Aus dem Lehrstuhl Anatomie II - Neuroanatomie -

der Anatomischen Anstalt,

Lehrstuhl der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

Stereologische Untersuchung immunhistochemisch differenzierter Strukturbestandteile des Zottenbaums menschlicher Plazenten mit und ohne IUGR

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sina Henschen

aus Bielefeld

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter	Prof. Dr. med. Hans-Georg Frank			
Mitberichterstatter	Prof. Dr. Udo Jeschke Prof. Dr. Christian Thaler			
Mitbetreuung	Dr. rer. nat. Eva Pfaff			
	Dr. rer. nat. Nirav Barapatre			
Dekan	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann			
Tag der mündlichen Prüfung	28.07.2022			

Zusammenfassung

Schon lange ist aus epidemiologischen Studien bekannt, dass das Plazentagewicht und das Gewicht der Neugeborenen eng miteinander korrelieren. Es ist allerdings unklar, ob, und wenn ja, welche mikroskopischen Abschnitte des Plazenta-Zottenbaums den Gewichtsverlust widerspiegeln.

Erst vor kurzem konnten Teilstrukturen des Zottenbaums der menschlichen Plazenta identifiziert werden, deren Volumen (Gewicht) bei Plazenten aus klinisch unauffälligen Schwangerschaften mit dem Plazentagewicht korreliert. Diese Strukturen sind Anteile des Zottenbaums, in denen perivaskuläre Myofibroblasten nachweisbar sind. Hierfür wird der glattmuskuläre Reifungsmarker γ-smooth-muscle-Aktin (γ-sm) verwendet.

Bei der intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR) spielen Minderung der Kindsgröße und damit auch des Kindsgewichts und des Plazentagewichts eine entscheidende Rolle, und zwar schon klinisch diagnostisch. Der per Ultraschall nachgewiesene Abfall des zunächst noch normalen kindlichen Wachstums unter die 10. Perzentile ist ein entscheidendes diagnostisches Kriterium für die IUGR.

Die Frage dieser Studie war daher, ob auch bei IUGR der Gewichtsverlust der Plazenta mit einer Reduktion der Anteile des Zottenbaums einhergeht, die den oben genannten Marker γ-sm-Aktin enthalten (γ-sm-positiv). Eine teilweise gematchte Kontrollgruppe normaler Plazenten wurde mitgeführt.

Zur Volumenbestimmung wurden stereologische Methoden eingesetzt, mit denen die Volumina der γ-sm-positiven Anteile des Zottenbaums (C-villi) und der γ-sm-negativen Anteile des Zottenbaums (NC-villi) bestimmt wurden. Einige der im peripheren Zottenbaum bekannten Veränderungen bei IUGR (verlängerte Diffusionsdistanz, verminderte Verzweigung der Zotten) wurden zum Vergleich mit Literaturdaten und damit auch zur Validierung parallel mitbestimmt.

Zentrales Ergebnis ist, dass der Volumen- und Gewichtsverlust der Plazenten bei IUGR praktisch nur für die C-villi signifikant ist, nicht aber für die NC-villi. Weitere Daten bestätigen die Verlängerung der Diffusionsdistanz an der Oberfläche der Zotten und die verminderte Verzweigung der Zottenbäume bei IUGR. Qualitative Mustervergleiche aller bestimmten Parameter zeigen einen weitgehenden Verlust der in normalen Plazenten auffindbaren Wachstumskorrelationen. Die Plazenten bei IUGR sind von einer sehr breiten und umfassenden Störung der Entwicklung betroffen.

Der Gewichtsverlust der Plazenten mit IUGR ist damit zuerst mit dem Gewichts- und Volumenverlust der C-villi verbunden. Diese enthalten kontraktile Myofibroblasten und müssen in ihrer Masse den Stammzotten zugeordnet werden. Damit sind diese Gewichtsveränderungen eine sich sehr früh in der Plazentaentwicklung (ab dem Übergang vom ersten zum zweiten Trimester) progressiv entwickelnde pathogenetische Veränderung. Dies wirft viele Fragen auf, u.a. ob die im peripheren Zottenbaum auftretenden Veränderungen (erhöhte Diffusionsdistanz und verminderte Zottenverzweigung) nicht sekundär zu dieser zeitlich vorangehenden pathogenetischen Veränderung im zentralen Zottenbaum sind.

Inhaltsverzeichnis

Ζ	usamn	nenfassung	III
A	bbildu	ngsverzeichnis	VII
Т	abeller	nverzeichnis	VIII
A	bkürzu	ingsverzeichnis	IX
1	Ein	leitung	11
	1.1	Plazenta: Entwicklung, Aufbau und Funktion	11
	1.2	IUGR – eine Übersicht	15
	1.3	Analyse der Architektur des Zottenbaums	16
	1.4	Zur "mikroskopischen Anatomie" des Plazentagewichts	17
	1.5 sind n	Die Diffusionsdistanz und die Verzweigungsdichte an der Zottenober norphologische Korrelate der Plazentafunktion	fläche 18
	1.6 Gescł	Die mikroskopische Anatomie menschlicher Plazenten nlechtsunterschiede auf	weist 19
	1.7	Ziel	20
2	Ma	terial und Methoden	21
	2.1	Studienmaterial	21
	2.2	Makroskopische Daten	22
	2.3	Gewebeentnahme nach dem "systematic random sampling"	23
	2.4	Immunhistochemie der Gewebeschnitte	25
	2.5	Stereologische Analyse	28
	2.6	Statistische Analyse	32
3	Erg	ebnisse	33
	3.1 Grupp	Vergleich zwischen Plazenten der IUGR Auswahlgruppe und der N be	IORM 33
	3.2	Analyse der IUGR Hauptgruppe	40

3.2.1 Bivariate multiparametrische Korrelationsanalyse	40
3.2.2 Analyse ausgewählter Korrelationen von mikroskopisch makroskopischen Parametern	nen und 41
3.2.3 Analyse von mikroskopischen Parametern: Korrelat Diffusionsdistanzen zwischen C- und NC-villi	ion der 43
4 Diskussion	45
4.1 Die wichtigsten Ergebnisse	45
4.2 Vergleich der IUGR Auswahlgruppe mit der NORM Gruppe	46
4.2.1 C-villi: Struktur und Funktion	46
4.2.2 Widerstand im fetalen plazentaren Kreislauf und Zottenreifung	47
4.2.3 Fehlentwicklungen des peripheren Zottenbaums bei IUGR	49
4.2.4 "Second Order" Stereologie: Der Verzweigungsindex	50
4.3 Korrelationen von Parametern der IUGR Hauptgruppe	51
4.3.1 Übersicht	51
4.3.2 Zur "mikroskopischen Anatomie" des Plazentagewichts	52
4.3.3 Bedeutung der veränderten Diffusionsdistanzen	53
4.4 Methodische Besonderheiten der Studie	53
4.5 Offene Fragen und Ausblick	55
5 Literatur	57
Anhang	64
Deskriptive Statistik der klinischen Fallgruppen und der Parameter	64
Makroskopische Daten	64
Mikroskopische Daten	66
Danksagung	69
Eidesstattliche Erklärung	70
Publikationsliste	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Punkteraster zur randomisierten Gewebeentnahme
Abbildung 2: Die immunhistochemische Differenzierung des Zottenbaums
Abbildung 3: Die "Nearest-Neighbor" Analyse der Plazentazotten
Abbildung 4: Bestimmung des Verzweigungsindex
Abbildung 5: Zusammenschau der wichtigsten Befunde
Abbildung 6: "Radar charts" zur semiquantitativen Musteranalyse
Abbildung 7: Bivariate multiparametrische Korrelationsanalysen: IUGR versus NORM.
Abbildung 8: Klinische und anatomische Kenngrößen im Vergleich
Abbildung 9: Bivariate multiparametrische Korrelationsanalyse der IUGR Hauptgruppe40
Abbildung 10: Korrelationen des Plazentagewichts der Plazenten der IUGR Hauptgruppe mit absoluten Zottenvolumina
Abbildung 11: Korrelationen der Plazentadicke der Plazenten der IUGR Hauptgruppe mit absoluten Zottenvolumina
Abbildung 12: Korrelationen des Geburtsgewichts der Plazenten der IUGR Hauptgruppe mit absoluten Zottenvolumina
Abbildung 13: Korrelation der durchschnittlichen Diffusionsdistanz

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der klinischen undmakroskopische Parameter der IUGR Hauptgruppe
Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der makroskopischen Daten der IUGR Auswahlgruppe (männlich/ Sectio)
Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der makroskopischen Daten der klinisch unauffälligen Gruppe (NORM; männlich/ Sectio)
Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) aller mikroskopischen Parameterder Plazenten der IUGR Hauptgruppe
Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) aller mikroskopischen Parameterder IUGR Untergruppe männlich/ Sectio
Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) aller mikroskopischen Parameterder NORM Plazenten

Abkürzungsverzeichnis

Makroskopische und klinische Bezüge

IUGR	Intrauterine Growth Restriction; intrauterine Wachstumsretardierung
Plazenten der IUGR Hauptgruppe	Gesamtanzahl der Plazenten mit IUGR, die für diese Studie gemessen wurden (n=36)
Plazenten der IUGR Auswahlgruppe	Auswahl der Plazenten mit IUGR aus der IUGR Hauptgruppe, die für den Vergleich mit den NORM Plazenten herangezogen wurden (n=11; Sectio, männlich)
NORM Plazenten	Plazenten von Neugeborenen ohne erkennbare Pathologie (n=10; Sectio, männlich)
Sectio/ vaginal	Geburtsmodus
Sectio	Sectio Caesarea
GA [Woche]	Gestationsalter bei Geburt
GG [g]	Geburtsgewicht
PG [g]	Plazentagewicht
PG/GG	
Relation der Gewichte	Relation von Plazentagewicht zu Geburtsgewicht
Plazenta/ Fetus Gewichte	
LD [cm]	längster Plazentadurchmesser
KD [cm]	kürzester Plazentadurchmesser
OF [cm ²]	Plazentaoberfläche
Rundung	Plazentarundung
Plazentadicke [cm]	Plazentadicke

Stereologisch ermittelte Parameter

Anteile des Zottenbaums, in denen perivaskuläre Myofibroblasten nachweisbar sind (unter Verwendung von γ-smooth-muscle-Aktin); γ-sm-positive Zottenabschnitte
Anteile des Zottenbaums, in denen keine perivaskuläre Myofibroblasten nachweisbar sind; γ-sm-negative Zottenabschnitte
Standardabweichung
Zottenvolumen von Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten
relative Anteile konkaver Zottenoberflächen am Trophoblastenrand mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten

Gefäße in C-villi [ml]	Gefäßvolumen in Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten
DD in C-villi [µm]	durchschnittliche Diffusionsdistanzen an der Oberfläche zwischen Gefäßendothel und Trophoblastenrand von
C-villi Diff. Dist.	Zotten ohne perivaskuläre stromale Myofibroblasten
SD von DD in C-villi [µm]	Standardabweichung der durchschnittlichen Diffusionsdistanz von Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten
NC-villi Volumen [ml]	Zottenvolumen von Zotten ohne perivaskuläre stromale Myofibroblasten
NC-villi Verzweigungsindex	relative Anteile konkaver Zottenoberflächen am Trophoblastenrand ohne perivaskuläre stromale Myofibroblasten
Gefäße in NC-villi [ml]	Gefäßvolumen in Zotten ohne perivaskuläre stromale Myofibroblasten
DD in NC-villi [µm]	durchschnittliche Diffusionsdistanzen an der Oberfläche zwischen Gefäßendothel und Trophoblastenrand von
NC-villi Diff. Dist.	Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten
SD von DD in NC-villi [µm]	Standardabweichung der durchschnittlichen Diffusionsdistanzen von Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten
IVR [ml]	Volumen des intervillöser Raums
Volumen: Intervillöser Raum	
Relation Villöser Volumina (C-villi zu NC-villi)	Relation der Zottenvolumina von Zotten mit und ohne
C-villi/ NC-villi: Volumina	perivaskuläre stromale Myofibroblasten
Gesamtzottenvolumen [ml]	Gesamtzottenvolumen des gesamten Zottenbaums
Volumen: Zottenbaum [ml]	

Sonstige Abkürzungen

S.	siehe
Abb.	Abbildung
Tab.	Tabelle
γ-sm-Aktin	γ-smooth-muscle-Aktin
p.c.	post conceptionem; nach Befruchtung der Eizelle

1 Einleitung

1.1 Plazenta: Entwicklung, Aufbau und Funktion

Übersicht

Die Plazenta ist ein temporäres Organ, welches sehr rasch in einem komplizierten Entwicklungsprozess entsteht. Von Beginn der Plazentation an muss die sich parallel zum Embryo entwickelnde und reifende Plazenta effektiv den Stoff- und Gasaustausch zwischen Mutter und Kind innerhalb des Uterus gewährleisten. An der Bildung der Plazenta sind Mutter (Basalplatte), aber vor allem das Kind (Chorionplatte und das von ihr ausgehende baumähnlich verzweigte Zottensystem) beteiligt. Das kindliche Zottensystem ist der sogenannte Zottenbaum, der von mütterlichem Blut umspült wird. Das mütterliche und kindliche Blut bleibt stets durch eine vom Embryo gebildete epitheliale und bindegewebige Schranke, die sogenannte Blut-Plazenta-Schranke, voneinander getrennt. Über diese Grenzmembran an der Oberfläche der Zotten kann der Stoff- und Gasaustausch kontrolliert und selektiv ablaufen.

Am Ende einer normalen Geburt löst sich die Plazenta mit den Nachwehen vom Uterus und wird mitsamt den Eihäuten als Nachgeburt ausgeschieden.

Entwicklung der menschlichen Plazenta

In der Präimplantationsphase teilt sich die befruchtete Eizelle (Zygote) mehrere Male, um dann schließlich als Blastozyste am Implantationsort im Uterus anzukommen. In der Blastozyste befinden sich zwei wesentliche Zellpopulationen: Innen der Embryoblast und außen der Trophoblast, letzterer ist das erste Epithelgewebe des menschlichen Körpers. Aus dem zunächst aus Einzelzellen bestehenden Trophoblasten an der Oberfläche der Blastozyste entsteht während der Einnistung durch interzelluläre Fusion eine zweite Trophoblastpopulation, der Synzytiotrophoblast. Dieser bildet die apikale Lage des nunmehr zweischichtigen trophoblastären Epithels. Der zelluläre, nicht synzytiale Teil des Trophoblasten wird als Zytotrophoblast bezeichnet und liegt basal [1].

Die Entwicklung der Plazenta, die Plazentation, beginnt mit der Einnistung der Blastozyste am 6. - 7. Tag p.c. [2]. Üblicherweise heftet sich die Blastozyste mit der Seite an die Uterusschleimhaut, an der innen der Embryoblast liegt. Diese Seite wird

deswegen auch Implantationspol genannt [1]. Der Synzytiotrophoblast, die durch interzelluläre Fusion von Zytotrophoblasten entstandene vielkernige Zellschicht ohne Zellgrenzen, penetriert massiv die Uterusschleimhaut und dringt in diese ein. Innerhalb des Synzytiotrophoblasten entstehen Lakunen. Dies markiert den Beginn der lakunären oder trabekulären Phase der Plazentation, die ca. von Tag 8 bis Tag 13 p.c. andauert. Die Lakunen werden größer und von Balken des Synzytiotrophoblasten liegt, wächst entlang dieser Balken (Trabekel) ein und an einigen Stellen sogar durch die Oberfläche des Synzytiotrophoblast bestehende Zellschicht. Diese Zellschicht wird als Zytotrophoblastschale bezeichnet und grenzt das Gewebe des Embryos gegen das mütterliche Gewebe in der endometrialen Durchdringungszone ab [1, 3]. Die Trophoblastschale verankert die Frucht im Endometrium [4].

Weil die Proliferation und Fusion des Trophoblasten am Implantationspol begonnen hat, ist die Trophoblastenwand dort wesentlich dicker als an der gegenüberliegenden Seite. Die relativ dickeren Trophoblastschichten am Implantationspol werden später zur Plazenta (chorion frondosum) während der dünne Trophoblast auf der anderen Seite später zum chorialen Bestandteil der Eihäute (Chorion laeve) wird, also zu den sogenannten Eihäuten [1].

Seit wenigen Jahren ist klar, dass in der lakunären Phase zunächst kein Blut in die Lakunen einströmt, sondern dass diese Bereiche mit Sekreten endometrialer Drüsen durchströmt werden [5]. Die sogenannten "Trophoblast Plugs", die sich von der Trophoblastschale ableiten, versiegeln die zuvor durch Synzytiotrophoblast umgebauten Spiralarterien des Endometriums [6, 7]. Sobald die ersten mütterlichen Erythrozyten in die Lakunen und den frühen intervillösen Raum strömen, werden verschiedene biologische Prozesse in Gang gesetzt.

Folgend ist die Beschreibung aus Benirschke et al. [1]: Es wachsen die Lakunen in die Länge und der Synzytiotrophoblast wächst in blind endenden Ästen in die Lakune ein. Mit wachsender Größe dieser Primärzotten dringt auch der Zytotrophoblast in diese blind endenden Äste ein. Die Primärzotten werden anschließend durch die Bildung eines Stromakerns unter dem Trophoblasten zu sogenannten sekundären Zotten. Die Bindegewebszellen, die in die Primärzotten einwandern und dort das zentrale Zottenbindegewebe bilden, sind Zellen des extraembryonalen Mesoderms. Diese

Sekundärzotten bestehen aus einem bindegewebigen Zentralraum, überzogen von einer basalen Lage Zytotrophoblast und einer apikalen Lage Synzytiotrophoblast. Sobald im Stroma der Sekundärzotten hämangiopoetische Foci entstanden sind und sich erste Gefäße gebildet haben, wird von den sogenannten Tertiärzotten gesprochen. Ab diesem frühen Entwicklungsstadium sind alle später im Rahmen der weiteren Zottenreifung entstehenden Zottenverzweigungen tertiäre Zotten. Die lokal entstandenen Gefäße finden rasch Anschluss an das fetale Gefäßbett, so dass auch die fetoplazentare Zirkulation morphologisch angelegt ist.

