konzeption bis Abschluss des zweiten Lebensjahres) und die Funktionsweise der Mechanismen, die durch Prägung erworbenen Normwerte als Sollwerte anzustreben.⁴⁰

Gluckman et al. verallgemeinerten diese Thesen zur „Match-Mismatch“-Theorie (Tab. 4) als allgemeines, evolutionsbiologisch grundlegendes Prinzip.⁴⁶ Ein „Mismatch“ entspricht dabei der Diskrepanz zwischen intrauteriner „prädiktiver Adaption“ an widrige Umweltbedingungen und den Anforderungen des extrauterinen Lebens.^{45,46}

Suboptimale Bedingungen in der Schwangerschaft wie z.B. maternale Unterernährung, psychischer Stress oder GC-Exposition können demnach lebenslang Auswirkungen auf den Organismus des Kindes haben. Anhand pränataler GC-Gaben wurden diese Stressauswirkungen in unterschiedliche Organsysteme verfolgt und verschiedene Forschungsansätze zu deren Entstehung diskutiert. In der vorliegenden Arbeit befindet sich der Schwerpunkt auf der Bedeutung des GC-Einflusses auf die Plazenta, da diese in der Fetalentwicklung eine besondere Position einnimmt.

1.2 Rolle der Plazenta

Als Verbindung zwischen mütterlichem und fetalem Kreislauf spielt die Plazenta eine zentrale Rolle für die Entwicklung des Kindes. Ihre Aufgaben werden nach der Geburt

Einleitung

von Niere, Gastrointestinaltrakt, Lunge und Endokrinium übernommen,⁴⁷ was die Diversität dieses Organs widerspiegelt.

Zu den primären Funktionen der Plazenta gehören die Bildung einer immunologischen Barriere und die Regulation des Transfers von Atemgasen, Wasser, Elektrolyten und vor allem Nährstoffen zwischen Fetus und Mutter. Weiterhin wird durch die Plazenta eine große Anzahl an Peptid- und Steroidhormonen, Cytokinen und Signalmolekülen produziert und sezerniert.⁴⁷ Diese wirken zum einen auf das fetale Gewebe, zum anderen indirekt durch metabolische Umsetzung auf die Mutter und die Plazenta, um die fetale Nährstoffzufuhr anzupassen (Abb. 3).⁴⁸ Veränderungen in der physiologischen Entwicklung und Funktion haben aufgrund der einzigartigen Bedeutung der Plazenta weitreichende Konsequenzen für den Fetus und sind vermutlich ein Ursprung fetaler Prägung.⁴⁸

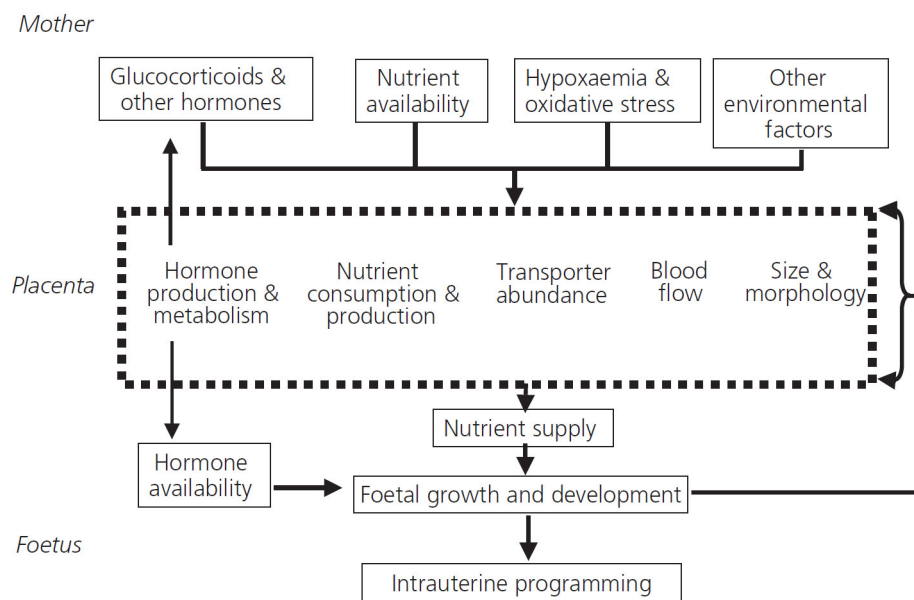


Abb. 3: Übersicht der Interaktion zwischen Mutter, Plazenta und Fetus. Originalabbildung, Fowden et al.⁴⁸

1.3 Tiermodell

Aus ethischen und praktischen Gründen können viele Untersuchungen zur Stressexposition nicht in der humanen Schwangerschaft durchgeführt werden. Tiermodelle haben gegenüber klinischen oder epidemiologischen humanen Studien zudem zahlreiche Vorteile.

Der Mensch teilt viele seiner biologischen Eigenschaften auf zellulärer und molekularer Ebene mit einem breiten Spektrum anderer Spezies.⁴⁹ Für Säugetiere sind Maus und Ratte mit Ähnlichkeiten in Genen, biochemischen Signalwegen, Organen und Physiologie eng mit dem Menschen verwandt. Die Einschränkung bei Nagetieren besteht jedoch darin, dass sie als Nesthocker sowohl mit einem unreifen Gehirn als auch mit unterentwickeltem endokrinen und parakrinen System geboren werden. Die Organreifung findet bei ihnen erst in der Entwöhnungsphase statt. Weiterhin gibt es bei Tierarten, die Junge im Wurf zur Welt bringen, Unterschiede in der plazentaren Nährstoffversorgung für die einzelnen Feten. Primaten sind das ideale Tiermodell, aber die kostenintensive Unterbringung, die Lebenserwartung und die ethischen Betrachtungen limitieren ihren Einsatz.⁴⁹

1.3.1 Tiermodell gravidus Schaf

Das trächtige Schaf wird seit Jahrzehnten eingesetzt, um die Schwangerschaft und die fetale Entwicklung in Analogie zum Menschen zu untersuchen. Das Gewicht der Mutterschafe entspricht näherungsweise dem einer menschlichen Schwangeren.⁵⁰ Zudem ist das Verhältnis von fetalem zu maternalem Gewicht am Ende der Schwangerschaft ähnlich. Weiterhin sind Schafsschwangerschaften meist Einlingschwangerschaften, in 30 – 40 % (speziesabhängig) gibt es Zwillingsgeburten, höhergradige Mehrlinge sind jedoch, ebenso wie in der humanen Schwangerschaft, selten.⁵⁰

Der Schafsfetus ist für Untersuchungen der fetalen Physiologie das am häufigsten verwendete Tiermodell. Sein Geburtsgewicht ist mit dem der humanen Feten vergleichbar, obwohl die Dauer der ovinen Schwangerschaft nur ca. 57 % (145 - 150 Tage) der menschlichen Schwangerschaftsdauer beträgt.⁵¹ Insbesondere im Hinblick auf Studien zur Lungenreifeinduktion (LRI) eignet sich das Schaf besonders gut, da die Alveolenausbildung in der fetalen Lunge mit ca. 75 % der Schwangerschaftsdauer (ca. 111 Tage) beginnt, beim Menschen nach 80 % der Schwangerschaft (ca. 214 Tage). In anderen Tiermodellen (Kaninchen, Ratte, Maus) entwickeln sich die Alveolen erst mit oder gar nach der Geburt.⁵² Das ähnliche fetale Kortisolprofil, mit einem physiologischen Kortisolanstieg gegen Ende der Schwangerschaft, ist ein weiterer Vorteil.¹⁰ Die Größe und das einfache Handling der Tiere sowie die umfassenden Erfahrungen mit diesem Tiermodell erleichtern invasive Eingriffe und Dauermonitoring deutlich.⁵⁰

Diverse medizinische Interventionsmöglichkeiten aus Schafsstudien wurden bis heute in die Routinearbeit der Geburtsmedizin und der Neonatologie übernommen. Dazu gehören die Lungenreifeinduktion mit antenatalen GC,¹³ die tracheale Ballonokklusion bei Zwerchfeldefekten,^{53,54} die Laserablation zur Therapie des fetofetalen Transfusions-syndroms⁵⁵ sowie die Erkenntnisse über den positiven Einfluss von Hypothermie nach Ischämie.^{56,57} Weiterhin ermöglichte die Erforschung diverser maternaler und fetaler Katheteranlagen vielfältige Untersuchungs- und Überwachungsmöglichkeiten.^{58,59} Als Surrogatmarker für die Effekte der fetalen Programmierung wird u.a. das fetale Wachstum mit fetaler Wachstumsretardierung durch maternale Unter- oder Überernährung, GC-Gaben, uteroplazentare Embolisierung, maternale Hyperthermie oder Entnahme von Placentomen herangezogen (siehe 1.4).⁶⁰

1.3.1.1 Plazenta des Menschen und des Schafs im Vergleich

Die plazentare Morphologie des Schafs unterscheidet sich in verschiedener Hinsicht von der menschlichen. Zunächst differiert die äußere Form: das Schaf bildet in einem bikornealen Uterus eine Placenta cotyledonaria aus (Abb. 4). Diese besteht, in einer physiologischen Einlingsschwangerschaft, aus 50 bis 90 auf dem Chorion sitzenden Plazentabezirken, den Placentomen.^{61,62} Dies entspricht, im Gegensatz zur humanen Plazentabildung, einer nicht-invasiven Plazentation.

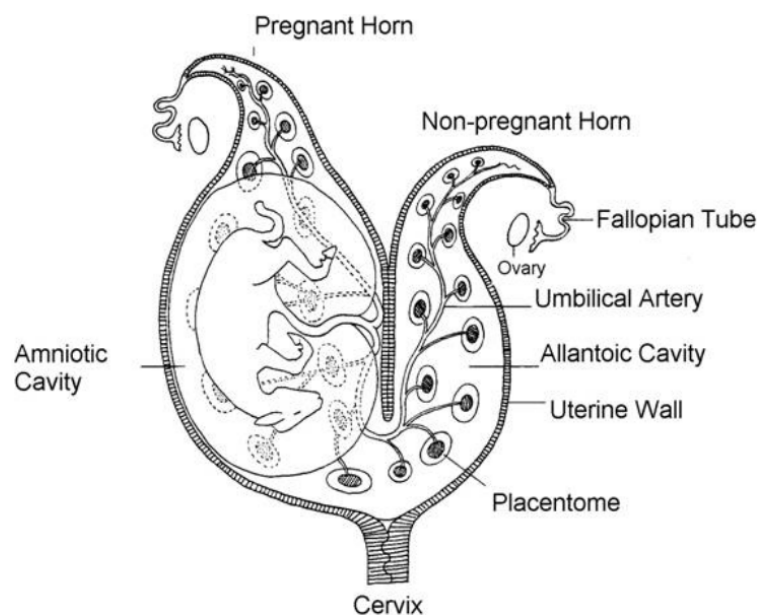


Abb. 4: Schafsuterus. Originalabbildung, Steven.⁶³

Einleitung

Die humane Placenta localisata ist auf einen Bereich des Chorions beschränkt (monochorial) (Abb. 5). Sie ist scheibenförmig und zeigt eine größtmöglich invasive Plazentation auf. Die Grenze zwischen Chorion und mütterlichem Gewebe ist beim Schaf synepitheliochorial ausgebildet, das Chorion grenzt also direkt an das uterine Epithel.⁶⁴ Beim Menschen ist dieser Übergang hämochorial entwickelt, wobei das Chorion an das mütterliche Blut grenzt⁶² und seine Zotten mit maternalem Blut umspült werden (Abb. 5).^{64,65}

Es gibt jedoch auch diverse entscheidende Gemeinsamkeiten. Bei Mensch und Schaf wird eine Placenta deciduata (Vollplazenta) gebildet. Das Endometrium wird dabei zu einer Decidua umgebaut, wovon bei der Geburt ein Teil abgestoßen wird und eine Blutung entsteht.⁶² Zudem sind beide Plazentaarten vom villösen Typ, was sich im strukturellen Aufbau des fetalen Zottenbaums aber auch in der Blutgefäßarchitektur zeigt. Diese ist in der Human- sowie in der Schafsplazenta durch eine Gliederung in Stamm- (Arterien, Venen), Mittel- (Arteriolen, Venolen) und Endgefäße gekennzeichnet. Die terminalen Gefäße entsprechen den Kapillaren, welche die wichtigste Einheit im materno-fetalen Austausch darstellen.⁶⁵ Dieser Austausch wird durch eine enge Verzahnung der Zotten miteinander vereinfacht. An der Zottenoberfläche findet sich in beiden Spezies der Syncytiotrophoblast (Abb. 5), eine mehrkernige Schicht aus fusionierten Epithelzellen, die eine funktionelle Barriere für den Austausch von Nährstoffen zwischen Mutter und Fetus bildet.⁶⁶ Mehr Gemeinsamkeiten mit der humanen Plazenta finden sich im endokrinen System (Östrogen-, Progesteron- und Plazentalaktogensynthese^{67,68}), der Angiogenese^{69,70} und hinsichtlich weiterer zahlreicher funktioneller und morphologischer Aspekte.^{71,72}

In der Summe ist das Schaf ein etabliertes und wertvolles Modell, um die Physiologie der Plazenta zu untersuchen und damit Schlüsse auf die Funktion der menschlichen Plazenta zu ziehen.

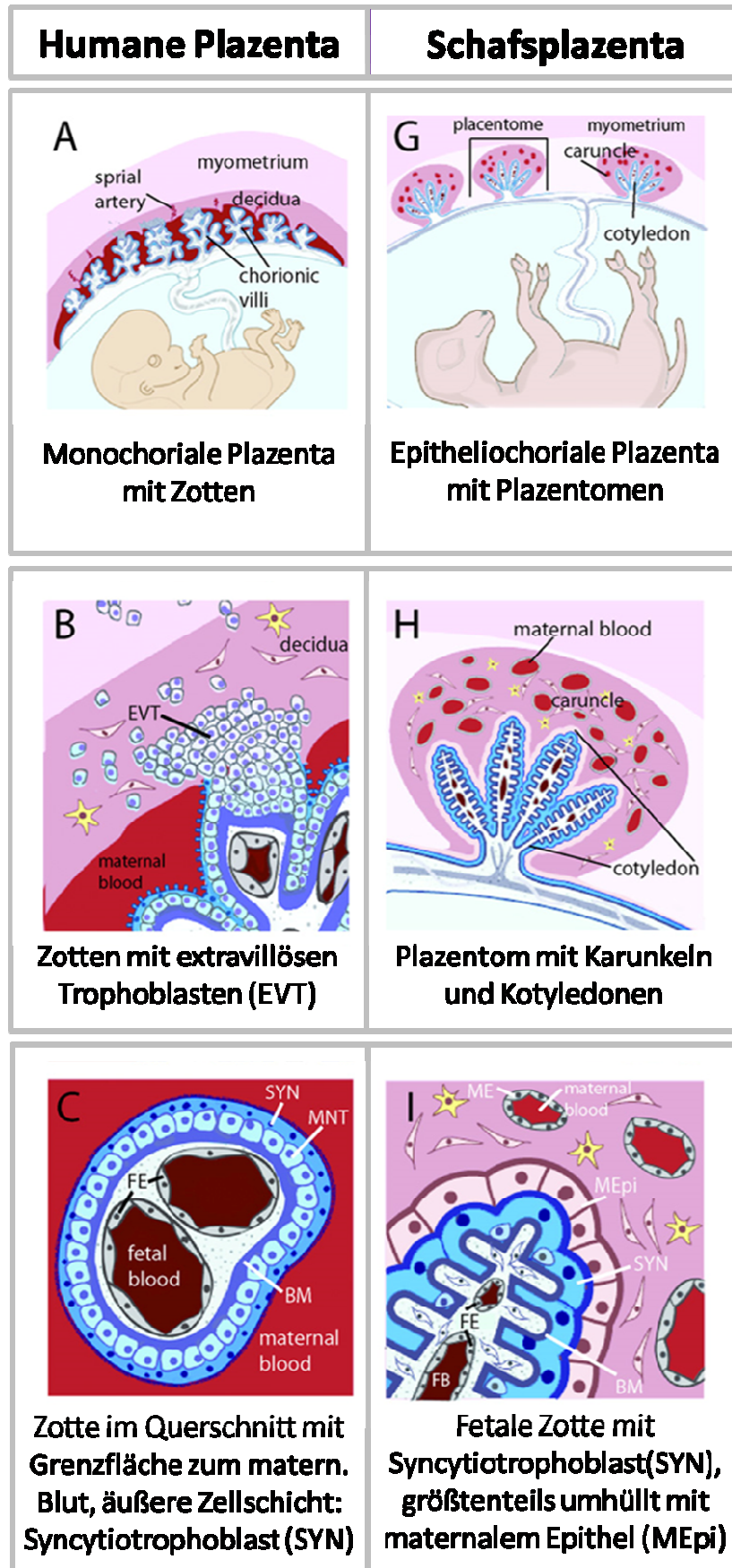


Abb. 5: Humane Plazenta und Schafsplazenta im Vergleich, mod. nach Robbins et al.⁷³

1.3.1.2 Plazentome der Schafsplazenta

Aufbau

Die Implantation in der 145 - 150 Tage andauernden Schafsschwangerschaft findet zwischen dem 14./16. und dem 22. Schwangerschaftstag (dG) statt.⁷⁴ Sind die Plazentome voll ausgebildet, bestehen sie aus maternalen Karunkeln und fetalen Kotyledonen⁷⁵ (vgl. Abb. 5). Diese stehen über interdigitierende maternale Krypten (Endometrium) und fetale Zotten (Trophoblast) in Verbindung.⁶¹

Die finale Anzahl an Plazentomen ist um den vierzigsten Schwangerschaftstag erreicht,⁷⁶ das Maximalgewicht am Tag 75 – 80.⁷⁷ Die Anzahl der Plazentome ist abhängig von Rasse, Stamm, Wurfgröße, Alter, fetalem Geschlecht sowie der Zahl vorangegangener Schwangerschaften.⁷⁸ Morphologisch besteht der maternale Anteil der Plazentome aus Epithelzellen, Bindegewebe und Kapillaren. Der fetale Anteil enthält zusätzlich den Trophoblasten als äußere Zellschicht.⁷⁴ Die Oberfläche des fetalen Plazentomanteils wird durch eine dünne hämophagische Schicht bedeckt, in der sich extravasates mütterliches Blut befindet, weshalb sie dunkel erscheint (hämophagische Zone).⁶¹

Plazentomtypen

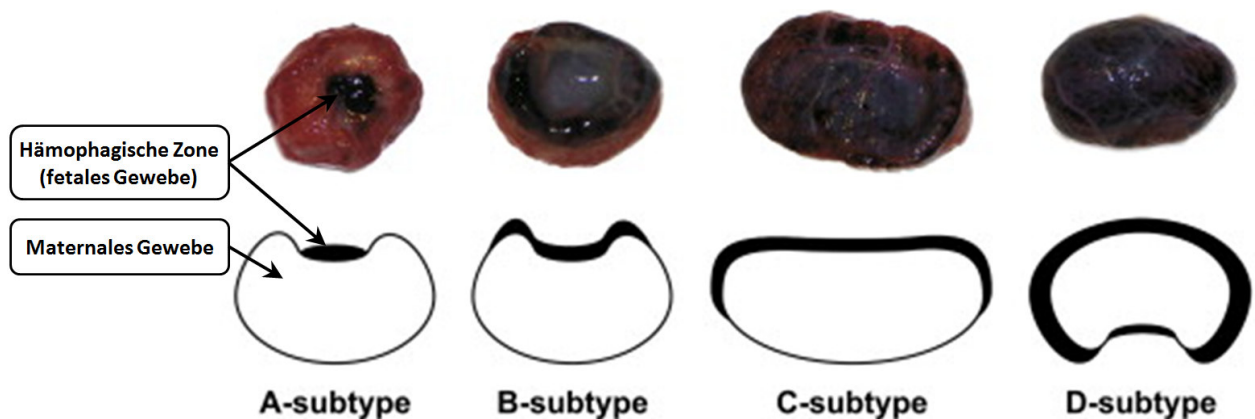


Abb. 6: Plazentome schematisch und im Bild, mod. nach Braun et al.⁷⁹

Die Plazentome werden anhand ihres morphologischen Erscheinungsbildes in vier Typen klassifiziert (Abb. 6). Für diese Einteilung wird der Grad der Ausstülpung der hämophagischen Zone beurteilt.⁸⁰ In den A-Plazentomen umschließt das maternale Gewebe das fetale Gewebe fast vollständig (invertierte Form). Bei B-Plazentomen ist der Anteil des freiliegenden fetalen Gewebes größer. In D-Plazentomen umschließt das

Einleitung

fetale Gewebe vollständig den maternalen Anteil (eventierte Form).^{80,81} In normalen Einlingsschwangerschaften dominieren A- (ca. 70 – 90 %) und B-Plazentome (ca. 10 – 30 %). C- und D-Plazentome sind lediglich mit ca. 5 – 7 % bzw. 1 – 2 % vertreten,^{79,81} eine Häufung tritt bei Mehrlingsschwangerschaften⁸¹ und zum Schwangerschaftsende auf.^{61,78}

Die Frage nach funktionellen Unterschieden zwischen den Plazentomtypen ist Gegenstand vieler Studien. Steyn et al. untersuchten Schafsplazentome nach Nahrungsrestriktion (85 % des Bedarfs in der ersten Schwangerschaftshälfte).⁸² Im Vergleich zur Kontrollgruppe war am Tag 130 eine signifikante Verschiebung von A- zu D-Plazentomen erkennbar. Verbliebene A-Plazentome waren kleiner. Das Geburtsgewicht der Feten war jedoch in beiden Gruppen ähnlich, was für eine Aufrechterhaltung der Nährstoffzufuhr durch Umverteilung der Plazentomanteile spricht.⁸² Ebenfalls mehr C- und D-Plazentome in Plazenten mangelernährter Schafe beschrieben Osgerby et al.⁸³ Ähnliche Plazentomverteilungen fanden sich nach DEX-Infusion bei Mutterschafen.⁸⁴ Eine partielle chirurgische Karunkelentfernung vor der Schwangerschaft führte antenatal zur Gewichtszunahme der verbliebenen Plazentome (vormalige Karunkel).⁸⁵ Weiterhin wurde für Tag 110 die Reduktion des A-Plazentomanteils und die Zunahme der B-, C- und D-Plazentome nach Hypoxie durch Penninga et al. beschrieben.⁸⁶ Zwillingschwangerschaften zeigten nach Fetektomie signifikant mehr B- und C-Plazentome und weniger A-Plazentome als die Plazenten normaler Schwangerschaften.⁸⁰ Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass ein gesteigerter Anteil an C- und D-Plazentomen einem plazentaren Kompensationsmechanismus entspricht. Damit wird trotz ungünstiger intrauteriner Bedingungen eine ausreichende Versorgung des Fetus mit Nährstoffen angestrebt.⁷⁸

Zu anderen Verteilungsmustern gelangten Gardner et al.⁷⁶, Braun et al.⁷⁹ und Ward et al.⁶¹ mit ihren Untersuchungen zur IUGR in der späten Schwangerschaft. Es zeigten sich gleiche oder gar geringere C- und D-Plazentomanteile und -gewichte (Details siehe Tab. 5). Eine kontinuierliche Umwandlung von A- über B-, C- zu D- Plazentomen im Schwangerschaftsverlauf, wie in älteren Studien^{61,78,85,87} postuliert, konnte widerlegt werden. Braun et al. zeigten die unveränderte Gesamtanzahl der Plazentome sowie ein gleiches zahlenmäßiges Verhältnis der Typen zwischen Tag 75 und 146 auf.⁷⁹

Quelle	Behandlung	Details	Behandlungszeitpkt. (dG)	Ergebnis	Unters.-zeitpkt. (dG)
Gardner et al. ⁷⁶	reversible (3 d) Einschränkung der Nabelschnurdurchblutung (um 70 %)		124-126	↓ Plazenta- und Einzelplazentomgewicht ↓ C/D-Plazentomanzahl ↓ C/D-Plazentomgewicht Trend A/B ← C/D-Plazentome	135-137
Braun et al. ⁷⁹	maternale BET-Injektionen	Kontrolle		↓ A-Plazentome (vgl. restl. Schwangerschaft)	116
		1, 2 oder 3 maternale BET-Injektionen	104/111/118	↑ A-Plazentome	109-116
				↓ A-Plazentome	116-146
				↓ B-Plazentome	116
Ward et al. ⁶¹	Kennzeichnung + Beobachtung des Klassifikationswechsels einzelner Plazentome	Kontrolle	117/120	↑ C/D-Plazentome (21 %) ca.50 % der Plazentome verändern ihre Klassifikation	127/131
		fetale Kortisolinfusion (122-126)	117/120	↑ A/B-Plazentome (7 %) ↓ C/D-Plazentome (7 %)	127-131
	Entfernung der fetalen Nebennieren		117-120	A → C,D-Plazentome im Vergleich zu Kontrollen	141-146
	fetale Kortisolinfusion (122-126 dG)	Kontrolle		↓ A- ↑ D-Plazentome	127-131
		Kortisolinfusion	122-126	A ← D-Plazentome	127-131

Tab. 5: Untersuchungen zur Plazentomverteilung in der IUGR-Schafsplazenta (→ ≙ Verschiebung des prozentualen Anteils).

Die zuvor beschriebenen Studien zeigten den höchsten C- und D-Plazentomanteil in der Spätschwangerschaft (Tag 130 – 136), jedoch noch vor dem physiologischen präpartalen Kortisolanstieg.^{61,88} Dieser könnte die anschließende Abnahme der C- und D-Plazentomanteile bis zur Geburt (siehe Tab. 5) erklären.⁶¹ In der Summe geht aus allen Studien hervor, dass der Untersuchungszeitpunkt nach GC-Gabe entscheidend ist.

Vonnahme et al. folgerten aus ihren Studien der Plazentommorphologie, dass es entgegen aller vorbeschriebenen Untersuchungen nicht der Plazentomtyp, sondern die Plazentomgröße wäre, die entscheidend für den Nährstofftransport zum Fetus ist.⁸¹

Level

Ein Plazentom-Längsschnitt kann in 3 Zonen oder Level eingeteilt werden.⁶⁸ Level 1 entspricht der Plazentomregion, die vorrangig aus maternalem Gewebe besteht (Zona intima). Level 2 beschreibt eine intermediäre Zone, in der die Anteile maternalen und fetalen Gewebes fingerförmig ineinandergreifen. Level 3 umfasst den Gewebeanteil des Plazentoms, der zur hämophagischen, also fetalen Zone zählt^{68,89} (Abb. 7). Zur quantitativen Untersuchung von Gewebeunterschieden in den einzelnen Leveln bietet sich eine stereologische Analyse an.

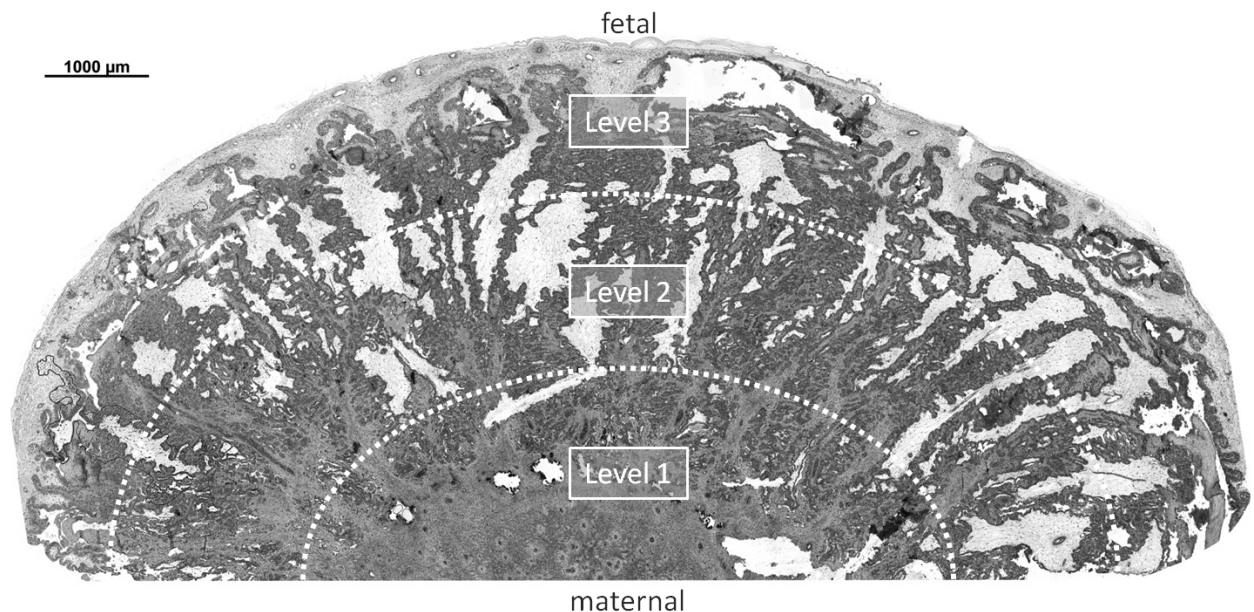


Abb. 7: Plazentom (Typ D) mit schematischer Aufteilung in Level 1, 2 und 3.

1.4 Auswirkungen von Stress auf Morphologie und Stereologie der Schafsplazenta

Die Plazenta ist häufig Mittelpunkt von Untersuchungen zu Ursache und Auswirkung intrauteriner Wachstumsrestriktion, da sie eine zentrale Rolle in der materno-fetalen Interaktion spielt (siehe 1.2). Aufgrund dieser Position ist es naheliegend, dass Veränderungen in der placentaren Funktion eine Ursache der beschriebenen niedrigen Geburtsgewichte und der durch fetale Programmierung hervorgerufenen lebenslangen Folgeschäden (siehe Tab. 2, Tab. 3) sein können. Um diese These bestätigen zu können, wurde an der Schafsplazenta der Einfluss von Stressoren wie hyperthermen

Umgebungen, großen Höhenlagen, Über- und Unterernährung und chirurgische Manipulation auf die plazentare Entwicklung studiert (Zusammenfassung: Tab. 6).

IUGR durch folgende Faktoren		Untersuchte plazentare Veränderungen	Effekt
Hyperthermie		Angiogenesefaktoren ⁹⁰ Plazentagewicht ⁹¹ Plazentare Glukosetransportkapazität ⁹¹ Geweberegeneration an 50 vs. 80 dG	↑↓ ↓ ↓ ↑
Hypoxie		Plazentare GefäÙe ⁹³ <ul style="list-style-type: none"> • Dichte des Kapillarbetts durch Grad der Verzweigung • Fetales GefäÙlumen • Maternales GefäÙlumen Plazentomverteilung ⁸⁶	↑ ↑ ↓ A → B/C/D
Ernährung	Unterernährung	Plazentomverteilung ^{82,83,87} Plazentomanzahl ⁸⁷ Plazentagewicht ^{83,87} Plazentares IGF-Bindungsprotein ⁸³	A(B) → (B)C/D ↑ ↓ ↑
	Überernährung	Plazentomanzahl ⁹⁴ Plazentagewicht ⁹⁴ Angiogenesefaktoren ⁹⁵	↓ ↓ ↓
Chirurgische Manipulation	Reduktion der Plazentome	Plazentomverteilung ⁸⁵	Kompensation in fetalem Gewebe
	Unilaterale Fetektomie bei Zwillingsschwangerschaften	Plazentomanzahl ⁸⁰ Plazentomgewicht ⁸⁰	↓ ↑

Tab. 6: Veränderungen in der Schafsplazenta bei intrauteriner Wachstumsrestriktion (IUGR) unterschiedlichen Ursprungs.

1.5 Auswirkungen von GC auf humane Plazenta und Schafsplazenta

Humane Plazenta

Den Einfluss des Stressors „Glukokortikoid“ zu erforschen ist von größter Bedeutung, da dieses häufig in der Therapie von Schwangeren eingesetzt wird (siehe auch 1.1.2.1). Zahlreiche Ansätze werden in dieser Hinsicht verfolgt. Clifton et al. untersuchten Plazenten von Asthmapatientinnen, die während der Schwangerschaft inhalative GC nutzten, auf Veränderungen der Aktivität der 11 β HSD (Hydroxysteroid Dehydrogenase) Typ 2.⁹⁶ Dieses Enzym reguliert durch die Katalyse der Inaktivierung von maternalem Kortisol zu Kortison den transplazentaren Übertritt zum Fetus. Auf diesem Weg wird der Fetus vor zu hohen Kortisolspiegeln geschützt.⁹⁷ Nach Budenosid-Behandlung der Schwangeren wurden erhöhte 11 β HSD Typ 2-Aktivitäten in der Plazenta festgestellt.⁹⁶ Die Aktivität des sich im Syncytiotrophoblasten befindlichen System-A-Transporters, der

kurze, neutrale Aminosäuren (wie Alanin und Glycin) zum Fetus transportiert, wurde ebenfalls untersucht.⁹⁸ Nach antenataler GC-Gabe (Lungenreifeinduktion) zeigte sich eine geringere Aktivität im Plazentagewebe. Wurden die Kinder 12 h – 14 d nach GC-Gabe geboren, waren sie und die zugehörige Plazenta zudem kleiner als die Kontrollgruppe.⁹⁸ Die genannten Beispiele belegen, dass synthetische GC die physiologischen Regulationsmechanismen außer Kraft setzen können und es auf diesem Weg zur „fetalen Programmierung“ kommen könnte.

