

Aus der Anatomischen Anstalt der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Lehrstuhl II - Neuroanatomie  
Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz



*Die Mikroarchitektur der humanen Plazenta und ihre Korrelation mit  
dem Plazentagewicht in physiologischen Schwangerschaften*

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katharina Isabel Sophia Renz

aus Homburg

2023

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Hans-Georg Frank
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Kolben
Mitbetreuende promovierte Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Nirav Barapatre Dr. rer. nat. Eva Häußner
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	09.02.2023

*Le mieux est l'ennemi du bien.*

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung .....	IX
1 Einleitung - Die humane Plazenta .....	13
1.1 Implantation, Entwicklung und Funktion.....	13
1.2 Aufbau der reifen Plazenta .....	18
1.3 Zottentypen, Zottenarchitektur und Branching in der humanen Plazenta .....	20
1.4 Histologische Klassifizierung von Verzweigungsmustern im plazentaren Zottenbaum .....	24
1.5 Prenatal programming und IUGR.....	26
1.6 Ziel der Arbeit .....	30
2 Material und Methoden .....	31
2.1 Studiendesign .....	31
2.2 Plazenta-Spenden.....	31
2.3 Makroskopische Datenerhebung.....	32
2.4 Stereologie.....	33
2.5 Schnittpräparate.....	35
2.5.1 Probenauswahl / Systematic random sampling.....	35
2.5.2 Verarbeitung der nativen Präparate .....	36
2.5.3 Fixierung, Paraffineinbettung, Schneiden.....	37
2.5.4 Immunhistochemische Doppelfärbung mit Antikörpern gegen $\gamma$ -sm-Aktin und CD34 .....	38
2.6 Lichtmikroskopische Auswertung durch Stereologie („unbiased Stereology“) .....	43
2.6.1 Stereologischer Arbeitsplatz .....	43
2.6.2 MBF Biosciences Stereo Investigator .....	44
2.6.2.1 Mess-Algorithmus.....	44
2.6.2.2 Voreinstellungen.....	44
2.6.2.3 Nearest Neighbor .....	44
2.6.2.4 Ablauf der Messentscheidungen.....	45
2.6.3 Erhobene mikroskopische Parameter .....	50
2.7 Statistische Analyse .....	51
2.7.1 Verwendete Software & Tests.....	51
3 Ergebnisse.....	52

3.1	Immunhistochemische Identifizierung von $\gamma$ -sm-Aktin und Differenzierung von histologischen Strukturen der Plazentazotte .....	52
3.2	Deskriptive Statistik .....	55
3.3	Befunde der multivariaten Korrelationsanalysen .....	60
3.4	Ergebnisse und Analyse ausgewählter Korrelationen.....	64
3.4.1	Plazentagewicht vs. Konkavität und Diffusionsdistanz .....	64
3.4.2	Plazentagewicht-Geburtsgewicht-Ratio vs. Konkavität, Diffusionsdistanz und Intervillöser Raum .....	65
3.4.3	Plazentagewicht und Plazentadicke vs. Volumina sowie Plazentadicke vs. Konkavität .....	67
3.4.4	Konkavität und Volumina vs. $\gamma$ -sm-Aktin-Positivität und Diffusionsdistanzen .....	69
4	Diskussion.....	71
4.1	Referenzwerte klinischer und makroskopischer Daten .....	71
4.2	Methodische Besonderheiten der vorliegenden Studie .....	71
4.2.1	Immunhistochemische Zottenklassifizierung .....	71
4.2.2	Stereologische Abschätzung der Verzweigungsintensität .....	73
4.3	Korrelationsmuster zwischen den Parametern.....	74
4.4	Die perivaskuläre kontraktile Manschette und ihre funktionelle Bedeutung .....	74
4.5	Spezielle mikroskopische Daten der vorliegenden Studie .....	76
4.5.1	Konkavitäten (Verzweigungsindex) .....	76
4.5.2	Diffusionsdistanz .....	76
4.6	Ausgewählte Korrelationen klinisch-makroskopischer Daten mit mikroskopischen Parametern .....	77
4.6.1	Korrelationen von Plazentagewicht und Plazentadicke .....	77
4.6.1.1	Korrelation mit Konkavität und Diffusionsdistanz .....	77
4.6.1.2	Korrelationen mit Zottenvolumina .....	78
4.6.2	Plazentaquotient vs. Konkavität, Diffusionsdistanz und Intervillöser Raum .....	79
4.6.3	Interpretation von Verzweigungsanalysen und Diffusionsdistanzen des placentaren Zottenbaumes .....	80
	Literaturverzeichnis .....	83
	Danksagung .....	91
	Affidavit.....	93
	Curriculum vitae .....	95