Der Haftstiel ist der Vorläufer der Nabelschnur und verbindet die Embryonalscheibe mit der Chorionplatte. Zwischen 8. und 12. Woche p.c. bildet sich allmählich der vollständige maternale Kreislauf zwischen uterinen Arterien und dem intervillösen Raum [7]. Spätestens in der 10. Woche p.c. schon haben sich alle hämangiopoetischen Inseln des Zottenmesenchyms mit dem fetoplazentaren Gefäßnetz verbunden, wodurch die Bildung eines kompletten fetoplazentaren Blutkreislaufes abgeschlossen ist.

Ein komplett funktionsfähiger fetoplazentarer Blutkreislauf besteht ungefähr ab Ende der 11. bis 12. Woche p.c. [8].

Aufbau der reifen menschlichen Plazenta und ihre Funktion

Zum Zeitpunkt der Geburt misst die normale menschliche Plazenta durchschnittlich 20cm im Durchmesser, 2-3cm in der Dicke und ist etwa 500g schwer [9]. Sie wird mit 500 ml/min durchblutet [10]. Die reife menschliche Plazenta besteht im Wesentlichen aus drei Teilen [9]:

- der bindegewebigen Chorionplatte, die außen auf dem Amnionepithel aufliegt.
 Die Chorionplatte gehört zum kindlichen Anteil der Plazenta.
- dem Zottensystem, welches aus dem intervillösen Raum und den Zottenbäumen besteht. Die Zotten gehen von der Chorionplatte aus und werden im intervillösen Raum von mütterlichem Blut umspült.
- der Basalplatte, die zum mütterlichen Anteil der Plazenta gehört. Von den Gefäßen der Basalplatte strömt maternales Blut in den intervillösen Raum ein und fließt über diese auch wieder ab.

Die Chorionplatte hat nach innen (zum Embryo hin) das Amnionepithel mit unterliegendem Amnion-Bindegewebe und nach außen (zum Myometrium, also zum

Uterus hin) die Trophoblastenschicht. Zwischen Trophoblast und Amnion-Bindegewebe liegt das Chorionbindegewebe, in das die Äste der Umbilicalgefäße eingebettet sind.

Im Zottensystem findet der Nährstoffaustausch zwischen Mutter und Kind statt. Von der Chorionplatte aus wachsen etwa 30-50 stark verzweigte Zottenbäume in den von mütterlichem Blut ausgefüllten intervillösen Raum hinein. Diese Zotten werden in der klassischen Nomenklatur unterteilt in Stammzotten, Intermediärzotten und Terminalzotten [11]. Der Zottenbaum bildet insgesamt eine Oberfläche von 10-14qm². Des Weiteren gibt es noch die Haftzotten, die bis zur Basalplatte reichen, sich dort verankern und die Zottenbäume somit an der Basalplatte befestigen.

Die Basalplatte liegt der Uteruswand an. Die Basalplatte wächst an einigen Stellen als Einstülpung in den intervillösen Raum ein. Diese Einstülpungen werden Plazentasepten genannt und unterteilen die Plazenta in 10 - 40 Kotyledonen, die uterusseitig makroskopisch sichtbar sind.

Das mütterliche und kindliche Blut werden durch mehrere Zellschichten getrennt, die sogenannte Blut-Plazenta-Schranke zusammengefasst werden. Zu den als Zellschichten gehören von der mütterlichen Seite ausgehend: der Synzytiotrophoblast, der Zytotrophoblast, die Basallamina des Trophoblasten, Bindegewebe des Zottenstromas, die Basallamina des Kapillarendothels und die Endothelzellen der Zottenkapillaren. Nach dem 4. Schwangerschaftsmonat nimmt die Dichte der Zellen des Zytotrophoblasten graduell und kontinuierlich ab. Zytotrophoblasten sind zum Termin nur noch gelegentlich unter dem Synzytium vorzufinden. Der Aufbau der Blut-Plazenta-Schranke zum Termin ist dann am überwiegenden Teil der Zottenoberfläche wie folgt: Synzytiotrophoblast, verschmolzene Basallaminae des Trophoblasten und des Kapillarendothels und zum Schluss die Endothelzellen der Zottenkapillaren. Gegen Ende der Schwangerschaft liegen die Kapillaren der Terminalzotten weitestgehend direkt am Synzytiotrophoblast eng an. Die Blut-Plazenta-Schranke soll den Gas- und Stoffaustausch kontrollieren. Die Atemgase O² und CO² können frei hindurch diffundieren. Auch das mütterliche Immunglobulin der Klasse IgG, der Antikörper gegen das Rhesus-D-Antigen, Alkohol und einige Infektionserreger (z. B. Röteln, Zytomegalieviren, Toxoplasmen) können die Blut-Plazenta-Schranke passieren. Teilweise geschieht dies auch durch aktiven Rezeptor-vermittelten Transport (z. B. Immunglobuline) [9].

Neben dem Gas- und Stoffaustausch hat die Plazenta auch eine endokrine Funktion. Die Hormone werden vom Synzytiotrophoblasten gesteuert und aktivieren die Mechanismen im Körper, die notwendig für die Schwangerschaft sind. Dazu gehören unter anderem das humane Chorion-Gonadotropin und Gestagene wie Progesteron, die für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft von Bedeutung sind [9].

1.2 IUGR – eine Übersicht

Die intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR – Intrauterine Growth Restriction) ist von großem wissenschaftlichen und klinischen Interesse. Feten mit IUGR haben ein erhöhtes Risiko die Schwangerschaft nicht zu überleben und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Behinderungen [12, 13]. Außerdem haben die Neugeborenen mit IUGR ein lebenslang erhöhtes Gesundheitsrisiko [14], wie zum Beispiel für arterielle Hypertonie, kardiovaskuläre Ereignisse und Nierenerkrankungen [15].

Ungefähr 8% aller Schwangerschaften sind von einer IUGR betroffen [16, 17].

Fetales Wachstum wird bestimmt von Genetik und dem Umfeld aus mütterlichen, fetalen und plazentaren Einflüssen [18]. Wenn das durch die genannten Faktoren vorbestimmte Wachstumspotenzial nicht erreicht werden kann, dann spricht man von einer IUGR.

Laut der allgemein gültigen Definition, wird die Diagnose der intrauterinen Wachstumsretardierung gestellt, wenn die in den Vorsorgeuntersuchungen sonographisch gemessenen fetalen Wachstumsparameter (wie zum Beispiel Femurlänge, Abdomen- oder Kopfumfang) während der ersten Hälfte der Schwangerschaft oberhalb der 10. Wachstumsperzentile waren und dann im weiteren Verlauf unter die 10. Wachstumsperzentile fallen [19]. Folglich bleibt die Plazenta in Schwangerschaften mit IUGR eher klein und das Kind ebenfalls. Was genau der auslösende Mechanismus dieser Wachstumsstörung ist, ist bisher nicht bekannt. Zudem ist auch nicht bekannt, wie sich die IUGR Plazenten strukturell auf mikroskopischer Ebene von den NORM Plazenten unterscheiden. Sind die ersteren nur kleinere NORM Plazenten oder gibt es wesentliche mikroskopisch anatomische Unterschiede zwischen den beiden Plazentatypen?

1.3 Analyse der Architektur des Zottenbaums

Der Zottenbaum der Plazenta mit seiner dreidimensionalen baumartigen Struktur stellt die wesentliche Struktur des Stoffaustausches dar [20, 21]. Eine weit verbreitete qualitative Methode der Klassifizierung dieser Baumstruktur wurde von Kaufmann et al. entwickelt [21, 22]. Hierbei werden die Zotten anhand des Durchmessers und der stromalen Zusammensetzung in Stamm-, Intermediär- und Terminalzotten eingeteilt.

Insbesondere die Intermediär- und Terminalzotten sind stark vaskularisiert. Deswegen werden diese beiden Zottenabschnitte in manchen Studien auch als funktionelle Einheit des Stoffaustausches der Plazenta zusammengefasst [23]. Es wird sogar davon ausgegangen, dass die unzureichende Entwicklung der Terminalzotten Einfluss auf die anderen Gewebe (Trophoblast, Stroma, Kapillaren) der Plazenta hat [24].

Demnach ist die histologische Analyse des Zottenbaums und seiner Abschnitte von essenzieller Bedeutung. Die Herausforderung dabei ist jedoch, dass die histologische Analyse von Zottenabschnitten auf zweidimensionaler Ebene geschieht und dabei nur bedingt Rückschlüsse auf die eigentliche dreidimensionale Struktur des Zottenbaums ermöglicht [25]. Eine Methode, die dreidimensionale Analysen an histologischen zweidimensionalen Schnitten ermöglicht, ist die Stereologie [26, 27]. Bis vor ein paar Jahren galt die histologische Unterteilung anhand scheinbar klar abgrenzbarer Merkmale in Stammzotten, Intermediärzotten und Terminalzotten als verlässlich. Als solche scheinbar klar abgrenzbaren Merkmale wurden die Dichte von Fibrin, die Anwesenheit von Arterien, Arteriolen oder Kapillarnetzen genutzt [21, 22, 28, 29]. Eine zuletzt publizierte Studie zur Validierung dieser Unterteilungen zeigte jedoch, dass die Unterteilung in Stamm-, Intermediär- und Terminalzotten stark untersucherabhängig ist und es zu großen Streuungen kommt [30].

Daher bedient sich diese Studie objektiver Merkmale und nutzt einen Antikörper gegen "γ-smooth-muscle"-Aktin (γ-sm-Aktin), um Zottentypen anhand des Nachweises perivaskulärer Myofibroblasten, die γ-sm-Aktin exprimieren, zu charakterisieren [31, 32]. Dies erlaubt eher eine funktionelle Einteilung des Zottenbaums in längskontraktile Abschnitte mit perivaskulären Myofibroblasten (C-villi) und nicht längskontraktile Abschnitte ohne Myofibroblasten (NC-villi). Diese Einteilung ist aber nicht eins zu eins mit der klassischen dreifachen Einteilung übereinstimmend [30, 33, 34]. Die meisten der C-villi in dieser Studie sind allerdings vom histologischen Typ der Stammzotten.

Die meisten der NC-villi in dieser Studie sind vom histologischen Typ der reifen Intermediär- und Terminalzotten.

1.4 Zur "mikroskopischen Anatomie" des Plazentagewichts

Das Plazentagewicht ist engstens mit vielen Parametern des Plazentawachstums verbunden, unter anderem mit Plazentaoberfläche und Plazentadicke [35]. Diese makroskopisch anatomischen Parameter der Plazenta gehören zu epidemiologischen Routineparametern in Plazentastudien [14, 36, 37] und sind bedeutend in Bezug auf die Veranlagung in Zukunft liegender Krankheiten [38, 39].

Diese Korrelationen der verschiedenen makroskopischen Parameter untereinander sind im Grundsatz gut bekannt. Viel schwieriger ist es, nachzuvollziehen, wie sich die makroskopischen Parameter aus den zugrundliegenden mikroskopischen Strukturen ableiten und mit ihrer mikroskopischen Basisstruktur, dem Zottenbaum, zusammenhängen.

Die nachfolgende Konversation stammt aus dem Buch der Konferenz "The Placenta and Human Developmental Programming" [37], die in Cambridge (UK) stattfand. Sie unterstreicht die Problematik der Korrelation zwischen makroskopischen Parametern (Gewicht, Dicke) und Histologie, bzw. mikroskopischer Anatomie der Plazenta. Unter den Beteiligten war der Epidemiologe David Barker, Gründer des pränatalen Anlage-Konzepts ("prenatal programming"), und Robert Pijnenborg, Graham Burton und Robert Boyd, alle zusammen erfahrene Plazenta-Forscher und Morphologen. Nach einem Vortrag von David Barker begann die Diskussion wie folgt:

Bagby:	Haben wir Informationen zur Histologie der Plazenta im Hinblick
Barker [.]	Ich hahe keine Ahnung []
Boyd:	Hast Du eine Idee, Robert? (zu Robert Pijnenborg)
Pijnenborg:	Nein. []

Woran könnte das liegen?

Es könnte zum Beispiel daran liegen, dass die hohe Streuung bei Anwendung der klassischen Nomenklatur regionale Unterschiede bei der quantitativen Analyse verwischt. Wie aber die Zottenvolumina der in Kapitel 1.3 beschriebenen

Zottenabschnitte mit dem Plazentagewicht bei normalen Plazenten zusammenhängen, hat bisher nur eine jüngst veröffentlichte Studie beschrieben [34]. Die Anteile des Zottenbaums mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten sollen maßgeblich das Plazentagewicht und die Plazentadicke von Schwangerschaften ohne erkennbare Pathologie bestimmen [34].

Dies eröffnet auch für die Reduktion des Plazentagewichts bei IUGR eine neue Perspektive. Die Unterteilung in C-villi und NC-villi hat jedenfalls auf Basis dieser Daten das Potenzial, Subregionen des Zottenbaums zu identifizieren, die bei IUGR bevorzugt fehlen oder nicht gebildet werden.

Diese Studie vertritt ähnlich wie die Studie von Bühlmeyer et al. folgende Hypothese [33, 34]: Der große Gewichtsverlust bei IUGR Plazenten ist ebenfalls mit den C-villi assoziiert und nicht generell über den Zottenbaum verteilt.

1.5 Die Diffusionsdistanz und die Verzweigungsdichte an der Zottenoberfläche sind morphologische Korrelate der Plazentafunktion

In der IUGR sind vor allem im peripheren Zottenbaum typische morphologische Veränderungen bekannt. Diese betreffen den Synzytiotrophoblasten selbst, aber auch die Verzweigungsdichte des Zottenbaums als Ganzes.

Der Synzytiotrophoblast wird als Hauptträger der epithelialen Funktionen verstanden, während der Zytotrophoblast eher als Wachstumsreserve gesehen wird [20, 40]. Der Trophoblast als epitheliales Gewebe besteht aus diesen beiden Untereinheiten. Die Zytotrophoblasten stellen die Proliferationsreserve dar und werden im Laufe ihrer Reifung durch Zyto-Synzytiale Fusion in den Synzytiotrophoblasten einbezogen. Aus dem Synzytiotrophoblasten schilfern dann veraltete Organellen, Zellkerne und Membranen ins maternale Blut ab [20, 40, 41]. Bei IUGR ist die Proliferation des Zytotrophoblasten unverändert, jedoch wurde eine erhöhte Dichte an Zellkernen im Synzytiotrophoblasten bei IUGR hat möglicherweise mit verlängerten Verweilzeiten der ursprünglich aus dem Zytotrophoblasten stammenden Zellelemente im Synzytiotrophoblasten zu tun [43]. Eine wichtige Konsequenz dieser erhöhten Zellkerndichte könnte sein, dass die mittlere Dicke der synzytialen Schicht des

Trophoblasten bei IUGR größer ist als bei normalen Schwangerschaften und die Oberfläche der kernfreien "vasculo-syncytial membrane" [44] insgesamt abnimmt. Bei der sogenannten "vasculo-syncytial membrane" handelt es sich um enganliegende Kapillaren am Synzytium, bei denen die fetomaternale Diffusionsdistanz besonders kurz ist. Diese "vasculo-syncytial-membranes" werden mit dem Gasaustausch der Plazenta in Verbindung gebracht. Ein geringerer Anteil dieser "vasculo-syncytial membrane" verlängert im Mittel die Diffusionsdistanz, die für Atemgase an der Zottenoberfläche durch Diffusion zu überwinden ist [24].

Bei der Verzweigung des peripheren Zottenbaumes in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft werden die dominierenden Angiogenesemechanismen des in den Zotten expandierenden Kapillarbetts als wesentliche Triebkraft der Verzweigung interpretiert [45, 46].

Im Rahmen der Zottenreifung bei IUGR ist bekannt, dass weniger Verzweigungen und längere, gerader verlaufende Zotten in der Peripherie auftreten [47]. Im Rahmen dieser Arbeit haben wir mit einer neuen Methode der "second order" Stereologie versucht, diese abnehmende Verzweigungsdichte des Zottenbaums auch stereologisch nachzuweisen.

Hypothese: In den Zottenbäumen bei IUGR finden wir die erhöhte Diffusionsdistanz und auch die verminderte Verzweigungsdichte wieder und bestätigen – teilweise mit neuer Methodik – ihr Vorkommen.

Dazu führen wir – basierend auf der Unterteilung in C-villi und NC-villi – Bestimmungen der fetomaternalen Diffusionsdistanz an Zottenoberflächen und ein neuartiges "second order" Verfahren der Stereologie zur Abschätzung der Verzweigungsdichte der Zottenbäume durch.

1.6 Die mikroskopische Anatomie menschlicher Plazenten weist Geschlechtsunterschiede auf

Es ist bereits bekannt, dass die Plazenta nicht unabhängig vom Geschlecht gesehen werden kann und der Einfluss des Geschlechts des Fetus auf Wachstum und Überleben bei Untersuchungen der Plazenta mit bedacht werden muss [43, 48, 49].

Eine Studie, die 2004 veröffentlich wurde, geht davon aus, dass männliche Nachkommen einem stärkeren intrauterinen Selektionsdruck ausgesetzt seien. In

Schwangerschaften mit zum Beispiel Präeklampsie, Frühgeburtlichkeit und IUGR hätten männliche Nachkommen ein schlechteres Outcome gezeigt [50].

Das schlechtere Outcome könnte darin begründet sein, dass die männlichen Babys durch ein beschleunigteres Wachstum im Uterus anfälliger sind gegenüber verschiedensten negativen Veränderungen [51]. Proportional zum beschleunigteren Wachstum männlicher Babys ist auch die reife Plazenta im Durchschnitt zu 2% schwerer als die Plazenta weiblicher Babys [52].