Schafsplazenta

Weitere Auswirkungen antenataler GC-Exposition konnten im Tierexperiment dargestellt werden. Neben den Studien an Plazentomen (siehe 1.4) wurde beispielsweise untersucht, welchen Einfluss synthetische GC auf binukleäre Zellen (BNC) haben. BNC sind große Zellen, die 15 – 20 % des fetalen Trophoektoderms ausmachen und placentares Laktogen, ein Wachstumshormon, sezernieren.⁹⁹ Braun et al. stellten im Schafmodell nach BET-Gabe einen signifikanten Abfall der BNC-Zahl (um 24 %) fest. Damit assoziiert ist ein transienter Rückgang der maternalen und fetalen ovinen Plazentalaktogen-Konzentration im Plasma. Ein niedrigeres Fetal- und vorübergehend auch Plazentagewicht wurde aufgezeigt.⁶⁸ Nach DEX-Gabe wurde zudem eine Zunahme der Glukokortikoidrezeptoren beobachtet.¹⁰⁰

Laut Braun et al. ist die Aktivität der 11β HSD Typ 2 in der Schafsplazenta, analog zur menschlichen Plazenta, nach GC-Gabe gesteigert.¹⁰¹ Physiologisch zeigt sich zum Schwangerschaftsende ein Abfall der 11β HSD Typ 2-Aktivität.¹⁰² Kerzner et al. beschrieben die placentare 11β HSD Typ 2-Expression am 106 – 108. Schwangerschaftstag nach einzelnen und mehrfachen DEX-Gaben ab Tag 76 – 78 oder Tag 104 – 106. Nach Einfachgaben sank die Expression von 11β HSD Typ 2.¹⁰³ Zudem fiel nach mehrfachen DEX-Gaben das Fetalgewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe ab.¹⁰³

Ein weiteres Schlüsselenzym, welches in der Schafsplazenta untersucht wurde, ist Prostaglandin H Synthase 2 (PGHS-2). Es katalysiert die Prostaglandinsynthese und ist nach BET-Gabe vermehrt in C-, reduziert in A-Plazentomen zu finden.⁷⁹ Auch der Insulin-like growth factor (IGF), ebenfalls bedeutsam für die Wachstums- und Metabolismusregulation, wird durch Einzel- und Mehrfachgaben von BET beeinflusst.¹⁰⁴ Ein um 25 % verringertes Plazentagewicht beschrieben Jensen et al. nach maternalen

Hydrokortison-Infusionen in der Spätschwangerschaft. Die fetale Wachstumsrate war um 30 % reduziert.¹⁰⁵

Ein weiterer wichtiger Aspekt, insbesondere im Hinblick auf den transplazentaren Gas- und Nährstoffaustausch, ist die Vaskularisierung der Plazenta. Eine signifikante Wirkung von GC auf die glatte Gefäßmuskulatur gibt es nicht. Jedoch konnte bei Schafen nach dreifacher DEX-Injektion (Tag 103, 110 und 117) eine vaskuläre Sensitivitätssteigerung für Endothelin-1 sowie eine erhöhte Endothelin-A-Rezeptor-Expression in fetalen Plazentargefäßen am Tag 119 nachgewiesen werden.¹⁰⁶ Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass auch die physiologische, mit dem Gestationsalter zunehmende Sensitivitätssteigerung u.a. durch (endogene) GC beeinflusst wird. Zudem wurde eine höhere Adaptionfähigkeit der fetalen gegenüber der maternalen Plazentargefäße (die keine DEX-Antwort zeigten) an unstete Umweltbedingungen deutlich.¹⁰⁶

1.6 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Bei Feten einer humanen Schwangerschaft bestehen geschlechtsspezifische Unterschiede in der Adaption an ungünstige intrauterine Bedingungen. Nach Komplikationen im Schwangerschaftsverlauf, wie IUGR, Infektionen, plazentare Insuffizienz, Frühgeburt etc., weisen männliche Feten eine höhere Morbidität und Mortalität als weibliche Feten auf.^{101,107,108} Ein Beispiel ist eine größere Anfälligkeit männlicher Feten für das RDS, was für ein schlechteres Ansprechen auf GC spricht.¹⁰⁹ Weiterhin wurden nach GC-Exposition gesteigerte 11 β HSD Typ 2-Aktivitäten bei weiblichen Feten gemessen, eine solche Autoregulation bei männlichen Feten blieb aus.¹¹⁰ Nach LRI mit Hilfe einer einmaligen BET-Gabe zeigten sich Braun et al. hingegen verminderte 11 β HSD Typ 2-Level bei weiblichen und gesteigerte 11 β HSD Typ 2-Level bei männlichen Feten.²⁶ Bei mütterlicher Asthmatherapie konnte man in weiblichen Feten eine kompensatorische Anpassung des plazentaren GC-Metabolismus beobachten. Diese ging mit einem verminderten fetalen Wachstum einher. Keine Adaption gab es hingegen bei den männlichen Feten. Sie erlitten keinen Gewichtsverlust, ihre Unfähigkeit zusätzlich hinzukommenden widrigen Umweltbedingungen zu entgegnen ist jedoch eine denkbare Ursache für die gesteigerte Morbidität und Mortalität.¹⁰⁷

Einleitung

Im Schafsmodell zeigten Braun et al., dass eine DEX-Gabe in der frühen Schwangerschaft geschlechtsspezifische Auswirkungen auf die HPA-Achse hat. Bei weiblichen Feten konnte ein Anstieg der Enzyme der Steroidogenese beobachtet werden, männliche Feten reagierten mit gestiegenen 11 β HSD Typ 2 mRNA-Leveln.¹⁰¹ Außerdem wurde eine signifikante transiente Gewichtsreduktion am 100. Schwangerschaftstag in der behandelten Gruppe der weiblichen Feten nachgewiesen (Abb. 8).¹⁰¹ Da ein niedriges Fetalgewicht als Indikator für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko im Lauf des Lebens gilt, ist dieses Ergebnis von besonderer Relevanz. Im Kontext der herausragenden Bedeutung der Plazenta in der Fetalentwicklung ist nach früher GC-Behandlung die geschlechtsspezifische Analyse plazentarer Veränderungen essentiell.

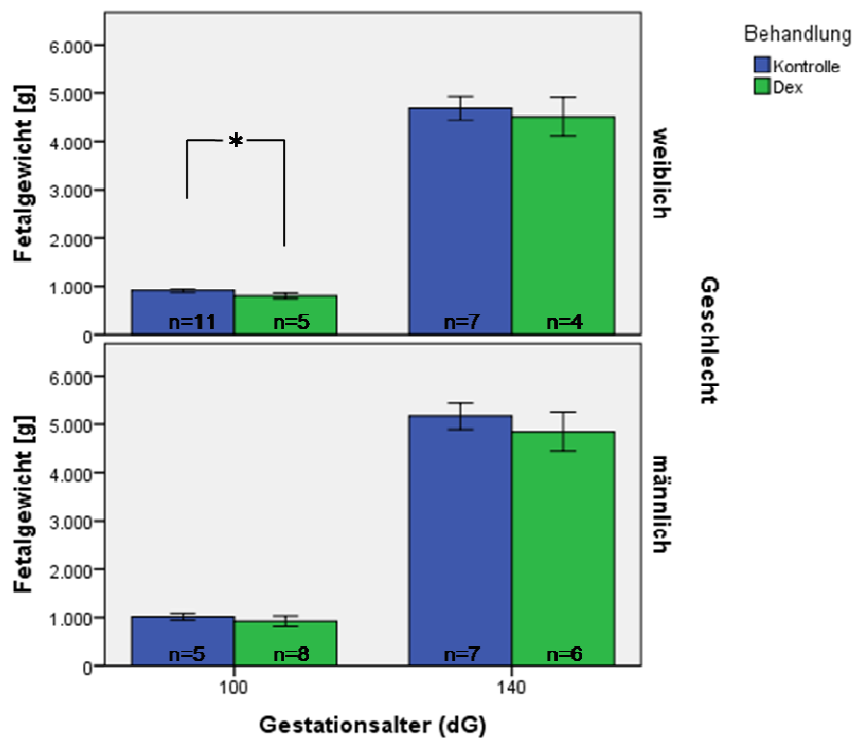


Abb. 8: Auswirkungen früher maternaler DEX-Therapie auf das Fetalgewicht bei weiblichen und männlichen Feten, abhängig vom Gestationsalter (dG). Darstellung: Mittelwert \pm SEM. Mod. nach Braun et al.¹⁰¹

1.7 Hypothesen und Ziel

1.7.1 Hintergrund der frühen DEX-Behandlung

Die zuvor beschriebenen Untersuchungen legen nahe, dass die Plazenta eine Schlüsselrolle bzgl. der fetalen Programmierung durch GC-Behandlung spielt. Diese Studien befassen sich allerdings größtenteils mit den Folgen antenataler GC-Applikation in der Spätschwangerschaft. Durch die vorliegende Untersuchung der Auswirkungen einer frühen maternalen DEX-Gabe im Schafsmodell werden die Folgen psychischen Stresses oder GC-Therapie, z. B. zur Behandlung des AGS, in der Frühschwangerschaft simuliert.

1.7.2 Hypothesen

Da der genaue Mechanismus der GC-Wirkung auf die Plazenta noch weitgehend unklar ist, sollen in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der frühen DEX-Behandlung auf die Schafsplazenta untersucht werden. Folgende Arbeitshypothesen wurden formuliert:

Die frühe DEX-Behandlung verändert die Morphologie der Schafsplazenta:

- I. Die frühe maternale DEX-Behandlung reduziert das Plazentagewicht.
- II. Es finden sich plazentare Anpassungsmechanismen mit Gewichts- und Anteilsveränderungen der Plazentome. Es kommt zur Zunahme von C- und D-Plazentomen im frühen und zur Abnahme im fortgeschrittenen Gestationsalter.

Die frühe DEX-Behandlung resultiert in stereologischen Veränderungen in der Schafsplazenta:

- III. Eine Anpassung der Plazenta mit Änderungen der Oberflächenparameter im Sinne einer Oberflächenvergrößerung ist zu beobachten.
- IV. Die Gefäßdichte in fetalem und maternalem Plazentagewebe nimmt nach früher DEX-Gabe zu.

Hierbei sind geschlechtsabhängige Veränderungen, vor allem in Schwangerschaften mit weiblichen Feten, nach DEX-Exposition zu erwarten.

1.7.3 Ziel

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der frühen DEX-Therapie auf morphologische und stereologische Parameter der Schafsplazenta in Abhängigkeit vom Gestationsalter, dem Plazentomtyp und dem Geschlecht zu untersuchen.

2 Methodik

2.1 Tiermodell

Das in dieser Arbeit untersuchte Probenmaterial wurde durch Braun et al. 2004 bis 2007 im Rahmen eines durch die DFG geförderten Forschungsaufenthaltes (BR2925 1-1) in Westaustralien (Animal Welfare Act 2002 Licence U12/2005, Animal Ethics Committee AEC No. 6-04-40) gewonnen. Die Gewebeproben wurden anschließend für weitere Untersuchungen nach Berlin überführt und mittels finanzieller Unterstützung durch die DFG (BR2925 3-1, 3-2, 3-3 sowie PL241 8-2, 8-3) untersucht.

Trächtige Merinoschafe mit Einlingschwangerschaften (n = 111) und bekanntem Gestationsalter (dG) wurden randomisiert und erhielten entweder DEX (n = 50) oder Natriumchlorid (in der Kontrollgruppe, n = 61). Am 40. und 41. Schwangerschaftstag bekamen die Mutterschafe der DEX-Gruppe vier Dexamethason-Injektionen mit einer Einzeldosis von 0,14 mg/kg maternalem Körpergewicht. Die Injektionen wurden im Abstand von 12 Stunden intramuskulär appliziert (Abb. 9). Die Muttertiere der Kontrollgruppe erhielten parallel dazu Injektionen mit einer Natriumchloridlösung vergleichbaren Volumens (2 ml NaCl/Tier).

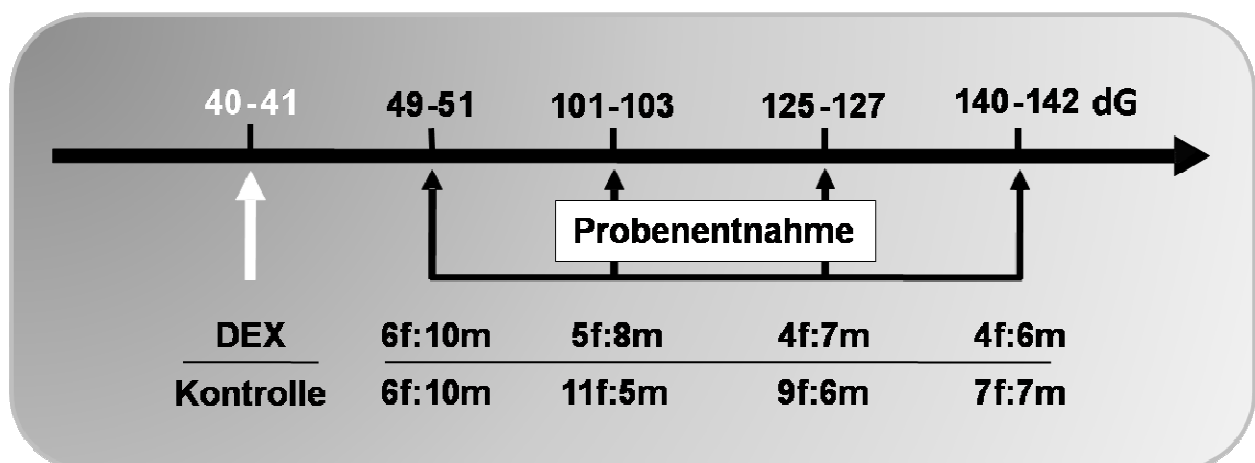


Abb. 9: Behandlung und Probenentnahme mit Anzahl und Geschlecht der Feten; f = weiblich, m = männlich, dG = Gestationsalter in Tagen.

Es wurde u.a. ein sehr früher Behandlungszeitpunkt (40. – 41. Schwangerschaftstag) gewählt, da in diesem Stadium der Schwangerschaft die besonders sensiblen Phasen der placentaren Entwicklung und Differenzierung, sowohl im Hinblick auf morphologische als auch endokrinologische Reifungsprozesse, stattfinden.¹¹¹ Aufgrund

der Annahme, das Gewebe werde durch die Behandlung zunächst Veränderungen durchlaufen, sich aber zum Ende der Schwangerschaft wieder regenerieren, wurden zu vier Zeitpunkten der Schwangerschaft Gewebeproben entnommen und untersucht.

2.1.1 Probengewinnung

Am 49. – 51., 101. – 103., 125. – 127. und 140. – 142. Schwangerschaftstag wurden die Mutterschafe mittels Bolzenschuss eingeschläfert. Die Feten wurden per Sectio-hysterektomie entbunden und erhielten eine Überdosis Phenobarbital. Fetales Körpergewicht und -maße wurden bestimmt, Organe entnommen und gewogen sowie Gewebeproben für weitere Untersuchungen sichergestellt. Der Uterus der Mutterschafe wurde entfernt. Die einzelnen Plazentome wurden separiert, in Plazentomtypen (A, B, C, D) klassifiziert⁸⁰ und gewogen. Anschließend erfolgte die Fixierung in Paraformaldehyd und die Einbettung in Paraffin. Maternale und fetale Blutproben wurden u.a. für biochemische Analysen des Plasmas zentrifugiert und eingefroren.

2.2 Immunhistochemische Untersuchung

2.2.1 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie wurde zum einen die ABC-Methode angewendet. Dabei nutzt man die hohe Bindungsaffinität von Avidin (Hühnereiweiß-Glykoprotein) zu Biotin (Vitamin H). Der Primärantikörper bildet mit dem Zielantigen einen Komplex. Ein biotinylierter Sekundärantikörper ist gegen den Primärantikörper gerichtet und koppelt damit den Avidin-Biotin-Komplex indirekt an das Zielantigen. Dies wird durch eine Enzym-Substrat-Reaktion zwischen Meerrettich-Peroxidase (HRP), Wasserstoffperoxid und dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) als braun-schwarze Färbung sichtbar gemacht. Auf diese Weise wird die Lokalisation des Zielantigens im Gewebe angezeigt.

Zum anderen wurde die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase-Komplex) verwendet, bei welcher der mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Sekundärantikörper an den Primärantikörper bindet. Chromogen in diesem Fall ist Fast Red, wodurch das Zielantigen durch eine rote Färbung lokalisiert werden kann.

Die beiden Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit in einem Doppelfärbungs-Protokoll kombiniert (siehe 2.2.3.2). Zielantigen der ABC-Methode war Cytokeratin Typ II, wodurch der Trophoblast (äußere Zellschicht der fetalen Zotte) dargestellt werden konnte. Der von-Willebrand-Faktor als Zielantigen der APAAP-Methode diente dem Hervorheben des Gefäßendothels. Details zu Reagenzien, Lösungen, Geräten und Software sind in Anhang 11.4.1, 11.4.2, 11.4.3 und 11.4.4 zusammengestellt.

2.2.2 Probenvorbereitung

Von den nach Subtypen klassifizierten, in Paraffin eingebetteten Plazentomen wurden mit Hilfe des Rotationsmicrotoms 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden auf SuperFrost-Objektträger aufgebracht und in einem Trockenschrank bei 37 °C über Nacht getrocknet.

2.2.3 Färbeprotokoll

2.2.3.1 Etablierung des Färbeprotokolls

Zunächst wurden jeweils die Einzelprotokolle zur Cytokeratin-Färbung und von-Willebrand-Faktor-Färbung mit verschiedenen Methoden der Antigendemaskierung (Kochen in Citratpuffer, Tris-EDTA, Protease-Verdau, Triton) umfangreich und auf beste Resultate hin ausgetestet. Die Inhibition der endogenen Peroxidase wurde mit und ohne Methanol durchgeführt. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden verschiedene Lösungen (Milchpulver, Pferdeserum) untersucht. Außerdem wurde die Konzentration der primären und sekundären Antikörper austitriert und das optimale Verdünnungsmedium (Milchpulver, Antikörperverdünner) bestimmt. Verschiedene Inkubationszeiten der Antikörper und Reagenzien wurden ausgetestet. Das Ergebnis mit und ohne anschließende Dehydrierung wurde untersucht. Als Eindeckmedien wurden Entellan und Glycergel verwendet. Anhand der Ergebnisse der Einzelprotokolle wurde ein optimiertes Doppelfärbungsprotokoll etabliert.

2.2.3.2 Doppelfärbungsprotokoll der Cytokeratin- und von-Willebrand-Faktor-Färbung

Tag 1

Die Entparaffinierung der Gewebeschnitte erfolgte in einem Xylolbad (2 x 5 min) mit anschließender Rehydrierung in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 90 %, 70 %, 50 %, je 2 min). Daraufhin wurde mit Aqua dest. (5 min) und Phosphatpufferlösung (PBS pH 7,4; 10 min) in Küvetten gewaschen. Mit einer Triton-Lösung (0,3 %) wurden die Antigene 30 min bei Raumtemperatur (RT) demaskiert und die Objektträger im Anschluss erneut in PBS (2 x 5 min) gewaschen. Die Inhibition der endogenen Peroxidase und damit eine Reduktion der Hintergrundfärbung erfolgte mit einem Gemisch aus Methanol, Wasserstoffperoxid und PBS (10 min). Nach dem Waschen in PBS (2 x 5 min) wurde jeder Schnitt mit einem hydrophoben Markierungsstift (Pap-Pen) umrandet, um das Ablaufen der folgenden Reagenzien und ein Austrocknen der Gewebe zu verhindern. Zusätzlich wurden die Objektträger während der Inkubationszeiten in einer Feuchtkammer gelagert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnitte für 60 min bei RT mit 2 %-igem Pferde-Normalserum (in PBS) behandelt. Anschließend wurde der primäre Mouse anti-human Cytokeratin Type II Antikörper (1:25 in Antikörperverdünner (AKV)) aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Tag 2

Die Gewebeschnitte wurden zunächst in PBS (3 x 5 min) gewaschen und der sekundäre biotinylierte Horse anti-mouse Antikörper (1:200 in AKV) für 60 min (RT) aufgetragen. Anschließend wurden die Schnitte in PBS (3 x 5 min) erneut gewaschen. Daraufhin wurde ein 15 min zuvor hergestellter Avidin-Biotin-HRP-Komplex hinzugegeben und 60 min bei RT inkubiert. Für einen erneuten Waschvorgang wurde zunächst PBS (2 x 5 min), dann Tris-HCL-Puffer (5 min) verwendet. Zur Lokalisation des Antigens wurden die Objektträger mit DAB bei RT behandelt. Die Reaktion wurde nach 12 Minuten durch das Waschen in Tris-HCL-Puffer (10 min) gestoppt. Es folgten weitere Waschschrte mit PBS (5 min) und Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS, 5 min). Für die folgende von-Willebrand-Faktor-Färbung wurden zuvor 75 mg Protease in 100 ml TBS (37 °C) suspendiert. Darin wurden die Gewebeschnitte zur Antigenemaskierung nach dem Waschen 5 min inkubiert und schließlich in reinem TBS (5 min), dann in PBS (2 x 5 min) gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte 10 min in einer Methanol-Wasserstoffperoxid-PBS-Lösung belassen und dann in reinem PBS (3 x 5 min)

gewaschen. Im Folgenden wurden sie erneut 45 min bei RT mit 2 %-igem Pferde-Normalserum, danach 60 min mit dem primären Rabbit anti-human von-Willebrand-Faktor Antikörper (1:100 in AKV) bei RT inkubiert. Mit Tris-HCL-Puffer (5 min) und PBS (2 x 5 min) wurde gewaschen. Der folgende sekundäre Donkey anti-rabbit Antikörper (1:500 in AKV), der an alkalische Phosphatase gekoppelt ist, verblieb für 50 min bei RT auf dem Gewebe. Nach dem Waschen in PBS (3 x 5 min) wurde ein Gemisch aus Fast Red Chromogen und Naphtol-P-Substrat aufgetragen, welches mit der alkalischen Phosphatase reagierte. Nach 25 min folgten weitere Waschschrte in PBS (2 x 5 min) und Aqua dest. (5 min). Es wurde eine Kern-Gegenfärbung (0,5 min) mit einer Hämalaun-Lösung, anschließendem Spülen (8 min) unter fließendem Leitungswasser und in Aqua dest. durchgeführt. Zum Abschluss der Doppelfärbung wurden die Gewebeschnitte mit Glycergel und einem Deckgläschen eingedeckt. In jedem Färbungsdurchgang wurde eine interne Negativ-Kontrolle mitgeführt, in welcher der erste Antikörper durch PBS ersetzt wurde.

2.3 Bildanalyse

2.3.1 Mikroskopie

Es wurden je Plazentom drei gefärbte Präparate ausgewählt. Für diese Schnitte wurden die idealen Start- und Endpunkte für die mikroskopische Aufnahme definiert, welche makroskopisch ein Areal von ca. 4 x 4 mm einschließen. Ziel war es, jeweils eine Mosaikaufnahme aus ca. 100 mäanderförmig aufgenommenen Einzelbildern zusammenzusetzen (Abb. 10).

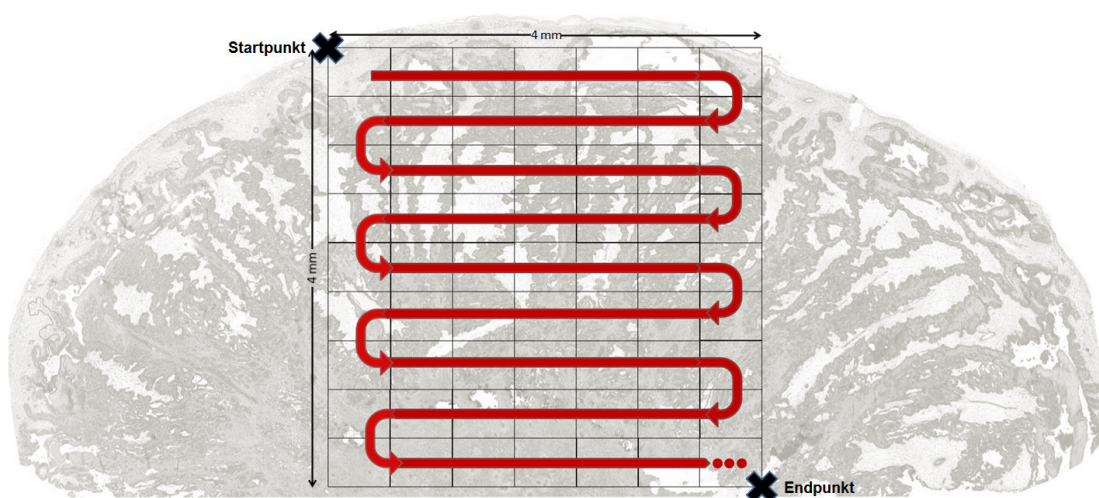


Abb. 10: Mäanderförmige Rasteraufnahme für Plazentommosaik.

Methodik

Für diesen Zweck wurde ein Durchlichtmikroskop (Leica Leitz, Deutschland) mit aufgesetzter Kamera (Zeiss, Deutschland) und AxioVision-Software (Zeiss, Deutschland) verwendet. Nebeneinander liegende Einzelbilder (Abb. 11) wurden in 20-facher Vergrößerung mit 10 % Überlappung aufgenommen.

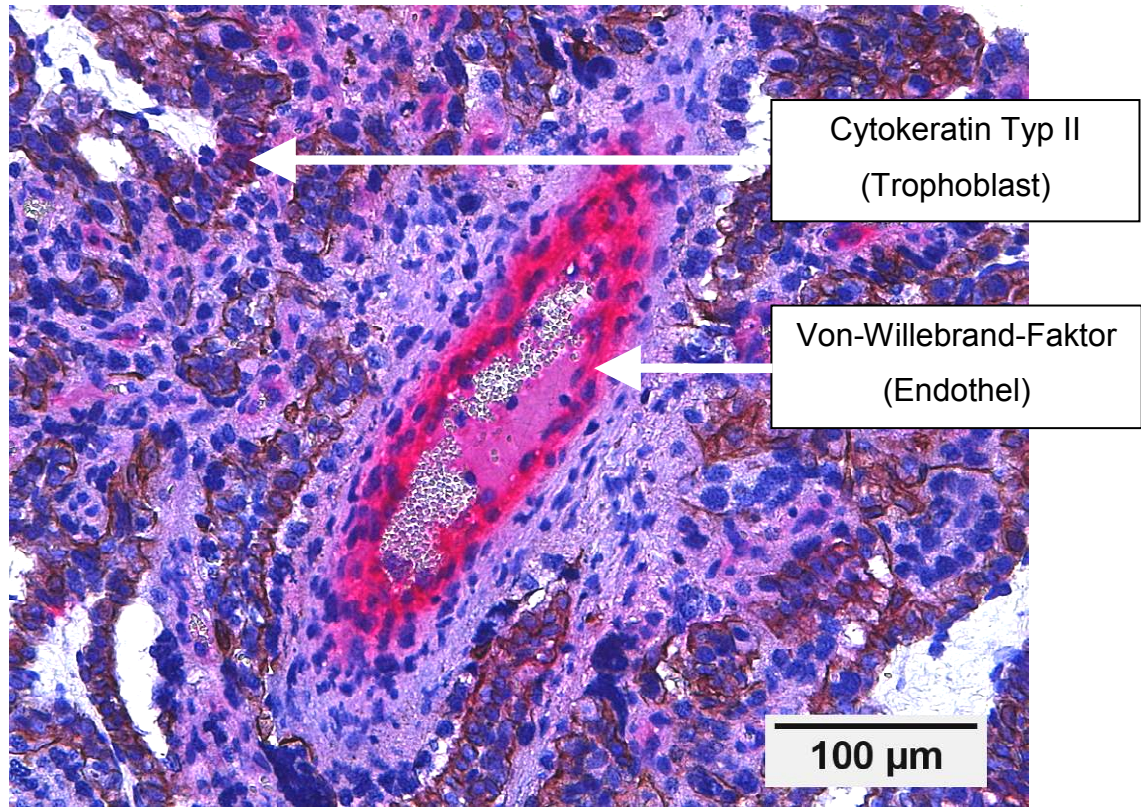


Abb. 11: Einzelaufnahme mit Gefäß, 20-fache Vergrößerung.

Mit Hilfe der Software wurden die Einzelbilder im Anschluss zu einer Gesamtaufnahme zusammengefügt und die Helligkeit angepasst (Abb. 12).

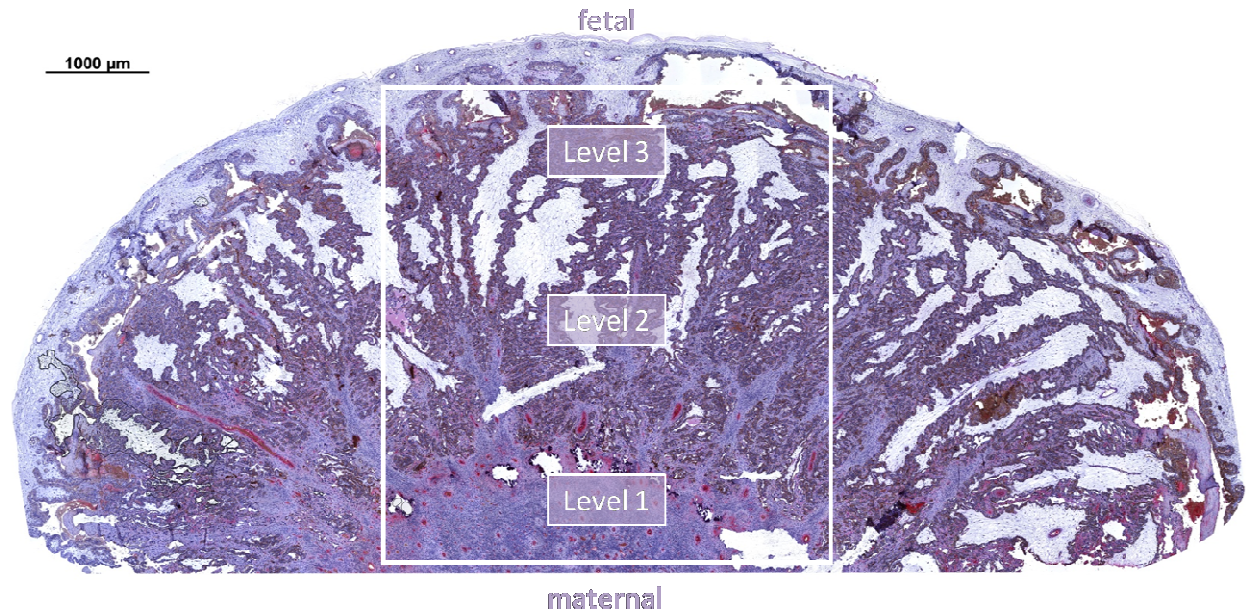


Abb. 12: Gesamtaufnahme Plazentom mit Leveln und Bereich, in dem die Einzelbilder ausgeschnitten wurden.

2.3.2 Bildbearbeitung

Mittels Adobe Photoshop (Adobe Systems, USA) wurde das Mosaik gedreht und standardisiert positioniert (maternaler Plazentomanteil nach unten, fetaler Plazentomanteil nach oben orientiert).

Für die weitere Bildbearbeitung wurde mit der Software ImageJ (NIH, USA) ein Ausschnitts-Makro entwickelt (Quelltext siehe Anhang 11.1). Dieses löst aus dem positionierten Gesamtbild neun Einzelbilder mit jeweils einem Abstand von zwei Bilderbreiten ($2 \times 0,975 \text{ mm}$) und drei Bilderhöhen ($3 \times 0,773 \text{ mm}$) heraus (Abb. 13).

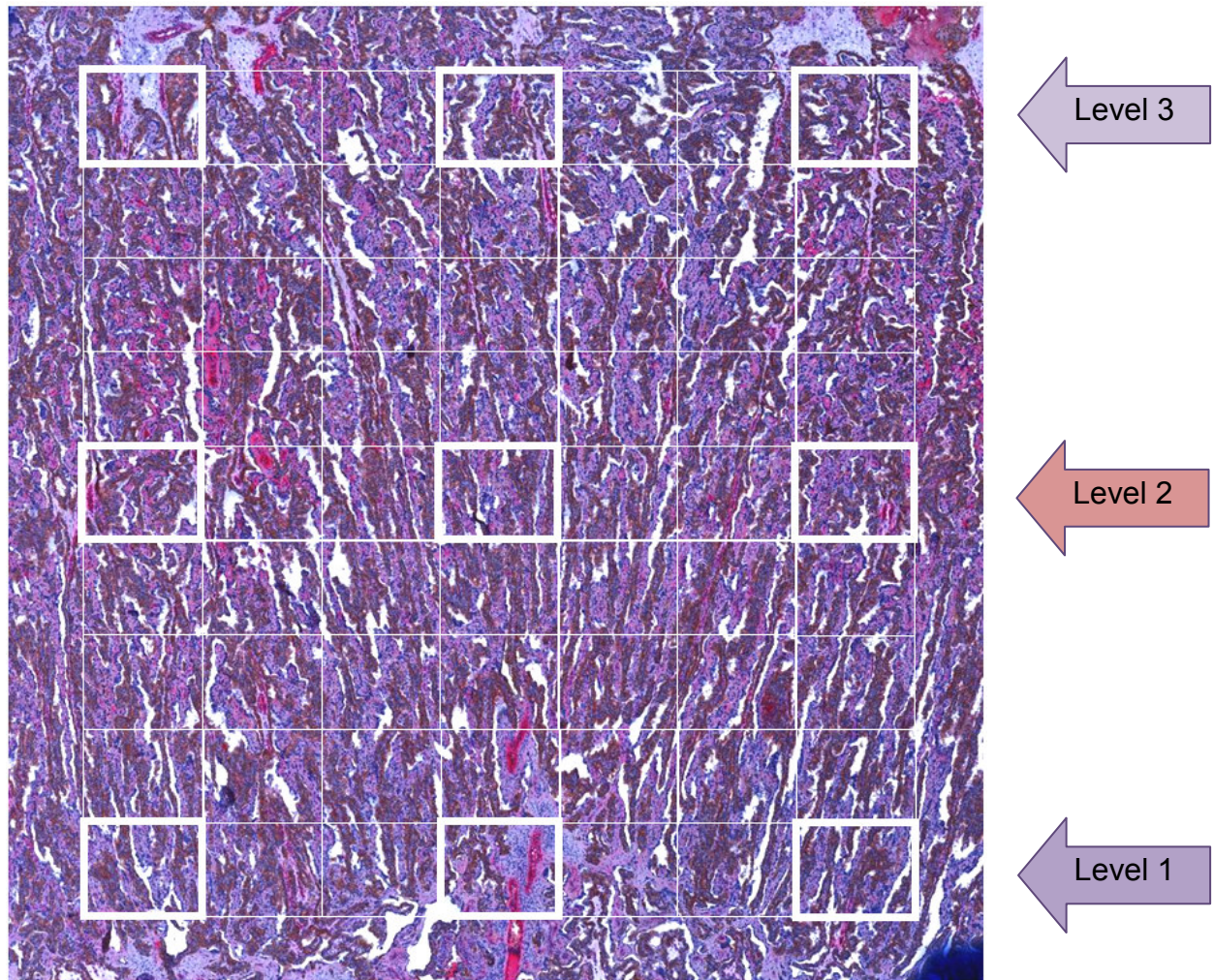


Abb. 13: Anordnung der durch das Ausschnitts-Makro generierten Bilder.

Somit wurden aus drei Gewebeschnitten pro Plazentom insgesamt drei mal neun Bilder pro Plazentom, $n = 27$, aufgenommen und ausgewertet.

Von diesen 27 Aufnahmen entstammten jeweils drei mal drei Bilder dem Level 1, Level 2 und Level 3, womit eine homogene Verteilung der Aufnahmen über alle Gewebereiche gesichert wurde (Übersicht zur Verteilung: siehe Abb. 14).