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morula mit umgebender Zona pellucida. ....	14
Abbildung 2: Blastozyste im Stadium der Anheftung.....	14
Abbildung 3: A: Schematische Darstellung eines Embryos in der 5. Schwangerschaftswoche. ....	16
Abbildung 4: Anatomie der reifen Plazenta im Sagittalschnitt. ....	19
Abbildung 5: Schematisierter Zottenbaum in der physiologisch entwickelten, reifen Plazenta. ....	20
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Zottendifferenzierung der humanen Plazenta in der frühen und späten Schwangerschaft. ....	23
Abbildung 7: Schema eines Zottenbaums im Querschnitt.....	26
Abbildung 8: Hypoxie und ihre Auswirkungen auf die Zottendifferenzierung. ....	28
Abbildung 9: Plazenta vor der weiteren Verarbeitung in der Anatomischen Anstalt .....	33
Abbildung 10: Mehrstufiges systematic random sampling der Plazenta. ....	35
Abbildung 11: Schematische Darstellung der randomisierten Gewebeentnahme mit einem auf die Plazenta projizierten Punkteraster.....	36
Abbildung 12: Chorale Seite einer Plazenta nach der Markierung mit nummerierten weißen Pins. ....	37
Abbildung 13: $\gamma$ -sm-Aktin-positive Zotte im Programm Stereo Investigator.....	45
Abbildung 14: Messung einer $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotte im Programm Stereo Investigator .....	46
Abbildung 15: Messung einer $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotte im Programm Stereo Investigator.....	47
Abbildung 16: Messung im Programm Stereo Investigator. ....	49
Abbildung 17: Messung einer $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotte ohne Anschnitt des Throphoblastenrandes im Programm Stereo Investigator. ....	50
Abbildung 18: Bestimmung von Subtypen der Zottenbäume durch Immunhistochemie. ....	52
Abbildung 19: Screenshots von Meßkonstellationen in Stereo Investigator. ....	54
Abbildung 20: Matrix-Scatterplot mit Regressionsgeraden sowie Korrelations-Heat-Map der erhobenen makroskopischen Parameter gegeneinander zur graphischen Veranschaulichung der Ergebnisse der Korrelationsanalyse. ....	61
Abbildung 21: Matrix-Scatterplot mit Regressionsgeraden und Korrelations-Heat-Map der erhobenen mikroskopischen Parameter und des Plazentagewichtes gegeneinander zur graphischen Veranschaulichung der Ergebnisse der Korrelationsanalyse.....	63
Abbildung 22: Plazentagewicht vs. Konkavität und Diffusionsdistanz.....	64

---

Abbildung 23: Plazentagewicht-Geburtsgewicht-Ratio vs. Konkavität, Diffusionsdistanz und Intervillöser Raum.....	66
Abbildung 24: Plazentagewicht und Plazentadicke vs. Volumina sowie Plazentadicke vs. Konkavität.....	68
Abbildung 25: Konkavitäten und Volumina von Zotten sowie villösen Gefäßen in Abhängigkeit von $\gamma$ -sm-Aktin-Positivität und Diffusionsdistanzen.....	70

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Standardeinbettungsprotokoll für Plazenten .....	38
Tabelle 2: Immunhistochemische Färbung der histologischen Präparate (Arbeitsschritte, Tag 1, Markierung des Kapillarendothels (Antigen CD34)). .....	41
Tabelle 3: Immunhistochemische Markierung der kontraktilen Zellen der perivaskulären Manschette über $\gamma$ -sm-Actin (Arbeitsschritte, Tag 2). .....	42
Tabelle 4: Übersicht aller acht möglichen Messkonstellationen der stereologischen Auswertung von Plazenta-Präparaten anhand von Markern im Messprogramm Stereo Investigator – Nearest Neighbor Analyse. ....	48
Tabelle 5: Deskriptive Statistik der Makroskopie der gesamten untersuchten Plazentapopulation (n=49) mit Mittelwerten und Standardabweichung (SA). ....	56
Tabelle 6: Deskriptive Statistik der Mikroskopie der gesamten untersuchten Plazentapopulation (n=49) mit Mittelwerten und Standardabweichungen (SA). ....	57
Tabelle 7: Deskriptive Statistik der Mikroskopie der gesamten untersuchten Plazentapopulation (n=49) mit Mittelwerten und Standardabweichungen.. ....	58
Tabelle 8: Deskriptive Statistik der Mikroskopie der gesamten untersuchten Plazentapopulation (n=49, Nr. 1-49) mit Mittelwerten und Standardabweichungen .....	59