Das männliche Geschlecht soll insbesondere bezogen auf die IUGR größere Unterschiede zeigen [53, 54].

Deswegen wurden für den Vergleich von Plazenten aus Schwangerschaften mit IUGR (n=11) gegen die Plazenten aus physiologischen Schwangerschaftsverläufen (n=10) nur die Plazenten von männlichen Neugeborenen ausgesucht (siehe Kapitel 3.1).

Beim Geburtsmodus haben wir uns auf die Sectio geeinigt. Dabei ist zu bedenken, dass das Plazentagewicht im Generellen nach einer Sectio etwas höher ist: Durch die schnellere Entbindung und die fehlende Passage durch den engen Geburtskanal wird das Blut nicht aus den Plazentagefäßen gepresst und somit trägt das in der Plazenta enthaltene Blut zum erhöhten Plazentagewicht bei.

1.7 Ziel

Ziel dieser Arbeit ist:

- Histologisch abgrenzbare Regionen des Zottenbaums zu identifizieren, deren Größenabnahme/Volumenabnahme das reduzierte Plazentagewicht bei IUGR spezifisch widerspiegelt.
- 2. Die Diffusionsdistanz an der Zottenoberfläche verschiedener Abschnitte des Zottenbaums (NORM vs. IUGR) zu ermitteln.
- Die Verzweigungsdichte verschiedener Abschnitte des Zottenbaums (NORM vs. IUGR) mit Hilfe eines neuartigen Verfahrens der "second order" Stereologie zu bestimmen.
- 4. Zu bestimmen, ob der Schaden durch IUGR die gesamte Plazenta strukturell verändert oder sich selektiv in wenigen Arealen der Plazenta widerspiegelt.

2.1 Studienmaterial

Seit 2011 besteht eine Kooperation zwischen der Anatomischen Anstalt und der Geburtshilfestation im Klinikum Dritter Orden (München, Deutschland), wodurch wir täglich die benötigten Plazentaspenden erhalten. Die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität hat der Studie mit den NORM Plazenten unter der Nummer 084-11 und mit den IUGR Plazenten unter der Nummer 478-12 zugestimmt.

Das in dieser Studie untersuchte Studienmaterial besteht aus 36 Plazenten aus Schwangerschaften mit intrauteriner Wachstumsretardierung (intrauterine growth restriction (IUGR): IUGR Hauptgruppe). Um Vergleiche mit Plazenten ohne IUGR zu ermöglichen, wurden 10 Plazenten nach klinisch unauffälliger Schwangerschaft gesammelt (NORM). Bei allen NORM Plazenten wurde darauf geachtet, dass es sich um männliche Neugeborene und eine Geburt durch Sectio Caesarea (Sectio) handelt. Sowohl der Geburtsmodus wie auch das Geschlecht spielen bei hier gemessenen Parametern (Plazentagewicht) oder auch der Schwere der IUGR (Geschlecht) eine Rolle. In der IUGR Hauptgruppe wurden ebenfalls die 11 Plazenten von Neugeborenen ausgewählt, die per Sectio entbunden wurden und männlichen Geschlechts waren (IUGR Auswahlgruppe). Die Diagnose der intrauterinen Wachstumsretardierung wurde gestellt, wenn die in den Vorsorgeuntersuchungen sonographisch gemessenen fetalen Wachstumsparameter (wie zum Beispiel Femurlänge, Abdomen- oder Kopfumfang) während der ersten beiden Trimester oberhalb der 10. Wachstumsperzentile waren und dann im weiteren Verlauf unter die 10. Wachstumsperzentile fielen. Plazenten von Schwangerschaften, bei denen eine Kombination der IUGR mit einer Präeklampsie vorlag, wurden nicht in diese Studie mit einbezogen.

Die 36 IUGR Plazenten wurden in den Zeiträumen 01.01.2013 - 22.11.2013 und 21.01.2014 - 17.08.2014 gesammelt und die 10 NORM Plazenten zwischen dem 05.04.2011 und 27.06.2011.

Es wurden nur Plazenten verwendet, bei denen die Eltern vor der Geburt ausführlich über die Verwendung zu Forschungszwecken aufgeklärt wurden und dieser schriftlich und ausdrücklich zugestimmt haben. Dabei mussten die sprachlichen und psychischen

Voraussetzungen der Eltern vorliegen, um eine eigene Entscheidung zu dieser Erklärung treffen zu können.

Nach Geburt der Neugeborenen wurden die Plazenten mit einer anonymisierten Nummer versehen, in einer Tüte verpackt im Kühlschrank bei 4 - 8°C aufbewahrt bis sie einmal täglich abgeholt wurden und schließlich unter Einhaltung der Kühlkette ins Labor der Anatomischen Anstalt (München, Deutschland) transportiert wurden. Hier erfolgte umgehend die Untersuchung und Bearbeitung der Plazenten.

2.2 Makroskopische Daten

Die Daten zum Hintergrund des Neugeborenen wurden für diese Studie anonymisiert auf einem Begleitschein übermittelt. Hierzu gehörten die klinische Fallgruppe (ob IUGR oder NORM), das Geburtsgewicht (GG) und das Geschlecht des Neugeborenen, das Gestationsalter bei Geburt in Wochen (GA) und der Geburtsmodus (Entbindung vaginal oder per Sectio). Alle anderen Daten wie auch die Ergebnisse der Doppler-Sonographie wurden nicht übermittelt.

Im Labor der Anatomischen Anstalt erfolgte eine genaue Untersuchung und Dokumentation der Beschaffenheit des Organs. Zuallererst wurde die Plazenta mit der Chorionseite unten liegend, der Eingangsnummer und einem handelsüblichen Lineal mithilfe eines Reprostativs fotografiert (Kamera: Power Shot G12, Canon, Krefeld, Deutschland). Dann wurde die Plazenta umgedreht, mit der Chorionseite oben liegend, und das Gewicht der Plazenta (PG) bestimmt (ohne Nabelschnur, die oberhalb der Chorionplatte abgeschnitten wurde, aber mit chorion laeve). Mit dem Geburtsgewicht (GG) und dem Plazentagewicht (PG) konnte die Relation PG/GG (Relation PG/GG) bestimmt werden (siehe Formel 1) [55].

Relation PG/GG: Relation von Plazentagewicht zu Geburtsgewicht des Kindes (Maß für die Abschätzung der Effizienz der Plazenta pro Kindsgewicht)

PG: Plazentagewicht

GG: Geburtsgewicht

Des Weiteren wurden mit einem handelsüblichen Lineal der längste (LD) und der kürzeste Durchmesser (KD) der Plazenta gemessen, wobei der Nabelschnuransatz als Mittelpunkt zu sehen ist. Die Plazentaoberfläche (OF) konnte mit diesen beiden Durchmessern nach Formel 2 berechnet werden [37].

$$OF = \frac{1}{4} \times \pi \times LD \times KD$$
 (Formel 2)

OF: Plazentaoberfläche

LD: längster Plazentadurchmesser

KD: kürzester Plazentadurchmesser

Die Dicke der Plazenta wurde ohne Druck mit einem Ultraschallgerät (Convex ScannerHS 300, Honda Electronics, Tokyo, Japan) nahe der Insertion der Nabelschnur gemessen.

Die klinischen und anatomisch makroskopischen Parameter der Plazenten der verschiedenen Studiengruppen dieser Studie (IUGR Hauptgruppe, IUGR Auswahlgruppe, NORM) sind im Anhang in Tab. 1 - 3 zusammengestellt.

Die Positionen der geplanten Probenentnahme wurden auf der Plazenta markiert und fotografisch festgehalten. Pro Plazenta wurden sechs Gewebeproben aus verschiedenen Arealen der jeweiligen Plazenta entnommen. Dies erfolgte nach dem etablierten "systematic random sampling" (siehe dazu Kapitel 2.3) [43, 56]. Nach der Probenahme aus den Plazenten erfolgte die Fixierung, Einbettung, Herstellung von Paraffinschnitten und ein immunhistochemischer Nachweis (IHC) zur Differenzierung des Zottenbaums (siehe dazu Kapitel 2.4). Die so entstandenen gefärbten Gewebeschnitte wurden anschließend stereologisch ausgewertet (siehe dazu Kapitel 2.5).

2.3 Gewebeentnahme nach dem "systematic random sampling"

Die Gewebeentnahme der Plazenten sollte immer nach einem ähnlichen Prinzip erfolgen, um untersucherunabhängige Daten erheben zu können und die Proben nicht nach persönlichen Präferenzen auszuwählen. Dazu wurde folgendes Vorgehen entwickelt [43, 56]: Die Plazenta wurde mit ihrer Chorionplattenseite nach oben unter einen Projektor Mini-LED LB 936 (SceneLights Technologie, Buggingen, Deutschland) gelegt. Dieser projizierte ein immer gleiches Punkteraster, dessen Umfang etwa der Größe des Tabletts, auf dem die Plazenta lag, entsprach. Beginnend bei dem ersten vollständig auf der Plazenta projizierten Punkt in der linken oberen Ecke wurde der erste Entnahmepunkt mit einem beschrifteten Pin markiert (s. Abb. 1). Diesem Punkt folgend wurde je nach Größe der Plazenta jeder vierte, dritte oder zweite nachfolgende projizierte Punkt mit dem jeweiligen Pin markiert. Dies wurde dann erneut zusammen mit einem handelsüblichen Lineal fotografisch festgehalten (Power Shot G12, Canon, Krefeld, Deutschland). Die Insertion der Nabelschnur wurde mit einem weiteren Pin markiert (s. Abb. 1).



Abbildung 1: Punkteraster zur randomisierten Gewebeentnahme: Die Abbildung zeigt ein schematisiertes Beispiel, in dem die Plazenta grau vor schwarzem Hintergrund dargestellt ist. Über einen LED-Projektor werden helle Lichtpunkt auf die choriale Seite der Plazenta projiziert. Die Entnahmepunkte werden ermittelt, indem der erste Lichtpunkt, der links oben auf die Plazenta fällt, mit einem Pin (grün, bezeichnet mit 1) markiert wird. Von da aus werden die Lichtpunkte im Schema zeilenweise auf der Plazentafläche weiterverfolgt. Jeder vierte Lichtpunkt auf der Plazenta erhält einen weiteren Pin mit aufsteigender Nummerierung. Auf diese Weise wurde die systematisch randomisierte Probeentnahme in dieser Studie implementiert. Die Position der Nabelschnur (Nabelschnurinsertion) wurde mit einem andersfarbigen Pin (rot, Pfeil) markiert. Die nummerierten grünen Punkte sind die Entnahmestellen der Proben 1-6 [57].

Nun wurden die Gewebeproben schließlich an den sechs markierten Stellen mit einer Schere und einer Kantenlänge von 0,5 – 1 cm entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle Strukturen zwischen Basal- und Chorionplatte innerhalb einer Gewebeprobe enthalten sind. Diese wurden dann in Histo-Kassetten für mindestens 24 Stunden bei 4°C in 4,5 %igem Formaldehyd (phosphatgepuffert, pH 7.2; RotiHistofix, #5666.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Das Formaldehyd wurde anschließend mit Leitungswasser für 5 – 6 Stunden wieder ausgespült. Die Gewebeproben innerhalb der Kassetten befanden sich nun in einem wässrigen Milieu. Für die sogenannte Paraffin-Einbettung (Standardverfahren nach Mulisch und Welsch [58, 59]) wurden die Gewebeproben maschinell (Leica ASP2005) über eine aufsteigende Ethanolreihe (vergällt; 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, 100 %; je 3 Stunden) entwässert und über das Intermedium Xylol (#108681, Merck, Darmstadt,

Deutschland) in Paraffin (Paraplast Plus, #76258, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) überführt. Dieses Programm lief über 2 Tage.

Danach wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben per Hand in die benötigte Blockform gebracht. Bei 62°C wurden die Gewebeproben aus der Kassette entfernt und in kleine vorgewärmte Metall-Ausgießförmchen gebettet, in denen ebenfalls flüssiges Paraffin eingefüllt war. Die Ausgießförmchen standen auf einem kalten Untergrund und das Paraffin fing von unten an zu erhärten. Dies ermöglichte die Fixieruna der Gewebeprobe durch leichten Druck auf den Grund des Ausgießförmchens und die Bestimmung der Lage der Gewebeprobe. Die Gewebeprobe sollte seitlich mit ihrer Chorionplatte liegen. Andere Positionsoptimierungen wurden nicht durchgeführt. Auf das Ausgießförmchen wurde noch eine beschriftete Plastik-Kassette gelegt und schließlich der restliche Luftraum mit flüssigem Paraffin aufgefüllt. Der Paraffinblock hatte am Ende folgende Größe: 2,5x1,2x1,8cm.

Nach vollständigem Erkalten und Erhärten des Paraffinblocks mit der Gewebeprobe, wurde der Paraffinblock aus dem Ausgießförmchen geklopft und für das Schneiden bereitgelegt. Dies geschah mithilfe eines Paraffin-Schlittenmikrotoms (SM2000R; Leica, Wetzlar, Deutschland). Es wurden 4µm dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Super-plus-Objektträger (Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland) transferiert und im Brutschrank bei 48°C über Nacht getrocknet. Am Tag darauf konnte nach der Entparaffinierung der Schnitte mit der Färbung bzw. der Immunhistochemie begonnen werden.

2.4 Immunhistochemie der Gewebeschnitte

Die Immunhistochemie der Gewebeproben beinhaltete zwei voneinander unabhängige Färbe-Prozesse, eine etablierte Doppelfärbung [60]. Diese mussten unbedingt getrennt voneinander durchgeführt werden, da bei beiden Schritten ein Maus-Antikörper verwendet wurde. Der erste Schritt beinhaltete die Braunfärbung des Gefäßendothels (CD34-Antikörper) mittels Peroxidase-Reaktion (Diaminobenzidin, DAB) über einen ABC-Komplex. Der zweite Schritt sah die Blaufärbung der perivaskulären Manschette mittels Streptavidin- β -Galactosidase (X-Gal) und dem γ sm-Aktin-Antikörper [31] sowie die Färbung der Zellkerne mit Hämalaun vor.



Abbildung 2: Die immunhistochemische Differenzierung des Zottenbaums. Gezeigt ist der Doppelnachweis von CD34 im Endothel (braun) und der Nachweis von γ-sm-Aktin in perivaskulären Myofibroblasten (blau). Abgebildet sind eine Übersicht eines immunhistochemisch gefärbten Schnittes (A), eine Zotte mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten (B; C-villi) und eine Zotte ohne perivaskuläre stromale Myofibroblasten (C, NC-villi). Die schwarzen Pfeile beschreiben die Gefäßwand, die weißen Pfeile den Trophoblastenrand, welcher das Epithel der Zotten bildet (B, C). Die schwarzen Kreuze liegen im Zottengewebe und die weißen Kreuze im Gefäßlumen (B, C). Der Messbalken in (C) entspricht 25µm in 40facher mikroskopischer Vergrößerung (40x).

Zum ersten Tag der Färbung:

CD34-Antigen ist ein Membranprotein, welches unter anderem von Das Endothelzellen der fetoplazentaren Gefäße exprimiert wird und sich auf deren Zelloberfläche befindet. Die Endothelzellen bilden die Innenauskleidung eines jeden Blutgefäßes, das Endothel. Um eben dieses Endothel markieren und damit auch färben zu können, wurde ein Antikörper gegen das CD34-Protein (1:900 in PBS Puffer; Katalognummer: MS-363-PO; Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland; Visualisierung mit Peroxidase als Markerenzym und DAB-Braun als Farbstoff) verwendet. Der gesamte Prozess des ersten Tages beinhaltete 7 Schritte mit jeweils zwischengeschalteten Spülschritten in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS pH 7,45) (mit Ausnahme nach Schritt 3 nach dem G0S-Blocking: hier wird nicht mit PBS gespült, da sonst der Effekt des G0S-Blocking abgemindert werden würde). Zuallererst wurde der Gewebeschnitt entparaffiniert. Für die Rehydrierung, und damit Entparaffinierung, wurde beginnend mit dem Intermedium Xylol (2x 10 Minuten) eine absteigende Ethanolreihe (100% - 96% - 80% - 70% - 50%) je 3 Minuten durchlaufen bis der Gewebeschnitt schließlich wieder in wässrigem Milieu mit destilliertem Wasser (Aqua destilliert, Aqua dest.) lag. In Schritt 2 wurden endogene Peroxidasen blockiert. Dafür wurde 3% ige H₂O₂-Lösung verwendet. In Schritt 3 wurden die gewebeeigenen Eiweiße blockiert, damit es nicht zu unspezifischen positiv geladenen Hintergrundfärbungen kam. Hierfür wurde eine 5%ige G0S (Ziegen(goat)-0-Serum) verwendet. Nun erst kam es in Schritt 4 zur Verwendung des Primärantikörpers, dem CD34-Maus-Antikörper, der sich spezifisch an das CD34-Antigen im Gefäßendothel

anheftete. Der folgende in Schritt 5 verwendete Sekundärantikörper (ein aus der Ziege gewonnener gegen Maus-Antikörper gerichtete Antikörper; konjugiert mit Biotin) war in der Lage sich an den Primärantikörper zu binden. Der 6te Schritt geschah unter Verwendung eines sogenannten ABC-Komplexes. Dies ist ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichten die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase wurde in Schritt 7 mit dem geeigneten Chromogen, dem DAB, visualisiert. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte in der phosphatgepufferten Kochsalzlösung über Nacht bei 4°C gelagert.