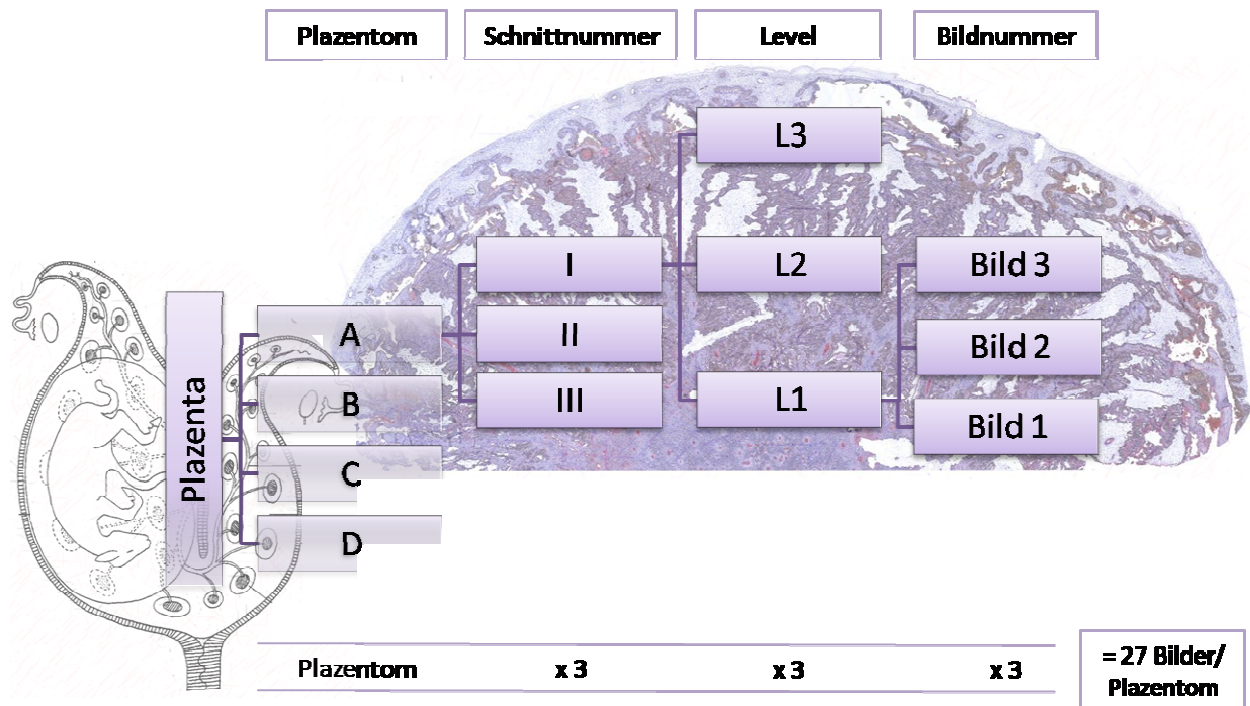


Abb. 14: Übersicht ausgewertete Bilder pro Plazentom, mod. nach Steven et al.⁶³

Diese 27 Aufnahmen pro Plazentom wurden im Original, mit Makro „Curve“ und Makro „Grid“ gespeichert (siehe 2.3.3.2). Die Makros dienen der stereologischen Auswertung des Gewebes.

2.3.3 Bildauswertung

2.3.3.1 Stereologische Untersuchung von Plazentagewebe

Das Gebiet der stereologischen Untersuchung umfasst Methoden, mit denen aus den 2D-Abbildungen glatter Schnittflächen mit klaren Regeln zur Probenentnahme und einfachen Bewertungshilfsmitteln 3D-Quantitäten berechnet werden können. Zu diesen Werten gehören das Volumen, die Oberflächen, Längen etc.¹¹² Diese dreidimensionalen Annäherungen erleichtern die Interpretation der funktionellen Morphologie während der Entwicklung, vor und nach Krankheiten, im Alterungsprozess und während experimenteller Beeinflussung enorm.¹¹³⁻¹¹⁵ Zu den Vorteilen der Anwendung stereologischer Methoden gegenüber qualitativen Studien zählt, dass die Ergebnisse nicht subjektiv, sondern in eindeutigen Zahlen ausgedrückt werden. Damit ist die Nachvollziehbarkeit und die Reproduzierbarkeit gegeben. Auch genau beschriebene Vorgehensweisen in der Probengewinnung, eine schnelle und unkomplizierte Einarbeitung und

letztlich die geringen Kosten machen eine stereologische Untersuchung attraktiv.¹¹⁶ Auch die Reifung der Plazenta -und die Veränderungen dieses Prozesses durch äußere Einflüsse- kann durch die Messung der Anteile maternalen und fetalen Gewebes verfolgt und beurteilt werden.¹¹⁷ Daher wurden stereologische Untersuchungsmethoden schon oft zur Quantifizierung der funktionellen Oberfläche und des Volumens placentarer Gewebekomponenten beim Menschen¹¹⁸ und beim Tier, z. B. Meerschweinchen¹¹⁹ und Rind^{117,120,121}, eingesetzt. Auch an der Schafsplazenta wurden bereits stereologische Untersuchungen zu Volumendichte, Oberflächendichte, Barrieredichte^{122,123} und Verzweigungsgrad der Zotten¹²³ durchgeführt.

2.3.3.2 Raster für die stereologische Untersuchung

Das Makro „Curve“ wurde für die Generierung eines Zählrasters im Rahmen des Projektes mit ImageJ erstellt (Quelltext: siehe Anhang 11.2).

Es wurde nach den Vorgaben für ein zykloidales Testsystem von Howard und Reed¹¹² entwickelt. Dadurch konnten Oberfläche und Oberflächendichte des maternalen und fetalen Gewebes und deren Veränderungen bewertet werden (Abb. 15).

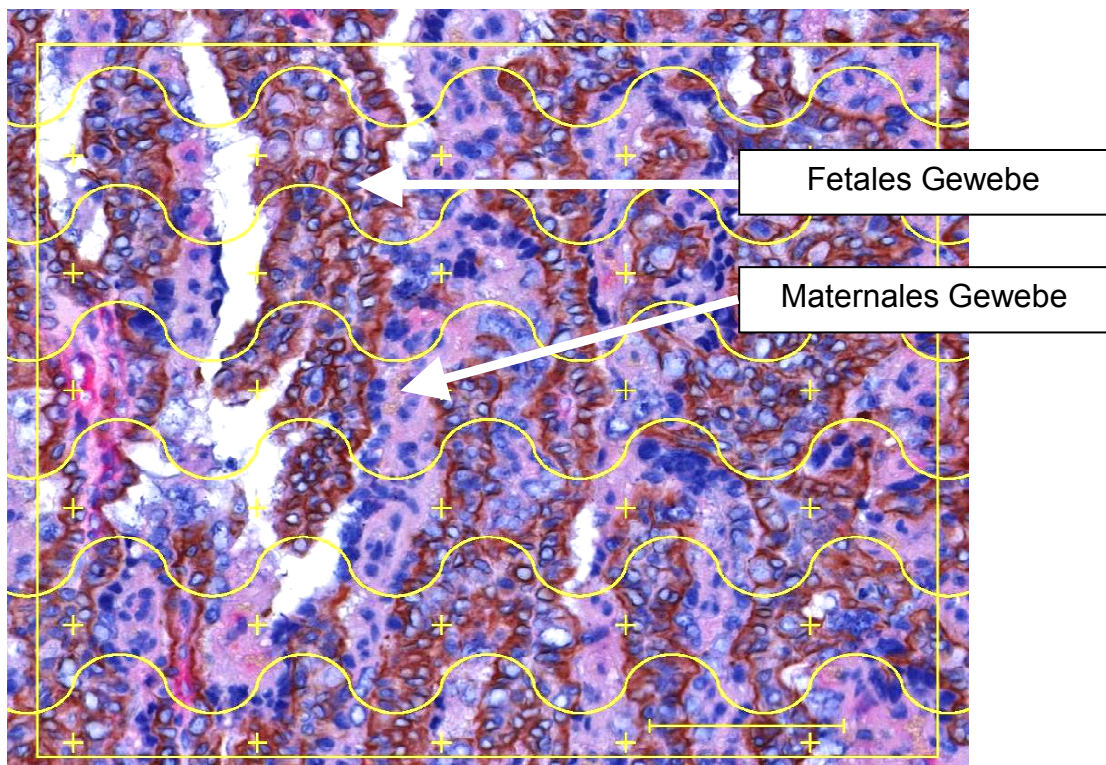


Abb. 15: Makro „Curve“.

Das Makro „Grid“ ist ein bearbeitetes Gitterlinien-Makro, welches zur Auszählung maternalen und fetaler Gefäße diente (Quelltext: siehe Anhang 11.3, Makro: Abb. 16).

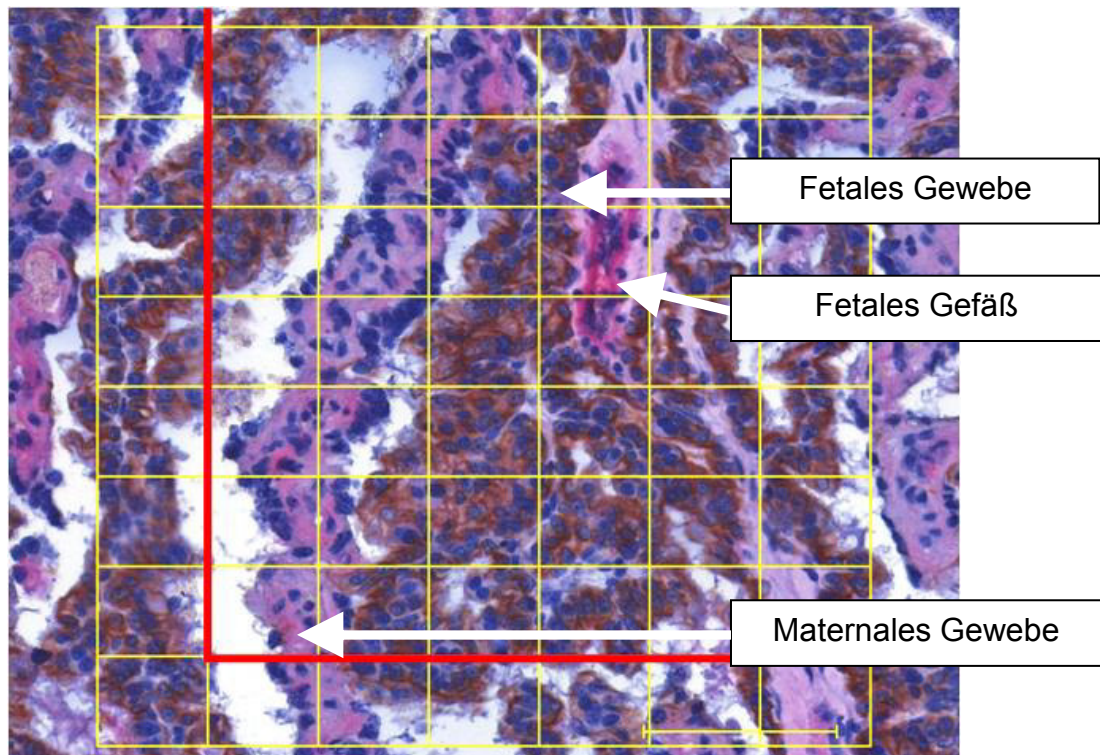


Abb. 16: Makro „Grid“.

2.3.3.3 Auszuwertende Parameter

Die Auswertung erfolgte für den 100. und 140. Schwangerschaftstag, da, entsprechend der beobachteten transienten fetalen Gewichtsreduktion¹⁰¹ und vorbeschriebenen Plazentomveränderungen (siehe 1.6 und 1.3.1.2), zwischen diesen Gestationsaltern die größten stereologischen Unterschiede hinsichtlich eines DEX-Effektes zu erwarten waren. Jedes auszuwertende Bild (vgl. Abb. 14) wurde mit der Bildverarbeitungs-Software ImageJ geöffnet und mit Hilfe des „Cell Counters“, einem bereits vorinstallierten ImageJ-Makro, und einem Zählpad (Wacom, Japan) ausgezählt. Folgende Parameter wurden erfasst:

Mit dem Makro „Curve“ wurde die Anzahl (P_i) der 30 Raster-Kreuze gezählt, die sich in maternalem (P_{iM}) und in fetalem Gewebe (P_{iF}) befanden (vgl. Abb. 17). Das fetale Gewebe hebt sich eindeutig vom maternalen Gewebe ab, da das Cytokeratin im Trophoblasten durch DAB braun-schwarz gefärbt ist (Abb. 15).

Außerdem wurde die Anzahl der Schnittpunkte (I_T) der 6 Rasterlinien mit maternalen (I_M) und fetalen Zotten (I_F) ausgewertet (vgl. Abb. 17).

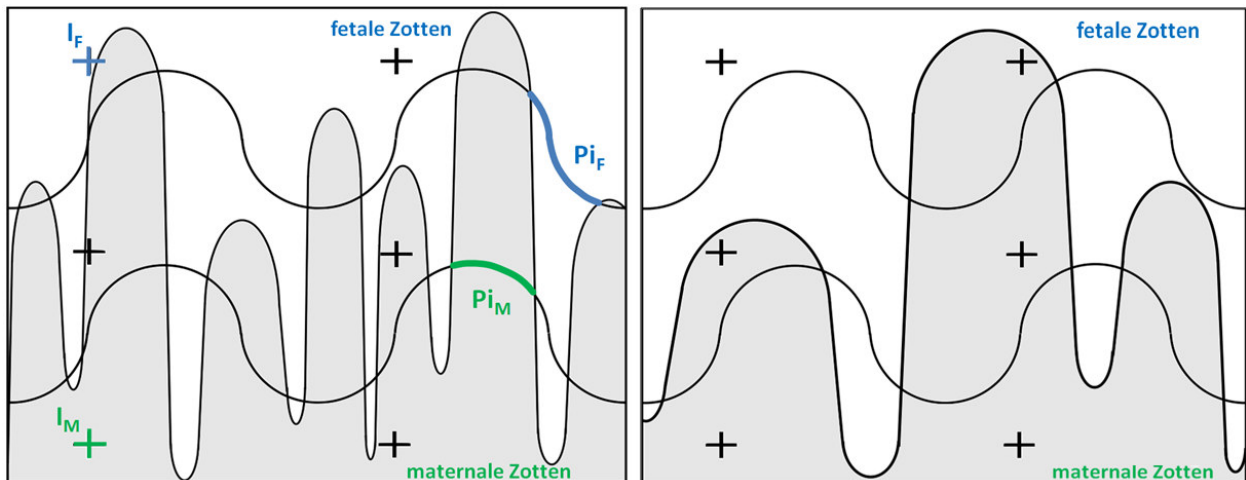


Abb. 17: Schematische Darstellung der einzelnen Parameter im Makro „Curve“ (linke Abb.) und des Funktionsprinzips des Makros im Falle einer Veränderung (rechte Abb.).

Auf diese Weise konnten Veränderungen in der Zottenanzahl und -dichte und damit einhergehende Veränderungen der Oberfläche und der Oberflächendichte erfasst werden.

Mit Makro „Grid“ wurde die Anzahl (N) der sich im Bild (vgl. Abb. 16) befindenden Gefäße in maternalem (N_M) und fetalem Gewebe (N_F) ermittelt. Gewertet wurden dabei die Gefäße, die innerhalb des Gitters lagen und weder die rote Linie noch die äußere Begrenzungslinie kreuzten. Die Gefäße sind gut lokalisierbar, da der von-Willebrand-Faktor in den Endothelzellen durch Fast-Red rot gefärbt ist. Insgesamt wurden mit den im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Verfahren 3267 Bilder für jeweils 6 Parameter verblindet ausgewertet.

2.4 Berechnungen

Zur Auswertung von P_i und I_T wurden pro Schnitt jeweils die Summen der Ergebnisse von Bild 1–3, 4–6 und 7–9 gebildet. Diese Bildergruppen repräsentieren die Aufteilung in fetalen (Level 3), zentralen (Level 2) und maternalen (Level 1) Gewebeanteil des Plazentoms. Weiterhin wurden diese Level-Summen mit den Level-Summen der anderen beiden zugehörigen Plazentomschnitte summiert (Abb. 18). Entstanden ist ein Gesamtwert aus 9 ($3 + 3 + 3$) gezählten Einzelwerten pro Parameter und Level eines Plazentoms.

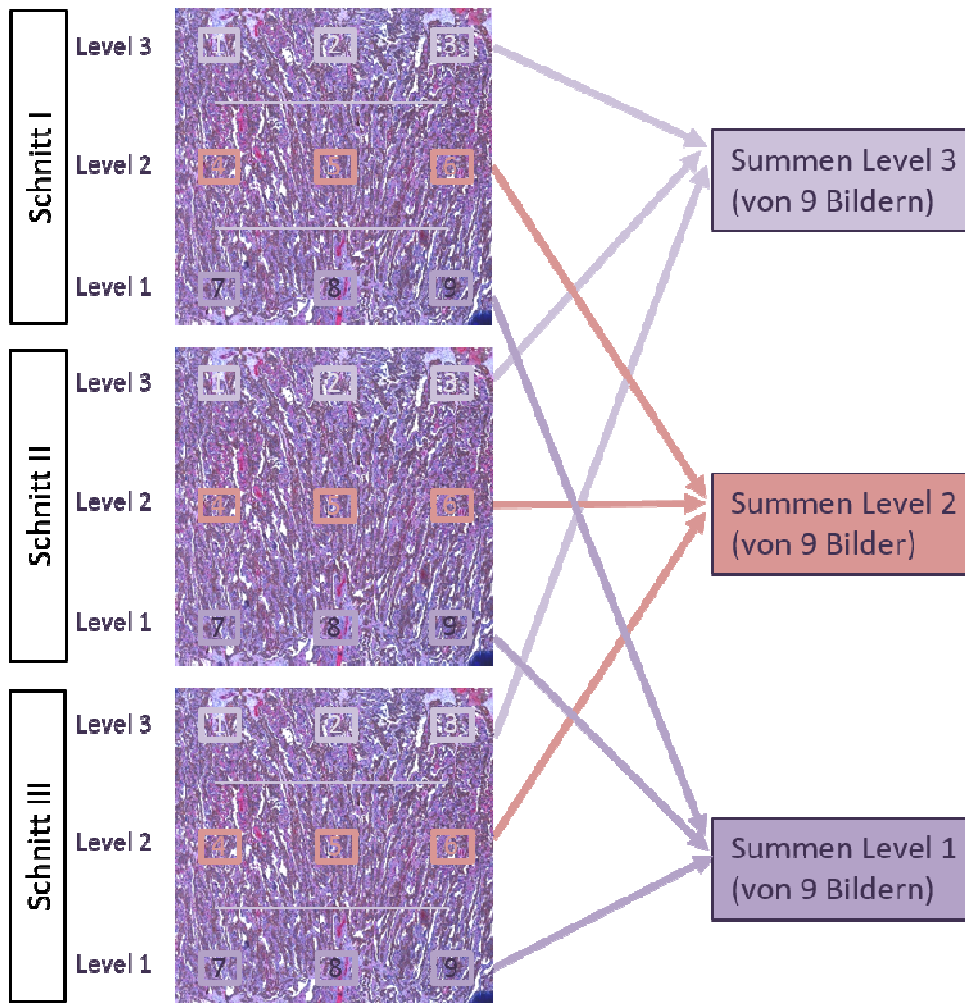


Abb. 18: Übersichtsbild Summierung pro Plazentom.

Der Gesamtwert von N_M und N_F pro Plazentom wurde jeweils durch level-unabhängige Summierung der 27 Einzelwerte ermittelt.

Mit den Gesamtwerten der Zählungen wurden folgende Parameter berechnet:^{112,117}

Oberflächendichte S_V :		
S_V	(surface density)	$= (2 \times \sum I_T) / (l/p \times \sum P_i)$ [$\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$]
$l/p = \text{arc length per point} = 30 \mu\text{m}$ (Abb. 19)		
$S_{V \text{ total}}$	(surface density of maternal <u>and</u> fetal villous)	$= (2 \times (\sum I_M + \sum I_F)) / (l/p \times (\sum P_{iM} + \sum P_{iF}))$
S_{VM}	(surface density of maternal villous)	$= (2 \times \sum I_M) / (l/p \times \sum P_{iM})$
S_{VF}	(surface density of fetal villous)	$= (2 \times \sum I_F) / (l/p \times \sum P_{iF})$

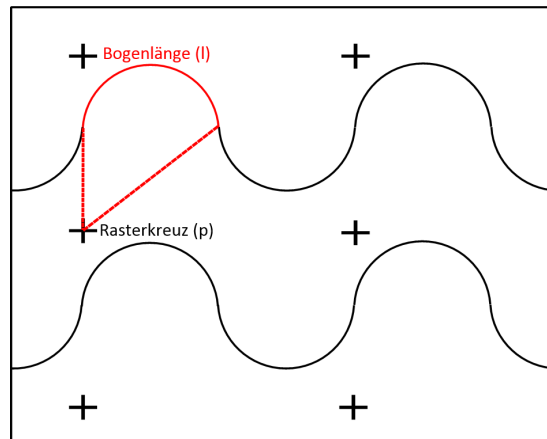


Abb. 19: Bogenlänge (l) pro Rasterkreuz (p)
(arc length per point).

Die Oberflächendichte wurde als Maß für die Verflechtung der maternalen mit den fetalen Zotten berechnet. Für die Berechnung wurde eine Gewebedichte von 1g/cm^3 ¹¹⁹ angenommen sowie ein Korrekturfaktor von $1,05$ ¹²⁴ einbezogen.

Gesamtoberfläche pro Plazentom S_A (wenn $\rho = 1\text{g/cm}^3$):

S_A	(total placentomal surface area)	= $S_V \times (\text{placental weight [g]} \times 1.05)$ [m^2]
$S_{A \text{ total}}$	(total maternal <u>and</u> fetal placentomal surface a.)	= $S_{V \text{ total}} \times (\text{placental weight} \times 1.05)$
S_{AM}	(total maternal placentomal surface area)	= $S_{VM} \times (\text{placental weight} \times 1.05)$
S_{AF}	(total fetal placentomal surface area)	= $S_{VF} \times (\text{placental weight} \times 1.05)$

Die auf das Gewicht des zugehörigen Plazentoms bezogene Oberflächendichte wurde als S_A bestimmt. Bezogen auf das Gesamtgewicht der entsprechenden Plazenta wurde S_T ermittelt. Diese Parameter stellen das quantitative Verhältnis zwischen verfügbarer Austauschfläche und Gewebevolumen, dessen Versorgung durch diese Oberfläche sichergestellt werden muss, dar.¹²⁵ Auf diese Weise dienen sie als Marker für den potenziellen Nährstoff- und Gasaustausch zwischen maternalem und fetalem Kreislauf.

Gesamtoberfläche pro Plazenta S_T (wenn $\rho = 1\text{g/cm}^3$):

S_T	(total placental surface area)	= $S_V \times (\text{total placenta weight [g]} \times 1.05)$ [m^2]
$S_{T \text{ total}}$	(total maternal <u>and</u> fetal placental surface area)	= $S_{T \text{ total}} \times (\text{placenta weight} \times 1.05)$
S_{TM}	(total maternal placental surface area)	= $S_{VM} \times (\text{placenta weight} \times 1.05)$
S_{TF}	(total fetal placental surface area)	= $S_{VF} \times (\text{placenta weight} \times 1.05)$

Ratio maternaler zu fetaler Oberflächendichte:

Ratio_{SVM/SVF} (maternal over fetal surface density) = S_{VM}/S_{VF} [%]

Die Ratio aus maternaler und fetaler Oberflächendichte wurde berechnet, um Veränderungen in der Verhältnismäßigkeit der beiden Gewebebereiche zueinander abbilden zu können.

Gefäßdichte N_V :

N_V (vessel density)	= $N / ((9 \times A_T \times SHF) / F_m^2)$	[1/mm ²]
	N	amount of vessels
	A_T	test area = 0.149 mm ²
	F_m	magnification = 20
	SHF	shrinkage factor = 0.837
		$\left(\frac{\text{mean diameter of fixed erythrocytes (4.24\mu m)}}{\text{mean diameter of fresh erythrocytes (5.1\mu m)}^{126}} \right)$
		= $N / ((1.341 \times 0.837) / 400)$
$N_{V \text{ total}}$ (maternal <u>and</u> fetal vessel density)	= $(N_M + N_F) / 2.78 \times 10^{-3}$	
N_{VM} (maternal vessel density)	= $N_M / 2.78 \times 10^{-3}$	
N_{VF} (fetal vessel density)	= $N_F / 2.78 \times 10^{-3}$	

Die Gefäßanzahl über eine definierte Fläche als ein weiterer potenzieller Parameter veränderten Nährstoff- und Gasaustauschs wurde mit der Gefäßdichte erfasst.

Zudem wurden Ergebnisse der assoziierten Arbeitsgruppe (AG Perinatale Programmierung) zum VEGF mRNA-Gehalt der Gewebe in die Auswertungen einbezogen.

2.5 Statistische Auswertung

2.5.1 Variationskoeffizientenanalyse

Um die Gewebestruktur stereologisch hinreichend gut repräsentieren zu können, wurden die auszuwertenden Bilder level-spezifisch aufgenommen (Abb. 13).

Mit Berechnungen der Variationskoeffizienten wurde an Plazentom-Stichproben untersucht, ob neun ausgewertete Bilder (aus drei Gewebeschnitten des jeweiligen Plazentoms) pro Level ausreichend sind, um dieses realitätsnah stereologisch abbilden zu können. In Abb. 20 ist exemplarisch die Variationskoeffizientenanalyse für Plazentom 1A dargestellt. Insbesondere in Level 1 (maternales Gewebe) und Level 3 (fetales Ge-

webe) zeigen sich ab dem fünften ausgewerteten Bild nahezu konstante Variationskoeffizienten. Somit kann in diesen Leveln durch eine höhere Anzahl an Bildern keine neue Qualität hinsichtlich der Parameterauswertung erreicht werden. In Level 2 stellen sich die Variationskoeffizienten wesentlich unstabiler dar. Ursache dafür ist die zentrale Lokalisation des Levels – dem heterogenen Übergang vom fetalen zum maternalen Gewebe. Jedoch zeigt sich auch hier eine relativ homogene Entwicklung der Variationskoeffizienten ab fünf ausgewerteten Bildern.

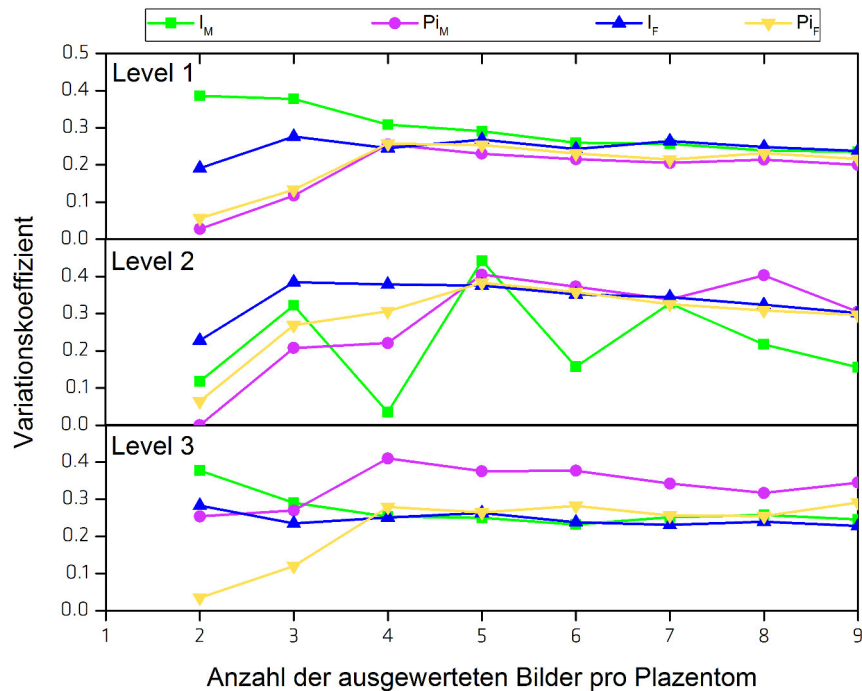


Abb. 20: Darstellung der Entwicklung der Variationskoeffizienten der Parameter I_M , Pi_M , I_F und Pi_F in Abhängigkeit von der Anzahl der ausgewerteten levelspezifischen Bilder pro Plazentom.

Folglich ist die Auswertung von neun Bildern ausreichend, um die level-spezifische Gewebestruktur – auch inhomogenerer Proben – bestmöglich innerhalb der Grenzen der gewählten stereologischen Methode abzubilden.

2.5.2 Auswertung mit SPSS

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Graphen erfolgte mit der Software SPSS Statistics Version 23 (IBM, USA). Eine Signifikanz von $p < 0,05$ wurde angenommen.

2.5.2.1 Morphologische Untersuchung

Die Gesamtzahl der Plazentome und die Anzahl jedes Plazentomtyps pro Plazenta wurden abhängig von Behandlung, Gestationsalter und Geschlecht erfasst.

Sie wurden zunächst auf Normalverteilung und Varianzhomogenität (Levene Test) geprüft. Nicht-normalverteilte Daten wurden logarithmiert und erneut auf Normalverteilung getestet. Um den Einfluss von Behandlung, Gestationsalter (dG), Geschlecht, Plazentomtyp und deren gegenseitige Interaktionen bestimmen zu können, wurden die Daten in einer multivariaten Varianzanalyse (MANOVA) untersucht. Ergaben sich signifikante Haupteffekte ($p < 0,05$), folgte ein paarweiser Mittelwertvergleich (Holm Sidak).

2.5.2.2 Stereologische Untersuchung

Anhand von Boxplots jeder Subgruppe wurden Ausreißer mit doppelter Standardabweichung identifiziert und ausgeschlossen. Die Gruppen wurden entsprechend den Einflussfaktoren Behandlung (DEX, Kontrolle), Gestationsalter (100, 140), Geschlecht (weiblich, männlich), Plazentomtyp (A, B, C, D) und deren Kombinationen untersucht. Im Anschluss wurden Gesamtgruppe und Subgruppen auf Normalverteilung geprüft (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$). Nicht-normalverteilte Daten wurden logarithmiert und erneut auf Normalverteilung getestet. Aufgrund eines großen Anteils nicht-normalverteilter Daten wurde für die Gesamtheit eine Nicht-Normalverteilung angenommen. Mit dem Levene-Test wurde die Varianzhomogenität untersucht. Nachfolgend wurde für die einzelnen Subgruppen (Behandlung, Gestationsalter, Geschlecht, Plazentomtyp) ein Mann-Whitney-U-Test (MWU) zur Homogenitätsbestimmung der Grundgesamtheit beider Ergebnisverteilungen durchgeführt. Für die Mehrfachvergleiche (z. B. Behandlung – Gestationsalter; Behandlung – Geschlecht; Behandlung – Gestationsalter – Geschlecht; Gestationsalter – Geschlecht) wurden zwei Gruppierungsvariablen erstellt. Eine enthielt die zweiteiligen Subgruppenkombinationen (z. B. Behandlung – Gestationsalter), eine die dreiteiligen Subgruppenkombinationen (z. B. Behandlung – Gestationsalter – Geschlecht). Mit den neuen Variablen wurden jeweils Kruskal-Wallis-Tests (KW-Test) durchgeführt, die prüfen, ob insgesamt Gruppenunterschiede vorhanden sind. Der KW-Test gibt jedoch nicht an, zwischen welchen Gruppen die Unterschiede bestehen. War er nicht signifikant gibt es keine Gruppenunterschiede und es wurde nicht weiter gerechnet.

War der KW-Test signifikant, folgten eine Reihe von MWU-Tests, um die Gruppenunterschiede festzustellen (Bsp.: MWU der Subgruppe Behandlung – Gestationsalter – Geschlecht). Abschließend wurden die derart berechneten p-Werte mit der Holm-Bonferroni-Methode auf das multiple Testen korrigiert.

2.5.2.3 Korrelationsanalysen

Es wurden bivariate Korrelationsanalysen (Pearson-Test) zur Darstellung des Verhältnisses vom Fetalgewicht¹⁰¹ zu Oberflächenparametern, Gefäßdichte, VEGF mRNA, Plazentagewicht, Plazentomgewicht und Plazentomanzahl erstellt. Untersucht wurden verschiedene Subgruppen (Behandlung, Gestationsalter, Geschlecht), in welche die Daten vor der entsprechenden Berechnung unterteilt wurden.

2.6 Reagenzien, Lösungen, Geräte und Software

Details zu den verwendeten Reagenzien und Lösungen sowie zu Geräten und Software für die beschriebene Immunhistochemie und die Bildanalyse befinden sich in Anhang 11.4.1, 11.4.2, 11.4.3 und 11.4.4.

3 Ergebnisse

3.1 Morphologische Untersuchung

3.1.1 Plazentagewicht

Die Ergebnisse der Analyse des Plazentagewichts, abhängig von fetalem Geschlecht, Behandlung und Gestationsalter, sind in Tab. 7 dargestellt. In den Kontrollgruppen konnte am Tag 125 bei Plazenten beider Geschlechter eine transiente Gewichtsabnahme beobachtet werden. Nach DEX-Behandlung zeigte sich keine signifikante Veränderung des Plazentagesamtgewichts im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Gestationsalter (dG)	Behandlung	Plazentagewicht (g)	
		weiblich	männlich
50	Kontrolle	61 ± 9,3 a	69 ± 7,2 a
	DEX	40 ± 10,3 A	58 ± 9,0 A
100	Kontrolle	473 ± 35,8 b	501 ± 55,3 b
	DEX	431 ± 32,0 B	396 ± 26,1 B
125	Kontrolle	418 ± 40,9 b	404 ± 33,6 b
	DEX	423 ± 46,2 B	466 ± 42,3 B
140	Kontrolle	499 ± 58,2 b	577 ± 46,1 b
	DEX	513 ± 29,0 B	571 ± 62,9 B

Tab. 7: Auswirkungen der frühen maternalen DEX-Therapie auf das Plazentagewicht bei weiblichen und männlichen Feten. Darstellung von Mittelwert ± SEM. Unterschiedliche Kleinbuchstaben (a, b) kennzeichnen signifikante Ergebnisse innerhalb der Kontrollgruppe über das Schwangerschaftsalter mit $p < 0,05$, unterschiedliche Großbuchstaben (A, B) zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der DEX-behandelten Gruppen über das Schwangerschaftsalter an. Signifikante Veränderungen nach DEX-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen ließen sich nicht nachweisen. Mod. nach Braun et al.¹²⁷

In den folgenden detaillierteren Untersuchungen der Gewichte wurden die einzelnen Plazentomtypen berücksichtigt. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 und Tab. 9 dargestellt.

In den Plazenten weiblicher Feten der Kontrollgruppe fand sich ein kontinuierlicher Gewichtsanstieg der C-Plazentome. Hier ergaben sich signifikante Veränderungen nach DEX-Behandlung. Eine Zunahme des mittleren C-Plazentomgewichts konnte sowohl am Tag 100 als auch am Tag 140 im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Tab. 8). Am Tag 125 fiel das Gewicht der C-Plazentome nach DEX vorübergehend signifikant ab.

Gestationsalter (dG)	Behandlung	Einzelplazentomgewicht (g) bei weiblichen Feten			
		A	B	C	D
50	Kontrolle	1,0 ± 0,14 a	1,2 ^k	NA	NA
	DEX	0,9 ± 0,29 A	1,2 ^k	NA	NA
100	Kontrolle	5,8 ± 0,68 b	8,2 ± 1,52 a	8,8 ± 4,03 a	8,8 ± 4,04 a
	DEX	5,0 ± 1,03 A, B	8,6 ± 1,55 A, B	22,4 ± 3,25 A	10,3 ± 1,95
125	Kontrolle	4,5 ± 0,65 a, b	7,5 ± 0,67 a	8,9 ± 1,9 a	8,6 ± 1,52 a
	DEX	5,4 ± 0,85 A, B	4,8 ± 1,20 A	12,0 ± 5,4 B	7,3 ^k
140	Kontrolle	6,1 ± 0,49 b	8,7 ± 1,11 a	12,8 ± 3,03 a	18,4 ^k
	DEX	7,7 ± 1,87 B	11,7 ± 3,12 B	18,8 ± 4,16 A	1,9 ^k

Tab. 8: Auswirkungen der frühen maternalen DEX-Therapie auf das Einzelplazentomgewicht bei weiblichen Feten. Darstellung: Mittelwert ± SEM. k = Plazentomanzahl ist sehr klein. NA = keine Plazentome verfügbar. Unterschiedliche Kleinbuchstaben (a, b) kennzeichnen signifikante Ergebnisse innerhalb der Kontrollgruppe über das Schwangerschaftsalter mit $p < 0,05$, unterschiedliche Großbuchstaben (A, B) zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der DEX-behandelten Gruppen über das Schwangerschaftsalter an. Fettgedruckt sind signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und DEX-Gruppe. Mod. nach Braun et al.¹²⁷

Das durchschnittliche Plazentomgewicht der DEX-behandelten Gruppe männlicher Feten unterschied sich hingegen in den B-Plazentomen am Tag 140 signifikant von der Kontrollgruppe (siehe Tab. 9). Hier fand sich nach DEX-Behandlung eine Zunahme des Plazentomgewichts im Vergleich zu den Kontrollen.