## Abkürzungsverzeichnis

### Makroskopische und klinische Termini

DELAY	Lagerungszeit bzw. zeitliche Verzögerung nach Geburt bis zur weiteren Verarbeitung der Plazenta-Präparate in der Anatomischen Anstalt
DELMOD	Entbindungsmodus (vaginal/ sectio caesarea)
GA	Gestationsalter in Wochen
GENDER	Geschlecht des Kindes (m/w)
GG	Geburtsgewicht des Kindes in Gramm
IUGR	Intrauterine Growth Restriction (intrauterine Wachstumsretardierung des Fetus)
KDM	Kürzester Durchmesser der Plazenta, gemessen auf der chorialen Seite durch die Nabelschnur, in Zentimetern
LDM	Längster Durchmesser der Plazenta, gemessen auf der chorialen Seite durch die Nabelschnur, in Zentimetern
OF	Oberfläche der Plazenta in $\text{cm}^2$
PG	Plazentagewicht in Gramm
PKM	Perivaskuläre kontraktile Manschette
PG_GG_Ratio	fetoplazentare Ratio, Verhältnis von Plazentagewicht zu Geburtsgewicht des Kindes
SSW	Schwangerschaftswoche
$\gamma$ -sm-Aktin	$\gamma$ -smooth-muscle-Aktin

### Stereologisch ermittelte Parameter

INTRO	intervillöser Raum
negCAP	$\gamma$ -sm-Aktin-negative Kapillaren
negCAPconcavity	prozentualer Anteil von Konkavität der Gefäße in $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten
negDIFdistance [ $\mu\text{m}$ ]	Diffusionsdistanzen vom Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand in $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zottenanschnitten
negVILLI	$\gamma$ -sm-Aktin-negative Zotten
negVILLIconcavity	prozentualer Anteil von Konkavität der $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten
posCAP	$\gamma$ -sm-Aktin-positive Kapillaren
posCAPconcavity	prozentualer Anteil von Konkavität der Gefäße in $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten
posDIFdistance [ $\mu\text{m}$ ]	Diffusionsdistanzen vom Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand in $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zottenanschnitten
posVILLI	$\gamma$ -sm-Aktin-positive Zotten
posVILLIconcavity	prozentualer Anteil von Konkavität der $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten

---

## Sonstige Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BSA	Bovines Serum Albumin
DAB	Diaminobenzidin
GOS	Ziegen-Null-Serum
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumphosphat
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
ROI	Regio of Interest
s.	siehe

## Zusammenfassung

Strukturelle Veränderungen der Plazenta werden schon seit mehreren Jahrzehnten mit der Entstehung von perinatalen Pathologien und Erkrankungen assoziiert und die Untersuchung der Plazenta besitzt in der klinischen Diagnostik pränataler Auffälligkeiten heute eine große Relevanz.

Der Plazenta kommt auch für das sogenannte Prenatal Programming eine zentrale Bedeutung zu. Fehlanpassungen und funktionelle Veränderungen in der Plazenta sind mit dem Auftreten von kardiovaskulären, metabolischen und psychischen Erkrankungen während des gesamten Lebens vergesellschaftet. In den frühen 1990er-Jahren beschrieb der Epidemiologe David Barker den Zusammenhang von niedrigem Geburtsgewicht und späteren gesundheitlichen Leiden als sogenannte Barker-Hypothese.

Signifikante Korrelationen von Plazentagewicht und Geburtsgewicht wurden bereits mehrfach publiziert, dennoch konnte bisher keine Kausalität zwischen der Verzweigung mikroskopischer Zottenabschnitte und makroskopischen Veränderungen fundiert analysiert werden. Da aber der feto-maternale Austausch in den weit verzweigten Zottenabschnitten stattfindet, ist es naheliegend, dass pathologische Veränderungen in der Verzweigungsstruktur sich auch in der gesundheitlichen Entwicklung des Fetus und im postnatalen Gesundheitszustand widerspiegeln.

Während die Inzidenz geburtshilflicher Erkrankungen wie intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR), Gestationsdiabetes oder Präeklampsie ansteigt, hat die Analyse mikroskopischer Plazentapathologien bisher kaum Eingang in die klinische Forschung gefunden. Entwicklungsbedingte Variationen des Zottenbaumes und ihre Beziehung zu makroskopischen Größen wie der Plazentadiecke wurden bisher nicht ausreichend beleuchtet. Ein funktionales Verständnis der dreidimensionalen Plazentastruktur – weg von der klassischen Einteilung nach Zottendurchmessern – stellt daher momentan eine der Herausforderungen im Feld der plazentaren Grundlagenforschung dar.