Zum zweiten Tag der Färbung:

Auch hier waren es insgesamt 7 einzelne Schritte, zwischen denen wieder mit einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS pH 7,5) gespült wurde (mit Ausnahme nach Schritt 1 nach dem GOS-Blocking: hier wird nicht mit PBS gespült, da sonst der Effekt des G0S-Blocking abgemindert werden würde). Der höhere pH-Wert war notwendig für den Aktin-Antikörper. Zuallererst wurden hier wieder die gewebeeigenen positiv geladenen Eiweiße blockiert. Dafür wurde das gleiche G0S (Ziegen(goat)-0-Serum) wie schon am ersten Tag der Färbung verwendet. In Schritt 2 wurde der Primärantikörper "gamma-smooth muscle actin" (γ-sm-Aktin) (1:900 in PBS Puffer; Katalognummer: 69133; MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland) eingesetzt, der sich an das Aktin in der perivaskulären Manschette anheftete. In Schritt 3 wurde der biotinylierte Sekundärantikörper hinzugefügt (ein aus der Ziege gewonnener gegen Maus-Antikörper gerichtete Antikörper). Im 4ten Schritt wurde ein konjugierter Streptavidin-β-Galactosidase-Komplex angeboten, der sich an den Sekundärantikörper anheften und durch das Chromogen X-Gal in Schritt 5 visualisiert werden konnte.

In Schritt 6 wurden die Zellkerne mit Hämalaun leicht angefärbt und durch Spülen mit Leitungswasser gebläut, um die histologische Orientierung während der mikroskopischen Messungen zu unterstützen.

Zum Schluss wurden die fertig gefärbten Gewebeschnitte im wässrigen Milieu in Kaisers Glyceringelatine (v. Merck) eingedeckt und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Ränder der Deckgläser mit handelsüblichem Nagellack abgedichtet, damit die Gewebeschnitte nicht austrockneten. Weil die Kaisers

Glyceringelatine bei Raumtemperatur gerade erst fest wird, wurden die Gewebeschnitte bis zu ihrer stereologischen Untersuchung im Kühlschrank bei 2° - 8°C aufbewahrt.

2.5 Stereologische Analyse

Die stereologischen Messungen wurden an computergesteuerten Mikroskopen durchgeführt, welche den Objekttisch unter dem Objektiv in x und y Richtung bewegen können. Damit dies stets präzise und mit hoher Genauigkeit umgesetzt werden konnte, wurden diese Vorgänge mit dem Computer und der dort installierten Stereologie-Software kalibriert. Durch die Software (Stereo Investigator Software Version 11.02, MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA) war es möglich, jeden beliebigen Punkt auf dem Objektträger genau anzufahren. Das mikroskopische Bild vom Objektträger wurde von einer Kamera direkt zum Monitor des kontrollierenden Computersystems gesendet, wo es mit Messgittern, Markern und Messpunkten gemäß den Vorgaben der Software überlagert und später abgespeichert werden konnte.

Es wurden folgende unterschiedliche mikroskopische Arbeitsplätze verwendet:

1) Lichtmikroskop Axioskop mit feinkalibrierbarem Revolver (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), Objektive (1,25x / 0,035; 40x / 0,75) (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), Steuereinheit LEP MAC 6000 XYZ (Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY USA), Messtaster MT 1271 (Dr. Johannes Heidenhain, Traunreut, Deutschland) und Kamera CCD-Color (3/4" CCD chip,1,92 MP, 1600x1200 Pixel, MBF Bioscience, Williston, VT, USA)

2) Lichtmikroskop BX50 (Olympus, Tokyo, Japan) mit motorisiertem XYZ Probenteller (MBF Bioscience, Williston, VT, USA), Objektive (1,25x / 0,035; 40x / 0,75) (Olympus, Tokyo, Japan), Steuereinheit LEP MAC 6000 XYZ, Messtaster MT 1271 und Digitalkamera (1/2" CCD Chip, 1392x1040 Pixel, MBF Bioscience, Williston, VT, USA)

Die Computer zur Steuerung der Mikroskope waren unter MS Windows 7 konfiguriert und nutzten die Software Stereo Investigator Version 11.02. Pro entnommenem Gewebeblock wurde ein Schnitt stereologisch analysiert (46 Plazenten mit je 6 Schnitten; d.h. es wurden 276 stereologische Messvorgänge durchgeführt).

Die Bearbeitung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte mithilfe des Stereo-Investigators hatte folgende Reihenfolge: Zuerst wurde der Schnitt auf dem Objekttisch

mit einer Klemme fixiert. Im Stereo-Investigator wurde das Objekt in 2-facher Objektiv-Vergrößerung scharf fokussiert und ein Reference-Point festgelegt, meist vom Bildschirm aus gesehen im rechten oberen Rand nahe der Chorionplatte. Der Reference-Point wurde mithilfe eines Screenshots festgehalten und abgespeichert. Danach erfolgte die Umrandung des gesamten Schnitts, um den Bereich für die anschließende Messung festzulegen. Als nächstes wurde die Vergrößerung auf die 40-fache Objektiv-Vergrößerung heraufgesetzt, der Kondensator eingesetzt, neu fokussiert und der Zählrahmen festgelegt. Dann wurde das Tool für die Messung (Nearest Neighbor) gestartet, welches untersucherunabhängig die automatisch festgelegten Messfelder, welche einen Abstand von 500µm zueinander haben, mit einem Zählrahmen ansteuert. Der Zählrahmen, siehe dazu Abbildung 2, betrug vertikal 100µm und horizontal 50 µm. Ausgehend von der durch die rechte obere Ecke des Zählrahmens im Präparat getroffenen Struktur musste nun bewertet werden, welche spezielle Kombination vorliegt und der entsprechende Marker ausgewählt werden. Es wurde unterschieden zwischen Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten und ohne perivaskuläre stromale Myofibroblasten, und zwischen konvexen und konkaven Anteilen der Zottenoberfläche. Wie bereits in Kapitel 1.5 angedeutet, besteht die Hypothese, dass ein konkaver Verlauf im zweidimensionalen Schnitt einer Aufzweigungsstelle des Zottenbaumes in der dreidimensionalen Ebene entsprechen kann und somit die Anzahl an konkaven Zottenoberflächen ein Hinweis auf die Anzahl an Verzweigungen des Zottenbaumes sein kann.



Abbildung 3: Die "Nearest-Neighbor" Analyse der Plazentazotten. Wenn der Zählrahmen mit seiner grünen rechten oberen Ecke (markiert durch einen schwarzen Kreis) innerhalb einer Zotte liegt (A), bedeutet das, dass hier die Diffusionsdistanz vom Gefäßrand bis zum nächstgelegenen Trophoblastenrand (Zottenoberfläche) ermittelt werden kann. Dafür wird der Punkt an der Schnittstelle der vertikalen grünen Linie des Zählrahmens mit der Zottenoberfläche herangezogen (B). An diesem Schnittpunkt wird mit Hilfe der Nearest Neighbor Routine des Messprogramms ein Kreis geöffnet. Der Kreis wird so lange vergrößert, bis sein Umfang gerade die nächstgelegene Gefäßwand erreicht. Der Radius dieses Kreises ist die Diffusionsdistanz an dieser Stelle. An derselben Stelle der Zottenoberfläche, an der die Diffusionsdistanz ermittelt wird, wird auch der Verzweigungsindex bestimmt (siehe dazu Abb. 4). Der Messbalken in (B) entspricht 25µm in 40facher mikroskopischer Vergrößerung in (A) und (B).

Fiel die rechte obere Ecke des Zählrahmens in einen Zottenanschnitt, wurde eine Messung durchgeführt (Abbildung 3). Dabei wurde nach Auswahl des richtigen Markers der erste Punkt am Rand des Trophoblasten gewählt, an der die rechte grüne Seite des Zählrahmens (Abbildung 3A) den Zottenanschnitt über den Trophoblasten verließ. Der zweite Punkt wurde am Rand des kindlichen Gefäßes im Zottengewebe angeklickt. Durch begleitende Bildung eines Kreises (Abb. 3B; "Nearest Neighbor"-Verfahren) konnte stets die kürzeste Strecke zwischen Trophoblastoberfläche und endothelialer Oberfläche gefunden werden. So wurde die Diffusionsdistanz des Sauerstoffs vom mütterlichen Blut zum fetalen Blut gemessen. Lag die rechte obere Ecke als Zählrahmens außerhalb der Zotte oder im Fibrinoid, wurde die rechte obere Ecke als Zählpunkt für die Volumenbestimmung genutzt, aber die Diffusionsdistanz nicht gemessen und zum nächsten Messfeld geklickt. Lag die obere rechte Ecke des Zählrahmens sowie die Messstrecke des Zählrahmens komplett innerhalb einer Zotte, wurde dies auf einer Strichliste dokumentiert, einmal für Zotten mit perivaskulären

stromalen Myofibroblasten, also zentrale Zottenbereiche, und einmal für Zotten ohne perivaskuläre stromale Myofibroblasten, also periphere Zottenbereiche. Nachdem die Messung abgeschlossen war, wurden die vom Nearest Neighbor erfassten Daten sowie die Daten der Strichliste in Excel exportiert.

Die zusätzliche Bestimmung der Konkavität des Zottenrandes (Trophoblast) ist exemplarisch in Abbildung 4 gezeigt. Dabei wurde eine virtuelle Linie entlang der zu bestimmenden Struktur gelegt und geschaut, ob die Linie, die im Zottengewebe liegt, einer konkaven Form entspricht, oder ob die Linie, die außerhalb der zu bestimmenden Struktur liegt, einer geraden oder konvexen Form entsprach.



Abbildung 4: Bestimmung des Verzweigungsindex. An genau denselben Stellen der Zottenoberfläche, die während der Messroutine für die Bestimmung der Diffusionsdistanz herangezogen wurden (zur Ermittlung dieser Stellen s. Abb. 3), wurde auch der Verzweigungsindex bestimmt. Dabei wird beurteilt, ob die Zottenoberfläche an diesem Punkt nach außen konvex oder gerade ist, oder aber ob sie nach innen konkav eingebogen ist. In der Abbildung sind beispielhaft zwei Stellen dargestellt. Mittels einer Hilfslinie am Messpunkt wird die Oberfläche bezüglich ihrer Krümmungscharakteristik beurteilt. Im Verzweigungsindex wird der Prozentsatz der Punkte an konkaven Oberflächen in Relation zu allen Punkten an konvexen oder linearen Oberflächen ermittelt. Der Messbalken am rechten unteren Bildrand entspricht 25µm.

2.6 Statistische Analyse

Über Formel 3 wurde aus den Rohdaten der stereologischen Untersuchung das absolute Volumen des entsprechenden Markers pro Schnitt berechnet. Dafür wurde das Plazentagewicht der jeweiligen Plazenta in die Kalkulation einbezogen. Es wurde eine Dichte der Plazenta von 1 g/ml angenommen [61].

$$MV = (CM/CG \times PG \times 100) / \rho(P)$$
 (Formel 3)

MV = Volumen des Markers [ml]

CM = "Counts" des Markes

CG = Gesamtanzahl "Counts" des Schnittes

PG = Plazentagewicht [g]

 $\rho(P)$ = Dichte der Plazenta [g/ml]; hier als 1 g/ml gesetzt

Für Vergleiche mikroskopischer Parameter untereinander und für Vergleiche von mikroskopischen mit makroskopischen Parametern, wurden für die einzelnen Marker die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Volumina der sechs Schnitte einer Plazenta gebildet (s. dazu Tabellen 1 – 6 im Anhang).

Bei allen hier untersuchten Parametern wurden Mittelwerte und Standardabweichungen mit Hilfe der Software R ermittelt. Aufgrund der Annahme nicht-normalverteilter Daten [62] und weil die Normalverteilung mit Hilfe der multiparametrischen Form des Shapiro-Wilk Tests nicht bestätigt werden konnte, wurde mit diesen Mittelwerten eine multiple bivariate Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt und graphisch als Musteranalyse ausgewertet. Bei der graphischen Auswertung wurden die Parameter mit Hilfe des Clustering-Algorithmus (hclust, R) so angeordnet, dass sich Korrelationscluster in einer Heatmap besser erkennen lassen. Die multiple bivariate Korrelationsanalyse erfolgte mit der Software R mit den Packages "psych" [63] und "car" [64]. Lineare Regressionsanalysen ausgewählter Parameter wurden mit GraphPad Prism (Version 5.04, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Paarweise Vergleiche einzelner Parameter zwischen den Gruppen (IUGR Auswahlgruppe mit NORM) wurden mit R ausgewertet (Mann-Whitney Test und Tukey Plots). Signifikanzlevel der jeweiligen statistischen Tests werden als p < 0.05, p < 0.01, p < 0.001; p < 0.0001 angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich zwischen Plazenten der IUGR Auswahlgruppe und der NORM Gruppe

Für den Vergleich von Plazenten aus Schwangerschaften mit IUGR (n=11) und von Plazenten aus Schwangerschaften ohne erkennbare Pathologie (NORM) (n=10) wurden nur die Plazenten von männlichen Neugeborenen ausgesucht, die per Sectio geboren worden waren (Erklärung dafür siehe Kapitel 1.6). Dieser Vergleich ist in den Abbildungen 5 - 8 zu sehen.

In IUGR Plazenten war das durchschnittliche Volumen der C-villi signifikant kleiner (p<0,0001) als in NORM Plazenten (Abb. 5). Bei den NC-villi tritt kein signifikanter Unterschied des Zottenvolumens zwischen IUGR und NORM Plazenten auf.

Qualitativ histologisch fanden sich in den C-villi der IUGR Plazenten keine auffälligen Besonderheiten (reduzierte Kaliber, Verlängerungen, apoptotische Veränderungen, Nekrosen, veränderte Gefäßarchitektur, etc.), die auf eine entzündliche oder degenerative Erklärung für das reduzierte Volumen der C-villi hinweisen würden.

Die Gefäßvolumina in Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten (Gefäße in C-villi; p<0,0001) und in Zotten ohne perivaskuläre stromale Myofibroblasten (Gefäße in NC-villi; p<0,01) sind beide signifikant niedriger in IUGR als in NORM Plazenten (Abb. 5).

Die Bestimmung des relativen Anteils konkaver Zottenoberflächen im histologischen Schnitt wird hier als Indikator für die Verzweigungsdichte des Zottenbaums verwendet und ist deswegen als durchschnittlicher Verzweigungsindex (Verzweigungsindex) bezeichnet worden. Sowohl in den Abschnitten des Zottenbaumes mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten (C-villi; p<0,01) als auch in den Abschnitten des Zottenbaumes ohne perivaskuläre stromale Myofibroblasten (NC-villi; p<0,0001) ist der Verzweigungsindex in IUGR Plazenten signifikant niedriger als in NORM Plazenten (Abb. 5).

Die Diffusionsdistanzen an der Oberfläche von Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten (C-villi Diff. Dist.; p<0,05) und an der Oberfläche von Zotten ohne perivaskuläre stromale Myofibroblasten (NC-villi Diff. Dist.; p<0,001) sind beide

signifikant länger in IUGR als in NORM Plazenten (Abb. 5). Die Standardabweichung der Diffusionsdistanz in NC-villi war signifikant größer (NC-villi SD (Diff. Dist.); p<0,01) in IUGR als in NORM Plazenten; die Standardabweichung der Diffusionsdistanz in C-villi (C-villi SD (Diff. Dist.)) war nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 5).



Abbildung 5: Zusammenschau der wichtigsten Befunde. In den dargestellten Tukey plots sind die Mittelwerte als große schwarze Dots und die Einzeldaten als blaue Punkte dargestellt. Ausreißer stellen sich als kleine schwarze Dots dar. Die Ergebnisse der statistischen Tests (Mann-Whitney U Test) sind in Rot unterhalb der Titelregion jedes Teilplots dargestellt (p>0.05 (ns, nicht signifikant), p<0.05(*), p<0.01 (**), p<0.001 (***), und p<0.0001 (****)). Die Bezeichnungen der klinischen Fallgruppen (IUGR und NORM) sind sowohl auf der X-Achse angezeigt wie auch farbkodiert im Graphen selbst (orange Balken für IUGR. hellblaue Balken für NORM). Abkürzungen: C-villi: Zotten mit perivaskulären stromalen Mvofibroblasten: NC-villi: Zotten ohne perivaskuläre stromale Mvofibroblasten: SD: Standardabweichung. In den Tukey plots sind folgende Parameter dargestellt: die absoluten Volumina [ml] von C-villi und NC-villi, außerdem das absolute Gefäßvolumen [ml] aus den C-villi und NC-villi, der durchschnittliche Verzweigungsindex (eine dimensionslose Zahl, die den konkaven Anteil der Zottenoberfläche von angeschnittenen Zotten widerspiegelt) und die Diffusionsdistanz [µm] als die kürzeste Strecke zwischen Oberfläche des villösen Trophoblasten und der nächstgelegenen endothelialen Oberfläche mit ihrer jeweiligen Standardabweichung.

Die semiquantitative Musteranalyse (Abb. 6) zeigt, dass eine Vielzahl der bestimmten Parameter in IUGR Plazenten im Vergleich zu NORM Plazenten verändert sind. In den meisten Fällen sind die Parameter bei IUGR Plazenten kleiner als in NORM Plazenten: Frühgeburtlichkeit (vermindertes Gestationsalter), vermindertes Geburtsgewicht, vermindertes Plazentagewicht, leicht verminderte Relation von Plazentagewicht zu Geburtsgewicht, vermindertes Volumen des Zottenbaums und des intervillösen Raums. All dies sind typische Kennzeichen des IUGR-Syndroms.

Als Ausnahme davon müssen die Diffusionsdistanzen an der Zottenoberfläche und ihre Standardabweichungen (beide größer in IUGR, s. auch Abb. 5) betrachtet werden. Diese sind im Gegensatz zu den anderen Parametern nicht vermindert, sondern größer als die der NORM Plazenten.

Die Analyse dokumentiert, dass in den IUGR Plazenten eine breite Störung der Morphologie vorliegt, die viele Parameter der plazentaren Struktur erfasst hat.