Gestationsalter (dG)	Behandlung	Einzelplazentomgewicht (g) der männlichen Feten			
		A	B	C	D
50	Kontrolle	1,3 ± 0,09 a	2,6 ± 0,12 a	NA	NA
	DEX	1,0 ± 0,16 A	2,7 ± 0,46 A	NA	NA
100	Kontrolle	9,9 ± 1,18 b, c	5,9 ^k	NA	7,7 ^k
	DEX	5,2 ± 0,42 B	7,7 ± 1,28 B	10,6 ± 3,74 A	9,9 ± 2,10 A
125	Kontrolle	4,9 ± 0,25 a, c	5,8 ± 0,68 a	9,4 ± 3,36 a	3,2 ^k
	DEX	5,8 ± 0,64 B	6,1 ± 0,94 A, B	5,5 ± 0,72 B	8,1 ± 0,71 A
140	Kontrolle	6,4 ± 0,63 b, c	6,5 ± 1,5 a	13,3 ± 1,49 a	NA
	DEX	9,2 ± 1,77 B	12,7 ± 2,2 C	12,7 ± 4,42 A	NA

Tab. 9: Auswirkungen der frühen maternalen DEX-Therapie auf das Einzelplazentomgewicht bei männlichen Feten. Darstellung: Mittelwert ± SEM. k = Plazentomanzahl ist sehr klein. NA = keine Plazentome verfügbar. Unterschiedliche Kleinbuchstaben (a, b, c) kennzeichnen signifikante Ergebnisse innerhalb der Kontrollgruppe über das Schwangerschaftsalter mit $p < 0,05$, unterschiedliche Großbuchstaben (A, B, C) zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der DEX-behandelten Gruppen über das Schwangerschaftsalter an. Fettgedruckt sind signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und DEX-Gruppe. Mod. nach Braun et al.¹²⁷

3.1.2 Plazentomanzahl und -verteilung

3.1.2.1 Plazentomanzahl

Nach Auswertung der Gesamtanzahl der Plazentome in Abhängigkeit von fetalem Geschlecht, Behandlung und Gestationsalter ergaben sich die in Tab. 10 aufgeführten Resultate. In der Kontrollgruppe mit männlichen Feten wurde ab Tag 100 eine relativ konstante Anzahl an Plazentomen nachgewiesen. Bei den weiblichen Feten nahm die Gesamtanzahl der Plazentome am Tag 125 vorübergehend ab, am Tag 140 glich sie sich wieder vorangegangenen Werten an. Bezüglich der DEX-behandelten Tiere zeigten sich in der Gesamtanzahl der Plazentome keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (Tab. 10).

Gestationsalter (dG)	Behandlung	Anzahl der Plazentome	
		weiblich	männlich
50	Kontrolle	59 ± 5 a, c	52 ± 4 a
	DEX	47 ± 5 A	47 ± 4 A
100	Kontrolle	73 ± 2 b	75 ± 5 b
	DEX	60 ± 8 A	65 ± 6 B
125	Kontrolle	57 ± 5 c	76 ± 7 b
	DEX	60 ± 5 A	80 ± 3 C
140	Kontrolle	70 ± 6 a, b, c	71 ± 6 b
	DEX	60 ± 7 A	59 ± 7 A, B

Tab. 10: Auswirkungen der frühen maternalen DEX-Therapie auf die Gesamtplazentomanzahl bei weiblichen und männlichen Feten. Darstellung: Mittelwert ± SEM. Unterschiedliche Kleinbuchstaben (a, b, c) kennzeichnen signifikante Ergebnisse innerhalb der Kontrollgruppe über das Schwangerschaftsalter mit $p < 0,05$, unterschiedliche Großbuchstaben (A, B, C) zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der DEX-behandelten Gruppen über das Schwangerschaftsalter an. Mod. nach Braun et al.¹²⁷

Im Anschluss an die Analyse der Gesamtplazentomzahl wurde in einer weiteren Untersuchung die Anzahl der einzelnen Plazentomtypen differenziert überprüft (Tab. 11 und Tab. 12). Bei den weiblichen Feten zeigte sich innerhalb der Kontrollgruppe am Tag 125 eine Reduktion der A-Plazentomzahl im Vergleich zu den sonstigen Gestationszeitpunkten. Für die DEX-behandelte Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zur Anzahl der Plazentome in den Plazenten der Kontrollgruppe (Tab. 11).

Gestationsalter (dG)	Behandlung	Anzahl der Plazentome bei weiblichen Feten			
		A	B	C	D
50	Kontrolle	56,2 ± 4 a	16 ^k	NA	NA
	DEX	44,7 ± 6 A	16 ^k	NA	NA
100	Kontrolle	56,9 ± 7 a	19,4 ± 6 a	13,3 ± 10 a	6,7 ± 4
	DEX	38,6 ± 11 A	17,6 ± 7 A	3,2 ± 2 A	2,0 ± 1
125	Kontrolle	29,2 ± 13 b	25,3 ± 5 a	15,0 ± 3 a	4,7 ^k
	DEX	20,0 ± 9 A	33,7 ± 9 A	12,0 ± 5 A	5,0 ^k
140	Kontrolle	52,8 ± 11 a	18,8 ± 4 a	10,8 ± 5 a	3,0 ^k
	DEX	44,5 ± 5 A	13,0 ± 3 A	6,0 ± 4 A	5,0 ^k

Tab. 11: Auswirkungen der frühen maternalen DEX-Therapie auf die typspezifische Plazentomanzahl bei weiblichen Feten. Darstellung: Mittelwert ± SEM. k = Plazentomanzahl ist sehr klein. NA = keine Plazentome verfügbar. Unterschiedliche Kleinbuchstaben (a, b) kennzeichnen signifikante Ergebnisse innerhalb der Kontrollgruppe über das Schwangerschaftsalter mit $p < 0,05$, unterschiedliche Großbuchstaben (A, B) zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der DEX-behandelten Gruppen über das Schwangerschaftsalter an. Mod. nach Braun et al.¹²⁷

Wie Tab. 12 zeigt, fand sich bei männlichen Feten in der Kontrollgruppe lediglich ein Trend zur Abnahme der Anzahl an A-Plazentomen nach Tag 100. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Plazentomzahlen der Plazenten männlicher Feten mit und ohne DEX-Behandlung.

Gestationsalter (dG)	Behandlung	Anzahl der Plazentome bei männlichen Feten			
		A	B	C	D
50	Kontrolle	50,2 ± 4 a	10,5 ± 3 a	NA	NA
	DEX	43,6 ± 5 A	8,4 ± 2 A	NA	NA
100	Kontrolle	68,6 ± 6 a	22,0 ^k	NA	9,0 ^k
	DEX	43,5 ± 9 A	15,8 ± 3 B	8,5 ± 3 A	10,5 ± 5 A
125	Kontrolle	40,5 ± 12 a	27,0 ± 8 a	10,5 ± 6 a	9,0 ^k
	DEX	42,0 ± 18 A	30,0 ± 8 A, B	33,4 ± 6 B	9,2 ± 4 A
140	Kontrolle	38,1 ± 10 a	25,6 ± 9 a	13,7 ± 4 a	NA
	DEX	35,8 ± 8 A	14,5 ± 4 A, B	21,5 ± 11 A, B	NA

Tab. 12: Auswirkungen der frühen maternalen DEX-Therapie auf die typspezifische Plazentomanzahl bei männlichen Feten. Darstellung: Mittelwert ± SEM. k = Plazentomanzahl ist sehr klein. NA = keine Plazentome verfügbar. Unterschiedliche Kleinbuchstaben (a, b) kennzeichnen signifikante Ergebnisse innerhalb der Kontrollgruppe über das Schwangerschaftsalter mit $p < 0,05$, unterschiedliche Großbuchstaben (A, B) zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der DEX-behandelten Gruppen über das Schwangerschaftsalter an. Mod. nach Braun et al.¹²⁷

Ergebnisse

3.1.2.2 Prozentuale Plazentomverteilung

Aus den Plazentomzahlen, differenziert nach Subtyp, Behandlung und Gestationsalter, wurde die prozentuale Verteilung bestimmt und in Abb. 21 dargestellt.

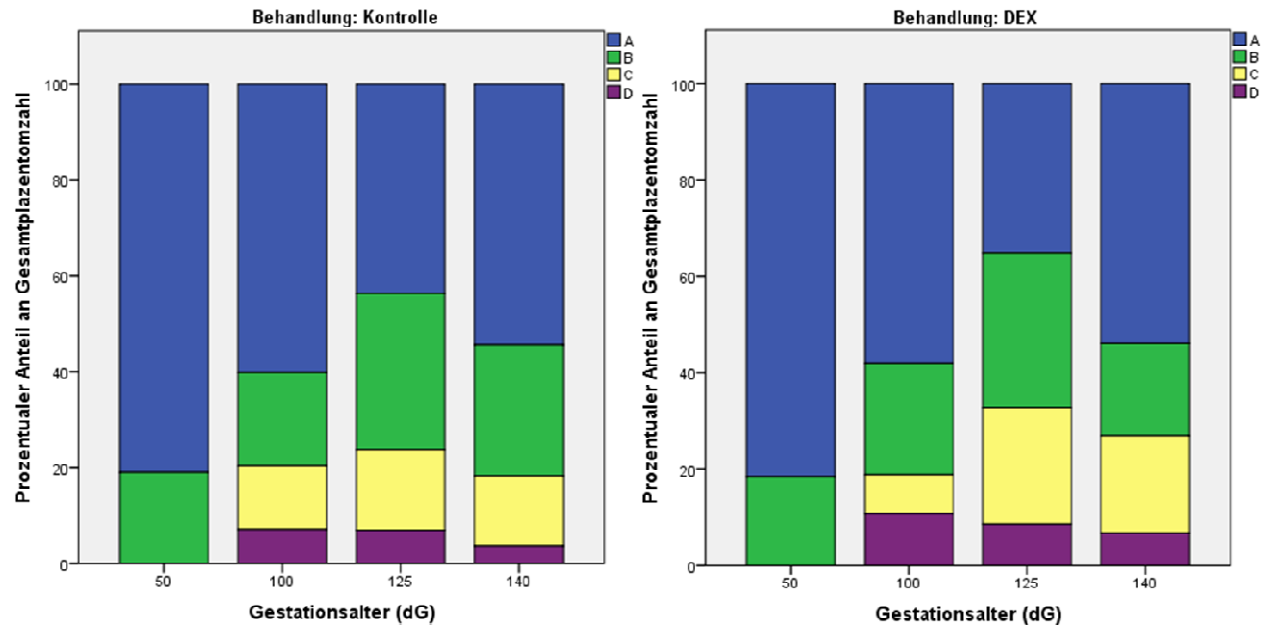


Abb. 21: Prozentualer Anteil der Plazentomtypen an der Gesamtplazentomzahl zu vier Zeitpunkten der Schwangerschaft (dG) in den Kontrollgruppen (links) und nach früher maternaler DEX-Therapie (rechts). Mod. nach Braun et al.¹²⁷

In der geschlechtsspezifischen Analyse konnte bei den weiblichen Feten der Kontrollgruppe am Tag 125 der geringste Anteil an A-Plazentomen im Schwangerschaftsverlauf festgestellt werden. B- und C-Plazentome waren am Tag 125 dagegen am häufigsten vertreten ($p < 0,001$). Dieser Trend war auch in der DEX-behandelten Gruppe ($p < 0,05$) zu erkennen (Abb. 22).

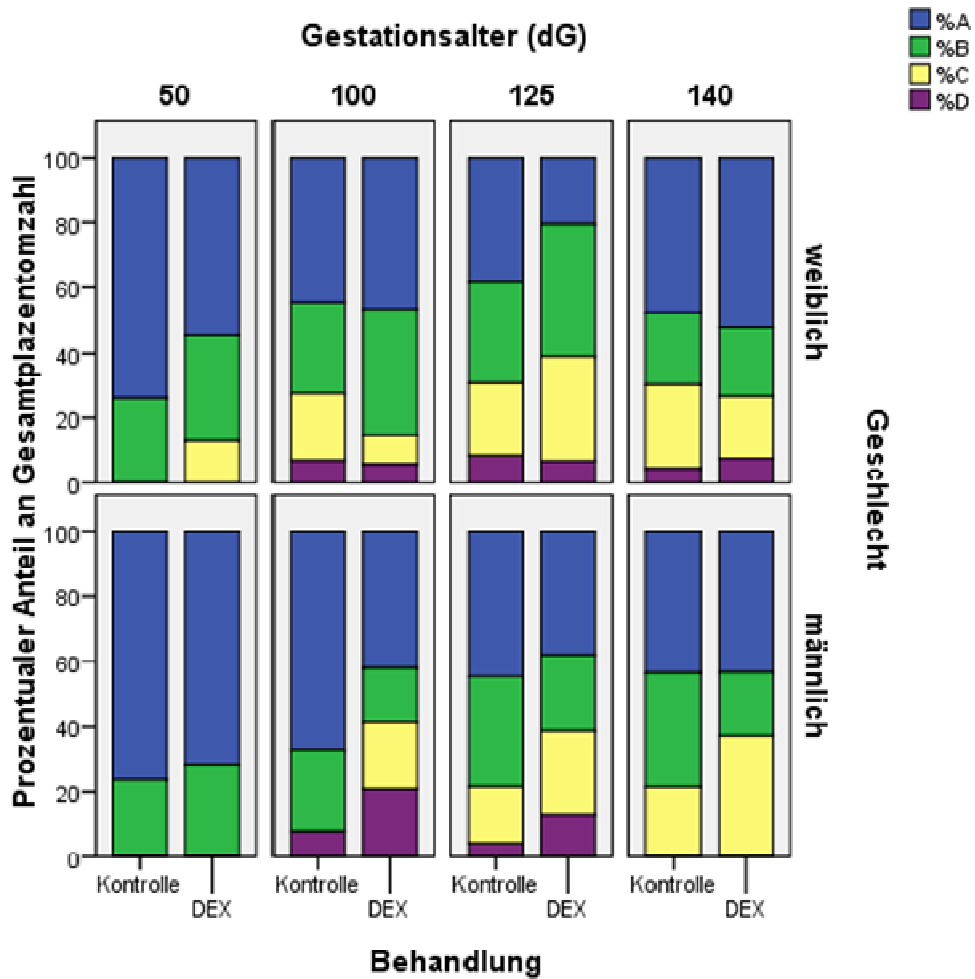


Abb. 22: Auswirkungen der frühen maternalen DEX-Therapie auf die prozentuale typspezifische Plazentomverteilung bei weiblichen und männlichen Feten zu vier Zeitpunkten der Schwangerschaft (dG). Darstellung: Mittelwerte der prozentualen Anteile. Mod. nach Braun et al.¹²⁷

Bei den männlichen Feten zeigte sich am Tag 125 in der Kontrollgruppe ebenfalls der größte Anteil an B-Plazentomen ($p < 0,05$). Die meisten A-Plazentome hingegen fanden sich am Tag 50. Nach DEX-Behandlung stieg der Anteil der C-Plazentome am Tag 125 im Vergleich zu den Kontrollen signifikant an ($p < 0,05$) (siehe Abb. 22).

3.2 Stereologische Untersuchung

3.2.1 Oberflächenparameter

3.2.1.1 Oberflächendichte

Oberflächendichte (S_V): Ontogeneseeffekt

Die Oberflächendichte, als Maß für die Verflechtung der maternalen mit den fetalen Zotten, nahm mit steigendem Gestationsalter signifikant zu. Dies traf auf alle untersuchten Gruppen zu (weibliche ($p \leq 0,001$), männliche ($p \leq 0,001$), Kontroll- und DEX-behandelte Gruppe ($p \leq 0,001$, Abb. 25), sowohl im maternalen als auch fetalen Gewebeanteil).

Über das gesamte Gewebe ($S_{V \text{ total}}$, maternales und fetales Gewebe) kam es im Lauf der Schwangerschaft zu einer Zunahme der Oberflächendichte in der weiblichen Kontrollgruppe ($p \leq 0,001$). Die $S_{V \text{ total}}$ und S_{V_F} der männlichen DEX-Gruppe ($p = 0,022$) stieg ebenfalls an (Abb. 23). In den entsprechenden behandelten weiblichen und unbehandelten männlichen Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der S_V zwischen Tag 100 und Tag 140 der Schwangerschaft.

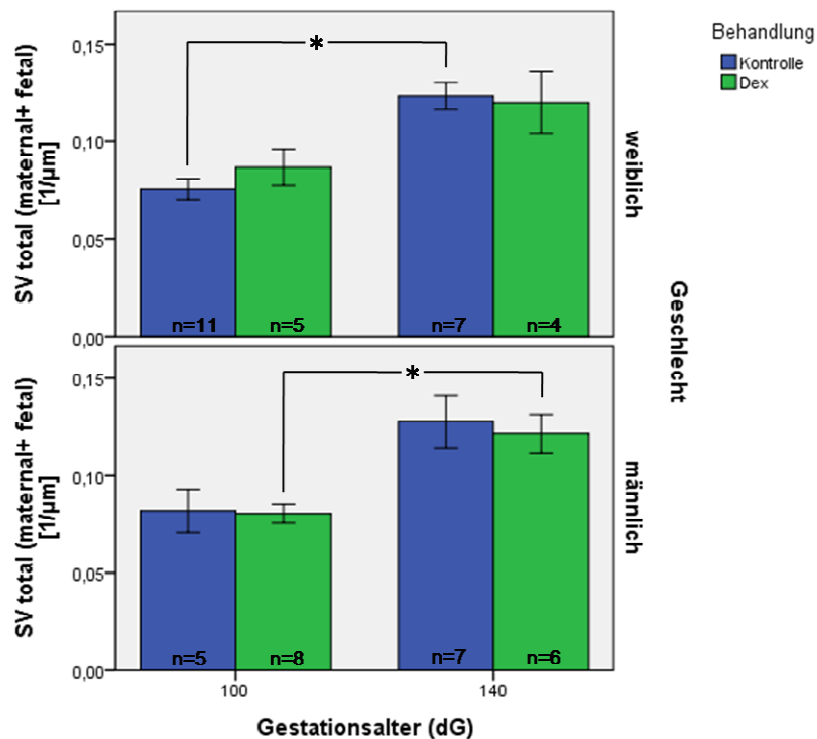


Abb. 23: Darstellung der Oberflächendichte des gesamten Gewebes (maternales und fetales Gewebe, $S_{V \text{ total}}$) geschlechtsspezifisch in der Kontroll- und DEX-Gruppe in Abhängigkeit vom Gestationsalter (dG). Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

Ergebnisse

Im maternalen Gewebeanteil nahm die S_V in der weiblichen ($p \leq 0,001$) und männlichen ($p \leq 0,001$) Kontrollgruppe signifikant zu. In der jeweiligen behandelten Gruppe gab es keinen Unterschied zwischen Tag 100 und Tag 140 der Schwangerschaft.

Der Anteil fetalen Gewebes zeigte mit zunehmendem Gestationsalter eine signifikant steigende S_{VF} in der weiblichen Kontrollgruppe ($p \leq 0,001$) auf. In der weiblichen DEX-Gruppe gab es keinen Unterschied zwischen Tag 100 und Tag 140. In der behandelten männlichen Gruppe kam es, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, ebenfalls zu einer Zunahme der S_{VF} im höheren Gestationsalter ($p = 0,022$).

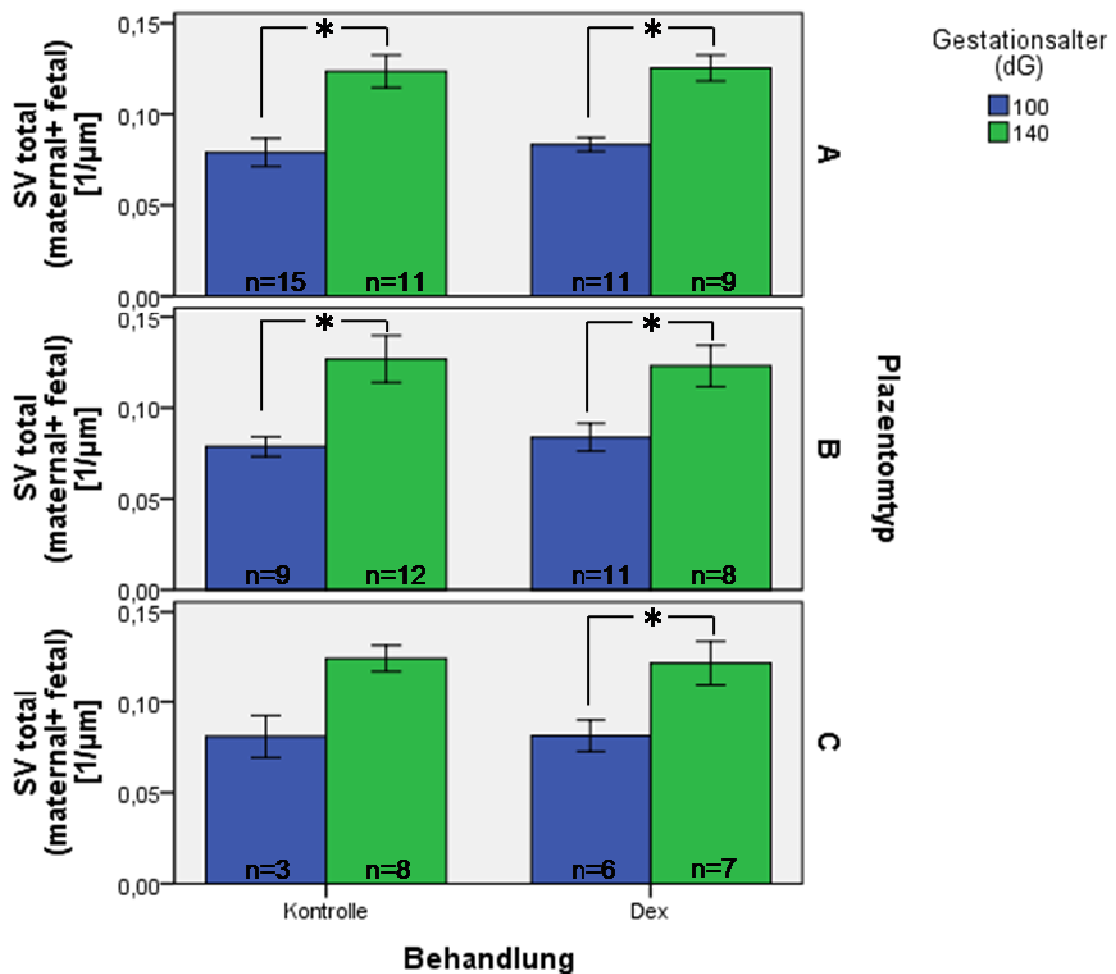


Abb. 24: Darstellung der Oberflächendichte des gesamten Gewebes (maternales und fetales Gewebe, $S_{V\text{total}}$) plazentomspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

In A, B und C-Plazentomen waren zwischen Tag 100 und Tag 140 in der Kontroll- sowie in der DEX-Gruppe signifikante Unterschiede in der S_V im Sinne eines Anstiegs zu erkennen (A (CON und DEX): $p \leq 0,001$; B (CON und DEX): $p = 0,01$; C (DEX):

Ergebnisse

$p = 0,032$, Abb. 24). In der Kontrollgruppe der C-Plazentome konnte nur ein Trend zur erhöhten S_V ausgemacht werden ($p = 0,098$). Angesichts einer in den Subgruppen zu geringen Anzahl wurden die D-Plazentome nicht in die Auswertung einbezogen.

Oberflächendichte (S_V): DEX-Behandlungseffekt

Im maternalen Gewebeanteil konnte am Tag 100 eine signifikant höhere S_{VM} in der DEX-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden ($p = 0,01$, Abb. 25).

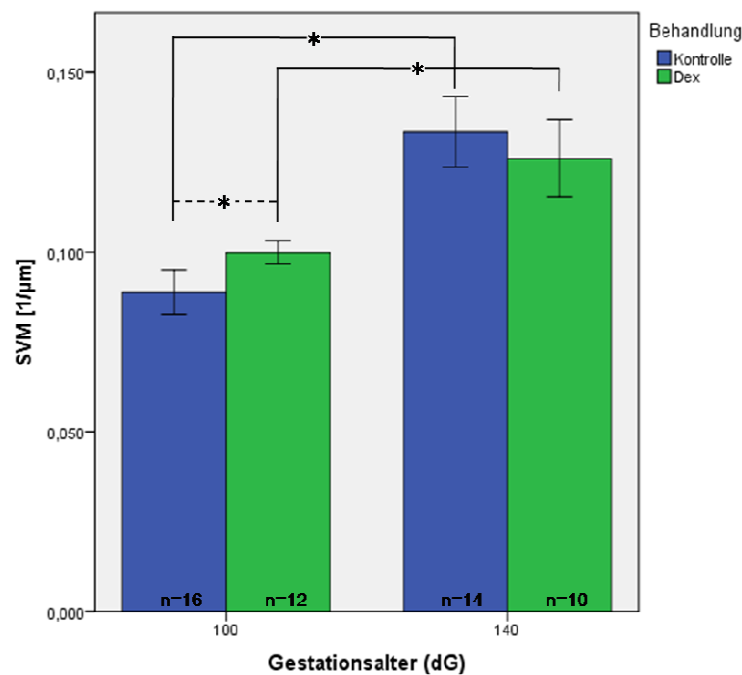


Abb. 25: Darstellung der Oberflächendichte des maternalen Gewebeanteils (S_{VM}) in der Kontroll- und DEX-Gruppe in Abhängigkeit vom Gestationsalter (dG). Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

In A-, B- und C-Plazentomen zeigten sich zwischen behandelten und nicht-behandelten Gruppen am Tag 100 sowie am Tag 140 keine signifikanten Unterschiede in der S_V .

3.2.1.2 Plazentomgewichtsspezifische Oberflächendichte

Plazentomgewichtsspezifische Oberflächendichte (S_A): Ontogeneseeffekt

Die auf das Gewicht des zugehörigen Plazentoms bezogene Oberflächendichte dient als Marker für den potenziellen Nährstoff- und Gasaustausch zwischen maternalem und fetalem Kreislauf. Eine Zunahme im Verlauf der Schwangerschaft konnte in allen untersuchten Gruppen nachgewiesen werden (d. h. weibliche und männliche Gruppe im maternalen ($p = 0,02$; $p \leq 0,001$) und fetalen ($p = 0,027$; $p \leq 0,001$) Gewebeanteil sowie Kontroll- und DEX-behandelte Gruppe (Abb. 26) im maternalen ($p \leq 0,001$; $p = 0,02$) und fetalen ($p \leq 0,001$; $p = 0,01$) Gewebeanteil).

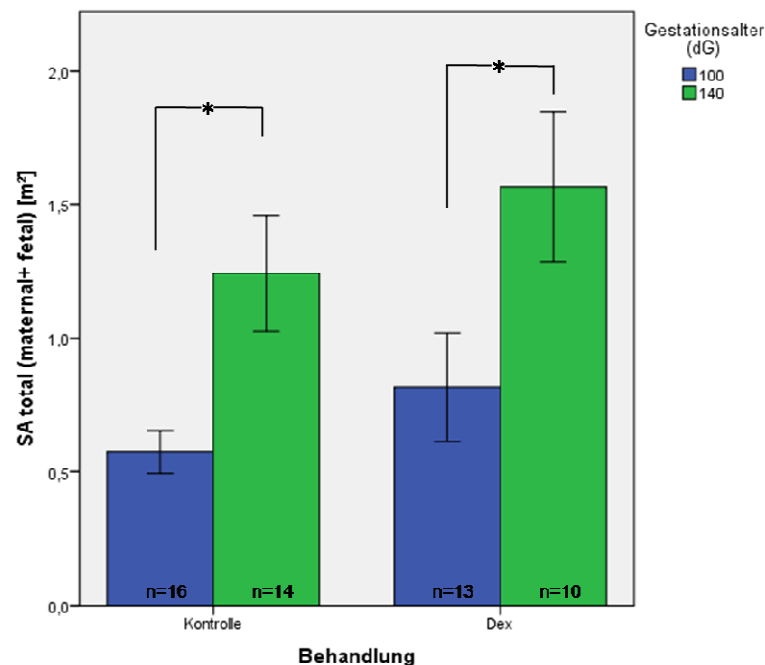


Abb. 26: Darstellung der plazentomgewichtsspezifischen Oberflächendichte des gesamten Gewebes (maternales und fetales Gewebe, $S_{A \text{ total}}$) an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

Weiterhin konnte dieser Trend in die weibliche Kontrollgruppe ($p = 0,012$) und die männliche DEX-Gruppe ($p = 0,022$) verfolgt werden (Abb. 27). In der weiblichen DEX-Gruppe und der männlichen Kontrollgruppe gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Tag 100 und 140.

Ergebnisse

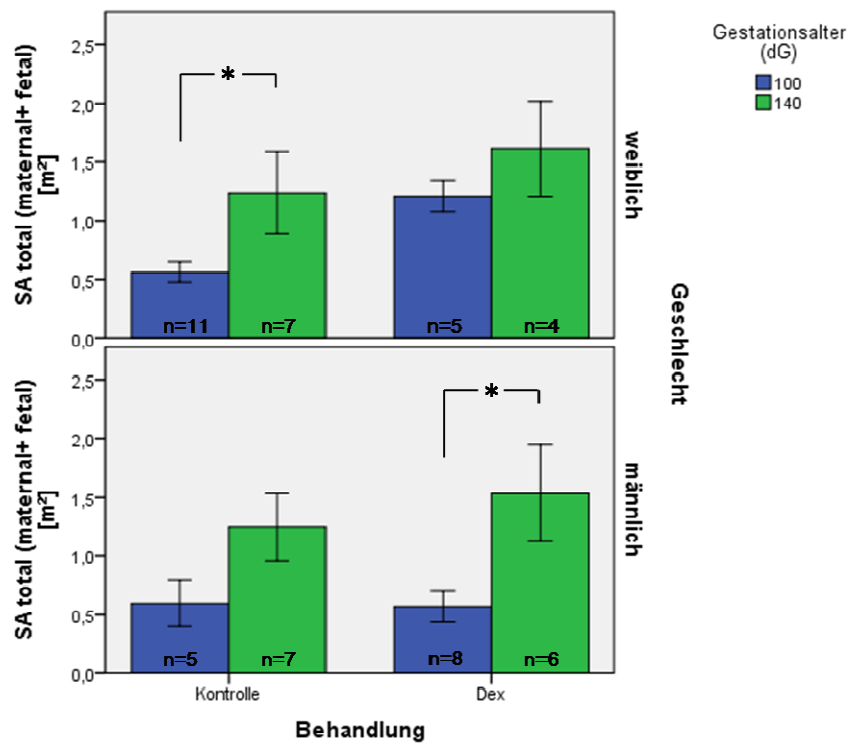


Abb. 27: Darstellung der plazentomgewichtsspezifischen Oberflächendichte des gesamten Gewebes (maternales und fetales Gewebe, S_A total) geschlechtsspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

Im maternalen Gewebeanteil der A-Plazentome zeigte sich in der behandelten Gruppe ein S_A -Anstieg zwischen Tag 100 und Tag 140 ($p = 0,024$), nicht aber in der Kontrollgruppe. Im maternalen Gewebe der B-Plazentome kam es hingegen zu einem Anstieg zwischen Tag 100 und Tag 140 in der Kontrollgruppe ($p = 0,024$, siehe Abb. 28), in der DEX-Gruppe zeigte sich ein entsprechender Trend ($p = 0,05$).

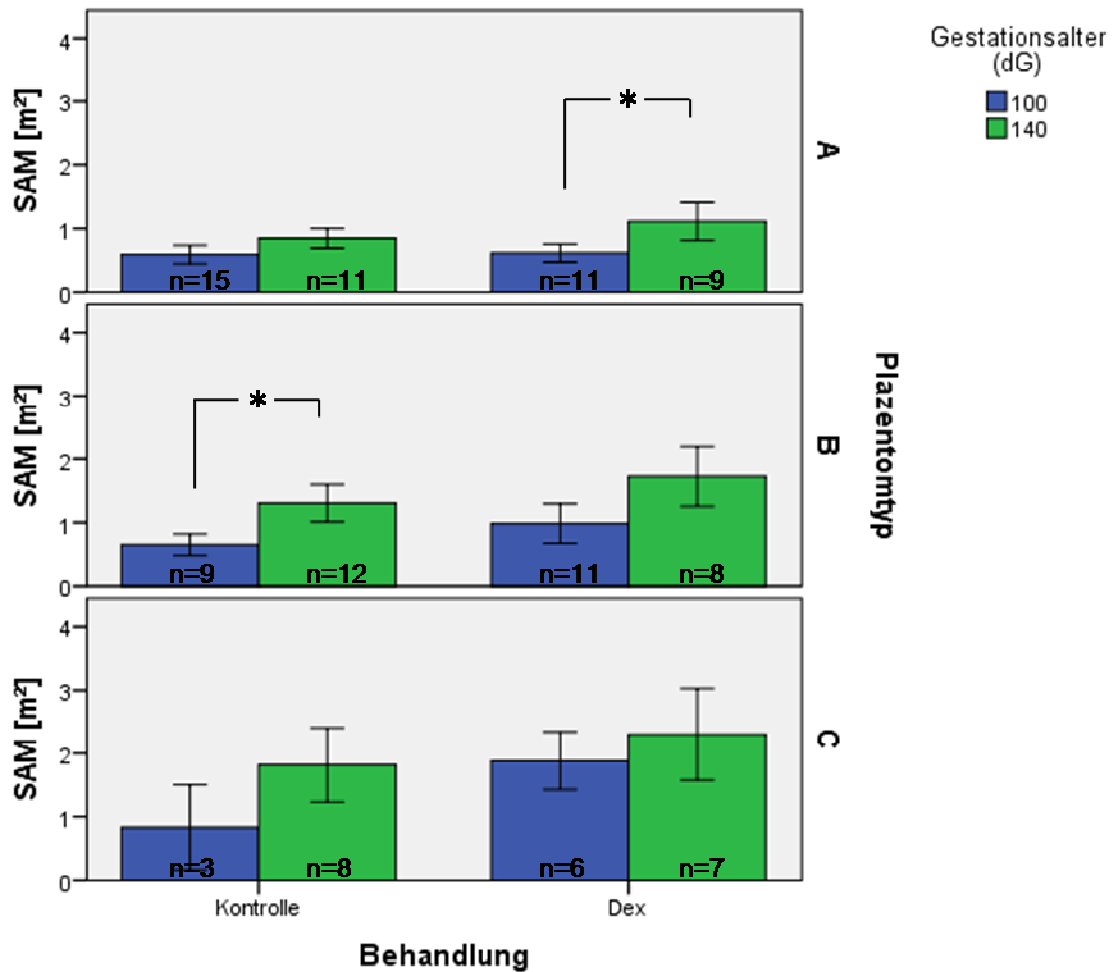


Abb. 28: Darstellung der plazentomgewichtsspezifischen Oberflächendichte des maternalen Gewebeanteils (S_{AM}) plazentomspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

Im fetalen Gewebeanteil der A-Plazentome wurde in der DEX-Gruppe ein S_A -Anstieg zwischen Tag 100 und Tag 140 ($p \leq 0,001$) nachgewiesen, in der Kontrollgruppe zeigte sich eine entsprechende Tendenz ($p = 0,089$). In den B-Plazentomen kam es sowohl in nicht-behandelten ($p = 0,022$) als auch in behandelten Gruppen ($p = 0,04$) zu einem Anstieg der S_A zwischen Tag 100 und Tag 140 (Abb. 29). In den C-Plazentomen kam es in allen Gewebeanteilen weder zu einem Entwicklungs- noch zu einem Behandlungseffekt auf die S_A .