Erstmals erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine genaue Differenzierung der physiologischen plazentaren Mikroarchitektur in 2D-Mikroskopie unter Anwendung stereologischer Messmethoden und einer neuen immunhistochemischen Anfärbung zentraler Zottenbestandteile durch  $\gamma$ -sm-Aktin. Dieses Strukturprotein ist in den kontraktile Einheiten des Zottenbaumes, in den Myofibroblasten der perivaskulären Manschette, lokalisiert. Damit konnten Untersucher-unabhängig Verzweigungspunkte der Plazentazotten identifiziert und innerhalb des Zottenbaumes lokalisiert werden; zudem wurden Diffusionsdistanzen als Marker im feto-maternalen Stoffaustausch bestimmt.

Zentrales Bestreben dieser Arbeit war es diese neu entwickelten Methoden zu validieren. Darüber hinaus wurden makroskopische und mikroskopische Korrelationen untersucht, um eine solide Datengrundlage aus den untersuchten physiologischen Plazenten für anschließende Studien mit pathologischen Präparaten zu schaffen.

Hervorzuheben ist als wesentlicher Befund dieser Studie die enge Verbindung der Verzweigungsintensität  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver und  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zottenanteile. Traten unter den  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten weniger Verzweigungen auf, zeigten sich auch die anschließenden  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten geringer verzweigt.

Die Diffusionsdistanzen in  $\gamma$ -sm-Aktin-positivem Gewebe hingegen fielen deutlich länger aus als in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten. Dies untermauert die These, dass diese Zotten funktional unterschiedliche Subtypen sind und deutet darauf hin, dass die Verzweigungsmuster durch die ganze Plazenta hindurch in einer physiologischen Schwangerschaft konstant bleiben.

Hohe Plazentagewichte und eine Erhöhung der Plazentadicke traten dann auf, wenn die Verzweigungsintensität in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten gering war. Dies lässt insbesondere im Hinblick auf intrauterine Wachstumsretardierungen vermuten, dass Schwankungen in der Verzweigungsstruktur nicht nur für das Plazentagewicht relevant, sondern auch Folge der Intensität der fetoplazentaren Plazentaperfusion sind.

Die transtrophoblastären (feto-maternalen) Diffusionsdistanzen waren in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zottenbestandteilen länger als in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zottenbestandteilen, allerdings konnte kein Zusammenhang mit dem Plazentagewicht beobachtet werden. Erwartungsgemäß

konzentriert sich der Stoffaustausch über kürzere Diffusionsdistanzen also auf die Peripherie des Zottenbaums.

Der fetoplazentare Quotient beleuchtet das Verhältnis von Plazentagewicht zu Geburtsgewicht und dient als Maß für die Effizienz der Plazenta. In der vorliegenden Arbeit konnte ermittelt werden, dass geringere Verzweigung und verkürzte Diffusionsdistanzen in den  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten gegenläufige Korrelation mit dem fetoplazentaren Quotienten aufweisen: Ein niedrigerer Verzweigungsindex sowie eine größere Diffusionsdistanz in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten korreliert mit einem erhöhten Quotienten. Eine stärkere Verzweigung des Zottenbaumes und kürzere Diffusionsdistanzen führen folglich zu einer höheren Effizienz des plazentaren Austauschsystems. Da die  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zottenbestandteile hier allerdings keine signifikante Korrelation aufweisen, sollten weitere Untersuchungen angeschlossen werden, welche diese Frage klären könnten. Womöglich könnten diese auch grundlegende Rückschlüsse auf den Zusammenhang dieser strukturellen Veränderungen mit perinatalen Pathologien zulassen.

# 1 Einleitung - Die humane Plazenta

Während der Schwangerschaft dient die Plazenta als temporäres Organ und regulatorische Einheit zwischen mütterlichem und fetalem Kreislauf, um den stetigen Gasaustausch zu gewährleisten, den heranwachsenden kindlichen Organismus mit allen notwendigen Nährstoffen zu versorgen sowie toxische Stoffwechselprodukte zu eliminieren. Neben der Aufrechterhaltung einer stabilen Stoffwechselsituation erfüllt sie daneben mit der Produktion von Hormonen auch die Funktion eines endokrinen Organs [1, 2].

Ohne eine funktionsfähige Plazenta sind eine regelrechte Schwangerschaft sowie eine physiologische Entwicklung des Fetus nicht möglich. Während der Schwangerschaft wächst und differenziert sich die Plazenta kontinuierlich, so dass in jedem Entwicklungsstadium die Bedürfnisse des ungeborenen Kindes gestillt werden [3].