Abbildung 6: "Radar charts" zur semiquantitativen Musteranalyse. Hier sind sogenannte "radar charts" relevanter Parameter zu einem Gesamt-Diagramm zusammengestellt. Alle Parameter sind auf radialen Achsen nach Normierung auf einer Normalskala zwischen null und eins dargestellt. Der Mittelpunkt der "charts" repräsentiert den Ursprung (null), und die Parameter-Achsen projizieren radial nach außen (eins). Die Namen der Parameter sind pro Achse am äußeren Rand des Diagramms an den Endpunkten der Achsen dargestellt. Auf den Achsen sind die jeweiligen Gruppen-Mittelwerte (große Dots) für IUGR (orange) und normale Plazenten (NORM, hellblau) als Overlays aufgetragen. Diese Art der Abbildung eignet sich insbesondere für die Vergleiche von Mustern.



Abbildung 7: Bivariate multiparametrische Korrelationsanalysen: IUGR versus NORM. Die Abbildung ist eine Heatmap, welche die Korrelationskoeffizienten darstellt, die sich aus den multiplen bivariaten Korrelationsanalysen der Parameter jeweils innerhalb der beiden Gruppe IUGR und NORM ergeben haben. Das Farbmaß auf der rechten Seite der Heatmap zeigt die Farbskala für die Korrelationsfaktoren zwischen -1 (rot) und +1 (blau), die nach dem Verfahren von Spearman ermittelt wurden. Die Bezeichnungen der Parameter sind in voller Länge auf der linken Seite und über der Heatmap zu lesen. Größe und Farbe der Kreise in den Kästchen der Heatmap deuten auf die Stärke der Korrelation hin. Selbst-Korrelationen in der Diagonale sind grau. Unter der Diagonalen (links unten, hellblauer Hintergrund) sind die Daten der NORM Plazenten dargestellt. Oberhalb der Diagonalen (rechts oben, hellroter Hintergrund) sind die Daten der IUGR Auswahlgruppe dargestellt. Die Reihenfolge der dargestellten Parameter wurden nach einem hierarchischen Cluster-Algorithmus in R (hclust) optimiert, auf Basis der NORM-Daten. Die Clusterung hebt Korrelationsmuster durch die Anordnung der Parameter hervor. Die IUGR Daten sind ebenfalls nach der in der NORM Gruppe ermittelten dargestellt. Die Graphik zeigt, dass die in NORM Plazenten auffindbaren Reihenfolge Korrelationscluster in der IUGR zu einem erheblichen Maße nicht mehr wiedergefunden werden können und weist auf das Vorhandensein einer weitreichenden Störung der plazentaren Entwicklung hin.

Aufbauend semiquantitativen auf der Analyse wurden auch bivariate multiparametrische Korrelationsanalysen durchgeführt und die Muster der Interdependenz verschiedener morphologischer Parameter bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind für die IUGR Vergleichsgruppe und die NORM Plazenten in Abb. 7 zusammengestellt. Die Anordnung der Parameter auf den Achsen wurde so optimiert, dass Korrelationscluster bevorzugt nebeneinander abgebildet werden. Die Cluster-Analyse für diese Reihenfolge wurde auf Basis der NORM Gruppe ermittelt, die IUGR Gruppe wurde dann in der gleichen Reihenfolge abgebildet. Abb. 7 zeigt, dass die in NORM Plazenten vielfältig vorhandenen Bezüge zwischen verschiedenen Parametern in den IUGR Plazenten verändert sind und sich dort nicht in der für NORM Plazenten abgebildeten Weise wiederfinden.

Zur Validierung der hier untersuchten Plazenten und der geburtshilflichen Diagnosen wurden geburtshilfliche Grundparameter und makroskopische Plazentadaten sowie die nicht nach C-villi und NC-villi unterschiedenen Daten des gesamten Zottenbaumes verwendet. In diesen Daten bestätigen sich statistisch signifikante Kennzeichen des IUGR Syndroms (Frühgeburtlichkeit bei IUGR, vermindertes Plazentagewicht und vermindertes Geburtsgewicht bei IUGR, vermindertes Volumen des intervillösen Raums und des Zottenbaums bei IUGR: Abb. 8).



Abbildung 8: Klinische und anatomische Kenngrößen im Vergleich. Die Abbildung zeigt Tukey plots klinischer Kerndaten sowie wichtiger makroskopisch-anatomischer und histologischer Parameter (Geburtsgewicht, Gestationsalter bei Geburt, Volumen des intervillösen Raums (IVR), Plazentagewicht, der Quotient von Plazentagewicht zu Geburtsgewicht (Plazenta/ Fetus Gewichtsrelation), und das Gesamtzottenvolumen (Volumen Zottenbaum)). Die Mittelwerte sind als große schwarze Punkte, Ausreißer als kleine schwarze Dots, und die individuellen Daten als Dots in blauer Farbe zu den Tukey Plots hinzugefügt. Die Ergebnisse der statistischen Tests (Mann-Whitney U Test) sind in Rot unterhalb der Titelregion jedes Teilplots dargestellt (p>0.05 (ns, nicht signifikant), p<0.05(*), p<0.01 (**), p<0.001 (***), und p<0.0001 (****)). Die Bezeichnungen der klinischen Fallgruppen (IUGR und NORM) sind sowohl auf der X-Achse angezeigt wie auch farbkodiert im Graphen selbst (orange Balken für IUGR, hellblaue Balken für NORM). Bezeichnungen und Einheiten der jeweiligen Parameter sind in den Titelmarkierungen über den Graphiken zu lesen.

3.2 Analyse der IUGR Hauptgruppe



3.2.1 Bivariate multiparametrische Korrelationsanalyse

Abbildung 9: Bivariate multiparametrische Korrelationsanalyse der IUGR Hauptgruppe. Die Abbildung ist eine Heatmap, welche die Korrelationskoeffizienten darstellt, die sich aus den bivariaten multiplen Korrelationsanalysen der Parameter innerhalb IUGR Hauptgruppe ergeben haben. Das Farbmaß auf der rechten Seite der Heatmap zeigt die Farbskala für die Korrelationsfaktoren zwischen -1 (rot) und +1 (blau), die nach dem Verfahren von Spearman ermittelt wurden. Die Bezeichnungen der Parameter sind in voller Länge auf der linken Seite und über der Heatmap zu lesen. Größe und Farbe der Kreise in den Kästchen der Heatmap deuten auf die Stärke der Korrelation hin. Selbst-Korrelationen in der Diagonale sind grau. Unter der Diagonalen (links unten, hellroter Hintergrund) sind die Daten der IUGR Hauptgruppe dargestellt. Die Reihenfolge der dargestellten Parameter wurde nach einem hierarchischem Cluster-Algorithmus in R (hclust) optimiert, auf Basis der IUGR Hauptgruppe. Die Clusterung hebt Korrelationsmuster durch die Anordnung der Parameter hervor.

Abbildung 9 zeigt die bivariate multiparametrische Korrelationsanalyse der Parameter der IUGR-Hauptgruppe. Auch hier wurde, ähnlich wie in Abb. 7 die Reihenfolge der Parameter durch eine Cluster-Analyse (hier: der IUGR-Hauptgruppe) so optimiert, dass sich Korrelationscluster in Gruppen anordnen. Die Abbildung bestätigt den Verlust der in NORM Plazenten breit visualisierbaren Korrelationscluster (s. Abb. 7) in IUGR Plazenten.

3.2.2 Analyse ausgewählter Korrelationen von mikroskopischen und makroskopischen Parametern

Korrelation des Plazentagewichts mit den Zottenvolumina

In der linearen Regressionsanalyse zeigt sich ein signifikant positiver linearer Zusammenhang zwischen dem Plazentagewicht und dem Volumen der C-villi (Abb. 10A, p<0,01) sowie dem Volumen der NC-villi (Abb. 10C, p<0,0001). Nur das Volumen der Gefäße in NC-villi (Abb. 10D, p<0,0001) korreliert signifikant positiv mit dem Plazentagewicht, nicht das Volumen der Gefäße in C-villi (Abb. 10B).



Abbildung 10: Korrelationen des Plazentagewichts der Plazenten der IUGR Hauptgruppe mit absoluten Zottenvolumina [ml] (A, C) getrennt nach C-villi (A) und NC-villi (C) und mit den korrespondierenden Gefäßvolumina [ml] (B,D) der C-villi (B) und NC-villi (D). p-Wert (Steigung der Regressionsgerade signifikant verschieden von null), R² (Maß der Streuung) und F (Beurteilung der Varianz) der Regressionsanalysen ist oben links in den signifikant positiven Graphiken der Abbildungen A, C und D zu sehen.

Korrelation der Plazentadicke mit den Zottenvolumina

In der linearen Regressionsanalyse zeigt sich ein signifikant positiver linearer Zusammenhang zwischen der Plazentadicke und dem Volumen der C-villi (Abb. 11A, p<0,05) sowie dem Volumen der NC-villi (Abb. 11C, p<0,01). Nur das Volumen der Gefäße in NC-villi (Abb. 11D, p<0,01) korreliert signifikant positiv mit der Plazentadicke, nicht das Volumen der Gefäße in C-villi (Abb. 11B).



Abbildung 11: Korrelationen der Plazentadicke der Plazenten der IUGR Hauptgruppe mit absoluten Zottenvolumina [ml] (A,C) getrennt nach C-villi (A) und NC-villi (C) und mit den korrespondierenden Gefäßvolumina [ml] (B,D) der C-villi (B) und NC-villi (D). P-Wert (Steigung signifikant verschieden von 0), R² (Maß der Streuung) und F (Beurteilung der Varianz) der Regressionsanalysen ist oben links in den signifikant positiven Graphiken der Abbildungen A, C und D zu sehen.

Korrelation des Geburtsgewichts mit den Zottenvolumina

In der linearen Regressionsanalyse zeigt sich ein signifikant positiver linearer Zusammenhang zwischen dem Geburtsgewicht und dem Volumen der C-villi (Abb. 12A, p<0,05) sowie dem Volumen der NC-villi (Abb. 12B, p<0,05).



Abbildung 12: Korrelationen des Geburtsgewichts der Plazenten der IUGR Hauptgruppe mit absoluten Zottenvolumina [ml] (A, B) getrennt nach C-villi (A) und NC-villi (B). P-Wert (Steigung signifikant verschieden von 0), R² (Maß der Streuung) und F (Beurteilung der Varianz) der Regressionsanalysen ist oben links in den signifikant positiven Graphiken der Abbildungen A und B zu sehen.

3.2.3 Analyse von mikroskopischen Parametern: Korrelation der Diffusionsdistanzen zwischen C- und NC-villi

Die durchschnittliche Diffusionsdistanz in Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten (Diffusionsdistanz in NC-villi) korreliert signifikant positiv mit der durchschnittlichen Diffusionsdistanz in Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten (Diffusionsdistanz in C-villi), s. Abb. 13.



Abbildung 13: Korrelation der durchschnittlichen Diffusionsdistanz [µm] (Trophoblastenoberfläche bis Endotheloberfläche) an Zottenoberflächen von C-villi (Y-Achse) und NC-villi (X-Achse) der Plazenten der IUGR Hauptgruppe. P-Wert (Steigung signifikant verschieden von 0), R² (Maß der Streuung) und F (Beurteilung der Varianz) der Regressionsanalyse ist oben links zu sehen.

Das heißt, je länger die durchschnittliche Diffusionsdistanz in Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten ist, desto länger ist ebenfalls die Diffusionsdistanz in Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten.

4 Diskussion

4.1 Die wichtigsten Ergebnisse

Die vorliegende Studie macht deutlich, dass das Plazentagewicht von IUGR Plazenten hauptsächlich durch das verminderte Volumen der zentral gelegenen C-villi bestimmt wird (s. Abb. 5 und 10 A, C). Diese Erkenntnis widerspricht der Erwartung einer generellen, topologisch und morphologisch gleichförmigen Wachstumsretardierung des Zottenbaums in IUGR Plazenten. Die IUGR Plazenten sind damit nicht nur verkleinerte NORM Plazenten mit pathologischem peripheren Zottenbaum, sondern entwicklungsbedingt, morphologisch und damit auch funktionell alteriert. Die simultan Parameter umfassende und breit gefächerte morphologische viele und entwicklungsbedingte Störung in den IUGR Plazenten wird in Darstellungen in Abb. 6 und Abb. 7 deutlich.

Das verminderte Volumen von C-villi als die hauptsächliche mikroskopische Begründung des verminderten Plazentagewichts könnte ein spezifischer Faktor der Histopathologie der IUGR Plazenten sein. Die anderen großen Syndrome in der Geburtshilfe haben epidemiologisch einen anderen Bezug zum Plazentagewicht als die IUGR (Präeklampsie [65, 66] und Gestationsdiabetes [67]). Die strikte Verbindung zwischen reduziertem Plazentagewicht und klinischem Syndrom ist bei der Präeklampsie nicht deutlich [65, 66] und bei Plazenten nach Gestationsdiabetes ist das Gewicht sogar im Mittel erhöht [67].

Die Zottenvolumina und die darin liegenden Gefäßvolumina von C-villi schienen verhältnismäßig gleichförmig verkleinert zu sein (s. Abb. 5). Dieser Strukturverlust lässt sich allerdings nicht durch Untergang bereits gebildeter Zotten erklären, da keine morphologischen Veränderungen existierender C-villi festgestellt werden konnten. Das auf dieser Basis – zu wenig Volumen der C-villi – reduzierte Plazentagewicht lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass das fehlende Volumen der C-villi zu Zotten gehört, die in IUGR Plazenten nie gebildet wurden.

4.2 Vergleich der IUGR Auswahlgruppe mit der NORM Gruppe

4.2.1 C-villi: Struktur und Funktion

In dieser Studie werden unter dem Begriff der C-villi alle Zottenabschnitte zusammengefasst, die in ihrer perivaskulären stromalen Manschette Myofibroblasten lokalisiert haben, in denen y-sm-Aktin nachgewiesen werden konnte. Die Myofibroblasten bilden die sogenannte perivaskuläre kontraktile Manschette [31, 32, 68–71]. Diese Myofibroblasten können in dichten Lagen in der perivaskulären Manschette vorkommen, oder schmale perivaskuläre Zonen bilden bzw. nur als einzelne Myofibroblasten perivaskulär auftauchen. Diese zelluläre Ausdünnung der Manschette schreitet von zentral zu den peripheren Zotten hin fort. Die Definition der C-villi geht somit über die klassische Definition der Stammzotten hinaus (s. auch Kapitel 4.4). Um die Ergebnisse aber vor dem Hintergrund bestehender Veröffentlichungen diskutieren zu können, wird die klassische Einteilung des Zottenbaumes (Stammzotten (reif und unreif), Intermediärzotten und Terminalzotten) trotzdem zwischenzeitlich in dieser Diskussion benutzt. Die Stammzotten repräsentieren den wichtigsten Zottentyp Begriff C-villi der unter dem zusammengefassten Zotten.

Durch die präkapilläre Lage der Gefäße in C-villi mit ihrer perivaskulären kontraktilen Manschette spielen sie als Widerstandsgefäße potenziell eine große Rolle. Das verminderte durchschnittliche Volumen der C-villi und die damit gleichzeitige durchschnittliche Verminderung der Gefäße in C-villi könnten somit dazu beitragen, dass der fetoplazentare Gefäßwiderstand in der IUGR steigt [72] (siehe Kapitel 4.2.2). Die perivaskuläre kontraktile Manschette ist nur bei der menschlichen Plazenta konkret beschrieben [68], wurde aber auch hier bisher nur wenig untersucht [31, 32, 71]. Das Vorkommen der IUGR beim Menschen (aber nicht bei gesunden, unmanipulierten Labornagern, beispielsweise Maus und Ratte) könnte daher auch mit der An- oder Abwesenheit des Zottenbaums und seiner kontraktilen Manschette zu tun haben. Das wirft Fragen auf, die die Validität von plazentaren Tiermodellen der IUGR in Labornagern betreffen.

4.2.2 Widerstand im fetalen plazentaren Kreislauf und Zottenreifung

Widerstand im fetalen plazentaren Kreislauf

Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, hat die perivaskuläre kontraktile Manschette der C-Einfluss auf die villi möglicherweise großen Regulierung des fetalen Gefäßwiderstands. Im Gegensatz zu der zirkulären Media der muskulären Arterien [73] verläuft die kontraktile Manschette der plazentaren C-villi parallel zum Blutfluss und liegt außerhalb der regulär ausgebildeten zirkulären Media [20]. Die kontraktile Manschette kann damit nicht unmittelbar den Gefäßdurchmesser verändern, wohl aber die Wandspannung des Gefäßes. Dass isometrische Kontraktionen der perivaskulären Manschette möglich sind und vorkommen, wurde von Frau Dr. Graf [69-71] gezeigt. Damit ergeben sich logischerweise andere biomechanische Konsequenzen der Kontraktion dieser Manschette als bei Kontraktion typischer Myozyten der arteriellen Media anderer Organe unseres Körpers:

Bei Kontraktion der perivaskulären Myofibroblasten der C-villi

- wird die Wandspannung der C-villi im Bereich der Längsachse des Gefäßes erhöht,
- 2) die Längsachse des betroffenen Gefäßabschnittes verkürzt und
- 3) dadurch die Form und Größe der intervillösen Poren indirekt verändert.

Weitere nachgeschaltete physiologische Effekte durch eine solche Kontraktion können dann sein:

- Schutz der Gefäße in C-villi (durch die erhöhte Wandspannung) vor Kollaps/Einengung, die von pulssynchronen Druckfluktuationen im intervillösen Raum ausgelöst werden könnten,
- die Feinmodulation des fetoplazentaren Widerstands durch Anpassung der Gefäßlänge, oder
- Anpassung des maternalen-plazentaren Flusswiderstands im intervillösen Raum durch Weitung oder Verengung der intervillösen Poren.