Ergebnisse

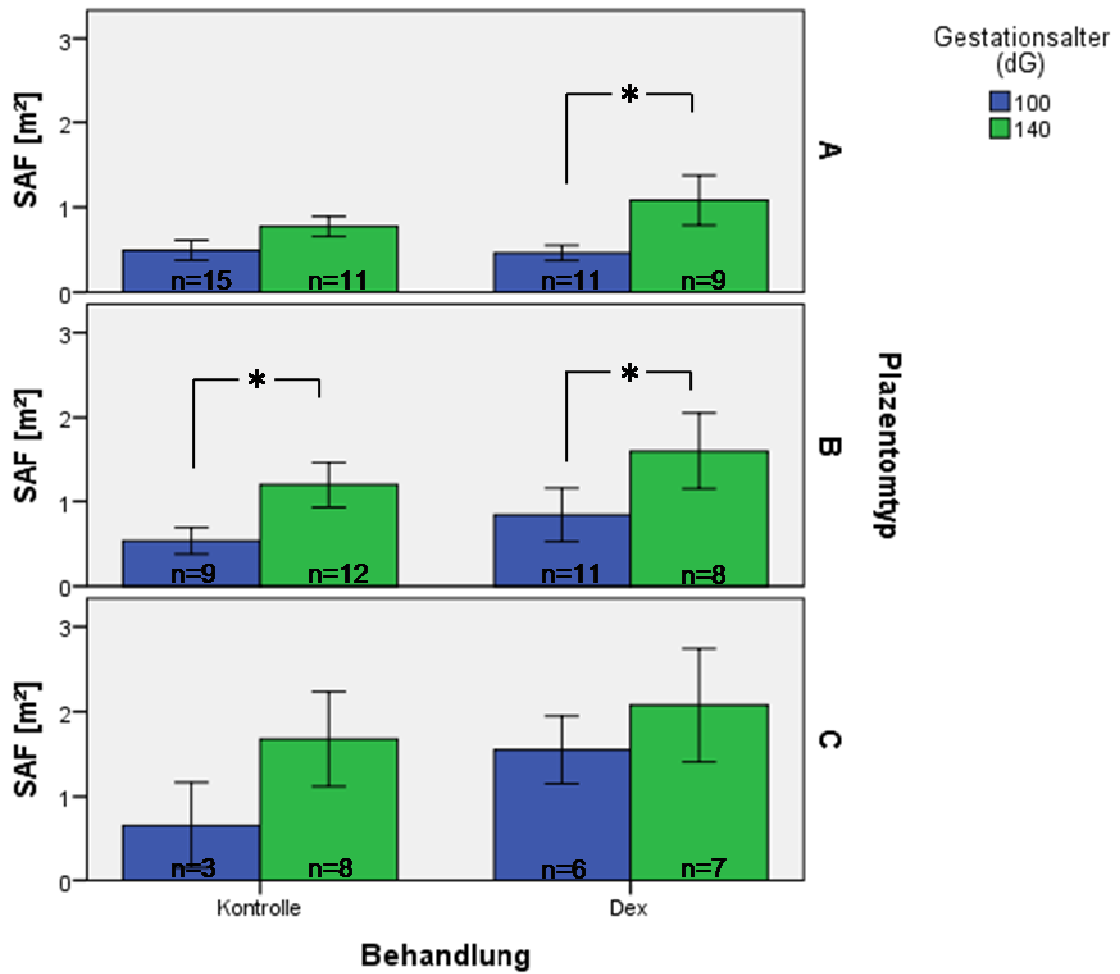


Abb. 29: Darstellung der plazentomgewichtsspezifischen Oberflächendichte des fetalen Gewebeanteils (S_{AF}) plazentomspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

Plazentomgewichtsspezifische Oberflächendichte (S_A): DEX-Behandlungseffekt

In der weiblichen Gruppe war die S_A im gesamten Gewebe der DEX-behandelten Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p = 0,02$, Abb. 30).

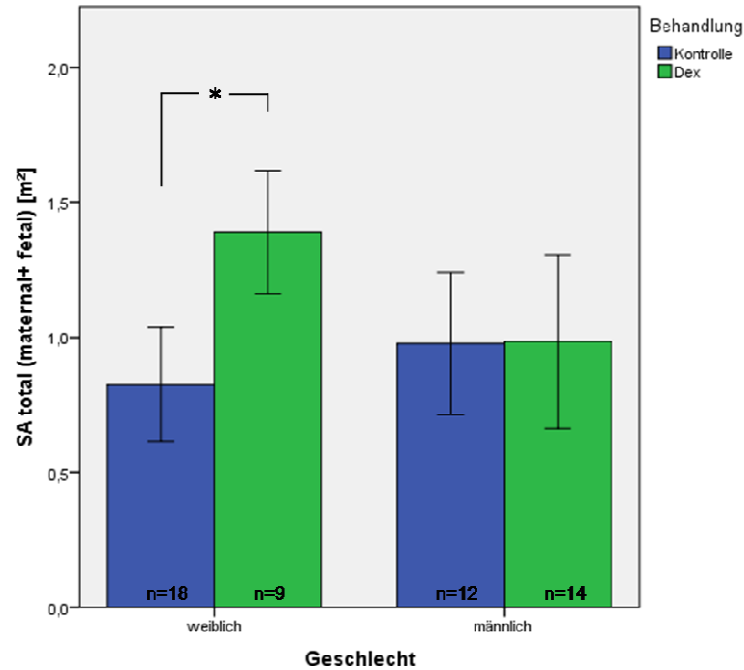


Abb. 30: Darstellung der plazentomgewichtsspezifischen Oberflächendichte des gesamten Gewebes (maternales und fetales Gewebe, S_A total) in der Kontroll- und DEX-Gruppe in Abhängigkeit vom Geschlecht. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

Dies ließ sich durch eine signifikant höhere S_A in der weiblichen DEX-Gruppe am Tag 100 im Vergleich zur Kontrollgruppe spezifizieren ($p = 0,022$, Abb. 31). Am Tag 140 zeigte sich in dieser Gruppe kein Unterschied der S_A nach Behandlung. Ebenso gab es keine Effekte in den männlichen Gruppen.

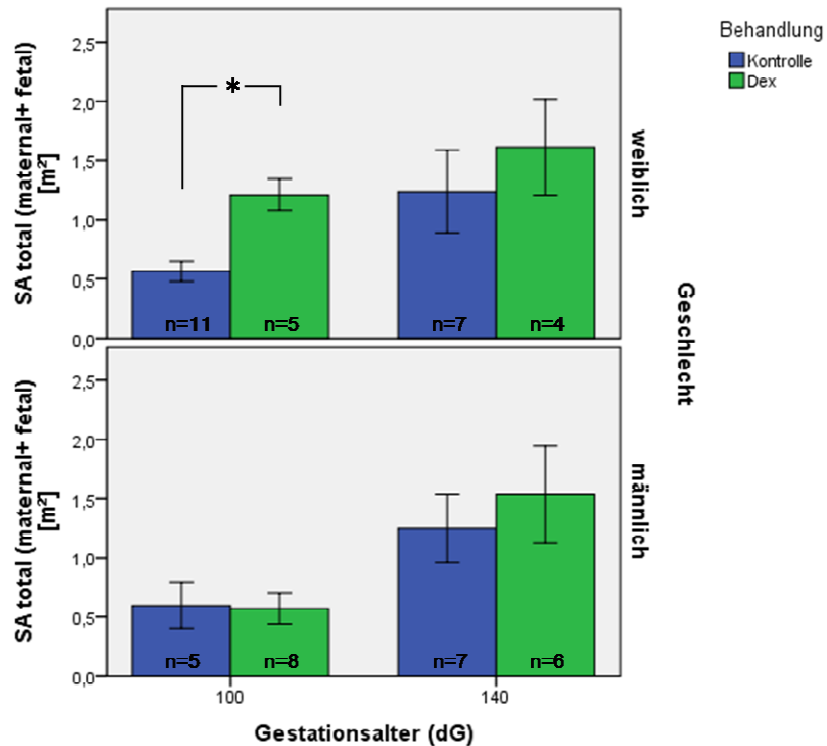


Abb. 31: Darstellung der plazentomgewichtsspezifischen Oberflächendichte des gesamten Gewebes (maternales und fetales Gewebe, S_A total) geschlechtsspezifisch in der Kontroll- und DEX-Gruppe in Abhängigkeit vom Gestationsalter. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

In A-, B- und C-Plazentomen zeigten sich zwischen behandelten und nicht-behandelten Gruppen am Tag 100 sowie am Tag 140 keine signifikanten Unterschiede in der S_A .

Plazentomgewichtsspezifische Oberflächendichte (S_A): Geschlechtsunterschied

Bezogen auf beide Gewebeanteile konnte in der weiblichen DEX-Gruppe am Tag 100 eine signifikant höhere S_A festgestellt werden als in der männlichen ($p = 0,045$ (maternal); $p = 0,027$ (fetal); $p = 0,027$ (total), siehe Abb. 31). Kein Geschlechtsunterschied ließ sich in der entsprechenden Kontrollgruppe und der DEX-Gruppe am Tag 140 erkennen.

3.2.1.3 Plazentagewichtsbezogene Oberflächendichte**Plazentagewichtsbezogene Oberflächendichte (S_T): Ontogeneseeffekt**

Die auf das Gesamtgewicht der entsprechenden Plazenta bezogene Oberflächendichte dient als Marker für den potenziellen Nährstoff- und Gasaustausch zwischen maternalem und fetalem Kreislauf. Sie nahm mit steigendem Gestationsalter zu. Dieser Verlauf konnte in allen untersuchten Gruppen, der weiblichen, männlichen sowie behandelter und Kontrollgruppe jeweils in beiden Gewebeanteilen nachgewiesen werden ($p \leq 0,001$, Abb. 32; maternales Gewebe: weibliche Gruppe $p = 0,005$).

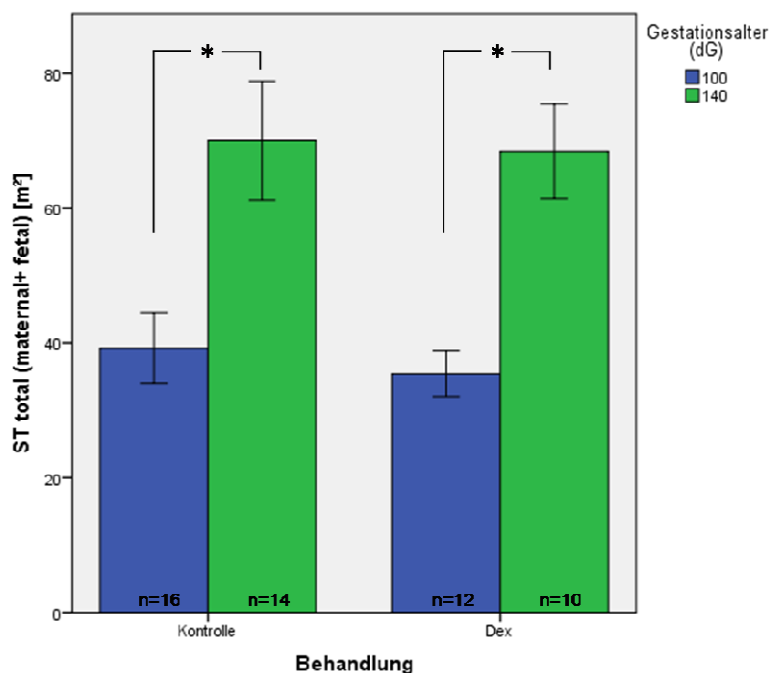


Abb. 32: Darstellung der plazentagewichtsspezifischen Oberflächendichte des gesamten Gewebes (maternales und fetales Gewebe, $S_{T \text{ total}}$) an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

Im gesamten Gewebe ($S_{T \text{ total}}$, maternales und fetales Gewebe) zeigte sich weiterhin eine signifikante Zunahme bei den weiblichen ($p = 0,033$) und männlichen ($p = 0,04$) Kontrollgruppen sowie in der männlichen DEX-Gruppe ($p = 0,024$, Abb. 33). In der behandelten weiblichen Gruppe gab es hingegen keinen signifikanten Unterschied der $S_{T \text{ total}}$ zwischen Tag 100 und Tag 140 der Schwangerschaft.

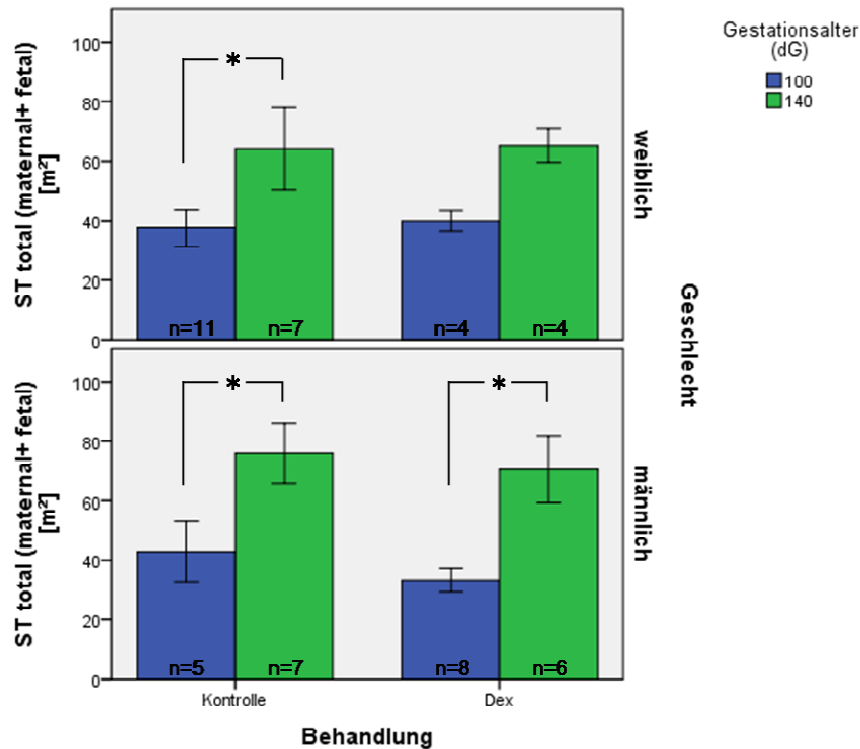


Abb. 33: Darstellung der plazentagewichtsspezifischen Oberflächendichte des gesamten Gewebes (maternales und fetales Gewebe, $S_{T \text{ total}}$) geschlechtsspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

Die signifikante Zunahme der $S_{T \text{ total}}$ in der männlichen Kontroll- und DEX-Gruppe im Schwangerschaftsverlauf ließ sich zu Veränderungen im maternalen Gewebeanteil zurückverfolgen (S_{TM} : Kontrollen $p = 0,044$; DEX $p = 0,024$). In diesem Gewebeanteil zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied der weiblichen Kontroll- oder DEX-Gruppen zwischen Tag 100 und Tag 140 der Schwangerschaft.

Im fetalen Gewebeanteil fand sich die signifikante S_{TF} -Zunahme in der weiblichen Kontrollgruppe ($p = 0,024$) und der männlichen DEX-Gruppe ($p = 0,024$). Sowohl in der weiblichen DEX-Gruppe als auch in der männlichen Kontrollgruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Tag 100 und Tag 140.

Ergebnisse

In A-, B- und C-Plazentomen waren in maternalem und fetalem Gewebe zwischen Tag 100 und Tag 140 in der Kontroll- sowie in der DEX-Gruppe signifikante S_T -Unterschiede zu erkennen. Diese zeigten sich im Sinne eines Anstiegs mit Fortschreiten der Schwangerschaft im maternalen Gewebeanteil (A – CON: $p = 0,027$; A – DEX: $p \leq 0,001$; B – CON und – DEX: $p = 0,011$; C – DEX: $p = 0,027$, siehe Abb. 34) und fetalen Gewebeanteil (A – CON und – DEX: $p \leq 0,001$; B – CON und – DEX: $p = 0,01$; C – DEX: $p = 0,024$, siehe Abb. 35).

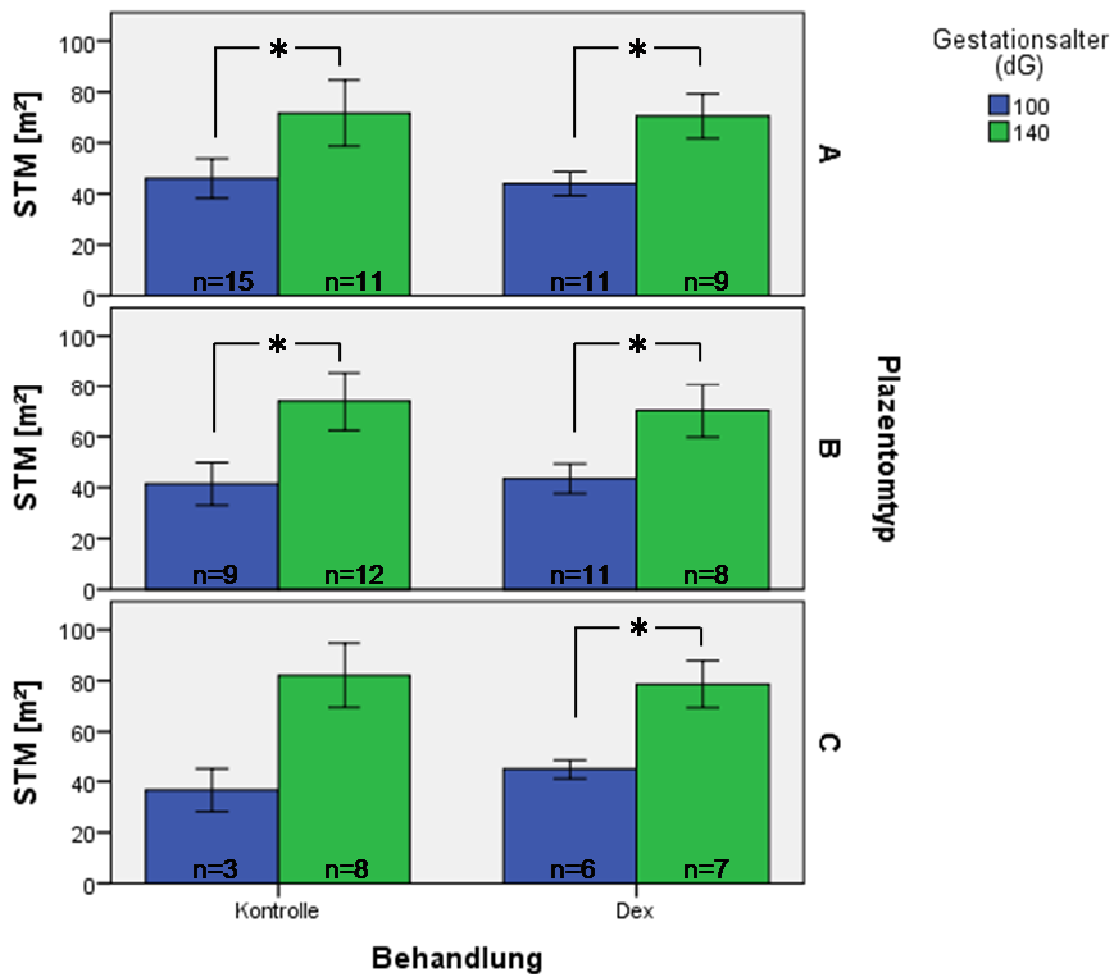


Abb. 34: Darstellung der plazentagewichtsspezifischen Oberflächendichte des maternalen Gewebeanteils (S_{TM}) plazentomspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

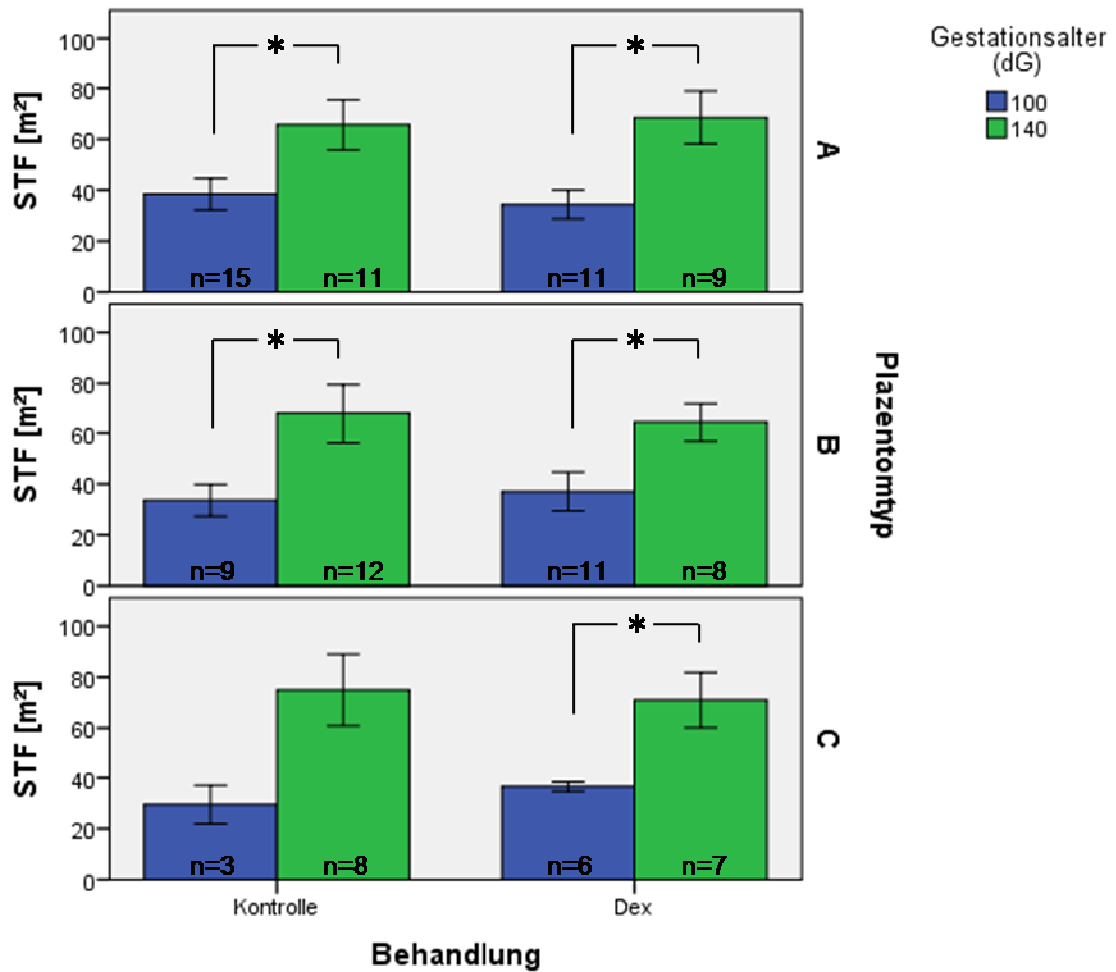


Abb. 35: Darstellung der plazentagewichtsspezifischen Oberflächendichte des fetalen Gewebeanteils (S_{TF}) plazentomspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

In der Kontrollgruppe der C-Plazentome konnte im gesamten Gewebe nur ein Trend zur steigenden S_T ausgemacht werden ($p = 0,098$).

3.2.1.4 Ratio maternale/fetale Oberflächendichte ($S_{SVM/SVF}$)

Ratio_{SVM/SVF}: Ontogeneseeffekt

Die Ratio aus maternaler und fetaler Oberflächendichte wurde berechnet, um Veränderungen in der Verhältnismäßigkeit der beiden Gewebereiche zueinander abbilden zu können. Dabei war eine Abnahme der Ratio nach DEX-Behandlung und separat in der männlichen Gruppe ($p = 0,032$, Abb. 36) mit zunehmendem Gestationsalter festzustellen.

Ergebnisse

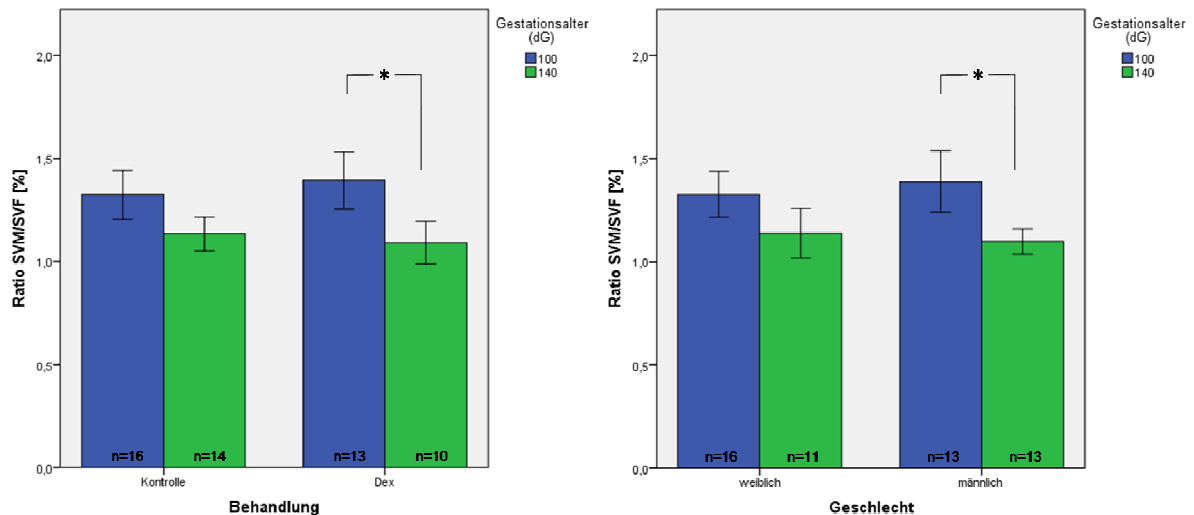


Abb. 36: Darstellung der Ratio aus maternaler und fetaler Oberflächendichte ($\text{Ratio}_{\text{SVM/SVF}}$) an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung (links) und des Geschlechts (rechts). Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

Auch in der männlichen behandelten Subgruppe konnte, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, eine signifikante Abnahme der Ratio ($p = 0,024$) gezeigt werden (siehe Abb. 37). Keine Unterschiede konnten dagegen in den weiblichen Gruppen ausgemacht werden.

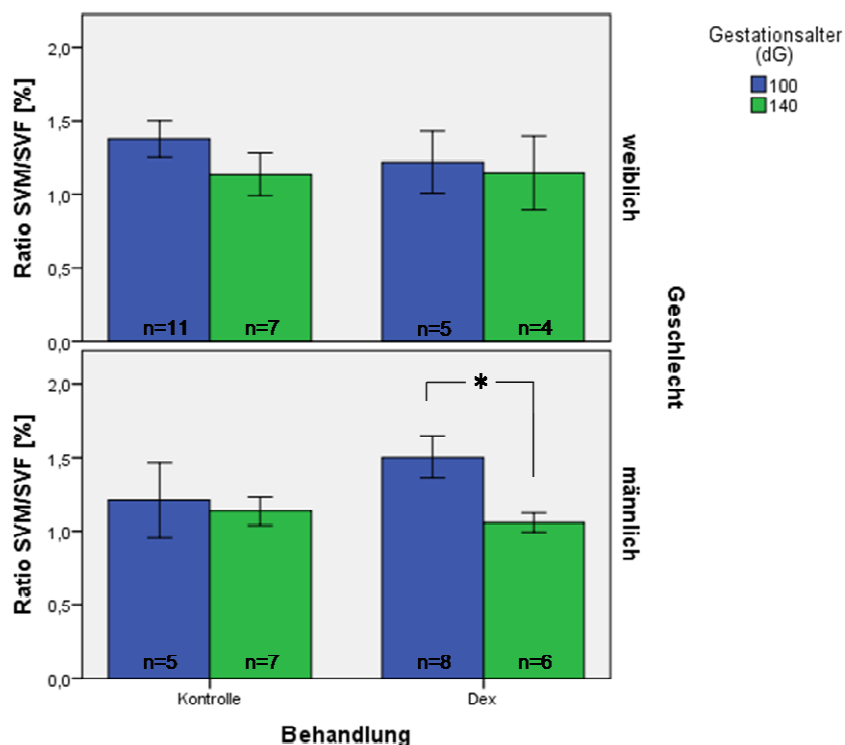


Abb. 37: Darstellung der Ratio aus maternaler und fetaler Oberflächendichte ($\text{Ratio}_{\text{SVM/SVF}}$) geschlechtsspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

Ergebnisse

Alle signifikanten Unterschiede der Ratio zwischen Tag 100 und 140 der Schwangerschaft sind in einer Zunahme des fetalen Gewebeanteils im Verhältnis zum maternalen Anteil begründet (Abb. 38, Abb. 39).

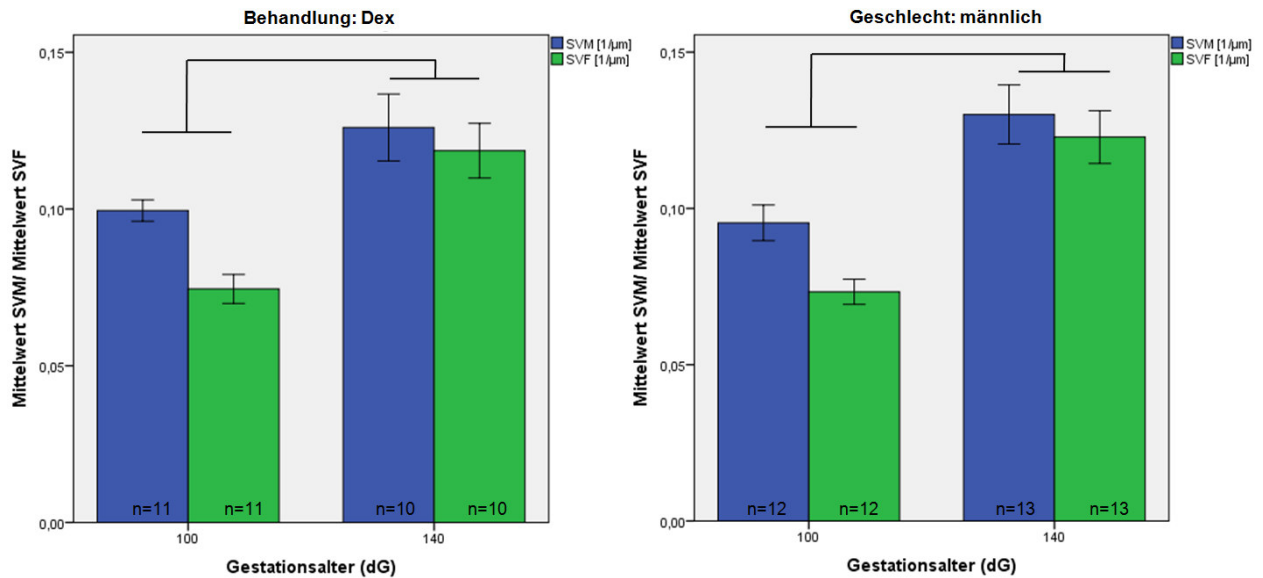


Abb. 38: Darstellung der mittleren Oberflächendichte des maternalen (S_{VM}) und fetalen (S_{VF}) Gewebeanteils der DEX-Gruppe (links) und der männlichen Gruppe (rechts) in Abhängigkeit vom Gestationsalter (dG). Zunahme des fetalen im Verhältnis zum maternalen Gewebeanteil zwischen 100 dG und 140 dG, damit $Ratio_{SVM/SVF}$ -Abnahme (siehe Abb. 36).

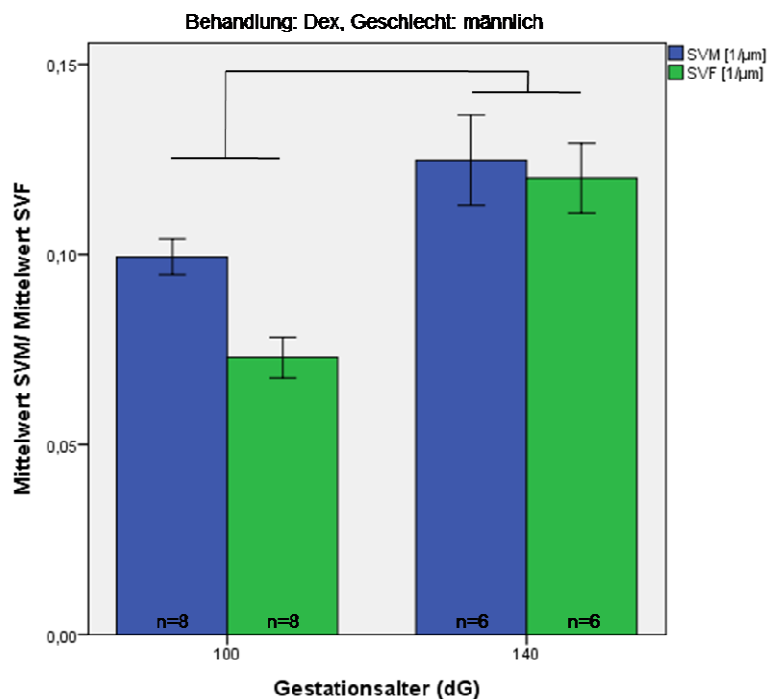


Abb. 39: Darstellung der mittleren Oberflächendichte des maternalen (S_{VM}) und fetalen (S_{VF}) Gewebeanteils der männlichen DEX-Gruppe in Abhängigkeit vom Gestationsalter (dG). Zunahme des fetalen im Verhältnis zum maternalen Gewebeanteil zwischen 100 dG und 140 dG, damit $Ratio_{SVM/SVF}$ -Abnahme (siehe Abb. 37).

3.2.2 Gefäßentwicklung

3.2.2.1 Gefäßdichte

Gefäßdichte (N_V): Ontogeneseeffekt

Die Gefäßanzahl über eine definierte Fläche als ein weiterer potenzieller Parameter veränderten Nährstoff- und Gasaustauschs wurde mit der Gefäßdichte erfasst. Diese Gefäßdichte nahm in allen Gewebeanteilen in der weiblichen Gruppe mit zunehmendem Gestationsalter signifikant ab ($p \leq 0,001$, siehe Abb. 40, fetales Gewebe: $p = 0,048$), in der männlichen Gruppe ergab sich kein Unterschied.