Die genannten Überlegungen können bedeuten, dass der Abfall des fetoplazentaren Gefäßwiderstands in klinisch normalen Plazenten [74] eher durch die entwicklungsbedingte Entstehung von mehr C-villi als durch Vasodilatation der Gefäße an sich entsteht. Obwohl das Forschungsfeld der Stammzotten weitestgehend

verlassen wurde, gibt es bereits Daten zur Beziehung zwischen Stammzotten und dem Index des Dopplerwiderstands [75]. Auch gibt es Daten zum Volumenverlust von zentral gelegenen Zotten in IUGR [76], in der die Plazentaproben jedoch nicht nach dem etablierten "systematic random sampling" entnommen wurden. Neben diesen älteren Studien gibt es auch eine jüngere Studie zur veränderten Stammzotten-Entwicklung und zur veränderten parakrinen Funktion in der Pathogenese der plazentaren Wachstumsretardierung [77].

Zottenreifung

Die entwicklungsgeschichtlichen Ursprünge der Stammzotten, die einen Großteil der C-villi ausmachen, sind gut bekannt [23, 40]. Stammzotten entwickeln sich durch stromale Reifungsprozesse aus ihren Vorläufern, den unreifen Intermediärzotten. Dieser Prozess beginnt am Ende des ersten Trimesters und zieht sich fort bis alle unreifen Intermediärzotten in Stammzotten umgewandelt wurden [23, 40]. Im idealen Fall ist dieser Zustand ca. gegen Ende der normalen Schwangerschaft in der 40. Schwangerschaftswoche erreicht. Der Vorrat an verfügbaren unreifen Intermediärzotten wird zum einen begrenzt durch die kontinuierlich fortschreitende Umwandlung unreifer Intermediärzotten in Stammzotten und zum anderen durch die Schwangerschaft abnehmende Entwicklung im Laufe der neuer unreifer Intermediärzotten aus mesenchymalen Aussprossungen (mesenchymale Zotten) von existierenden unreifen Intermediärzotten. Diese beiden Vorgänge laufen parallel ab. Die Folge einer verminderten Entwicklung neuer unreifer Intermediärzotten aus dem Mesenchym oder einer vermehrten Umwandlung von unreifen Intermediärzotten in Stammzotten ist in beiden Fällen ein vermindertes Volumen von C-villi bzw. Stammzotten, die an sich morphologisch keine Veränderungen aufzeigen. Eben dies ist ein Ergebnis dieser Studie.

Ein entwicklungsbedingter solcher Schaden würde gewisser Zeit, nach höchstwahrscheinlich frühgeburtlich, die Wachstumsreserven (unreife Intermediärzotten) vorzeitig aufbrauchen und die Kompensationsmechanismen der Plazenta frühzeitig erschöpfen. Dieses Konzept passt auch zu der schon bekannten Korrelation des Volumens der C-villi mit dem Gewicht normaler Plazenten [34].

Über die Aktivierung, Kontrolle und das Tempo der Zottenaussprossung aus unreifen Intermediärzotten ist leider nur wenig bekannt. Ebenso wenig weiß man über die

Umwandlung der unreifen Intermediärzotten in Stammzotten, obwohl bekannt ist, dass es eine umfangreiche stromale Differenzierung und Reorganisation der Gefäße gibt [23, 31, 32, 40, 69–71].

Unabhängig davon ordnet der Verlust von C-villi (wenige Stammzotten) die Gewichtsreduktion bei der IUGR einem Vorgang der Zottenreifung (Bildung der Stammzotten und der perivaskulären Manschette) zu, der bereits beginnt, bevor die ersten typischen peripheren Zotten (reife Intermediärzotten und Terminalzotten) überhaupt entstanden sind [23, 40]. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie wird damit der mögliche Ursprung der IUGR weit zurück in die frühen Phasen der Schwangerschaft, wahrscheinlich hinein bis in das später erste Trimester gelegt.

Ein solcher Bezug der IUGR zu Stammzotten und der frühen Plazentation im Übergang vom ersten zum zweiten Trimester widerspricht den aktuellen Konzepten zur Entstehung der IUGR allein im peripheren Zottenbaum. Aber diese Sicht auf Basis unserer Daten ist nicht neu [23, 25, 78]. Frühere Arbeiten stellten die zentralen Zottenabschnitte bereits in den Mittelpunkt [79-81], wurden aber aufgrund hauptsächlich methodischer Mängel abgelehnt. Später stattgefundene Untersuchungen, die nicht auf einer Probenentnahme nach dem Prinzip des "systematic random sampling" aufbauten, haben eine Abnahme des Volumens von Stammzotten gezeigt [76], wurden aber nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde der Fokus der IUGR-Forschung ab Mitte der 90er Jahre, spätestens ab der Jahrtausendwende weg vom zentralen Zottenbaum und hin zur Angiogenese und den diese bestimmenden Wachstumsfaktoren des peripheren Zottenbaumes verlegt [47]. Die Daten der vorliegenden Studie könnten diese scheinbar widersprüchlichen Ansätze vereinen, weil sie nicht nur das herabgesetzte Gewicht und Volumen der Cvilli aufzeigen, sondern eben auch vielfältige bereits bekannte Veränderungen der peripheren NC-villi bestätigen.

4.2.3 Fehlentwicklungen des peripheren Zottenbaums bei IUGR

Die NC-villi enthalten den Großteil des fetoplazentaren Kapillarsystems [34] und stellen die Areale des fetomaternalen Stoffaustausches bereit. Diese Studie bestätigt oder steht mindestens nicht im Widerspruch zu bereits etabliertem Wissen über die peripheren Zonen im Zottenbaum von IUGR Plazenten: verlängerte Diffusionsdistanzen [82], verminderte Verzweigungen der Kapillaren [47, 76, 83],

verlängerte und weniger verzweigte (siehe Kapitel 4.4.2) Intermediär- und Terminalzotten [83], verdickte Erscheinung des Synzytiotrophoblasten [83] und eine erhöhte synzytiale Seneszenz [43] als Indikator einer erhöhten synzytialen Belastung, z. B. durch oxidativen Stress [43, 84]. In einer aktuell publizierten Studie wurde zusätzlich dazu eine erhöhte Zellkerndichte im Synzytiotrophoblast bestätigt [42, 43]. Die Kombination von verlängerter Diffusionsdistanz mit erhöhter Dichte synzytialer Zellkernen macht deutlich, wie die Oberfläche des Zottenbaums auf Stress reagiert. Die vermehrte Anzahl an Zellkernen an der Zottenoberfläche, wie in der Studie von Barapatre et al. beschrieben, deutet auf eine vermehrte Anzahl an zur Verfügung stehenden Zellorganellen hin [43] (ERs, Golgiapparat, Vesikel). Dies weist darauf hin, dass sich das Synzytium auf den Transport metabolischer Nährstoffe (Aminosäuren, Glucose, etc.) fokussiert, um den zunehmenden Bedarf des Feten zu decken. Dies passiert zum Nachteil des diffusiven Transports von Atemgasen (längere Diffusionsdistanzen) und erhöht das Risiko einer potenziell lebensbedrohlichen Hypoxie des Feten. Diese Überlegung würde mit klinischen Erfahrungen übereinstimmen [19, 78].

Der zwangsläufig früh beginnende kontinuierlich zunehmende Mangel an C-villi stellt in Frage, ob die periphere Zottenpathologie wirklich direkt kausal mit den Symptomen der IUGR verknüpft ist. Weil sich die peripheren Zotten erst nach den C-villi entwickeln, könnten die Veränderungen Reaktionen auf die vorangehende Zottenentwicklungsstörung der C-villi sein. Diese Reaktion könnte ein weiteres Symptom einer allgemeinen Zottenreifungsstörung sein, oder aber eine zumindest teilkompensatorische Reaktion des Zottenbaums auf den früher schon akkumulierten Mangel an C-villi [77].

4.2.4 "Second Order" Stereologie: Der Verzweigungsindex

Die Verzweigung des Zottenbaumes ist nach aktueller Meinung nicht primär ein eigenständiger Prozess, sondern durch die v.a. in peripheren Zotten ablaufende Angiogenese angetrieben und determiniert.

Phase I: Branching-Angiogenese (32. Tag bis 25. Woche)

Die sogenannte Branching-Angiogenese, in der sich die ersten Kapillaren in ein zahlreich verzweigtes Kapillarnetz entwickeln, ist gekennzeichnet von hoher

Konzentration an VEGF (vascular endothelial growth factor). In dem reich verzweigten Kapillarnetz herrscht ein niedriger Gefäßwiderstand [40].

Phase II: Non-Branching Angiogenese (ab 25. Woche)

Nach der 25. Woche beginnt die Non-Branching Angiogenese, die durch den Abfall des VEGF und den Anstieg des PIGF (placental growth factor) bestimmt wird. Hier bilden sich in der Peripherie des Zottenbaums lange Kapillarschlingen mit einhergehendem Anstieg des Gefäßwiderstands und trotzdem steigendem Blutfluss (durch erhöhten fetalen Blutdruck und größere Gefäßdurchmesser) [40].

Angiogenese in IUGR

Feten mit IUGR leiden unter einer Hypoxie [85, 86]. Daraus resultieren veränderte Wachstumsfaktorlevel, v.a. bezüglich VEGF und PIGF, die sich auf die Morphologie des Gefäßbetts und des Zottenbaums auswirken. Die gängige Sicht ist, dass sich die Länge der Kapillaren im Mittel erhöht (und sich dadurch der fetoplazentare Gefäßwiderstand erhöht), die Verzweigungsdichte des Kapillarbettes und auch die Verzweigung der Zotten bei IUGR aber reduziert sind, und auf Ebene der Zotten eine geringere Verzweigungsdichte vorliegt [47].

Der in dieser Studie gemessene geringere Verzweigungsindex in IUGR Plazenten (s. Abb. 5) weist darauf hin, dass die Zotten (C-villi und NC-villi, d.h. sowohl in zentralen Bereichen als auch in peripheren Bereichen) tatsächlich weniger verzweigt sind. Allerdings passt diese geringere Verzweigung in zentralen (früh auftretend) und in peripheren Bereichen (späte Manifestation) nicht zu der Hypothese einer angiogenetischen Veränderung, die erst nach der 20. Schwangerschaftswoche nachweisbar wird [47].

4.3 Korrelationen von Parametern der IUGR Hauptgruppe

4.3.1 Übersicht

In der Hauptgruppe zeigen sich ebenfalls gestörte Wachstums- und Zottenreifungsmuster, die viele Parameter und auch ihre physiologische Korrelation untereinander betreffen (s. Abb. 9 - 13). Dadurch wird klar, dass die Morphologie der Plazenta bei IUGR keine selektive Störung einzelner und gut identifizierbarer Teilelemente des Zottenbaums ist. Zum Zeitpunkt der Geburt und damit nach einer

mehrwöchigen pathophysiologischen Entwicklung sind viele der zentralen Parameter der plazentaren Morphologie verändert und ihre normale Interdependenz verwischt.

Die Korrelationen zur Größe der IUGR Plazenten, die in Kapitel 4.3.2 besprochen werden, bestätigen bisherige Ansätze, die davon ausgehen, dass es durch den Verlust an C-villi zu einem verminderten Plazentagewicht, zu einer verringerten Dicke der Plazenta und zu einem verringerten Geburtsgewicht der Neugeborenen kommt.

Neu ist, dass sich auch die durchschnittliche Diffusionsdistanz in C-villi parallel zu der in NC-villi verlängert (s. Kapitel 4.3.3).

4.3.2 Zur "mikroskopischen Anatomie" des Plazentagewichts

Im Kapitel 4.2 wird beschrieben, dass im Vergleich der IUGR Auswahlgruppe mit der NORM Gruppe deutlich wird, dass das verminderte Volumen von C-villi die hauptsächliche mikroskopische Begründung für das verminderte Plazentagewicht von IUGR Plazenten ist. In Abb. 10 ist die Signifikanz der Korrelation des Plazentagewichts mit den peripheren Zottenvolumina jedoch höher als die Korrelation mit den zentralen Zottenvolumina. Dies lässt sich evtl. dadurch erklären, dass durch den nachgewiesenen Verlust der Zottenvolumina der C-villi nicht mehr ausreichend zentrale Anteile des Zottenbaums vorhanden sind, um eine stärkere Korrelation darzustellen. Dann wird diese Korrelation von den NC-villi dominiert. Dies ist anders bei normalen Plazenten [34], wo das Plazentagewicht mit dem Volumen der C-villi korreliert, aber nicht mit dem Volumen der NC-villi. Gleiches kann für die Gefäße in den jeweiligen Zottenvolumina angenommen werden (Abb. 10B, 10D). Die Abbildungen bestätigen die in Kapitel 4.2 diskutierte Annahme, dass die Zottenvolumina der C-villi und die darin liegenden Gefäße verhältnismäßig gleichförmig verkleinert sind. Die in Abb. 11 dargestellte Plazentadicke spiegelt die Annahmen für das Plazentagewicht wider: die zentralen Zottenvolumina tragen durch den generellen Verlust ihres Volumens zu einem geringeren Teil zur Plazentadicke bei als die peripheren Zottenvolumina. Ebenso verhalten sich die jeweiligen Gefäßabschnitte der Zottenvolumina.

Der Verlust der zentralen und peripheren Zottenabschnitte führt verhältnismäßig in gleichem Maße zu einem verminderten Geburtsgewicht bei IUGR (s. Abb. 12). Wenn angenommen wird, dass durch den Volumenverlust der C-villi nicht mehr ausreichend viel Blutvolumen die peripheren Zottenanteile erreicht und der Synzytiotrophoblast der

peripheren Zottenabschnitte kompensatorisch versucht, den Nährstoffmangel durch aktiven Transport auszugleichen [43], kann daraus geschlossen werden, dass die Kompensation nicht ausreicht, um dem wachsenden Nährstoff- und Sauerstoffbedarf zu decken.

4.3.3 Bedeutung der veränderten Diffusionsdistanzen

Im Vergleich der IUGR Auswahlgruppe mit der NORM Gruppe fiel auf, dass die Diffusionsdistanzen in IUGR Plazenten deutlich länger waren als die in Plazenten ohne erkennbare Pathologie (Abb. 5). In Abb. 13 ist zu erkennen, dass sich in der IUGR Hauptgruppe mit Verlängerung der Diffusionsdistanzen in peripheren Zotten (NC-villi) die Diffusionsdistanz in den zentralen Zotten (C-villi) verhältnismäßig gleichermaßen verlängert.

Es wird angenommen, dass die Hauptaufgabe der C-villi der Bluttransport in die peripheren Gebiete des Zottenbaums ist. Die Hauptaufgabe der NC-villi ist der Stoffaustausch zwischen dem mütterlichen und fetalen Blut. Die Verlängerung der Diffusionsdistanz in beiden Bereichen deutet darauf hin, dass hier auch eine generelle Reaktion des Trophoblasten, v.a. des Synzytiotrophoblasten vorliegen könnte.

Dass in IUGR Plazenten die Verlängerung der Diffusionsdistanz durch Verdickung und erhöhtem Kernreichtum des Synzytiotrophoblasten zustande kommen könnte [42, 43], ist ein Mechanismus, der sehr wohl den Trophoblasten als Ganzes – auch in C-villi – erfassen könnte. Wie oben bereits diskutiert (Kapitel 4.2.3), ist es möglich, eine solche Veränderung als trophoblastären Kompensationsmechanismus für eine Mangelsituation zu verstehen. Dies wird auch in einer aktuell veröffentlichten Studie angenommen und diskutiert [43].

4.4 Methodische Besonderheiten der Studie

In dieser Studie wurden menschliche Plazenten mit intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR) und Plazenten ohne Pathologie makroskopisch untersucht und stereologisch analysiert. Dabei wurde die komplexe dreidimensionale Struktur des Zottenbaumes mit einem neuartigen Verfahren untersucherunabhängig unterteilt.

In früheren Studien zur Plazenta wurde die komplexe baumartige Struktur des Zottenbaumes entweder anhand des Durchmessers einzelner Zottenabschnitte oder

anhand der qualitativen Zusammensetzung ihres Stromas klassifiziert [22, 87–92]. Dabei wurden die zweidimensionalen Schnitte meist mit einfachen histologischen Färbemethoden (wie zum Beispiel die Hämatoxylin-Eosin Färbung) bearbeitet, die jedoch nicht spezifisch genug sind, um eine verlässliche Einteilung des Zottenbaums gewährleisten zu können [30].

Die in den letzten Jahren am häufigsten verwendete Klassifizierung des Zottenbaums wurde von Kaufmann et al. [22] etabliert. Demnach handele es sich ab einem Durchmesser von größer als 50µm um eine Stammzotte und ab einem Durchmesser von kleiner als 60µm um eine Intermediär- oder Terminalzotte. Aber wie bezeichnet man nun eine Zotte mit einem Durchmesser von 55µm? Leider verursachen auch die Schnittrichtung (Tangentialschnitt?) und die Vollständigkeit eines Zottenanschnitts (Längsschnitte können – wenn sie nicht zentral sind – einen zu kleinen Durchmesser ergeben) eine erhebliche Streuung der in Schnitten gemessenen Durchmesser. Als Kriterien wurden Stromakanäle oder weitere histologische Gefäßmuster herangezogen. Eine kürzlich veröffentlichte Validierungsstudie, bei der die Untersucher im einfachen Blindmodus Zottenguerschnitte im histologischen Bild klassifizieren mussten, zeigte jedoch, dass es selbst bei geübten und routinierten Untersuchern zu großen Streuungen kam, die sich für guantitative Studien nicht eignen [30]. Gleichzeitig empfiehlt dieselbe Validierungsstudie im Rahmen der Diskussion dieser Ergebnisse die Verwendung von Markern, mit denen eine untersucherunabhängige, objektive Klassifikation der Zottenabschnitte möglich ist. Als mögliches Markermolekül wurde y-sm-Aktin vorgeschlagen [30], das in den Myofibroblasten der perivaskulären Manschette von Stammzotten exprimiert wird [31].

Mithilfe des vorgeschlagenen γ-sm-Aktin, das in dieser Studie in den Myofibroblasten der perivaskulären kontraktilen Manschette der kontraktilen Zotten (C-villi) nachgewiesen wurde, konnten der Zottenbaum in Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten (C-villi, contractile villi), zu denen auch die klassischen Stammzotten gehören, klassifiziert werden. Über die klassische Definition der Stammzotten hinaus gehend, kommen aber noch die kleinkalibrigeren Zottenanschnitte dazu, die bisher aufgrund von Kaliberanalysen nicht eindeutig zuzuordnen waren. Die Zottenanschnitte mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten, färbten sich blau (s. Abbildung 2 und 4). Die Zotten ohne perivaskuläre stromale Myofibroblasten wurden als NC-villi (non-contractile villi) zusammengefasst.

Die Zotten ohne perivaskuläre stromale Myofibroblasten liegen überwiegend im peripheren Zottenbaum und sind damit in dem Bereich lokalisiert, in dem der Stoffaustausch zwischen Mutter und Fetus stattfindet. In diesen Stroma-armen und gefäßreichen Zotten sind die fetalen Kapillaren zahlreich vorhanden und haben eine verhältnismäßig große Oberfläche. Der so geschaffene geringe räumliche Abstand zwischen mütterlichem und fetalem Blut macht den Nährstofftransport über Diffusion möglich [23, 93].

Diese Studie bedient sich durch die Immunreaktivität mit dem γ-sm-Aktin-Antikörper der etablierten Option für eine systematische, untersucherunabhängige Analyse von Plazenten mit und ohne Pathologie [33, 34, 94]. Dies ermöglicht einen Vergleich der Daten dieser Studie mit Daten anderer Studien, die mit der gleichen immunhistochemischen quantitativen Analyse gearbeitet haben [34].

Die vorliegende Studie hat als weiteres originäres Merkmal das Ziel, den Bau des Zottenbaums mit dem Gewicht der geborenen Plazenta zu korrelieren. Dies kann auch als "mikroskopische Anatomie des Plazentagewichtes" bezeichnet werden und ist bisher in der Analyse der IUGR (deren plazentares Hauptsymptom das reduzierte Gewicht ist) ein wenig bis gar nicht verfolgter Ansatz. Die Hypothese, dass der Zottenbaum in der IUGR im Wesentlichen peripher alteriert ist, hat zu vielen Studien Zottenbaums diesem Bereich des geführt (Verzweigungsanalysen, zu Wachstumsfaktoren, Angiogenese, Trophoblaststruktur) [47, 83]. Die scheinbar einfache Frage nach der Lokalisation des Gewichtsverlustes im Zottenbaum ist dabei aber unbeantwortet geblieben.

Eine jüngst veröffentlichte Studie [33, 34] hat bereits gezeigt, dass die C-villi als Bestandteil des zentralen Zottenbaumes mit dem Plazentagewicht – hier aber bei klinisch normalen Plazenten – in Zusammenhang stehen.

4.5 Offene Fragen und Ausblick

Aktuelle therapeutische Ansätze zielen vor allem auf die Ungleichgewichte bei den Wachstumsfaktoren in IUGR ab, bevorzugt nach der 20. Schwangerschaftswoche. Hier sind gentherapeutische Ansätze in präklinischen Phasen auf dem Weg [95], begleitet von groß angelegten, vorbereitenden klinischen Studien [96]. Es ist dabei von großer Bedeutung, ob die nach der 20. Schwangerschaftswoche auftretenden peripheren Veränderungen (die auch in unserer Studie bestätigt wurden) kausal zur

IUGR stehen, oder teilkompensatorische Spätfolgen einer früheren Schädigung sind. Diese Fragen sind zurzeit noch vollkommen ungeklärt.

Umgekehrt würden sich bei Bestätigung der hier erhobenen Befunde im zentralen Bereich des Zottenbaums (C-villi) ebenfalls mögliche therapeutische Ansätze ergeben. Wenn es gelingt, den progredienten Verlust an C-villi aufzuhalten, so wäre ein solcher Ansatz früh in der Schwangerschaft einsetzbar, mit einem langen therapeutischen Fenster. Die Komplikationen und Strukturmodifikationen des peripheren Zottenbaums wären damit gegebenenfalls a priori minimierbar oder würden vermieden werden können.

Die Grundsatzfrage unter allen diesen Erwägungen ist, wo in der Plazenta die Widerstandsgefäße zu finden sind, die den Widerstand im fetoplazentaren Kreislauf determinieren. Gängige Ansicht ist dabei, dass die peripheren Gefäßabschnitte der Ort der Widerstandsregulation sind; hier spielen die Wachstumsfaktorlevel eine entscheidende Rolle. Sollten aber – und das ist auf Basis der hier vorliegenden Studie möglich – die C-villi die entscheidenden Widerstandsgefäße aufweisen, dann würde die Plazenta damit wieder wie die meisten Organe des menschlichen Körpers funktionieren [73]: Die Widerstandsregulation fände dann nicht in plazentaren Kapillaren, sondern im präkapillären Abschnitt des fetoplazentaren Kreislaufs statt.

Die in der vorliegenden Studie angewandten Analyseverfahren sind geeignet, die Zusammenhänge zwischen Morphologie und Funktion der Plazenta neu zu beleuchten. Dies gilt aber nicht nur für die hier untersuchte IUGR, sondern auch für andere wichtige geburtshilfliche Syndrome wie die Präeklampsie und auch der Gestationsdiabetes. Beide Syndrome zeigen explizite plazentare Pathologien [65–67, 97] und sind mit dem hier eingesetzten Methodenarsenal zugänglich. Es ist zu erwarten, dass sich durch konsequente Analyse dieser Syndrome eine neue und erweiterte Sicht auf Zusammenhänge zwischen plazentarer Morphologie und Funktion ergeben wird.

5 Literatur

- Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN. Early Development of the Human Placenta. In: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN, Hrsg. Pathology of the Human Placenta. 5 Aufl. New York: Springer; 2006: 42–49
- 2 *Rath W, Gembruch U, Schmidt S.* Physiologie der Schwangerschaft. In: Rath W, Gembruch U, Schmidt S, Hrsg. Geburtshilfe und Perinatalmedizin. 2 Aufl. Stuttgart: Thieme; 2010: 2–31
- 3 Boyd JD, Hamilton WJ. The Implantation of the Blastocyst and the Development of the Trophoblast up to the Somite Stage. In: Boyd JD, Hamilton WJ, Hrsg. The Human Placenta: By J.D. Boyd and W.J. Hamilton. Cambridge: Heffer; 1970: 36–60
- 4 *Burton GJ, Jauniaux E*. The cytotrophoblastic shell and complications of pregnancy. Placenta 2017; 60: 134–139
- 5 *Burton GJ, Watson AL, Hempstock J et al.* Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87 (6): 2954–2959
- 6 Hamilton WJ, Boyd JD. Development of the Human Placenta in the First Three Months of Gestation. J Anat 1960; 94 (Pt 3): 297–328
- 7 Graham J. Burton MD, Eric Jauniaux MP, Adrian L. Watson P. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: The Boyd Collection revisited. Am J Obstet Gynecol 1999; (181 (3)): 718–724
- 8 *Jaffe R, Jauniaux E, Hustin J*. Maternal circulation in the first-trimester human placenta myth or reality? Am J Obstet Gynecol 1997; 176 (3): 695–705
- 9 Welsch U, Deller T. Befruchtung, Implantation, Plazenta. In: Welsch U, Deller T, Hrsg. Lehrbuch Histologie. 3 Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2010: 443–455
- 10 *Rieger L, Kämmerer U, Singer D*. Sexualfunktionen, Schwangerschaft und Geburt. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, Hrsg. Physiologie. 7 Aufl. Stuttgart: Thieme; 2014: 636–670
- 11 *Castellucci M, Scheper M, Scheffen I et al.* The development of the human placental villous tree. Anat Embryol (Berl) 1990; 181 (2): 117–128
- 12 Baschat AA, Gembruch U, Reiss I et al. Relationship between arterial and venous Doppler and perinatal outcome in fetal growth restriction. Ultrasound Obstet Gynecol 2000; 16 (5): 407–413
- 13 Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ et al. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. Am J Obstet Gynecol 2000; 182 (1 Pt 1): 198–206
- Burton GJ, Fowden AL, Thornburg KL. Placental Origins of Chronic Disease. Physiol Rev 2016;
 96 (4): 1509–1565

- 15 *Murphy VE, Smith R, Giles WB et al.* Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. Endocr. Rev. 2006; 27 (2): 141–169
- 16 *Brar HS, Rutherford SE*. Classification of intrauterine growth retardation. Semin Perinatol 1988; 12 (1): 2–10
- 17 Pollack RN, Divon MY. Intrauterine growth retardation: definition, classification, and etiology. Clin Obstet Gynecol 1992; 35 (1): 99–107
- Gardosi J, Chang A, Kalyan B et al. Customised antenatal growth charts. Lancet 1992; 339 (8788): 283–287
- 19 Kehl S, Dötsch J, Hecher K et al. Intrauterine Growth Restriction. Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics (S2k-Level, AWMF Registry No. 015/080, October 2016). Geburtshilfe Frauenheilkd 2017; 77 (11): 1157–1173
- 20 *Castellucci M, Kaufmann P*. Basic Structure of the Villous Trees. In: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN, Hrsg. Pathology of the Human Placenta. 5 Aufl. New York: Springer; 2006: 50–120
- 21 Sen DK, Kaufmann P, Schweikhart G. Classification of human placental villi. II. Morphometry. Cell Tissue Res 1979; 200 (3): 425–434
- 22 *Kaufmann P, Sen DK, Schweikhart G*. Classification of human placental villi. I. Histology. Cell Tissue Res 1979; 200 (3): 409–423
- 23 Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN. Architecture of Normal Villous Trees. In: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN, Hrsg. Pathology of the Human Placenta. 5 Aufl. New York: Springer; 2006: 121–173
- 24 *Mayhew TM, Ohadike C, Baker PN et al.* Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. Placenta 2003; 24 (2-3): 219–226
- 25 Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN. Classification of Villous Maldevelopment. In: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN, Hrsg. Pathology of the Human Placenta. 5 Aufl. New York: Springer; 2006: 491–518
- Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience 2005; 130 (4): 813–
 831
- 27 Howard CV, Reed MG, Hrsg. Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy. 1 Aufl. Oxford: BIOS Scientific Publ; 1998
- 28 Huppertz B, Burton G, Cross JC et al. Placental Morphology: From Molecule to Mother A Dedication to Peter Kaufmann – A Review. Placenta 2006; 27 Suppl A: 3–8
- 29 *Kaufmann P, Luckhardt M, Schweikhart G et al.* Cross-sectional features and three-dimensional structure of human placental villi. Placenta 1987; 8 (3): 235–247

- *Haeussner E, Aschauer B, Burton GJ et al.* Does 2D-Histologic identification of villous types of human placentas at birth enable sensitive and reliable interpretation of 3D structure? Placenta 2015; 36 (12): 1425–1432
- *Demir R, Kosanke G, Kohnen G et al.* Classification of human placental stem villi: review of structural and functional aspects. Microsc Res Tech 1997; 38 (1-2): 29–41
- *Kohnen G, Kertschanska S, Demir R et al.* Placental villous stroma as a model system for myofibroblast differentiation. Histochem Cell Biol 1996; 105 (6): 415–429
- *Bühlmeyer A*. Stereologische Volumenbestimmung immunhistochemisch differenzierter Strukturbestandteile der menschlichen Plazenta. München: Ludwig-Maximilians-Universität, 2018
- *Buehlmeyer A, Barapatre N, Schmitz C et al.* The volume of villi with γ-sm-actin positive perivascular cells correlates with placental weight and thickness. Placenta 2019; 85: 24–31
- *Salafia CM, Zhang J, Charles AK et al.* Placental characteristics and birthweight. Paediatr Perinat Epidemiol 2008; 22 (3): 229–239
- 36 Benirschke K. Examination of the placenta. Obstet Gynecol 1961; 18 (3): 309-333
- Barker DJP, Eriksson JG, Kajantie E et al. The maternal and placental origins of chronic disease.
 In: Burton GJ, Barker DJP, Moffett A, Thornburg K, Hrsg. The Placenta and Human
 Developmental Programming. Cambridge: Cambridge University Press; 2011: 5–16
- 38 Barker DJP, Larsen G, Osmond C et al. The placental origins of sudden cardiac death. Int J Epidemiol 2012; 41 (5): 1394–1399
- *Nielsen PR, Mortensen PB, Dalman C et al.* Fetal growth and schizophrenia: a nested casecontrol and case-sibling study. Schizophr Bull 2013; 39 (6): 1337–1342
- *Frank H-G*. Placental Development. In: Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW, Hrsg. Fetal and Neonatal Physiology. 5 Aufl. Philadelphia: Elsevier; 2016: 101–113
- *Mayhew TM*. Turnover of human villous trophoblast in normal pregnancy: What do we know and what do we need to know? Placenta 2014; (35(4)): 229–240
- *Haeussner E, Schmitz C, Grynspan D et al.* Syncytial nuclei accumulate at the villous surface in IUGR while proliferation is unchanged. Placenta 2017; (60): 47–53
- Barapatre N, Haeussner E, Grynspan D et al. The Density of Cell Nuclei at the Materno-Fetal Exchange Barrier is Sexually Dimorphic in Normal Placentas, but not in IUGR. Sci Rep 2019; 9 (1): 2359
- *Burton GJ, Tham SW*. Formation of vasculo-syncytial membranes in the human placenta. J. Dev. Physiol 1992; 18 (1): 43–47
- *Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM*. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. Placenta 2004; 25 (2-3): 103–113
- *Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS*. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. Placenta 2004; 25 (2-3): 114–126

- 47 Mayhew TM, Charnock-Jones DS, Kaufmann P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. Placenta 2004; 25 (2-3): 127–139
- *Clifton VL*. Review: Sex and the human placenta: mediating differential strategies of fetal growth and survival. Placenta 2010; 31 (24): S33–S39
- *Mayhew TM, Jenkins H, Todd B et al.* Maternal asthma and placental morphometry: effects of severity, treatment and fetal sex. Placenta 2008; 29 (4): 366–373
- *Vatten LJ, Skjaerven R*. Offspring sex and pregnancy outcome by length of gestation. Early Hum Dev 2004; 76 (1): 47–54
- *Eriksson JG, Kajantie E, Osmond C et al.* Boys live dangerously in the womb. Am J Hum Biol 2010; 22 (3): 330–335
- *Almog B, Shehata F, Aljabri S et al.* Placenta weight percentile curves for singleton and twins deliveries. Placenta 2011; 32 (1): 58–62
- *Trudell AS, Cahill AG, Tuuli MG et al.* Stillbirth and the small fetus: Use of a sex-specific versus a non-sex-specific growth standard. J Perinatol 2015; 35 (8): 566–569
- 54 Aibar L, Puertas A, Valverde M et al. Fetal sex and perinatal outcomes. J Perinat Med 2012; 40
 (3): 271–276
- *Boyd JD, Hamilton WJ*. General Description of Specimens. In: Boyd JD, Hamilton WJ, Hrsg. The Human Placenta: By J.D. Boyd and W.J. Hamilton. Cambridge: Heffer; 1970: 78–113
- *Haeussner E, Buehlmeyer A, Schmitz C et al.* Novel 3D Microscopic Analysis of Human Placental Villous Trees Reveals Unexpected Significance of Branching Angles. Sci Rep 2014; 4: 6192
- *Haeussner E, Schmitz C, Koch F* v. et al. Birth weight correlates with size but not shape of the normal human placenta. Placenta 2013; 34 (7): 574–582
- Welsch U. Begriffe und Methodik. In: Welsch U, Deller T, Hrsg. Lehrbuch Histologie. 3 Aufl.
 München: Elsevier, Urban & Fischer; 2010: 1–11
- 59 Friedelsheimer B, Büchl-Zimmermann S, Welsch U. Schnittpräparation für die Lichtmikroskopie.
 In: Mulisch M, Welsch U, Hrsg. Romeis Mikroskopische Technik. 19 Aufl. Berlin Heidelberg:
 Springer; 2015: 99–120
- *Lahti-Pulkkinen M, Cudmore MJ, Haeussner E et al.* Placental Morphology Is Associated with Maternal Depressive Symptoms during Pregnancy and Toddler Psychiatric Problems. Sci Rep 2018; 8 (1): 791
- *Del Nero U, Rudge, Marilza Vieira Cunha, Novo NF et al.* Methodology to study the volume and absolute placental density in human placenta at term. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia 2002; 24 (10): 212–216
- *Gill JS, Woods MP, Salafia CM et al.* Probability distributions for measures of placental shape and morphology. Physiol Meas 2014; 35 (3): 483–500