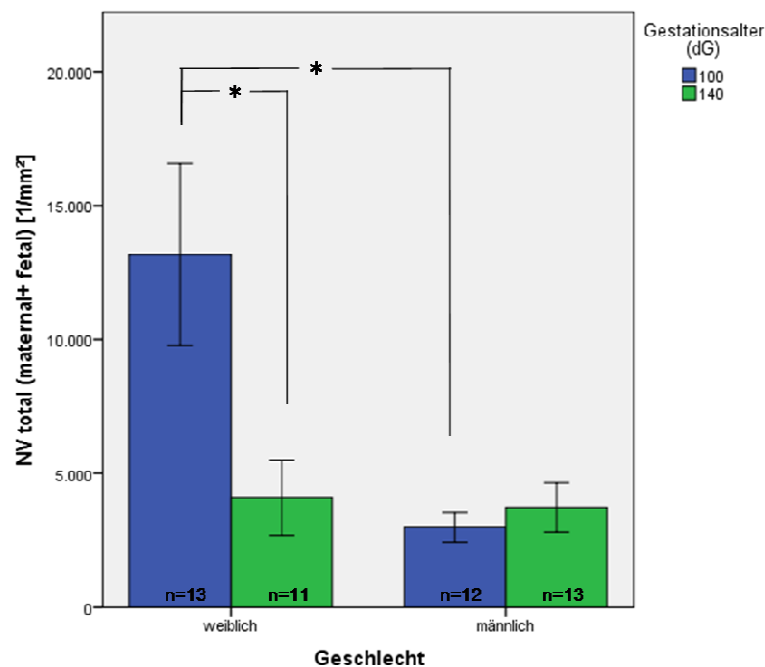


Abb. 40: Darstellung der Gefäßdichte des gesamten Gewebes (maternales und fetales Gewebe, $N_{V \text{ total}}$) an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit vom Geschlecht. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

Im maternalen Gewebe zeigte sich zusätzlich eine signifikante Abnahme der N_{VM} mit Verlauf der Schwangerschaft in der Kontrollgruppe ($p = 0,04$, Abb. 41) sowie in der Subgruppe der weiblichen Kontrollen ($p = 0,024$, Abb. 42). In den behandelten und den männlichen Gruppen gab es keinen Unterschied.

Ergebnisse

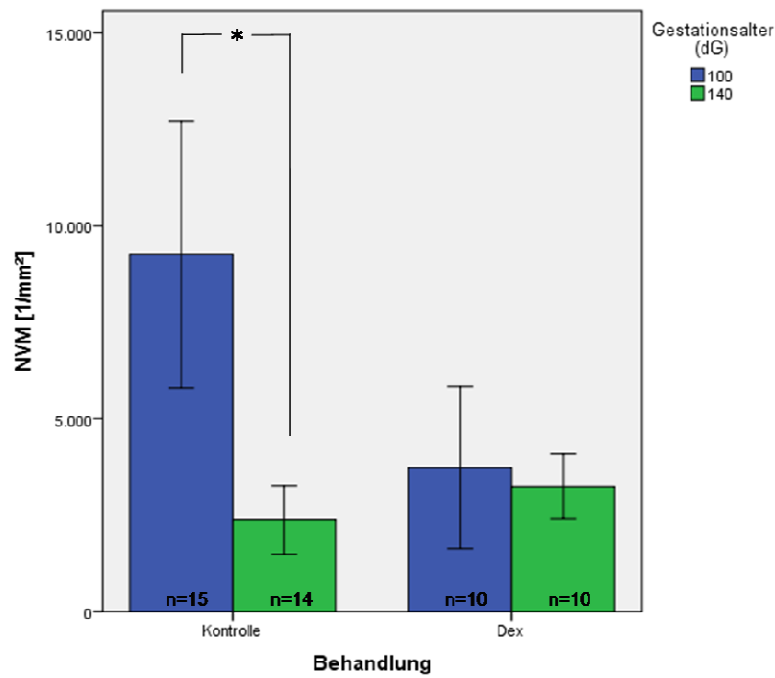


Abb. 41: Darstellung der Gefäßdichte im maternalen Gewebeanteil (N_{VM}) an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

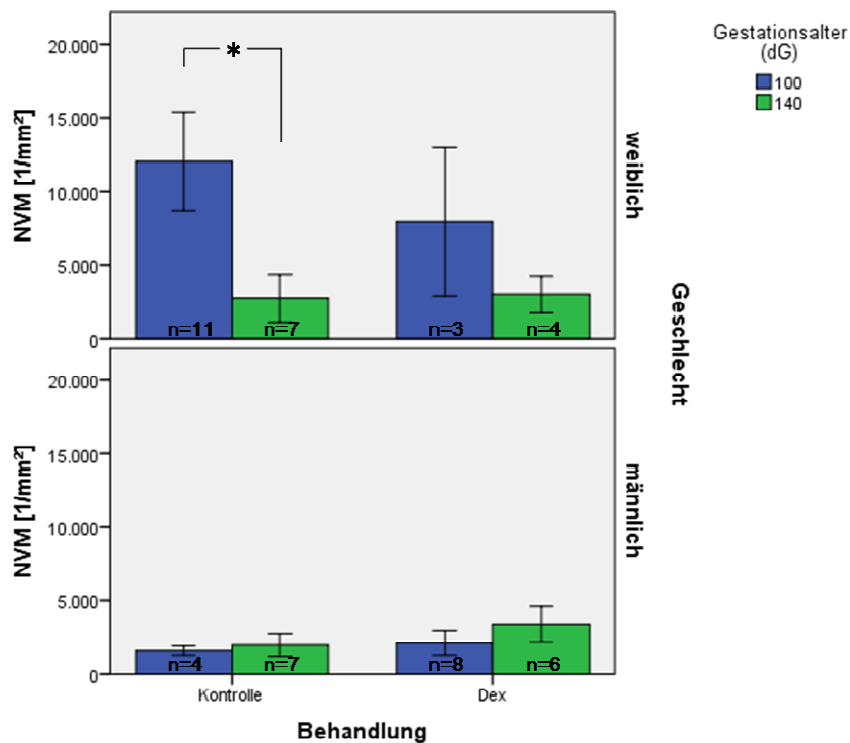


Abb. 42: Darstellung der Gefäßdichte im maternalen Gewebeanteil (N_{VM}) geschlechtsspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

Ergebnisse

In A- und B-Plazentomen waren in maternalem Gewebe zwischen Tag 100 und Tag 140 in der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede der N_V zu erkennen. Diese zeigten sich im Sinne einer Abnahme mit Fortschreiten der Schwangerschaft (A: $p = 0,033$; B: $p = 0,012$, siehe Abb. 43).

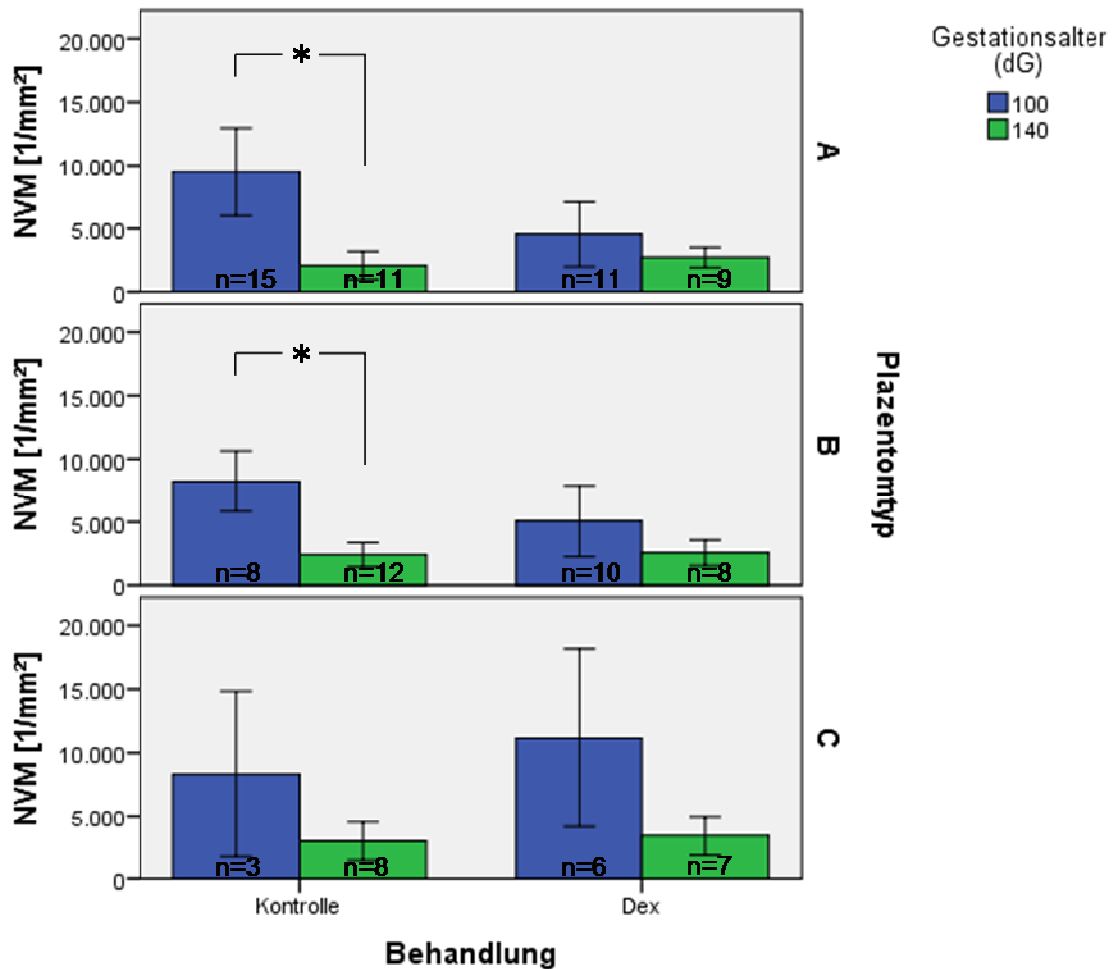


Abb. 43: Darstellung der Gefäßdichte im maternalen Gewebeanteil (N_{VM}) plazentomspezifisch an 100 dG und 140 dG in Abhängigkeit von der Behandlung. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

In den entsprechenden behandelten Gruppen und im fetalen Gewebeanteil gab es keine signifikanten Unterschiede der Gefäßdichte.

Gefäßdichte (N_V): Geschlechtsunterschied

In der weiblichen Kontrollgruppe war die Gefäßdichte signifikant höher (maternales Gewebe: $p = 0,04$; fetales Gewebe: $p = 0,014$; total: $p = 0,036$) als in der männlichen Kontrollgruppe (Abb. 44). Zwischen den jeweiligen behandelten Gruppen zeigte sich kein Unterschied.

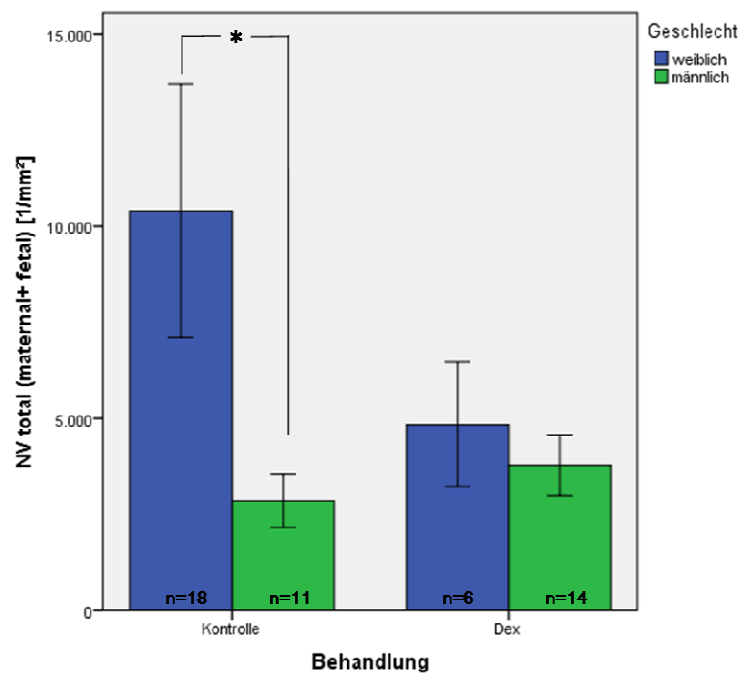


Abb. 44: Darstellung der Gefäßdichte des gesamten Gewebes (maternales und fetales Gewebe, N_V total) der weiblichen und männlichen Gruppe in Abhängigkeit von der Behandlung. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

Sowohl im maternalen als auch im fetalen Gewebe konnte am Tag 100 eine höhere Gefäßdichte ($p \leq 0,001$, Abb. 40) in der weiblichen Gruppe als in der männlichen nachgewiesen werden. Am Tag 140 der Schwangerschaft bestand kein signifikanter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Gruppen. Im maternalen Gewebeanteil zeigte sich zudem eine höhere N_{VM} am Tag 100 in der weiblichen Kontrollgruppe als in der männlichen ($p = 0,044$, Abb. 42). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen weiblicher und männlicher DEX-Gruppe am Tag 100.

3.2.2.2 VEGF mRNA**VEGF mRNA: Behandlungseffekt**

Die VEGF mRNA-Konzentration als Marker der Vaskulo- und Angiogenese (durch Stimulation des vaskulären Endothels) war am Tag 140 in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der DEX-behandelten Gruppe ($p = 0,008$, Abb. 45). Am Tag 100 zeigte sich kein Unterschied.

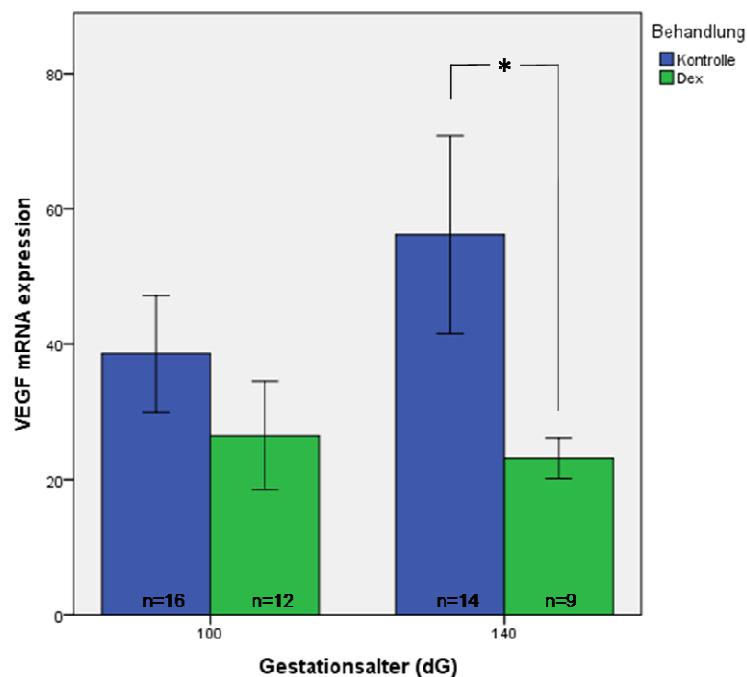


Abb. 45: Darstellung der VEGF mRNA expression bei Kontroll- und DEX-Gruppe in Abhängigkeit vom Gestationsalter (dG). Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

In der weiblichen Gruppe war die VEGF-Konzentration in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der DEX-behandelten Gruppe ($p = 0,021$, Abb. 46), bei den männlichen Feten bestand kein Unterschied. Ein Trend zum Konzentrationsunterschied zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe zeigte sich in den weiblichen Gruppen am Tag 140 ($p = 0,096$), am Tag 100 war kein Unterschied erkennbar (siehe Abb. 47).

Es konnten keine plazentomspezifischen Unterschiede in der VEGF-mRNA-Konzentration festgestellt werden.

Ergebnisse

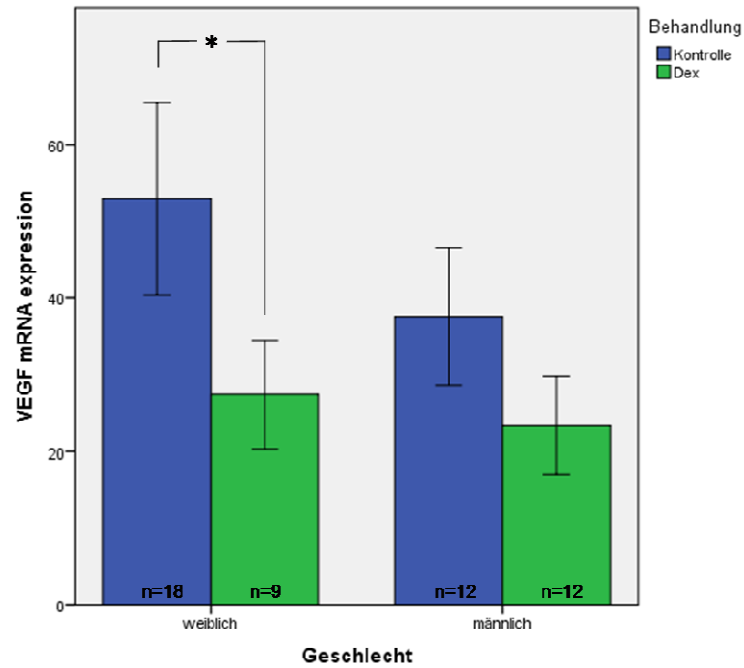


Abb. 46: Darstellung der VEGF mRNA expression bei Kontroll- und DEX-Gruppe in Abhängigkeit vom Geschlecht. Darstellung des Mittelwerts \pm SEM. Stern (*) kennzeichnet signifikante Ergebnisse zwischen den jeweiligen Gruppen.

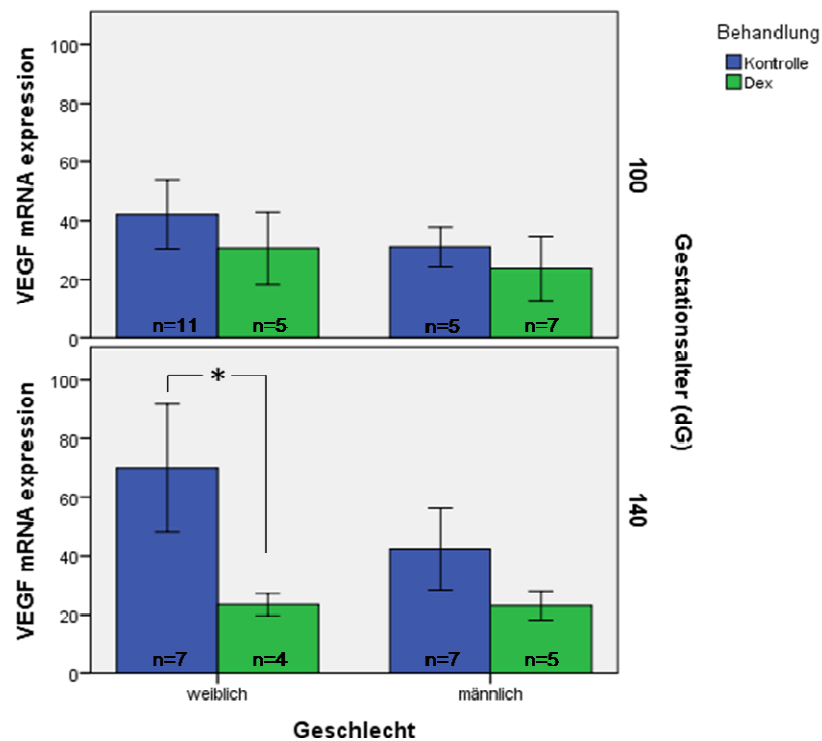


Abb. 47: Darstellung der VEGF mRNA expression bei Kontroll- und DEX-Gruppe in Abhängigkeit von Gestationsalter und Geschlecht. Trend zur VEGF-Abnahme zwischen Kontrollen und DEX-behandelten der weiblichen Gruppe ($p = 0,096$). Darstellung des Mittelwerts \pm SEM.

3.3 Korrelationsanalysen

3.3.1 Korrelationen nach Behandlungsart

In der Kontrollgruppe korrelierte die Gefäßdicke negativ mit den Oberflächenparametern SV (Korrelationskoeffizient (KKE): -0,642, $p < 0,001$); SA (KKE: -0,542, $p = 0,003$) und ST (KKE): -0,550, $p = 0,002$, Korrelation nach Pearson). In der DEX-Gruppe gab es keine signifikanten Korrelationen.

Der VEGF korrelierte stark negativ mit der Gefäßdicke im maternalen Gewebeanteil (N_{VM} , KKE: -0,742, $p = 0,009$) in der weiblichen Kontrollgruppe am Tag 100 der Schwangerschaft. Dieser Zusammenhang war in der entsprechenden DEX-behandelten Gruppe nicht erkennbar.

3.3.2 Korrelationen mit dem Fetalgewicht

Die behandlungsabhängigen Korrelationen von Fetalgewicht zu Oberflächen- und Gefäßparametern im Schwangerschaftsverlauf (zwischen Tag 100 und Tag 140 der Schwangerschaft) wurden in Tab. 13 dargestellt. Nahezu alle Oberflächenparameter der weiblichen Kontrollgruppe und beider männlicher Kohorten korrelierten positiv mit dem entsprechenden Fetalgewicht. In der weiblichen DEX-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse. Die Gefäßdicke korrelierte ausschließlich in der weiblichen Kontrollgruppe negativ mit dem Fetalgewicht.

weiblich	CON				DEX				
	Parameter	sig. Veränderungen	KKE	p-Wert	Parameter	sig. Veränderungen	KKE	p-Wert	
		des Parameters zw. 100 u. 140dG	mit Fetalgewicht			des Parameters zw. 100 u. 140dG	mit Fetalgewicht		
	SVM	↑	0,815	p < 0,001					
	SVF	↑	0,927	p < 0,001					
	SVT	↑	0,927	p < 0,001					
	SAM	↑	0,696	p = 0,001					
	SAF	↑	0,708	p = 0,001					
	SAT	↑	0,714	p = 0,001					
	STF	↑	0,735	p = 0,001					
	STT	↑	0,713	p = 0,001					
	NVM	↓	-0,707	p = 0,001					
	NVT	↓	-0,702	p = 0,001					
männlich	CON				DEX				
	Parameter	sig. Veränderungen	KKE	p-Wert	Parameter	sig. Veränderungen	KKE	p-Wert	
		des Parameters zw. 100 u. 140dG	mit Fetalgewicht			des Parameters zw. 100 u. 140dG	mit Fetalgewicht		
		SVM	↑	0,864	p < 0,001	SVM	(↑)	0,720	p = 0,004
		SVF	(↑)	0,888	p < 0,001	SVF	↑	0,890	p < 0,001
		SVT	(↑)	0,866	p < 0,001	SVT	↑	0,868	p < 0,001
		SAM	(↑)	0,742	p = 0,006	SAM	↑	0,749	p = 0,002
		SAF	n.s.	-	-	SAF	↑	0,842	p < 0,001
		SAT	n.s.	-	-	SAT	↑	0,813	p < 0,001
		STM	↑	0,830	p = 0,001	STM	↑	0,866	p < 0,001
		STF	n.s.	-	-	STF	↑	0,892	p < 0,001
		STT	↑	0,866	p < 0,001	STT	↑	0,895	p < 0,001
		Ratio	n.s.	-	-	Ratio	↓	-0,816	p < 0,001

keine sig. Veränderungen

Tab. 13: Zusammenfassung der Korrelationen des Fetalgewichts mit den Oberflächenparametern abhängig vom Geschlecht im Schwangerschaftsverlauf (Pearson-Korrelation). ↑ = signifikante Zunahme ($p \leq 0,05$) zwischen 100 dG und 140 dG, ↓ = signifikante Abnahme ($p \leq 0,05$) zwischen 100 dG und 140 dG, (↑) = Trend ($p < 0,1$) zur Zunahme zwischen 100 dG und 140 dG, n.s. = nicht signifikant. KKE = Korrelationskoeffizient.

4 Diskussion

4.1 Hintergrund

GC sind häufig eingesetzte Wirkstoffe, die auch in der Schwangerschaft bei maternalen Erkrankungen (z. B. Asthma¹⁷, rheumatische Erkrankungen¹⁶) oder zur fetalen Behandlung (z. B. AGS¹⁸, drohende Frühgeburtlichkeit^{11,13,14}) angewendet werden. Neben den positiven Effekten kommt es zu Nebenwirkungen, welche die Entwicklung des Kindes sowohl kurz- als auch langfristig beeinträchtigen können („Fetale Programmierung“). Insbesondere eine Behandlung mit hohen GC-Dosen beeinflusst das fetale Wachstum, führt zu niedrigeren Geburtsgewichten und Körpermaßen^{14,19-25} und ist im höheren Lebensalter mit kardiovaskulären-, metabolischen-, endokrinologischen-, renalen- sowie mentalen Beeinträchtigungen assoziiert.^{8,20,22,30-38} Speziell nach maternaler GC-Therapie in der frühen Schwangerschaft, in den sensiblen Phasen der fetalen Entwicklung und Differenzierung, konnten beim Menschen u.a. Aktivitätsänderungen der 11 β HSD Typ 2⁹⁶ und ein erhöhtes Risiko für eine Lippen-Kiefer-Gaumenspalte¹²⁸ nachgewiesen werden. Im Schafsmodell kam es zu Veränderungen der fetalen HPA-Achse⁹⁹, der Enzyme der Steroidogenese^{101,129}, der Level der 11 β HSD Typ 2 mRNA^{101,103}, der IGF-Freisetzung¹⁰⁴ und zu Organgewichtsveränderungen⁹⁹. Zudem wurde eine transiente Gewichtsreduktion bei weiblichen Feten am 100. Schwangerschaftstag gezeigt.¹⁰¹ Da die Plazenta, als Verbindung zwischen maternalem und fetalem Kreislauf, eine zentrale Rolle in der Entwicklung des Kindes spielt,⁴⁷ wird ihr auch in der Ursachenforschung hinsichtlich GC-Folgen eine besondere Bedeutung beigemessen. Das Wachstum der Plazenta in der frühen Schwangerschaft hat einen direkten Einfluss auf das spätere Fetalwachstum. Dieses ist wiederum von der placentaren Anpassungsfähigkeit an die fetalen Bedürfnisse abhängig.¹³⁰

4.2 Morphologische Untersuchung

4.2.1 Plazentagewicht

In vorangegangenen Studien der Schafsschwangerschaft wurde gezeigt, dass die Plazentagröße nach GC-Behandlung abnimmt.²¹ Auch das Plazentagewicht war nach GC-Exposition in der späten Schwangerschaft reduziert.^{68,79} Dies kann mit einer eingeschränkten placentaren Funktionsfähigkeit und damit einer beeinträchtigten fetalen

Nährstoffzufuhr einhergehen. In der vorliegenden Studie zur frühen maternalen DEX-Behandlung änderte sich das Gesamtplazentagewicht hingegen nicht. Auch in Subgruppenanalysen bzgl. des Geschlechts konnten keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe gefunden werden (Tab. 7). Dies lässt sich am ehesten durch die studienspezifisch differierenden GC-Behandlungszeitpunkte erklären und hebt die besondere Rolle der einzelnen sensiblen Entwicklungszeitfenster für das Konzept der fetalen Programmierung hervor.

Für die vorliegende Untersuchung der Auswirkungen früher GC-Gabe in der Schafschwangerschaft wurden bereits zuvor die Geburtsgewichte der diesem Projekt zugehörigen Feten erhoben¹⁰¹ (Abb. 8). Nach DEX-Behandlung konnte eine signifikante, aber lediglich transiente Gewichtsreduktion der weiblichen Feten am Tag 100 der Schwangerschaft gezeigt werden. Am 125. Schwangerschaftstag findet sich kein Unterschied zwischen dem Fetalgewicht von DEX- und Kontrollgruppe mehr („Recovery“). Diese Entwicklung lässt darauf schließen, dass eine veränderte, an durch GC verschlechterte Bedingungen angepasste, Plazentastruktur die Wiederangleichung des Fetalgewichts ermöglicht.⁷⁸ Denkbare Mechanismen dafür wären plazentare Modifikationen in Hinsicht auf Plazentomanteile und Einzelplazentomgewichte.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Plazenten fand sich nach früher DEX-Behandlung in der Tat eine Zunahme des Einzelplazentomgewichts bei den C-Plazentomen. Die Veränderung ist sowohl am Tag 100 als auch Tag 140 bei den DEX-Behandelten im Vergleich zu den Kontrollen der weiblichen Gruppen nachzuweisen. Am Tag 140 ist der Unterschied zwischen Kontroll- und DEX-Gruppe jedoch um einiges geringer, was auf eine Adaption des Plazentomgewebes an die veränderten Bedingungen hinweist. Braun et al. stellten nach GC-Gabe in der späten Schwangerschaft keine therapiebedingten Gewichtsunterschiede der Einzelplazentome mehr fest.⁷⁹

4.2.2 Plazentomanzahl und -verteilung

Die 50–90 Plazentome einer Schafsplazenta^{61,62} werden nach groben morphologischen Gesichtspunkten in A-, B-, C- und D-Typen klassifiziert.⁸⁰ Die genauen funktionellen Unterschiede sind noch nicht vollständig geklärt, jedoch wird anhand von Gewichts-, Anteils- und Stereologieveränderungen ein Anpassungspotenzial an ungünstige intrauterine Bedingungen vermutet.

In den Kontrollgruppen der vorliegenden Arbeit konnte eine Plazentomverteilung mit einem großen Anteil an A-Plazentomen, gefolgt von B- und wenigen C- und D-Plazentomen^{79,81} bestätigt werden (Abb. 21). Die C- und D-Plazentome spielen unter normalen Umständen nur eine untergeordnete Rolle bei der Bereitstellung der Nährstoffe für die Feten.⁶¹ In der späten physiologischen Schwangerschaft (Tag 127 - 131) ist eine leichte Abnahme der invertierten (A- und B-) Plazentome und eine Zunahme der evertierten (C- und D-) Plazentome zu erkennen. Kurz vor der Geburt nimmt der Anteil der invertierten Plazentome erneut zu, der Anteil der evertierten ab.⁶¹ Diese Entwicklung im Schwangerschaftsverlauf konnte ebenfalls in der vorliegenden Studie bestätigt werden (Abb. 21), wobei nicht von einer direkten Umwandlung auszugehen ist.⁷⁹

Nach Exposition gegenüber Stressoren wie Hypoxie, Über- und Unterernährung oder chirurgischer Manipulation wurden Änderungen der Anzahl und Verschiebungen im prozentualen Anteil der Plazentome festgestellt.^{76,80,82,83,85,86,94} Hierbei handelte es sich meist um eine Umverteilung von A-Plazentomen zu mehr C-, D- und z.T. B-Plazentomen.^{80,82-84,86} Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Präsenz größerer Anteile an C- und D-Plazentomen eine Anpassungsreaktion des Plazentagewebes an widrige Umweltbedingungen darstellt. Auf diesem Weg können dem Fetus über die möglicherweise metabolisch aktiveren Subtypen adäquat Nährstoffe zugeführt werden.⁷⁸ Einen Hinweis darauf gibt auch eine nach GC-Behandlung mit BET erhöhte Prostaglandinsynthase(PGHS)-2 Expression in C-Plazentomen, die einer Aufrechterhaltung der Wachstumskapazität dienen könnte.⁷⁹

BET-Behandlungen in der späten Schwangerschaft führten zunächst (Tag 109–116) zur Zunahme der Anzahl der A-Plazentome. Bis Tag 146 sank die Anzahl jedoch signifikant ab.⁷⁹ Dementgegen wurde bei B- und C-Plazentomen nach BET eine vorerst (Tag 116 und 121) reduzierte Anzahl mit anschließender Angleichung an die Kontrollgruppenzahlen zum Ende der Schwangerschaft festgestellt. Dies führt zu der Annahme, dass eine kurzzeitige GC-Exposition zu einer Verschiebung in Richtung invertierter A-Plazentome führt, welche aber nicht bis zum Schwangerschaftsende anhält (Abb. 48).⁷⁹ Ein verminderter Anteil an C- und D-Plazentomen wurde weiterhin nach intrauteriner Beeinflussung des Feten, beispielsweise mit fetalen Kortisolinfusionen⁶¹ oder fetaler Hypoxie durch Nabelschnurokklusion⁷⁶ (Tab. 5) beobachtet. Durch den physiologischen

präpartalen Kortisolanstieg gegen Ende der Schwangerschaft kommt es ebenfalls zu diesen Veränderungen.⁶¹

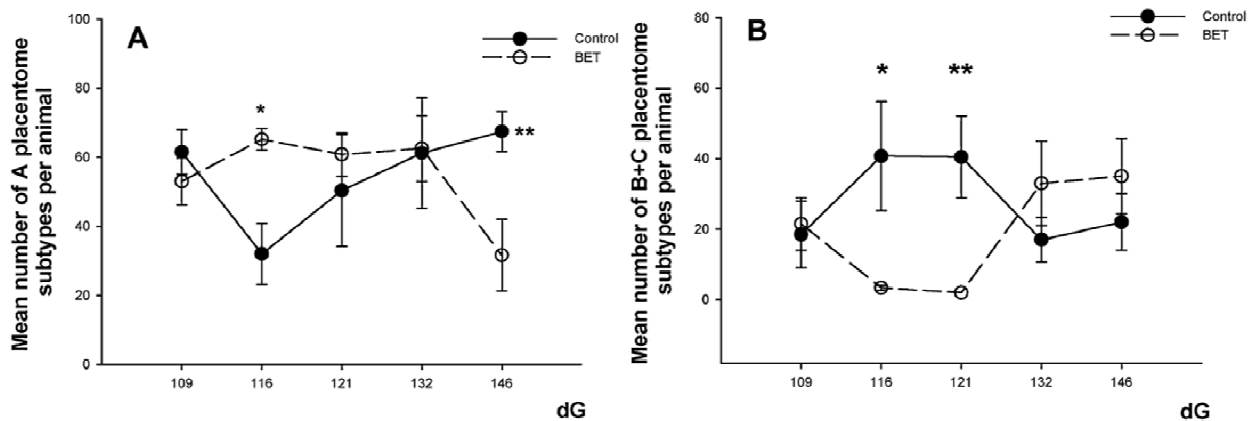


Abb. 48: Darstellung der A-Plazentomanzahl (links) und der B- und C-Plazentomanzahl (rechts) pro Tier der Kontroll- und BET-Gruppe, Stern (*) = signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und BET-Gruppe. Originalabbildung, Braun et al.⁷⁹

Alle zuvor genannten Studien beschreiben die Folgen des Einflusses eines Stressors in der späten Schwangerschaft auf die Plazentomverteilung. Nach früher maternaler DEX-Behandlung konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine Verschiebung von A- zu C- und D-Plazentomanteilen gezeigt werden (Abb. 21). Bei den männlichen Feten kam es zu einem signifikanten Anstieg des C-Plazentomanteils am Tag 125 im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 22). Diese Ergebnisse festigen die Annahme, dass es sich bei C- und D-Plazentomen um metabolisch aktivere Subtypen handelt, die zur Kompensation von widrigen Bedingungen vermehrt auftreten.^{80,82-84,86} Die Auswirkungsbetrachtung einer frühen Behandlung ist dabei hinsichtlich der sensiblen Phasen der placentaren Entwicklung und Differenzierung von besonderer Bedeutung.¹¹¹ Aufgrund dessen sind im Rahmen des übergeordneten Projektes weitere Folgen früher GC-Gabe im Schafsmodell untersucht worden. Es kam zu Gewichtsveränderungen der Organe, Beeinträchtigungen der fetalen HPA-Achse mit erhöhten Plasma-Kortisol-Werten,¹⁰¹ erhöhter PGHS-2-Expression⁷⁹ und zur Reduktion der BNC-Anzahl mit einer Induktion von placentaren Apoptose-Markern.¹²⁷

4.3 Stereologische Untersuchung

4.3.1 Oberflächenparameter

Der zuvor beschriebenen transienten Fetalgewichtsabnahme bei weiblichen Feten am Tag 100 nach früher maternaler DEX-Therapie mit Gewichtserholung am Tag 140 (vgl. 4.2.1) können verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Neben den genannten Veränderungen der Plazentomanteile und der Einzelplazentomgewichte sind strukturelle Modifikationen im Plazentom denkbar. So könnte durch Anpassung der funktionellen Oberfläche und des Volumens der Plazentome den durch widrige Umweltbedingungen veränderten nutritiven Ansprüchen entgegnet werden. Dies wurde mit Hilfe stereologischer Methoden (vgl. 2.3.3.1) untersucht. Differenziert wurde bei der Analyse zwischen maternalen und fetalen Gewebeanteilen, da eine unterschiedliche Entwicklung im Adaptionsprozess wahrscheinlich ist. Dies belegten Roberts et al. mit reduzierten fetalen Gewebeanteilen in Meerschweinchenplazenten nach maternaler Nahrungsrestriktion.¹¹⁹ Eine verschiedenartige Ausbildung der Plazentagewebe konnte beispielsweise auch bei geklonten Tieren im Vergleich zu Normschwangerschaften durch stereologische Untersuchungen aufgezeigt werden. Beim geklonten Schaf wurden dabei höhere maternale Gewebeanteile,¹²² beim Rind niedrigere maternale in Verbindung mit höheren fetalen Gewebeanteilen¹³¹ festgestellt.

4.3.1.1 Weibliche Feten

Die Oberflächendichte (S_V) als Maß für die Verflechtung maternaler und fetaler Zottenanteile nimmt in der weiblichen Kontrollgruppe im Schwangerschaftsverlauf zu, wird aber durch DEX-Behandlung gehemmt (Abb. 23). Eine solche Entwicklung bestätigten Roberts et al. mit dem Nachweis einer verminderten Ausbildung der Oberflächendichte in Plazenten nahrungsreduzierter Meerschweinchen.¹¹⁹ Geschlechtsunabhängig ist die Oberflächendichte des maternalen Gewebes (S_{VM}) der DEX-behandelten Gruppe am Tag 100 größer als in der Kontrollgruppe, was für eine bereits stattgehabte frühe Reaktion des maternalen Gewebeanteils auf den DEX-Einfluss spricht (Abb. 25). Am Tag 140 gibt es keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mehr. Eine solche Regeneration des Gewebes war bei Roberts et al., mutmaßlich aufgrund der langanhaltenden Restriktion (ca. 50 % der Schwangerschaft),¹¹⁹ nicht zu erkennen.

Eine ähnliche Entwicklung zeigte sich in der plazentomgewichtsspezifischen Oberflächendichte (S_A). In der weiblichen Kontrollgruppe war mit steigendem Gestationsalter eine signifikante S_A -Zunahme in allen Gewebeanteilen zu beobachten (Abb. 27). Diese Zunahme wurde in der behandelten Gruppe durch DEX inhibiert. Hier ist jedoch die S_A am Tag 100 höher als in der Kontrollgruppe, was erneut für eine früh erfolgte Anpassung des Nährstoff- und Gasaustauschs nach DEX-Behandlung spricht (Abb. 30). Eine signifikant niedrigere S_A zeigt sich bei der Gruppe der entsprechenden männlichen Feten, welche sich jedoch zum Schwangerschaftsende hin angleicht.

Die auf das Gesamtgewicht der entsprechenden Plazenta bezogene Oberflächendichte (S_T) dient ebenfalls als Marker für den potenziellen Nährstoff- und Gasaustausch zwischen maternalem und fetalem Kreislauf. Hier lässt sich im fetalen Gewebeanteil (S_{TF}) eine signifikante Zunahme zwischen Tag 100 und Tag 140 in den weiblichen Kontrollen nachweisen, in der DEX-Gruppe wird diese Entwicklung jedoch erneut gehemmt. Entsprechendes bestätigten Roberts et al. mit einer geschlechtsunabhängigen Analyse zur plazentagewichtsbezogenen Oberflächendichte. Es kam zu einer eingeschränkten Ausbildung nach Nahrungsrestriktion (um 36 % an Tag 30 und um 60 % an Tag 60 der Meerschweinchen-Schwangerschaft).¹¹⁹ Aherne et al. beschrieben ebenso eine signifikant kleinere plazentabezogene Zottenoberfläche bei Plazenten hypertensiver Schafsschwangerschaften.¹¹⁸

4.3.1.2 Männliche Feten

Bei den männlichen Feten wurden keine signifikanten fetalen Gewichtsveränderungen nach früher DEX-Gabe beobachtet (Abb. 8). Ursache dafür könnten Regulationsmechanismen sein, welche sich von denen weiblicher Feten unterscheiden. Bei weiblichen Feten vermutet man eine durch Modifikation der plazentaren Stoffwechselwege erfolgte Anpassung. Diese geht mit vermindertem Wachstum einher, allerdings wird in der Folge eine bessere Kompensation weiterer potenzieller Verschlechterungen der intrauterinen Bedingungen erreicht. Das Ausbleiben dieses Kompensationsmechanismus scheint längerfristig zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität bei männlichen Feten zu führen.¹⁰⁷ Eine Theorie zu den geschlechtsspezifischen Reaktionsmustern basiert auf der unterschiedlichen Interaktion mehrerer Glukokortikoidrezeptor-Isoformen. Diese können als Transkriptionsfaktoren bei hohen Kortisolwerten

hemmende oder aktivierende Wirkungen im Gewebe vermitteln.¹³² In jedem Fall spiegeln sich die divergenten GC-Auswirkungen auch in den folgenden stereologischen Erkenntnissen wider.

Die Oberflächendichte (S_V) nimmt im physiologischen Schwangerschaftsverlauf der männlichen Feten nur leicht zu. Sie kann jedoch durch eine DEX-Gabe stimuliert werden und steigt, vorrangig im fetalen Gewebeanteil (S_{VF}), stark von Tag 100 zu Tag 140 an. Im Gegensatz hierzu beschrieben Roberts et al. eine reduzierte Oberflächendichte nach Nahrungsrestriktion (um 36 % an Tag 30 und um 29 % an Tag 60 der Schwangerschaft).¹¹⁹

Die Ratio aus maternaler und fetaler Oberflächendichte ($S_{SVM/SVF}$) wurde berechnet, um das sich ändernde Verhältnis zwischen den beiden Gewebeanteilen darstellen zu können. Auf diese Weise kann die Zunahme des fetalen Gewebeanteils im Verhältnis zum maternalen Anteil (Abb. 39) durch eine Abnahme der Ratio in der männlichen DEX-Gruppe zwischen Tag 100 und Tag 140 (Abb. 37) belegt werden. Dies deutet in der männlichen Subgruppe auf eine besondere Reagibilität des fetalen Gewebeanteils durch DEX-Behandlung hin.

Die männliche DEX-Gruppe zeigt von Tag 100 zu 140 eine signifikante Zunahme der auf das zugehörige Plazentomgewicht bezogenen Oberflächendichte (S_A) in allen Gewebeanteilen. Da in der entsprechenden Kontrollgruppe kein S_A -Anstieg nachgewiesen wurde, kam es folglich durch DEX zur Stimulation des Gewebes (Abb. 27). Dies geschieht, nachdem am Tag 100, im Vergleich zur weiblichen DEX-Gruppe mit einer signifikant höheren S_A , noch keine Reaktion des Gewebes auf die frühe DEX-Gabe ausgelöst wurde (Abb. 31). Damit beginnt erst nach Tag 100, also verzögert, der Anpassungsprozess der verfügbaren Austauschfläche an die veränderten Bedingungen. Dies stimmt mit neuen Erkenntnissen in Meerschwein- und Mausstudien überein, die erst in der späten Schwangerschaft eine erhöhte Bioaktivität von Glukokortikoiden bzw. Kompensationsmechanismen in männlichen Feten beschreiben.^{133,134} Am Tag 140 gibt es keinen geschlechtsspezifischen Unterschied mehr.

Im maternalen Gewebe konnte sowohl in der Kontroll- als auch der DEX-Gruppe der männlichen Feten eine Zunahme der plazentagewichtsbezogenen Oberflächendichte (S_{TM}) im Schwangerschaftsverlauf gezeigt werden. Im fetalen Gewebe (S_{TF}) hingegen beschränkt sich die Zunahme zwischen Tag 100 und 140 auf die DEX-Gruppe, was für

eine Wachstumsstimulation dieses Gewebeanteils durch DEX spricht. Dieses Ergebnis steht erneut im Gegensatz zu den Beobachtungen von Roberts et al., die eine stark beeinträchtigte Zunahme der plazentagewichtsspezifischen Oberflächendichte nach Einfluss des Stressors beobachteten.¹¹⁹ Die Resultate von Roberts et al. decken sich folglich nur mit den Ergebnissen der hier untersuchten weiblichen Kohorte, was die Bedeutsamkeit der geschlechtsspezifischen Analyse unterstreicht.

4.3.1.3 Plazentomspezifische Auswertungen

Bei den plazentomspezifisch ausgewerteten Oberflächenparametern ist ein einheitlicher Trend über dem Schwangerschaftsverlauf zu beobachten. Die A- und B-Plazentome zeigen, sowohl in der Kontroll- als auch in der DEX-Gruppe, einen Anstieg (S_V , S_A , S_T). In der Parameter-Analyse der C-Plazentome kam es jedoch nicht zu einer signifikanten S_A -Änderung (Abb. 28, Abb. 29) von Tag 100 zu 140. Eine S_V - und S_T -Zunahme zeigte sich im Schwangerschaftsverlauf nur im DEX-behandelten Gewebe der C-Plazentome (Abb. 24, Abb. 34, Abb. 35).

Zusammenfassend finden sich in einer physiologischen Schwangerschaft keine Oberflächen-, Anteils- und Gewichtsveränderungen in den C-Plazentomen. Nach DEX-Behandlung kommt es jedoch zu einer generellen Anpassungsreaktion des Gewebes. Die Oberflächenparameter nehmen zu (S_V , S_T). Der Anteil der C-Plazentome an der Gesamtplazentomzahl steigt an (männliche Feten, Abb. 22) und das Plazentomgewicht nimmt zu (weibliche Feten, Tab. 8). In der Konsequenz bestätigen diese Werte erneut die These, dass es sich bei C-Plazentomen um den metabolisch aktiveren Subtyp handelt, der fähig ist widrige Umweltbedingungen besser kompensieren zu können.^{80,82-84,86}

4.3.2 **Gefäßentwicklung**

Eine Anpassung der plazentaren Vaskularisierung an veränderte nutritive Bedürfnisse ist über die Regulation der quantitativen und qualitativen Angiogenese durch Angiogenesefaktoren möglich. Laut Reynolds et al. kann in der normalen Schafschwangerschaft im maternalen Gewebeanteil eine langsam, kontinuierlich zunehmende Gefäßgröße mit leicht steigender Gefäßdichte beobachtet werden. Im fetalen

Gewebeanteil nimmt die Gefäßdichte enorm zu, die Gefäßgröße hingegen nimmt ab. Dies führt hier zu einem wesentlich größeren fetalen Kapillarbett als es im maternalen Gewebeanteil zu beobachten ist.⁶⁹ Nach dreifacher DEX-Injektion wurde eine vaskuläre Sensitivitätssteigerung für Endothelin-1 sowie eine erhöhte Endothelin-A-Rezeptor-Expression in fetalen Plazentargefäßen nachgewiesen.¹⁰⁶ Dies spricht für eine höhere Adaptionfähigkeit der fetalen gegenüber der maternalen Plazentagefäße (die keine DEX-Antwort zeigten) an unstete Umweltbedingungen.

In der vorliegenden Studie wurde die Gefäßanzahl über eine definierte Fläche (N_V) als ein potenzieller Parameter veränderten Nährstoff- und Gasaustauschs untersucht. Diese nimmt in der Kontrollgruppe mit Zunahme der Austauschfläche ab. In der DEX-behandelten Kohorte ist dieser Zusammenhang nicht darstellbar. Im maternalen Gewebeanteil zeigt sich die Abnahme der Gefäßdichte (N_{VM}) nur in der weiblichen Kontrollgruppe (Abb. 42). Es findet sich weiterhin eine signifikant höhere Gefäßdichte in der weiblichen im Vergleich zur männlichen Kontrollgruppe am Tag 100 im maternalen Gewebeanteil (Abb. 42).

Diese Resultate lassen darauf schließen, dass die plazentare Gefäßausbildung bei weiblichen Feten bis in die Schwangerschaftsmittle vorrangig durch verzweigendes Wachstum geprägt ist. Das führt zu einer höheren Gefäßdichte, konträr zu den Ergebnissen von Reynolds et al. jedoch,⁶⁹ vorrangig im maternalen Gewebeanteil (N_{VM}). Hingegen kommt es bei den männlichen Feten in der Kontrollgruppe bestenfalls zu einer Größenzunahme der vorhandenen Gefäße,⁶⁹ welche allerdings durch die hier verwendete Analysetechnik nicht ausgewertet werden konnte. Zum Schwangerschaftsende nimmt jedoch auch die Gefäßdichte bei den weiblichen Feten ab. Nach DEX-Behandlung wird diese naturgemäß verzweigende Gefäßausbildung bei den weiblichen Feten in der ersten Schwangerschaftshälfte gehemmt. Zum Ende der Schwangerschaft kann man hingegen von einer Aufrechterhaltung der Gefäßdichte bzw. qualitativem Gefäßwachstum durch DEX sprechen. Belegen lässt sich dies durch den Trend der abnehmenden Gefäßdichte im maternalen Gewebe (N_{VM}) der weiblichen Kontrollgruppe zwischen Tag 100 und Tag 140, welcher in der weiblichen DEX-Gruppe nicht nachweisbar ist.

Insgesamt wird eine Gegensätzlichkeit in der Gewebeentwicklung der weiblichen Kontrollgruppe deutlich. Während die Oberflächenparameter im Verlauf der Schwangerschaft zunehmen, reduziert sich die Gefäßdichte.

In den Kontrollgruppen mit A- und B-Plazentomen kommt es innerhalb des maternalen Gewebes zwischen Tag 100 und Tag 140 zu einer Abnahme der Gefäßdichte (N_{VM}). In den zugehörigen DEX-Gruppen und den C-Plazentomen zeigen sich keine signifikanten Änderungen der Gefäßdichte (Abb. 43), was erneut für eine Erhaltung der zur Anpassung an die veränderten Bedingungen notwendigen Gefäßkapazität spricht.

Die VEGF mRNA-Konzentration als Marker der Vaskulo- und Angiogenese steigt in der weiblichen Kontrollgruppe zwischen Tag 100 und Tag 140 signifikant an. Ein Trend zu einer höheren Konzentration ist auch in der weiblichen Kontrollgruppe gegenüber der DEX-Gruppe am Tag 140 zu erkennen. VEGF korreliert in der weiblichen Kontrollgruppe am Tag 100 zudem stark negativ mit der Gefäßdichte im maternalen Gewebe (N_{VM}); gleicher Trend ist auch in der entsprechenden Gruppe am Tag 140 zu erkennen. Nimmt die Gefäßdichte im Gewebe ab, erhöht sich folglich die VEGF mRNA-Konzentration, da die Angiogeneseaktivität wieder gesteigert werden muss. Dieser physiologische Zusammenhang wird durch DEX aufgehoben.

4.3.3 Korrelationen mit dem Fetalgewicht

Das Fetalgewicht korreliert mit fast allen Oberflächenparametern in der weiblichen Kontrollgruppe zwischen Tag 100 und Tag 140 positiv (Tab. 13). Ebenso korrelieren die Parameter der männlichen Kontroll- und DEX-Gruppe im Verlauf der Schwangerschaft mit dem Fetalgewicht. Allein in der betroffenen Gruppe der weiblichen behandelten Feten gibt es keine Korrelation mit dem Fetalgewicht. Diese Beobachtung zeigt, dass der natürliche Prozess des homogenen Wachstums in allen fetalen und umgebenden Geweben durch DEX-Behandlung bei den weiblichen Feten verhindert wird.

4.4 Studienlimitation

Aus ethischen und praktischen Gründen können viele Untersuchungen nicht in der humanen Schwangerschaft durchgeführt werden. Tiermodelle haben gegenüber klinischen oder epidemiologischen humanen Studien viele Vorteile. In der Geburtsmedizin erlauben sie in vivo und in vitro die Exposition und sich daraufhin entwickelnde Reaktionen in unterschiedlichen kritischen Zeitfenstern zu beobachten.⁷¹ Dies ist in Hinblick auf den Humanvergleich besonders im Schafsmodell der Fall. Trotz allem können die Prozesse im menschlichen Körper nicht kongruent im Schafsmodell abgebildet werden.

Die Auswertung bezüglich der Gefäßdichte in den immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten hat sich in der gewählten Vergrößerung und der Anzahl der Bilder als ausreichend dargestellt. Eine höhere Vergrößerung oder eine maschinelle Detektion des Chromogens für die Gefäßzählungen sowie eine Registrierung der Gefäßdurchmesser wäre, im Hinblick auf die verschiedenen Wachstumsmodelle für die Gewebeabschnitte, hilfreich. Weitere Untersuchungen sind hierzu geplant.

Eine geschlechtsspezifische Analyse der Veränderungen von Oberflächenparametern und Gefäßdichte in Abhängigkeit von Behandlung und Gestationsalter wäre auch zwischen den Plazentomsgruppen aufschlussreich. In der vorliegenden Studie war jedoch die Zahl, insbesondere der D- und C-Plazentome, trotz enorm hoher Tierfallzahl begrenzt und daher für aussagekräftige Ergebnisse teilweise nicht hoch genug. Dies gilt ebenfalls für einen Level-spezifischen Vergleich der Oberflächenparameter, welcher weiterhin Aufschluss über die genaue Lokalisation struktureller Veränderungen geben kann.

Die Auswahl von Tag 100 und Tag 140 der Schwangerschaft für die Analyse von Oberflächenparametern und Gefäßdichte bildet die bedeutendsten Entwicklungsabschnitte der physiologischen und beeinträchtigten Gewebe ab. Um weitere Details über den Verlauf der Genese zu gewinnen, ist eine Auswertung von Tag 50 und Tag 125 geplant.

Die Auswertung der morphologischen und stereologischen Veränderungen nach früher maternaler DEX-Therapie bietet natürlich nur indirekte Anhaltspunkte für die funktionellen Zusammenhänge der plazentaren Anpassungsstrategien. Folglich wären direkte funktionale Untersuchungen von Plazenta und Plazentomen im Hinblick auf den

Nährstoff- und Sauerstofftransport interessant. Denkbar könnte dies mittels eines Plazentaperfusionsmodells sein, entsprechendes wurde für die Schafsplazenta allerdings noch nicht entwickelt.

4.5 Zusammenfassung

Eine Exposition mit antenatalen Glukokortikoiden kann in sensiblen Entwicklungsphasen wie der Frühschwangerschaft neben den positiven Effekten zu intrauterinen, postpartalen und lebenslangen Beeinträchtigungen („Fetale Programmierung“) des Kindes führen. Ein niedriges Fetalgewicht ist dabei ein Indikator für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko im Lauf des Lebens. Die Plazenta, als Verbindung zwischen maternalem und fetalem Kreislauf, nimmt dabei eine entscheidende Rolle in der Adaptionfähigkeit des Organismus an widrige Bedingungen ein. Hierbei sind deutliche geschlechtsspezifische Anpassungsmechanismen erkennbar. Eine im Schafmodell gezeigte transiente Gewichtsreduktion nach früher Dexamethason-Gabe trat ausschließlich bei weiblichen Feten auf. Geschlechtsabhängige Differenzen wie diese können in der vorliegenden Arbeit eindrücklich mit den untersuchten morphologischen und stereologischen Parametern der Plazentaentwicklung in Zusammenhang gebracht und präzisiert werden.

Das Plazentagewebe der weiblichen Feten entgegnet dem Stressor (DEX), indem Voraussetzungen für mehr Nährstoff- und Gasaustausch geschaffen werden. Dies entspricht einer Zunahme des für die adäquate Nährstoffzufuhr relevanten C-Plazentomgewichts und einer Erhöhung der Oberflächendichte (S_V). Außerdem wird die verfügbare Austauschfläche (S_A , S_T) an ein größeres zu versorgendes Gewebevolumen (C-Plazentome) adaptiert. Diese Mechanismen sind um den hundertsten Schwangerschaftstag bereits aktiviert, um die bis dahin entstandenen Beeinträchtigungen durch frühe DEX-Gabe (Tag 40 - 41) ausgleichen zu können.

Bei den männlichen Feten beginnt diese Adaption zu einem späteren Zeitpunkt der Schwangerschaft. Am Tag 125 ist der Anteil der C-Plazentome nach früher DEX-Behandlung signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die reaktive Vergrößerung der Oberflächendichte (S_V , S_A und S_T) findet erst zwischen Tag 100 und Tag 140 statt. Diese kann auf eine zunehmende Aktivität im fetalen Gewebeanteil zurückgeführt

werden. Ein Gewichtsverlust nach DEX bleibt bei männlichen Feten, möglicherweise aufgrund dieses verzögerten Reaktionsmechanismus, aus.

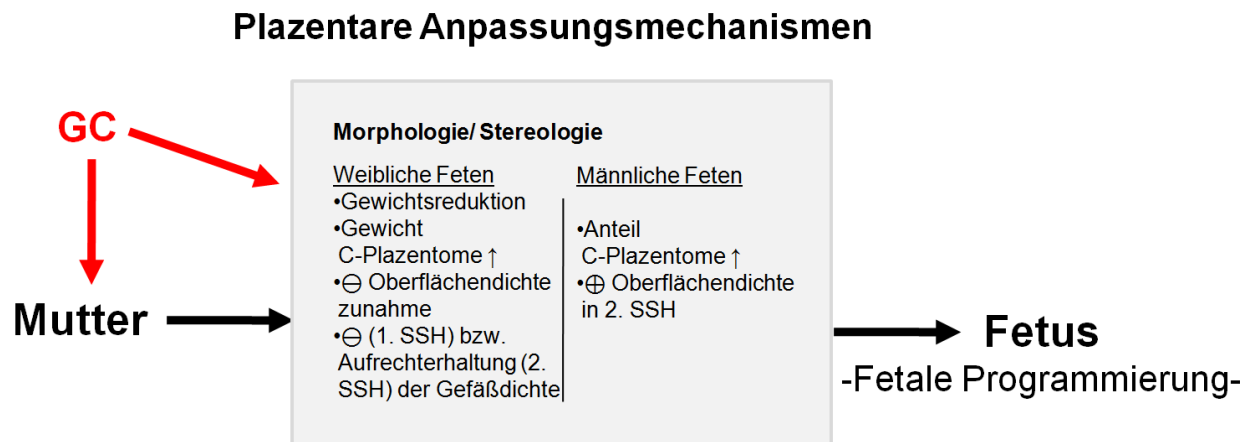


Abb. 49: Zusammenfassung plazentarer Anpassungsmechanismen bzgl. Morphologie und Stereologie nach Glukokortikoiden (GC) in der frühen Schafsschwangerschaft mit geschlechtsspez. Differenzierung. ⊕ = Stimulation, ⊖ = Hemmung, SSH = Schwangerschaftshälfte. Mod. nach Braun et al.¹³⁵

Schlussendlich sind weitere Untersuchungen zur Wirkweise von DEX in der Frühschwangerschaft hinsichtlich Veränderungen in der Entwicklung und Funktionsweise der Plazenta erforderlich. Im Besonderen die Abhängigkeit vom fetalen Geschlecht (Abb. 49), aber auch die Bedeutung der unterschiedlichen Adaptionenmechanismen maternaler und fetaler Gewebeanteile, sind hier interessant. Zur Rolle der Plazentome im Zusammenhang mit Oberflächenparametern, Gewichts- und Anteilsverschiebungen sowie dem Geschlecht sollten ebenfalls detaillierte Betrachtungen folgen. Schließlich muss das Maß der Translationsfähigkeit der Ergebnisse für das humane Plazentagewebe untersucht werden, da der Einfluss von Glukokortikoiden in der Frühschwangerschaft auf die Plazenta und damit auf die fetale Programmierung beim Menschen von größter Bedeutung ist.

5 Literaturverzeichnis

1. Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 1988;9:295-318.
2. Kempna P, Fluck CE. Adrenal gland development and defects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:77-93.
3. Ranabir S, Reetu K. Stress and hormones. *Indian J Endocrinol Metab* 2011;15:18-22.
4. Chrousos GP, Kino T. Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci STKE* 2005;2005:pe48.
5. Mazurek B, Stover T, Haupt H, Klapp BF, Adli M, Gross J, Szczepek AJ. [The significance of stress: its role in the auditory system and the pathogenesis of tinnitus]. *HNO* 2010;58:162-72.
6. Cruz-Topete D, Cidlowski JA. One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* 2015;22:20-32.
7. Schacke H, Docke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 2002;96:23-43.
8. Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3:479-88.
9. McKinlay CJ, Dalziel SR, Harding JE. Antenatal glucocorticoids: where are we after forty years? *J Dev Orig Health Dis* 2015;6:127-42.
10. Fowden AL, Li J, Forhead AJ. Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? *Proc Nutr Soc* 1998;57:113-22.
11. Braun T, Challis JR, Newnham JP, Sloboda DM. Early-life glucocorticoid exposure: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, placental function, and long-term disease risk. *Endocr Rev* 2013;34:885-916.
12. Harris A, Seckl J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm Behav* 2011;59:279-89.
13. Liggins GC. Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol* 1969;45:515-23.
14. Roberts D, Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* 2006:CD004454.
15. Roberts D, Brown J, Medley N, Dalziel SR. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;3:CD004454.
16. van der Goes MC, Jacobs JW, Bijlsma JW. The value of glucocorticoid co-therapy in different rheumatic diseases--positive and adverse effects. *Arthritis Res Ther* 2014;16 Suppl 2:S2.
17. Murphy VE, Fittock RJ, Zarzycki PK, Delahunty MM, Smith R, Clifton VL. Metabolism of synthetic steroids by the human placenta. *Placenta* 2007;28:39-46.
18. Lajic S, Nordenstrom A, Hirvikoski T. Long-term outcome of prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Endocr Dev* 2008;13:82-98.
19. Braun T, Sloboda DM, Tutschek B, Harder T, Challis JR, Dudenhausen JW, Plagemann A, Henrich W. Fetal and neonatal outcomes after term and preterm delivery following betamethasone administration. *Int J Gynaecol Obstet* 2015;130:64-9.

20. French NP, Hagan R, Evans SF, Mullan A, Newnham JP. Repeated antenatal corticosteroids: effects on cerebral palsy and childhood behavior. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:588-95.
21. Braun T, Husar A, Challis JR, Dudenhausen JW, Henrich W, Plagemann A, Sloboda DM. Growth restricting effects of a single course of antenatal betamethasone treatment and the role of human placental lactogen. *Placenta* 2013;34:407-15.
22. Dalziel SR, Walker NK, Parag V, Mantell C, Rea HH, Rodgers A, Harding JE. Cardiovascular risk factors after antenatal exposure to betamethasone: 30-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet* 2005;365:1856-62.
23. Murphy KE, Willan AR, Hannah ME, Ohlsson A, Kelly EN, Matthews SG, Saigal S, Asztalos E, Ross S, Delisle MF, Amankwah K, Guselle P, Gafni A, Lee SK, Armson BA, Multiple Courses of Antenatal Corticosteroids for Preterm Birth Study Collaborative G. Effect of antenatal corticosteroids on fetal growth and gestational age at birth. *Obstet Gynecol* 2012;119:917-23.
24. Newnham JP, Moss TJ. Antenatal glucocorticoids and growth: single versus multiple doses in animal and human studies. *Semin Neonatol* 2001;6:285-92.
25. Seckl JR. Glucocorticoids and small babies. *Q J Med* 1994;87:259-62.
26. Braun F, Hardt AK, Ehrlich L, Sloboda DM, Challis JRG, Plagemann A, Henrich W, Braun T. Sex-specific and lasting effects of a single course of antenatal betamethasone treatment on human placental 11 β -HSD2. *Placenta* 2018;69:9-19.
27. Challis JR, Sloboda D, Matthews SG, Holloway A, Alfaidy N, Patel FA, Whittle W, Fraser M, Moss TJ, Newnham J. The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health. *Mol Cell Endocrinol* 2001;185:135-44.
28. Tegethoff M, Pryce C, Meinlschmidt G. Effects of intrauterine exposure to synthetic glucocorticoids on fetal, newborn, and infant hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in humans: a systematic review. *Endocr Rev* 2009;30:753-89.
29. Challis J, Sloboda D, Matthews S, Holloway A, Alfaidy N, Howe D, Fraser M, Newnham J. Fetal hypothalamic-pituitary adrenal (HPA) development and activation as a determinant of the timing of birth, and of postnatal disease. *Endocr Res* 2000;26:489-504.
30. Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol* 2004;151 Suppl 3:U49-62.
31. Schneider U, Arnscheidt C, Schwab M, Haueisen J, Seewald HJ, Schleussner E. Steroids that induce lung maturation acutely affect higher cortical function: a fetal magnetoencephalography study. *Reprod Sci* 2011;18:99-106.
32. Kelly BA, Lewandowski AJ, Worton SA, Davis EF, Lazdam M, Francis J, Neubauer S, Lucas A, Singhal A, Leeson P. Antenatal glucocorticoid exposure and long-term alterations in aortic function and glucose metabolism. *Pediatrics* 2012;129:e1282-90.
33. Mildenhall LF, Battin MR, Morton SM, Bevan C, Kuschel CA, Harding JE. Exposure to repeat doses of antenatal glucocorticoids is associated with altered cardiovascular status after birth. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006;91:F56-60.
34. Doyle LW, Ford GW, Davis NM, Callanan C. Antenatal corticosteroid therapy and blood pressure at 14 years of age in preterm children. *Clin Sci (Lond)* 2000;98:137-42.

35. Elfayomy AK, Almasry SM. Effects of a single course versus repeated courses of antenatal corticosteroids on fetal growth, placental morphometry and the differential regulation of vascular endothelial growth factor. *J Obstet Gynaecol Res* 2014;40:2135-45.
36. Schneider U, Fiedler A, Schroder B, Jaekel S, Stacke A, Hoyer D, Schleussner E. The effect of antenatal steroid treatment on fetal autonomic heart rate regulation revealed by fetal magnetocardiography (fMCG). *Early Hum Dev* 2010;86:319-25.
37. Weiss SJ, Niemann S. Effects of Antenatal Corticosteroids on Cortisol and Heart Rate Reactivity of Preterm Infants. *Biol Res Nurs* 2015;17:487-94.
38. Finken MJ, Keijzer-Veen MG, Dekker FW, Frolich M, Walther FJ, Romijn JA, van der Heijden BJ, Wit JM, Dutch P-CSG. Antenatal glucocorticoid treatment is not associated with long-term metabolic risks in individuals born before 32 weeks of gestation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008;93:F442-7.
39. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 1991;156:38-50; discussion -5.
40. Plagemann A. Perinatale Programmierung, neuro-endokrine Epigenomik und präventive Medizin – Das Konzept der Vegetativen Prägung. In: Güntürkün O, Hacker J, eds. *Geist-Gehirn-Genom-Gesellschaft: Wie wurde ich zu der Person, die ich bin?: Nova Acta Leopoldina*; 2014.
41. Dorner G. Problems and terminology of functional teratology. *Acta Biol Med Ger* 1975;34:1093-5.
42. Barker DJ. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:364-8.
43. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001;60:5-20.
44. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992;35:595-601.
45. Plagemann A, Harder T, Schellong K, Schulz S, Stupin JH. Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26:641-53.
46. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* 2008;359:61-73.
47. Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond)* 2007;113:1-13.
48. Fowden AL, Forhead AJ, Coan PM, Burton GJ. The placenta and intrauterine programming. *J Neuroendocrinol* 2008;20:439-50.
49. Vuguin PM. Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease. *Horm Res* 2007;68:113-23.
50. Lang U, Zygmunt M, Künzel W, Clark EK. Fetal growth restriction in animal models. *Der Gynäkologe*;34:820-32.
51. Barbera A, Jones OW, 3rd, Zerbe GO, Hobbins JC, Battaglia FC, Meschia G. Ultrasonographic assessment of fetal growth: comparison between human and ovine fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1765-9.
52. Jobe AH. Animal models of antenatal corticosteroids: clinical implications. *Clin Obstet Gynecol* 2003;46:174-89.
53. Aubry E, Fayoux P, Jani J, Deprest J, Deruelle P, Houfflin-Debarge V, Storme L. Tracheal occlusion alters pulmonary circulation in the fetal lamb with normally developing lungs. *J Pediatr Surg* 2013;48:481-7.