- 63 *Revelle W.* psych: Procedures for Psychological, Psychometric, and Personality Research. Evanston, Illinois. Im Internet: cran.r-project.org/package=psych
- 64 *Fox J, Weisberg S*. An R Companion to Applied Regression. 3 Aufl. Thousand Oaks CA. Im Internet: socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/
- 65 *Dahlstrøm B, Romundstad P, Øian P et al.* Placenta Weight in Preeclampsia. Obstetric Anesthesia Digest 2009; 29 (3): 134–135
- 66 Eskild A, Romundstad PR, Vatten LJ. Placental weight and birthweight: does the association differ between pregnancies with and without preeclampsia? American Journal of Obstetrics & Gynecology 2009; 201 (6): 595.e1-5
- 67 *Strøm-Roum EM, Haavaldsen C, Tanbo TG et al.* Placental weight relative to birthweight in pregnancies with maternal diabetes mellitus. Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica 2013; 92 (7): 783–789
- 68 *Spanner R*. Mütterlicher und kindlicher Kreislauf der menschlichen Placenta und seine Strombahnen. Anat Embryol (Berl) 1935; 105 (2): 163–242
- 69 Graf R, Langer JU, Schonfelder G et al. The extravascular contractile system in the human placenta. Morphological and immunocytochemical investigations. Anat Embryol (Berl) 1994; 190 (6): 541–548
- 70 *Graf R, Schonfelder G, Muhlberger M et al.* The perivascular contractile sheath of human placental stem villi: its isolation and characterization. Placenta 1995; 16 (1): 57–66
- 71 *Graf R, Matejevic D, Schuppan D et al.* Molecular anatomy of the perivascular sheath in human placental stem villi: the contractile apparatus and its association to the extracellular matrix. Cell Tissue Res 1997; 290 (3): 601–607
- 72 *Gudmundsson S, Flo K, Ghosh G et al.* Placental pulsatility index: A new, more sensitive parameter for predicting adverse outcome in pregnancies suspected of fetal growth restriction. Acta Obstet Gynecol Scand 2017; 96 (2): 216–222
- 73 *Ehmke H*. Das Kreislaufsystem. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, Hrsg. Physiologie. 7 Aufl. Stuttgart: Thieme; 2014: 214–265
- 74 Acharya G, Sonesson S-E, Flo K et al. Hemodynamic aspects of normal human feto-placental (umbilical) circulation. Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica 2016; 95 (6): 672–682
- Fok RY, Pavlova Z, Benirschke K et al. The correlation of arterial lesions with umbilical artery
 Doppler velocimetry in the placentas of small-for-dates pregnancies. Obstet Gynecol 1990; 75 (4):
 578–583
- 76 Todros T, Sciarrone A, Piccoli E et al. Umbilical Doppler waveforms and placental villous angiogenesis in pregnancies complicated by fetal growth restriction. Obstet Gynecol 1999; 93 (4): 499–503

- 77 Lu L, Kingdom J, Burton GJ et al. Placental Stem Villus Arterial Remodeling Associated with Reduced Hydrogen Sulfide Synthesis Contributes to Human Fetal Growth Restriction. Am J Pathol 2017; 187 (4): 908–920
- 78 *Kingdom JC, Burrell SJ, Kaufmann P*. Pathology and clinical implications of abnormal umbilical artery Doppler waveforms. Ultrasound Obstet Gynecol 1997; 9 (4): 271–286
- 79 *Giles WB, Trudinger BJ, Baird PJ*. Fetal umbilical artery flow velocity waveforms and placental resistance: pathological correlation. Br J Obstet Gynaecol 1985; 92 (1): 31–38
- 80 *McCowan LM, Mullen BM, Ritchie K*. Umbilical artery flow velocity waveforms and the placental vascular bed. Am J Obstet Gynecol 1987; 157 (4): 900–902
- 81 Bracero LA, Beneck D, Kirshenbaum N et al. Doppler velocimetry and placental disease. Am J Obstet Gynecol 1989; 161 (2): 388–393
- 82 *Mayhew TM, Manwani R, Ohadike C et al.* The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: studies on exchange surface areas, diffusion distances and villous membrane diffusive conductances. Placenta 2007; 28 (2-3): 233–238
- 83 Krebs C, Macara LM, Leiser R et al. Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree. Am J Obstet Gynecol 1996; 175 (6): 1534–1542
- 84 *Cindrova-Davies T, Fogarty NME, Jones CJP et al.* Evidence of oxidative stress-induced senescence in mature, post-mature and pathological human placentas. Placenta 2018; 68: 15–22
- 85 *Kingdom JC, Kaufmann P*. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. Placenta 1997; 18 (8): 613–621
- 86 *Kingdom J, Huppertz B, Seaward G et al.* Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2000; 92 (1): 35–43
- 87 Aherne W, Dunnill MS. Morphometry of the human placenta. Br. Med. Bull 1966; 22 (1): 5-8
- Boyd PA. Quantitative structure of the normal human placenta from 10 weeks of gestation to term.
 Early Hum. Dev 1984; 9 (4): 297–307
- 89 *Ali KZ, Burton GJ, Morad N et al.* Does hypercapillarization influence the branching pattern of terminal villi in the human placenta at high altitude? Placenta 1996; 17 (8): 677–682
- 90 *Mayhew TM*. Fetoplacental angiogenesis during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodelling of vascular endothelial cells. Placenta 2002; 23 (10): 742–750
- 91 *Egbor M, Ansari T, Morris N et al.* Pre-eclampsia and fetal growth restriction: how morphometrically different is the placenta? Placenta 2006; 27 (6-7): 727–734
- 92 Almasry SM, Eldomiaty MA, Elfayomy AK et al. Structural analysis of human placental stem and terminal villi from normal and idiopathic growth restricted pregnancies. J Mol Histol 2012; 43 (3): 263–271

- Mayhew TM, Jackson MR, Boyd PA. Changes in oxygen diffusive conductances of human placentae during gestation (10-41 weeks) are commensurate with the gain in fetal weight.
 Placenta 1993; 14 (1): 51–61
- 94 Eva Maria Häußner. Three-dimensional Microscopic Topology of the Human Placental Villous Tree Reveals Relationships with Placental Function in Health and Obstetric Disease. München: Ludwig-Maximilians-Universität, 2016
- 95 *Krishnan T, David AL*. Placenta-directed gene therapy for fetal growth restriction. Semin Fetal Neonatal Med 2017; 22 (6): 415–422
- 96 Spencer R, Ambler G, Brodszki J et al. EVERREST prospective study: a 6-year prospective study to define the clinical and biological characteristics of pregnancies affected by severe early onset fetal growth restriction. BMC Pregnancy Childbirth 2017; 17 (1): 43
- 97 *Huynh J, Dawson D, Roberts D et al.* A systematic review of placental pathology in maternal diabetes mellitus. Placenta 2015; 36 (2): 101–114

Anhang

Deskriptive Statistik der klinischen Fallgruppen und der Parameter

Makroskopische Daten

Die deskriptive Statistik der makroskopischen Daten ist mit den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) für die Plazenten der IUGR Hauptgruppe in Tabelle 1, für die der IUGR Auswahlgruppe (männlich/ Sectio) in Tabelle 2 und für die Plazenten ohne Pathologie (NORM) in Tabelle 3 zusammengefasst.

IUGR Hauptgruppe

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der klinischen und makroskopische Parameter der IUGR Hauptgruppe(GA: Gestationsalter; GG: Geburtsgewicht; PG: Plazentagewicht; PG/GG: Relation von Plazentagewicht zu Geburtsgewicht; LD: längster Plazentadurchmesser; KD: kürzester Plazentadurchmesser; OF: Plazentaoberfläche; Dicke: Plazentadicke). Die 36 Plazenten bestehen aus 15 Plazenten männlicher und 21 weiblicher Babys, davon wurden 23 per Sectio und 13 vaginal geboren.

	GA [Wochen]	GG [g]	PG [g]	PG/GG	LD [cm]	KD [cm]	OF [cm ²]	Dicke [cm]
n	36	36	36	36	36	36	36	36
Mittelwert	38,15	2347,08	341,83	0,15	18,51	15,49	912,78	1,51
SD	1,55	368,70	44,50	0,02	2,47	2,46	241,04	0,34

IUGR Auswahlgruppe männlich/ Sectio

Tabelle 2: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der makroskopischen Daten der IUGR Auswahlgruppe (männlich/ Sectio)(GA: Gestationsalter; GG: Geburtsgewicht; PG: Plazentagewicht; PG/GG: Relation von Plazentagewicht zu Geburtsgewicht; LD: längster Plazentadurchmesser; KD: kürzester Plazentadurchmesser; OF: Plazentaoberfläche; Dicke: Plazentadicke). Die Auswahlgruppe der IUGR Plazenten, die für den Vergleich mit den normalen Plazenten (NORM) herangezogen wurden umfassen insgesamt 11 Plazenten von männlichen Babys, die per Sectio zur Welt gekommen sind.

	GA [Wochen]	GG [g]	PG [g]	PG/GG	LD [cm]	KD [cm]	OF [cm ²]	Dicke [cm]
n	11	11	11	11	11	11	11	11
Mittelwert	37,28	2142,82	323,55	0,15	17,59	14,36	803,55	1,48
SD	1,72	424,80	26,52	0,03	2,01	2,86	229,81	0,40

Plazenten ohne Pathologie (NORM) männlich/ Sectio

Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der makroskopischen Daten der klinisch unauffälligen Gruppe (NORM; männlich/ Sectio)(GA: Gestationsalter; GG: Geburtsgewicht; PG: Plazentagewicht; PG/GG: Relation von Plazentagewicht zu Geburtsgewicht; LD: längster Plazentadurchmesser; KD: kürzester Plazentadurchmesser; OF: Plazentaoberfläche; Dicke: Plazentadicke). Die 10 Plazenten sind von männlichen Babys, die alle per Sectio geboren wurden.

	GA [Wochen]	GG [g]	PG [g]	PG/GG	LD [cm]	KD [cm]	OF [cm ²]	Dicke [cm]
n	10	10	10	10	10	10	10	10
Mittelwert	38,94	3364,8	538,5	0,16201	19,75	28,35	1088,4	1,52
SD	1,40	570,12	117,17	0,0372	2,43	35,88	383,17	0,23

Mikroskopische Daten

Die deskriptive Statistik der mikroskopischen Daten ist mit den Mittelwerten und Standardabweichungen (SD) für die Plazenten der IUGR Hauptgruppe in Tabelle 4, für die der IUGR Auswahlgruppe (männlich/ Sectio) in Tabelle 5 und für die Plazenten ohne Pathologie (NORM) in Tabelle 6 zusammengefasst.

IUGR Hauptgruppe

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) aller mikroskopischen Parameter der Plazenten der IUGR Hauptgruppe(C-villi: Volumen von Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten; Gefäße in C-villi: Gefäßvolumen in Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten; DD in C-villi: Diffusionsdistanz in Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten; SD von DD in C-villi: Standardabweichung der Diffusionsdistanz in Zotten mit perivaskulären Myofibroblasten; NC-villi: Volumen von Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten; Gefäße in NC-villi: Gefäßvolumen in Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten; DD in NC-villi: Diffusionsdistanz in Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten; SD von DD in NC-villi: Standardabweichung der Diffusionsdistanz in Zotten ohne perivaskulären Myofibroblasten; IVR: intervillöser Raum; Relation Zottenvolumina (C-villi zu NC-villi): Quotient von Zottenvolumina mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten und ohne perivaskuläre stromale Myofibroblasten; Gesamtzottenvolumen: Gesamtzottenvolumen des gesamten Zottenbaums). Die 36 Plazenten bestehen aus 15 Plazenten männlicher und 21 weiblicher Babys, davon wurden 23 per Sectio und 13 vaginal geboren.

	C-villi [ml]	Gefäße C-villi [ml]	DD in C-villi [µm]	SD von DD in C- villi [µm]	NC- villi [ml]	Gefäße NC-villi [ml]	DD in NC-villi [µm]	SD von DD in NC- villi [µm]	IVR [ml]	Relation Zottenvolumina (C-villi zu NC-villi)	Gesamtzottenvolumen [ml]
n	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Mittelwert	30,80	2,96	24,84	14,90	131,43	96,45	10,10	9,13	179,61	0,25	162,23
SD	10,33	2,12	6,96	4,65	23,85	17,44	1,59	1,21	26,00	0,09	27,84

IUGR Auswahlgruppe männlich/ Sectio

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) aller mikroskopischen Parameter der IUGR Untergruppe männlich/ Sectio(C-villi: Volumen von Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten; Gefäße in C-villi: Gefäßvolumen in Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten; DD in C-villi: Diffusionsdistanz in Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten; SD von DD in C-villi: Standardabweichung der Diffusionsdistanz in Zotten mit perivaskulären Myofibroblasten; NC-villi: Volumen von Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten; Gefäße in NC-villi: Gefäßvolumen in Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten; DD in NC-villi: Diffusionsdistanz in Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten; SD von DD in NC-villi: Standardabweichung der Diffusionsdistanz in Zotten ohne perivaskulären Myofibroblasten; IVR: intervillöser Raum; Relation Zottenvolumina (C-villi zu NC-villi): Quotient von Zottenvolumina mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten und ohne perivaskuläre stromale Myofibroblasten; Gesamtzottenvolumen: Gesamtzottenvolumen des gesamten Zottenbaums). Die Auswahlgruppe der IUGR Plazenten, die für den Vergleich mit den normalen Plazenten (NORM) herangezogen wurden umfassen insgesamt 11 Plazenten von männlichen Babys, die per Sectio zur Welt gekommen sind.

	C-villi [ml]	Gefäße in C-villi [ml]	DD in C-villi [µm]	SD von DD in C- villi [µm]	NC- villi [ml]	Gefäße in NC- villi [ml]	DD in NC-villi [µm]	SD von DD in NC- villi [µm]	IVR [ml]	Relation Zottenvolumina (C-villi zu NC- villi)	Gesamtzottenvolumen [ml]
n	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Mittelwert	27,83	2,70	26,47	16,96	124,75	90,88	10,46	9,27	170,97	0,25	152,58
SD	6,70	1,40	8,35	5,64	19,62	13,00	2,05	1,25	18,14	0,05	23,34

Plazenten ohne Pathologie (NORM) männlich/ Sectio

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) aller mikroskopischen Parameter der NORM Plazenten(C-villi: Volumen von Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten; Gefäße in C-villi: Gefäßvolumen in Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten; DD in C-villi: Diffusionsdistanz in Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten; SD von DD in C-villi: Standardabweichung der Diffusionsdistanz in Zotten mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten; NC-villi: Volumen von Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten; Gefäße in NC-villi: Gefäßvolumen in Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten; Gefäße in NC-villi: Gefäßvolumen in Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten; SD von DD in NC-villi: Standardabweichung der Diffusionsdistanz in Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten; SD von DD in NC-villi: Standardabweichung der Diffusionsdistanz in Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten; SD von DD in NC-villi: Standardabweichung der Diffusionsdistanz in Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten; SD von DD in NC-villi: Standardabweichung der Diffusionsdistanz in Zotten ohne perivaskulären stromalen Myofibroblasten; Gesamtzottenvolumina (C-villi zu NC-villi): Quotient von Zottenvolumina mit perivaskulären stromalen Myofibroblasten; Gesamtzottenvolumen: Gesamtzottenvolumen des gesamten Zottenbaums). Die 10 Plazenten sind von männlichen Babys, die alle per Sectio geboren wurden.

	C-villi [ml]	Gefäße in C-villi [ml]	DD in C-villi [µm]	SD von DD in C- villi [µm]	NC-villi [ml]	Gefäße in NC- villi [ml]	DD in NC-villi [µm]	SD von DD in NC- villi [µm]	IVR [ml]	Relation Zottenvolumina (C-villi zu NC- villi)	Gesamtzottenvolumen [ml]
n	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mittelwert	99,05	33,48	17,62	15,91	141,58	121,45	7,80	6,92	297,8 7	0,78	240,63
SD	29,68	13,65	4,10	4,66	32,94	27,67	1,28	1,68	72,77	0,31	47,03

Danksagung

Der lange Weg der vorliegenden Dissertation wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung des Plazenta-Teams am Lehrstuhl II der Anatomischen Anstalt der LMU München, unter Leitung von Prof. Dr. Christoph Schmitz. Ich bin sehr dankbar für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die vielen wertvollen Anregungen, ermutigenden Gespräche und stetige Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Georg Frank für die Bereitstellung des Themas und die fachliche, wissenschaftliche und persönliche Betreuung, durch die ich den roten Faden dieser Arbeit nicht aus den Augen verloren habe. Danke für die vielen Stunden, in denen wir über die Daten und die Arbeit gesprochen haben.

Meiner Betreuerin Dr. Eva Pfaff danke ich für die Betreuung während des experimentellen Teils der Dissertation und für die Ermutigungen trotz aller technischen Widrigkeiten. Meinem Betreuer Dr. Nirav Barapatre möchte ich Dank für die Betreuung während der Zeit des Schreibens und für die Begleitung zur SRI Konferenz in Paris zu sprechen.

Ein großer Dank geht an Beate Aschauer, Astrid Baltruschat, Sabine Tost, Barbara Mosler und Sibylle Kerling für die Unterstützung mit der Laborarbeit.

Danke an die Korrekturleser*Innen Andrea Asikoglu, Beate Aschauer, Lea Borchert, Moritz Bach und Dr. Stephan Henschen.

Einen speziellen Dank möchte ich auch an die Mütter richten, die ihre Plazenten dem Dienste dieser wissenschaftlichen Studien zur Verfügung gestellt haben. Großer Dank an die Pfleger*Innen, Geburtshelfer*Innen, Ärzte und Ärztinnen der Station Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikums Dritter Orden unter der Leitung von Herrn Dr. Franz Edler von Koch für ihre vorbildliche Arbeit.

Zuallerletzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Freund, für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während der langen Zeit meines Studiums danken.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

Stereologische Untersuchung immunhistochemisch differenzierter Strukturbestandteile des Zottenbaums menschlicher Plazenten mit und ohne IUGR

von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen wurden.

Des Weiteren erkläre ich, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Lüllau, den 10.08.2022

Ort und Datum

Sina Henschen

Unterschrift, Sina Henschen

Ort der Durchführung

Der labortechnische Teil dieser Dissertation wurde von Mai 2011 bis August 2014 im Labor unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Frank am Lehrstuhl von Herrn Prof. Dr. Christoph Schmitz in der Anatomischen Anstalt (Lehrstuhl II / Neuroanatomie) der Ludwig-Maximilians-Universität zu München durchgeführt.

Publikationsliste

Barapatre, N., Kampfer, C., Henschen, S., Schmitz, C., von Koch, F. E., & Frank, H. G. Growth restricted placentas show severely reduced volume of villous components with perivascular myofibroblasts. Placenta 2021; 109: 19-27