54. Tchirikov M, Gatopoulos G, Strohner M, Puhl A, Steetskamp J. Two new approaches in intrauterine tracheal occlusion using an ultrathin fetoscope. *Laryngoscope* 2010;120:394-8.
55. Branisteanu-Dumitrascu I, Deprest JA, Evrard VA, Van Ballaer PP, Van Schoubroeck D, Gratacos E, Pijnenborg R. Time-related cotyledonary effects of laser coagulation of superficial chorionic vessels in an ovine model. *Prenat Diagn* 1999;19:205-10.
56. Gunn AJ, Gunn TR, de Haan HH, Williams CE, Gluckman PD. Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs. *J Clin Invest* 1997;99:248-56.
57. Roelfsema V, Bennet L, George S, Wu D, Guan J, Veerman M, Gunn AJ. Window of opportunity of cerebral hypothermia for postischemic white matter injury in the near-term fetal sheep. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:877-86.
58. Rakers F, Bischoff S, Schiffner R, Haase M, Rupprecht S, Kiehntopf M, Kuhn-Velten WN, Schubert H, Witte OW, Nijland MJ, Nathanielsz PW, Schwab M. Role of catecholamines in maternal-fetal stress transfer in sheep. *Am J Obstet Gynecol* 2015;213:684 e1-9.
59. Schwab M, Roedel M, Anwar MA, Muller T, Schubert H, Buchwalder LF, Walter B, Nathanielsz W. Effects of betamethasone administration to the fetal sheep in late gestation on fetal cerebral blood flow. *J Physiol* 2000;528:619-32.
60. Anthony RV, Scheaffer AN, Wright CD, Regnault TR. Ruminant models of prenatal growth restriction. *Reprod Suppl* 2003;61:183-94.
61. Ward JW, Forhead AJ, Wooding FB, Fowden AL. Functional significance and cortisol dependence of the gross morphology of ovine placentomes during late gestation. *Biol Reprod* 2006;74:137-45.
62. Lippert H. Beckeneingeweide und Entwicklungsgeschichte. *Anatomie kompakt: Springer Berlin Heidelberg*; 1994:234.
63. Steven DH. Comparative placentation. *Essays in structure and function: Academic Press.*; 1975.
64. Montiel JF, Kaune H, Maliqueo M. Maternal-fetal unit interactions and eutherian neocortical development and evolution. *Front Neuroanat* 2013;7:22.
65. Leiser R, Krebs C, Ebert B, Dantzer V. Placental vascular corrosion cast studies: a comparison between ruminants and humans. *Microsc Res Tech* 1997;38:76-87.
66. Sibley CP, Birdsey TJ, Brownbill P, Clarson LH, Doughty I, Glazier JD, Greenwood SL, Hughes J, Jansson T, Mylona P, Nelson DM, Powell T. Mechanisms of maternofetal exchange across the human placenta. *Biochem Soc Trans* 1998;26:86-91.
67. Challis JR. Endocrinology of late pregnancy and parturition. *Int Rev Physiol* 1980;22:277-324.
68. Braun T, Li S, Moss TJ, Newnham JP, Challis JR, Gluckman PD, Sloboda DM. Maternal betamethasone administration reduces binucleate cell number and placental lactogen in sheep. *J Endocrinol* 2007;194:337-47.
69. Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Wallace JM, Caton JS, Redmer DA. Animal models of placental angiogenesis. *Placenta* 2005;26:689-708.
70. Burton GJ, Jauniaux E. The maternal circulation and placental shape. In: Burton PJ, Barker DJP, Moffett A, Thornburg K, eds. *The placenta and human developmental programming. Cambridge University Press* 2010:161-74.

71. Nathanielsz PW. Animal models that elucidate basic principles of the developmental origins of adult diseases. *ILAR J* 2006;47:73-82.
72. Langley-Evans SC. Metabolic programming in pregnancy: studies in animal models. *Genes Nutr* 2007;2:33-8.
73. Robbins JR, Bakardjiev AI. Pathogens and the placental fortress. *Curr Opin Microbiol* 2012;15:36-43.
74. Zhang S, Regnault TR, Barker PL, Botting KJ, McMillen IC, McMillan CM, Roberts CT, Morrison JL. Placental adaptations in growth restriction. *Nutrients* 2015;7:360-89.
75. Gadev CK. Untersuchungen über die Plazentarverbindung beim Schaf und beim Schwein im Hinblick auf die Klassifikation der Plazenta bei den Haussäugetern. *Cells Tissues Organs* 1974;89:109-20.
76. Gardner DS, Ward JW, Giussani DA, Fowden AL. The effect of a reversible period of adverse intrauterine conditions during late gestation on fetal and placental weight and placentome distribution in sheep. *Placenta* 2002;23:459-66.
77. Ehrhardt RA, Bell AW. Growth and metabolism of the ovine placenta during mid-gestation. *Placenta* 1995;16:727-41.
78. Alexander G. Studies on the Placenta of the Sheep (*Ovis Aries L.*). Placental Size. *J Reprod Fertil* 1964;7:289-305.
79. Braun T, Li S, Moss TJ, Connor KL, Doherty DA, Nitsos I, Newnham JP, Challis JR, Sloboda DM. Differential appearance of placentomes and expression of prostaglandin H synthase type 2 in placentome subtypes after betamethasone treatment of sheep late in gestation. *Placenta* 2011;32:295-303.
80. Vatnick I, Schoknecht PA, Darrigrand R, Bell AW. Growth and metabolism of the placenta after unilateral fetectomy in twin pregnant ewes. *J Dev Physiol* 1991;15:351-6.
81. Vonnahme KA, Arndt WJ, Johnson ML, Borowicz PP, Reynolds LP. Effect of morphology on placentome size, vascularity, and vasoreactivity in late pregnant sheep. *Biol Reprod* 2008;79:976-82.
82. Steyn C, Hawkins P, Saito T, Noakes DE, Kingdom JC, Hanson MA. Undernutrition during the first half of gestation increases the predominance of fetal tissue in late-gestation ovine placentomes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;98:165-70.
83. Osgerby JC, Wathes DC, Howard D, Gadd TS. The effect of maternal undernutrition on the placental growth trajectory and the uterine insulin-like growth factor axis in the pregnant ewe. *J Endocrinol* 2004;182:89-103.
84. Wintour EM, Alcorn D, McFarlane A, Moritz K, Potocnik SJ, Tangalakis K. Effect of maternal glucocorticoid treatment on fetal fluids in sheep at 0.4 gestation. *Am J Physiol* 1994;266:R1174-81.
85. Alexander G. Studies on the Placenta of the Sheep (*Ovis Aries L.*). Effect of Surgical Reduction in the Number of Caruncles. *J Reprod Fertil* 1964;7:307-22.
86. Penninga L, Longo LD. Ovine placentome morphology: effect of high altitude, long-term hypoxia. *Placenta* 1998;19:187-93.
87. Heasman L, Clarke L, Stephenson TJ, Symonds ME. The influence of maternal nutrient restriction in early to mid-pregnancy on placental and fetal development in sheep. *Proc Nutr Soc* 1999;58:283-8.
88. Magyar DM, Fridshal D, Elsner CW, Glatz T, Eliot J, Klein AH, Lowe KC, Buster JE, Nathanielsz PW. Time-trend analysis of plasma cortisol concentrations in the fetal sheep in relation to parturition. *Endocrinology* 1980;107:155-9.

89. Burton GJ, Samuel CA, Steven DH. Ultrastructural studies of the placenta of the ewe: phagocytosis of erythrocytes by the chorionic epithelium at the central depression of the cotyledon. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1976;61:275-86.
90. Regnault TR, Orbus RJ, de Vrijer B, Davidsen ML, Galan HL, Wilkening RB, Anthony RV. Placental expression of VEGF, PlGF and their receptors in a model of placental insufficiency-intrauterine growth restriction (PI-IUGR). *Placenta* 2002;23:132-44.
91. Thureen PJ, Trembler KA, Meschia G, Makowski EL, Wilkening RB. Placental glucose transport in heat-induced fetal growth retardation. *Am J Physiol* 1992;263:R578-85.
92. Galan HL, Hussey MJ, Barbera A, Ferrazzi E, Chung M, Hobbins JC, Battaglia FC. Relationship of fetal growth to duration of heat stress in an ovine model of placental insufficiency. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:1278-82.
93. Krebs C, Longo LD, Leiser R. Term ovine placental vasculature: comparison of sea level and high altitude conditions by corrosion cast and histomorphometry. *Placenta* 1997;18:43-51.
94. Wallace JM, Bourke DA, Aitken RP, Leitch N, Hay WW, Jr. Blood flows and nutrient uptakes in growth-restricted pregnancies induced by overnourishing adolescent sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282:R1027-36.
95. Redmer DA, Aitken RP, Milne JS, Reynolds LP, Wallace JM. Influence of maternal nutrition on messenger RNA expression of placental angiogenic factors and their receptors at midgestation in adolescent sheep. *Biol Reprod* 2005;72:1004-9.
96. Clifton VL, Rennie N, Murphy VE. Effect of inhaled glucocorticoid treatment on placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity and neonatal birthweight in pregnancies complicated by asthma. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006;46:136-40.
97. Cottrell EC, Seckl JR, Holmes MC, Wyrwoll CS. Foetal and placental 11beta-HSD2: a hub for developmental programming. *Acta Physiol (Oxf)* 2014;210:288-95.
98. Audette MC, Challis JR, Jones RL, Sibley CP, Matthews SG. Synthetic glucocorticoid reduces human placental system a transport in women treated with antenatal therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E2226-33.
99. Ward JW, Wooding FB, Fowden AL. The effects of cortisol on the binucleate cell population in the ovine placenta during late gestation. *Placenta* 2002;23:451-8.
100. Shang H, Meng W, Sloboda DM, Li S, Ehrlich L, Plagemann A, Dudenhausen JW, Henrich W, Newnham JP, Challis JR, Braun T. Effects of maternal dexamethasone treatment early in pregnancy on glucocorticoid receptors in the ovine placenta. *Reprod Sci* 2015;22:534-44.
101. Braun T, Li S, Sloboda DM, Li W, Audette MC, Moss TJ, Matthews SG, Polglase G, Nitsos I, Newnham JP, Challis JR. Effects of maternal dexamethasone treatment in early pregnancy on pituitary-adrenal axis in fetal sheep. *Endocrinology* 2009;150:5466-77.
102. Clarke KA, Ward JW, Forhead AJ, Giussani DA, Fowden AL. Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in ovine placenta by fetal cortisol. *J Endocrinol* 2002;172:527-34.
103. Kerzner LS, Stonestreet BS, Wu KY, Sadowska G, Malee MP. Antenatal dexamethasone: effect on ovine placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression and fetal growth. *Pediatr Res* 2002;52:706-12.

104. Gatford KL, Owens JA, Li S, Moss TJ, Newnham JP, Challis JR, Sloboda DM. Repeated betamethasone treatment of pregnant sheep programs persistent reductions in circulating IGF-I and IGF-binding proteins in progeny. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E170-8.
105. Jensen EC, Gallaher BW, Breier BH, Harding JE. The effect of a chronic maternal cortisol infusion on the late-gestation fetal sheep. *J Endocrinol* 2002;174:27-36.
106. Kutzler MA, Molnar J, Schlafer DH, Kuc RE, Davenport AP, Nathanielsz PW. Maternal dexamethasone increases endothelin-1 sensitivity and endothelin a receptor expression in ovine foetal placental arteries. *Placenta* 2003;24:392-402.
107. Clifton VL. Sexually dimorphic effects of maternal asthma during pregnancy on placental glucocorticoid metabolism and fetal growth. *Cell Tissue Res* 2005;322:63-71.
108. Stevenson DK, Verter J, Fanaroff AA, Oh W, Ehrenkranz RA, Shankaran S, Donovan EF, Wright LL, Lemons JA, Tyson JE, Korones SB, Bauer CR, Stoll BJ, Papile LA. Sex differences in outcomes of very low birthweight infants: the newborn male disadvantage. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;83:F182-5.
109. Torday JS, Nielsen HC, Fencel Mde M, Avery ME. Sex differences in fetal lung maturation. *Am Rev Respir Dis* 1981;123:205-8.
110. Stark MJ, Wright IM, Clifton VL. Sex-specific alterations in placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 activity and early postnatal clinical course following antenatal betamethasone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;297:R510-4.
111. Reynolds LP, Redmer DA. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* 2001;64:1033-40.
112. Howard V, Reed M. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*: Taylor & Francis; 2004.
113. Mayhew TM. Stereology and the placenta: where's the point? -- a review. *Placenta* 2006;27 Suppl A:S17-25.
114. Duffell SJ, Soames AR, Gunby S. Morphometric analysis of the developing rat brain. *Toxicol Pathol* 2000;28:157-63.
115. Reid IM. Morphometric methods in veterinary pathology: a review. *Vet Pathol* 1980;17:522-43.
116. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003;75:469-86.
117. Kannekens EM, Murray RD, Howard CV, Currie J. A stereological method for estimating the feto-maternal exchange surface area in the bovine placentome at 135 days gestation. *Res Vet Sci* 2006;81:127-33.
118. Aherne W, Dunnill MS. Quantitative aspects of placental structure. *J Pathol Bacteriol* 1966;91:123-39.
119. Roberts CT, Sohlstrom A, Kind KL, Earl RA, Khong TY, Robinson JS, Owens PC, Owens JA. Maternal food restriction reduces the exchange surface area and increases the barrier thickness of the placenta in the guinea-pig. *Placenta* 2001;22:177-85.
120. Ribeiro AA, de Oliveira Lacerda PM, Pereira de Melo M, de Carvalho Balieiro JC, de Souza RR. Placental microstructure and efficiency in cloned bovines: a design-based stereological approach. *Cell Tissue Res* 2008;333:105-14.
121. Adeyinka FD, Laven RA, de Nicolo G, Lawrence KE, Parkinson TJ. The Use of Stereology Method to Estimate the Volume of Feto-Maternal Exchange Area of the Bovine Placentome during Gestation. *Anat Rec (Hoboken)* 2016;299:1571-7.

122. Fletcher CJ, Roberts CT, Hartwich KM, Walker SK, McMillen IC. Somatic cell nuclear transfer in the sheep induces placental defects that likely precede fetal demise. *Reproduction* 2007;133:243-55.
123. Stegeman JHJ. Placental development in the sheep and its relation to fetal development : a qualitative and quantitative anatomic and histologic study. Wageningen: s.n.; 1974.
124. Laga EM, Driscoll SG, Munro HN. Quantitative studies of human placenta. I. Morphometry. *Biol Neonate* 1973;23:231-59.
125. Baur R. Morphometry of the placental exchange area. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1977;53:3-65.
126. Liebich HG. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis ; mit 11 Tabellen: Schattauer; 2004.
127. Braun T, Meng W, Shang H, Li S, Sloboda DM, Ehrlich L, Lange K, Xu H, Henrich W, Dudenhausen JW, Plagemann A, Newnham JP, Challis JR. Early dexamethasone treatment induces placental apoptosis in sheep. *Reprod Sci* 2015;22:47-59.
128. Carmichael SL, Shaw GM, Ma C, Werler MM, Rasmussen SA, Lammer EJ, National Birth Defects Prevention S. Maternal corticosteroid use and orofacial clefts. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:585 e1-7; discussion 683-4, e1-7.
129. Li S, Nitsos I, Polglase GR, Newnham JP, Challis JR, Moss TJ. Effects of tail docking and castration on stress responses in lambs and the influence of prenatal glucocorticoid treatment. *Reprod Fertil Dev* 2013;25:1020-5.
130. Bell AW, Hay WW, Jr., Ehrhardt RA. Placental transport of nutrients and its implications for fetal growth. *J Reprod Fertil Suppl* 1999;54:401-10.
131. Constant F, Guillomot M, Heyman Y, Vignon X, Laigre P, Servely JL, Renard JP, Chavatte-Palmer P. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol Reprod* 2006;75:122-30.
132. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 1985;318:635-41.
133. Saif Z, Dyson RM, Palliser HK, Wright IM, Lu N, Clifton VL. Identification of Eight Different Isoforms of the Glucocorticoid Receptor in Guinea Pig Placenta: Relationship to Preterm Delivery, Sex and Betamethasone Exposure. *PLoS One* 2016;11:e0148226.
134. Lee JY, Yun HJ, Kim CY, Cho YW, Lee Y, Kim MH. Prenatal exposure to dexamethasone in the mouse induces sex-specific differences in placental gene expression. *Dev Growth Differ* 2017;59:515-25.
135. Braun T. Fetale Programmierung. In: Rath/Gembruch/Schmidt, ed. *Referenz Geburtshilfe und Perinatalmedizin*: Thieme Verlag 2018: under review.

6 Eidesstaatliche Versicherung

„Ich, Karolin Lange, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Auswirkungen maternaler Dexamethasontherapie in der Frühschwangerschaft auf Morphologie und Stereologie der Schafsplazenta“ 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 (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und 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. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

7 Anteilserklärung

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Karolin Lange hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Braun T, Meng W, Shang H, Li S, Sloboda DM, Ehrlich L, **Lange K**, Xu H, Henrich W, Dudenhausen JW, Plagemann A, Newnham JP, Challis JR. Early dexamethasone treatment induces placental apoptosis in sheep. *Reprod Sci* 2015;22:47-59.

Beitrag im Einzelnen: Mit meiner statistischen Auswertung habe ich zur Erstellung von Abb. 1 sowie Tabelle 2 und 3 beigetragen.

Publikation 2:

Braun T, **Lange K**, Ehrlich L, Li S, Plagemann A, Newnham JP, Challis JR, Henrich W, Sloboda DM. Early dexamethasone treatment results in structural abnormalities in sheep placentomes. *Placenta* 2012;33:9-A98.

Beitrag im Einzelnen: Durch meine immunhistochemischen Arbeiten sind Abb. 2 und 3 entstanden. Die zugehörige Bildanalyse und deren Auswertung bildete die Grundlage für Abb. 6-10.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8 Lebenslauf

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

9 Publikationen

Veröffentlichung mit Peer-Review-Verfahren:

Braun T, Meng W, Shang H, Li S, Sloboda DM, Ehrlich L, **Lange K**, Xu H, Henrich W, Dudenhausen JW, Plagemann A, Newnham JP, Challis JR. Early dexamethasone treatment induces placental apoptosis in sheep. *Reprod Sci* 2015;22:47-59.

Posterpräsentation:

Braun T, **Lange K**, Ehrlich L, Li S, Plagemann A, Newnham JP, Challis JR, Henrich W, Sloboda DM. Early dexamethasone treatment results in structural abnormalities in sheep placentomes. *Placenta* 2012;33:9-A98.

10 Danksagung

Vielen Dank an die gesamte AG Perinatale Programmierung für die kontinuierliche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Im Besonderen möchte ich Herrn Priv.- Doz. Dr. T. Braun für die hervorragende und umfassende Betreuung sowie Frau L. Ehrlich für die vielfältigen Hilfestellungen in allen Fragen danken.

Weiterhin danke ich Herrn M. Thiele für die ImageJ-Programmierung und seine Unterstützung in der Bildanalyse. Ich danke Frau K. Melchior und Herrn T. Ziska für ihre Hilfe bei den experimentellen Arbeiten sowie Herrn Dr. H.J. Gundersen, Herrn Prof. Dr. G. Burton und Herrn Dipl.-Math. T. Sörensen für ihre beratende Funktion bei der Konzeption und Auswertung der stereologischen Analysen.

11 Anhang

11.1 Quelltext Makro „Cut“

```
// Charite Campus Virchow Klinikum - Julius Wolff Institut
// @ 2011-2014 Mario Thiele
// Erstellung der ROIs fuer die Auswertung
// User: Karolin Lange
// min. benoetigte Bildabmessungen: 9100 x 9270 [Pixel]
// Erstellung des Outputordner
    title = getTitle();
    pos = lastIndexOf(title, ".");
    title = substring(title, 0, pos) + "_Evaluation";
    inputFolder = getDirectory("image");
    File.makeDirectory(inputFolder + title)
    inputFolder = getDirectory("image") + title + "/";
// Speicheroptionen
    run("Input/Output...", "jpeg=80 gif=-1 file=.txt copy_row save_column save_row");
// Bild 1
// Startposition setzen und ROI Pruefen
    run("ROI Manager...");
    roiManager("Open", "I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\ROI Braun.roi");
    roiManager("Select", 0);
    setTool("point");
    waitForUser("ROI setzen und mit \"OK\" bestätigen");
    selectWindow("ROI Manager");
    run("Close");
    getSelectionCoordinates(xPoint, yPoint);
    x = xPoint[0];
    y = yPoint[0];
    makeRectangle(x, y, 1300, 1030);
    run("Line Width...", "line=15");
// schneiden und speichern
    run("Copy");
    run("Internal Clipboard");
    saveAs("jpeg", inputFolder+"1");
    run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Grid.txt]");
    run("Braun_Grid");
    selectWindow("1-Multipurpose.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"1a");
    close("1a.jpg");
    run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Cycloid mit
Kreuzen.txt]");
    run("Braun_Cycloid mit Kreuzen");
    selectWindow("1-cycloid.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"1b");
    close("1b.jpg");
```

Anhang

```
close("1.jpg");
run("Draw");
// Bild 2
makeRectangle(x + 3900, y, 1300, 1030);
run("Copy");
run("Internal Clipboard");
saveAs("jpeg", inputFolder+"2");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Grid.txt]");
run("Braun_Grid");
selectWindow("2-Multipurpose.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"2a");
close("2a.jpg");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Cycloid mit
Kreuzen.txt]");
run("Braun_Cycloid mit Kreuzen");
selectWindow("2-cycloid.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"2b");
close("2b.jpg");
close("2.jpg");
run("Draw");
// Bild 3
makeRectangle(x + 7800, y, 1300, 1030);
run("Copy");
run("Internal Clipboard");
saveAs("jpeg", inputFolder+"3");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Grid.txt]");
run("Braun_Grid");
selectWindow("3-Multipurpose.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"3a");
close("3a.jpg");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Cycloid mit
Kreuzen.txt]");
run("Braun_Cycloid mit Kreuzen");
selectWindow("3-cycloid.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"3b");
close("3b.jpg");
close("3.jpg");
run("Draw");
// Bild 4
makeRectangle(x, y + 4120, 1300, 1030);
run("Copy");
run("Internal Clipboard");
saveAs("jpeg", inputFolder+"4");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Grid.txt]");
run("Braun_Grid");
selectWindow("4-Multipurpose.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"4a");
close("4a.jpg");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Cycloid mit
Kreuzen.txt]");
```

Anhang

```
run("Braun_Cycloid mit Kreuzen");
selectWindow("4-cycloid.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"4b");
close("4b.jpg");
close("4.jpg");
run("Draw");
// Bild 5
makeRectangle(x + 3900, y + 4120, 1300, 1030);
run("Copy");
run("Internal Clipboard");
saveAs("jpeg", inputFolder+"5");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Grid.txt]");
run("Braun_Grid");
selectWindow("5-Multipurpose.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"5a");
close("5a.jpg");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Cycloid mit
Kreuzen.txt]");
run("Braun_Cycloid mit Kreuzen");
selectWindow("5-cycloid.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"5b");
close("5b.jpg");
close("5.jpg");
run("Draw");
// Bild 6
makeRectangle(x + 7800, y + 4120, 1300, 1030);
run("Copy");
run("Internal Clipboard");
saveAs("jpeg", inputFolder+"6");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Grid.txt]");
run("Braun_Grid");
selectWindow("6-Multipurpose.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"6a");
close("6a.jpg");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Cycloid mit
Kreuzen.txt]");
run("Braun_Cycloid mit Kreuzen");
selectWindow("6-cycloid.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"6b");
close("6b.jpg");
close("6.jpg");
run("Draw");
// Bild 7
makeRectangle(x, y + 8240, 1300, 1030);
run("Copy");
run("Internal Clipboard");
saveAs("jpeg", inputFolder+"7");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Grid.txt]");
run("Braun_Grid");
selectWindow("7-Multipurpose.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"7a");
```


Anhang

```
close("7a.jpg");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Cycloid mit
Kreuzen.txt]");
run("Braun_Cycloid mit Kreuzen");
selectWindow("7-cycloid.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"7b");
close("7b.jpg");
close("7.jpg");
run("Draw");
// Bild 8
makeRectangle(x + 3900, y + 8240, 1300, 1030);
run("Copy");
run("Internal Clipboard");
saveAs("jpeg", inputFolder+"8");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Grid.txt]");
run("Braun_Grid");
selectWindow("8-Multipurpose.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"8a");
close("8a.jpg");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Cycloid mit
Kreuzen.txt]");
run("Braun_Cycloid mit Kreuzen");
selectWindow("8-cycloid.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"8b");
close("8b.jpg");
close("8.jpg");
run("Draw");
// Bild 9
makeRectangle(x + 7800, y + 8240, 1300, 1030);
run("Copy");
run("Internal Clipboard");
saveAs("jpeg", inputFolder+"9");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Grid.txt]");
run("Braun_Grid");
selectWindow("9-Multipurpose.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"9a");
close("9a.jpg");
run("Install...", "install=[I:\\Extern\\2011_DEX-sheep-Plazenta_AgBraun\\ImageJ\\Braun_Cycloid mit
Kreuzen.txt]");
run("Braun_Cycloid mit Kreuzen");
selectWindow("9-cycloid.jpg"); saveAs("jpeg", inputFolder+"9b");
close("9b.jpg");
close("9.jpg");
run("Draw");
// Rohbild + Maske speichern
run("Select None");
setTool("zoom");
saveAs("jpeg", inputFolder + "ROIs");
```

11.2 Quelltext Makro "Curve"

```

requires("1.42i");
title = getTitle();
pos = lastIndexOf(title, ".");
title = substring(title,0,pos) + "-cycloid" + substring(title,pos);
run("Duplicate...", "title="+title);
// BEGIN PARAMETER-----
Res = 2.643;                // Resolution = pixel / um
Resl= 264.3;              // Resolution = pixel / 100um
L = 30;                   // L = Bogenlaenge in um
G = 30;                   // G = vertical gap in um
lineWidth = 3;           // lineWidth : Linien dicke in pixel
lineWidth = 3;           // rgb_red, _green, _blue = farbe der line
rgb_red = 255;
rgb_green = 255;
rgb_blue = 0;
// END PARAMETER-----
// Programm Weibel Linien-----
D = (Res*L) / 2;          // D = durchmesser der scheibe in pixel
S = (Res*G);             // S = zeilenabstand in pixel
W = getWidth();
H = getHeight();
hE = 2*D + S;           // doppelter durchmesser definiert die hoehe
wE = 2*D*PI;
vCount = floor(H/hE);
hCount = floor(W/wE);
gW = round(hCount*wE);
gH = round(vCount*hE);
xStart = floor((W-gW)/2-3*wE/4);
yStart = floor((H-gH+S)/2);
setColor(rgb_red,rgb_green,rgb_blue); // farbe r,b,g
setLineWidth(lineWidth); // Liniendicke
autoUpdate(false);
for(i=0; i<vCount; i++) {
Y = yStart + i*hE;
for(j=0; j<=hCount; j++) {
X = xStart + j*wE;
drawMaskElement(X,Y,D,S); //S=vertikaler Versatz der Kreuze relativ zur Wellenlinie
}
}
updateDisplay;
exit;
function drawMaskElement(x,y,D,S) { //S=vertikaler Versatz der Kreuze relativ zur Wellenlinie
y += D;

```

Anhang

```
    moveTo(x,y);                //Begrenzungsstriche im Cylcoid Wert auf Null gesetzt
    lineTo(x-0,y);
    moveTo(x,y);
    lineTo(x+0,y);
// Programm Kreuze -----
yk=y+S;                          //S-Zahl=Versatz nach oben (S+Zahl=nach unten) relativ zur Wellenlinie
moveTo(x,yk);
lineTo(x-12,yk);
moveTo(x,yk);
lineTo(x+12,yk);
moveTo(x,yk);
lineTo(x,yk-12);
moveTo(x,yk);
lineTo(x,yk+12);
// -----
// Programm Rechteck -----
yk=y+S;
moveTo(41,48);
lineTo(1258,48);
moveTo(1258,48);
lineTo(1258,1010);
moveTo(1258,1010);
lineTo(41,1010);
moveTo(41,1010);
lineTo(41,48);
// -----
// Skalierungs Balken-----
yk=y+S;
moveTo(1132,968);                // Linie=264.3 Pixel= 100um länge
lineTo(1132-Resl,968);          // Resl=Pixel/100um
moveTo(1132,960);
lineTo(1132,976);
moveTo(1132-Resl,960);
lineTo(1132-Resl,976);
// -----
X = 0;
Y = 0;
moveTo(x+X,y+Y);
for( i=1; i<=360; ++i) {
    alpha = (i*PI)/180.0;
    s = sin( alpha/2.0 );
    c = cos( alpha/2.0 );
    h = D*s;
    Y = h*s;
    X = (alpha*D/2.0) - h*c;
```

Anhang

```
    lineTo(x+X, y-Y);
}
X = PI*D/2.0;
Y = D;
moveTo(x+X, y-Y-0);           //Begrenzungsstriche im Cylcoid Wert auf Null gesetzt
lineTo(x+X, y-Y+0);
x += PI*D;
moveTo(x,y);
lineTo(x-0,y);               //Begrenzungsstriche im Cylcoid Wert auf Null gesetzt
moveTo(x,y);
lineTo(x+0,y);
X = 0;
Y = 0;
moveTo(x+X,y+Y);
for( i=1; i<=360; ++i) {
alpha = (i*PI)/180.0;
s = sin( alpha/2.0 );
c = cos( alpha/2.0 );
h = D*s;
Y = h*s;
X = (alpha*D/2.0) - h*c;
lineTo(x+X, y+Y);
}
X = PI*D/2.0;
Y = D;
moveTo(x+X, y+Y-0);         //Begrenzungsstriche im Cylcoid Wert auf Null gesetzt
lineTo(x+X, y+Y+0);
```

11.3 Quelltext Makro "Grid"

```
// BEGIN PARAMETER-----
Res = 2.643;           // Resolution = pixel / µm
Res1 = 264.3;         // Resolution = pixel/100um
L = 66.5;             // L = Abstand in µm
lineWidth = 3;        // lineWidth : Linien dicke in pixel
rgb_red = 255;        // rgb_red, _green, _blue = farbe deer line
rgb_green = 255;
rgb_blue = 0;
// END PARAMETER-----
// Programm Gitternetzlinien -----
yk=y+S;               //Gesamtfläche= 1057pixel x984pixel mit 2.643pixel/um2
                       //      = 399.92umx372,30um=148893,5071 um2
moveTo(121,149);      //Horizontale Linien
lineTo(1178,149);
```

Anhang

```
    moveTo(121,272);
    lineTo(1178,272);
    moveTo(121,395);
    lineTo(1178,395);
    moveTo(121,518);
    lineTo(1178,518);
    moveTo(121,641);
    lineTo(1178,641);
    moveTo(121,764);
    lineTo(1178,764);
    moveTo(121,887);
    lineTo(1178,887);
    moveTo(272,26);           //Vertikale Linien
    lineTo(272,1010);
    moveTo(423,26);
    lineTo(423,1010);
    moveTo(574,26);
    lineTo(574,1010);
    moveTo(725,26);
    lineTo(725,1010);
    moveTo(876,26);
    lineTo(876,1010);
    moveTo(1027,26);
    lineTo(1027,1010);
// Programm Rechteck -----
    yk=y+S;
    moveTo(121,26);
    lineTo(1178,26);
    moveTo(1178,26);
    lineTo(1178,1010);
    moveTo(1178,1010);
    lineTo(121,1010);
    moveTo(121,1010);
    lineTo(121,26);
// Skalierungs Balken-----
    yk=y+S;
    moveTo(1132,990);           // Linie=264.3 Pixel= 100um länge
    lineTo(1132-Resl,990);     // Resl=Pixel/100um
    moveTo(1132,982);
    lineTo(1132,998);
    moveTo(1132-Resl,982);
    lineTo(1132-Resl,998);
// -----
}
```

11.4 Zusammenstellung verwendeter Reagenzien, Lösungen, Geräte und Software

11.4.1 Zusammenstellung der verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel mit Artikelnummer und Hersteller

Reagenzien/Lösungsmittel/Artikelnummer	Hersteller
Aqua dest./Milli-Q	Merk-Millipore, USA
Avidin/Biotin Komplex (Vectastain ABC Kit PK-4002)	Vector Laboratories, USA
Bovines Serumalbumin (BSA) A9418	Sigma-Aldrich, USA
3,3'Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) 189-0	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dinatriumphosphatdihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) 4984.1	Roth, Deutschland
Donkey anti-rabbit IgG AP, polyclonal #97061	Abcam, UK
Ethanol 200-578-6	Herbeta Arzneimittel, Deutschland
Glycergel Mounting Medium	DAKO, USA
Horse anti-mouse IgG, biotinyliert #BA-2000	Vector Laboratories USA
Liquid Fast-Red Substrate Kit (ab64254)	Abcam, UK
Mayers Hämalaunlösung HX 390929	Merck, Deutschland
Methanol 4627.2	Roth, Deutschland
Mouse anti-human Cytokeratin Type II #MCA 888H	Serotec
Natriumazid (NaN_3) 6688	Merck, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) 3957.1	Roth, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) 1.06346.0500	Merck, Deutschland
Normal horse serum (Vectastain ABC Kit PK-4002)	Vector Laboratories, USA
Protease <i>Streptomyces griseus</i>	Sigma-Aldrich, USA
Rabbit anti-human Von-Willebrand-Faktor, polyclonal #A0082	DAKO, USA
Salzsäure (HCL) 37 % 317-1000	Merck, Deutschland
Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethan) A411.2	Roth, Deutschland
Trizmahydrochloride Tris-HCL T3253-250 G	Sigma-Aldrich, Deutschland
Triton X-1.08603.1000	Merck, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 9681.4	Roth, Deutschland
Xylol 18118	J.T.Baker, USA

11.4.2 Zusammenstellung der hergestellten Lösungen mit Bestandteilen

Hergestellte Lösungen	
ABC	1ml PBS (pH 7.4)+ 2,5µl Lösung A+ 2,5 µl Lösung B
Antikörperverdünner	500 mg BSA + 50 mg NaN ₃ + 100 ml 10 mM PBS (pH 7,3)
DAB	25 mg DAB + 10 ml Tris-HCL (vor Gebr. + 4,5 ml Tris-HCL Puffer + 5 µl H ₂ O ₂)
Fast Red	40 µl Fast Red Chromogen + 3 ml Naphtol-P-Substrat
2 % Horse Normalserum	1:50 gelöst in PBS (pH 7.4)
Peroxidase-Blocker	65 ml PBS(pH 7.4) + 7.5 ml Methanol + 2 ml H ₂ O ₂
Phosphatpufferlösung (PBS, pH 7.4, 2L)	3,78 g NAH ₂ PO ₄ x H ₂ O + 12,82 g NA ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O + 87,76 g NaCl + 1000 ml Aqua dest (vor Gebrauch 1:9 mit Aqua dest. verdünnen)
Primärer Antikörper: Mouse anti-human Cytokeratin Type II	1:25 gelöst in Antikörperverdünner
Primärer Antikörper: Rabbit anti-human Von-Willebrand-Faktor	1:100 gelöst in Antikörperverdünner
Proteaselösung	0,075 g gelöst in 100ml TBS bei 37°C
Sekundärer Antikörper: Horse anti-mouse IgG, biotinyliert	1:200 gelöst in Antikörperverdünner
Sekundärer Antikörper: Donkey anti-rabbitIgG	1:500 gelöst in Antikörperverdünner
Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS)	9 g Tris + 68,5 g Tris-HCL+ 87,8 NaCl
Tris-HCL (pH 7,6)	6,06 g Tris + 38,9 ml HCL + 1000 ml Aqua dest.
Triton	0,3 % in Aqua dest.

11.4.3 Zusammenstellung der verwendeten Geräte mit Hersteller

Geräte	Hersteller
Analysewaage AC 210 P	Sartorius, USA
Magnetrührer, MR2002	Heidolph, Deutschland
Graphics Tablet Intuos 3	Wacom, Japan
Leica Leitz DMRB Durchlichtmikroskop	Leica, Deutschland
Kamera Carl Zeiss AxioCam MR Color 431-145	Zeiss, Deutschland
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Deutschland
Pap Pen	Kisker Biotec, Deutschland
PH-meter, 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH, Deutschland
Rotationsmicrotom, HM340E	Microm International GmbH, Deutschland
Mikrotiterplattenschüttler, MTS 4	IKA Janke & Kunkel, Deutschland
Vortexschüttler REAX 1 DR	Heidolph, Deutschland
Wärmeschrank B 290	Heraeus, Deutschland

11.4.4 Zusammenstellung der verwendeten Softwareprogramme mit Version und Hersteller

Software/Version	Hersteller
Adobe Photoshop 12.0	Adobe Systems, USA
AxioVision4.8	Zeiss, Deutschland
Image J 1.48	National Institutes of Health, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, USA
SPSS Statistics 23	IBM, USA