Zum besseren Verständnis der Ergebnisse dieser Arbeit wird im Folgenden zunächst auf die relevanten Abschnitte der Entwicklung, die Anatomie und die physiologische Funktion der Plazenta eingegangen.

## 1.1 Implantation, Entwicklung und Funktion

Die Verschmelzung der weiblichen und männlichen Gameten markiert den Beginn der Schwangerschaft, welche im Durchschnitt 267 Tage (38 Wochen) andauert. Gerechnet ab dem ersten Tag der letzten Menstruation beträgt die Dauer hingegen durchschnittlich 281 Tage (40 Wochen) [4]. Die durch das Spermium befruchtete Eizelle wird als Zygote bezeichnet und durchläuft in den ersten Tagen nach der Befruchtung bereits mehrere Stadien der Zellteilung, bis sie etwa 3 Tage p.c. (post conceptionem) das 16-Zellen-Stadium der Morula erreicht (Abb. 1). Aus der inneren Zellmasse der Morula, dem späteren Embryoblasten, entstehen im weiteren Verlauf der Schwangerschaft der Embryo, die Nabelschnur und das Amnion, während aus den äußeren Zellen der Trophoblast hervorgeht. Dieser wird in der gesamten Schwangerschaft die epitheliale Grenze zum maternalen Blut und Gewebe bilden [5].

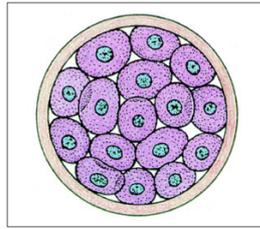


Abbildung 1: Morula mit umgebender Zona pellucida. Diese verschwindet am Ende des. 4 Tages. Modifiziert nach [6], S. 57.

Am 5. bis 6. Tag p.c. transportieren die Trophoblasten Flüssigkeit in den Interzellularraum der inneren Zellmasse, es formt sich die Blastozystenöhle. Die Zygote wird fortan Blastozyste genannt und beginnt über ihrem embryonalen Pol durch das Epithel in die mütterliche Uterusschleimhaut einzudringen (Abb. 2). Dieser als Adhäsion und Nidation bezeichnete Vorgang kennzeichnet die Entwicklung der Plazenta, welche geprägt ist von der Invasion des maternalen arteriellen Gefäßsystems. [6] Das fetale Trophoblastengewebe durchstößt das uterine Epithel invasiv, wächst in das maternale Endometrium ein und stellt so den direkten Kontakt zum mütterlichen Blutkreislauf her [2].

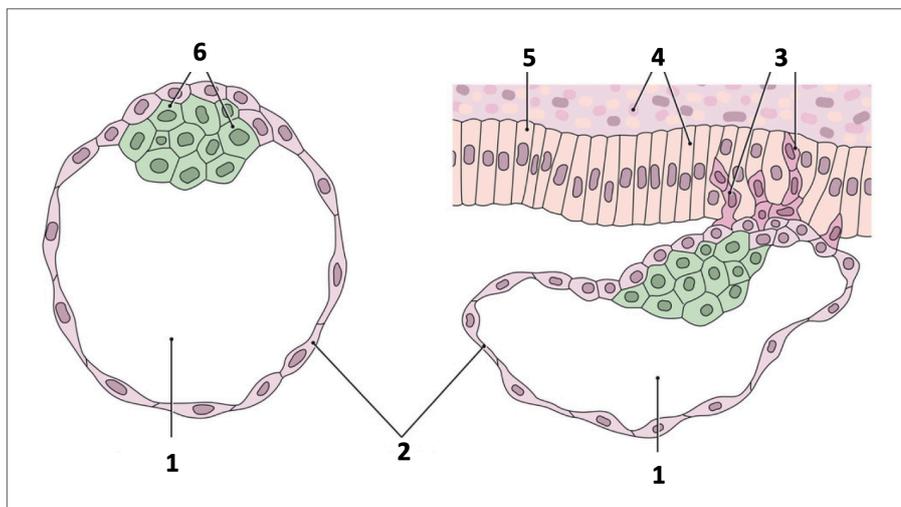


Abbildung 2: Blastozyste im Stadium der Anheftung. Blastozystenöhle (1), Trophoblast, äußere Zellschicht (2), Trophoblastzellen (3), Endometrium (4), endometriale Epithelzelle (5), Embryoblast (6). Modifiziert nach [6], S.58 u. [7], S.5.

Die äußeren Zellschichten des Trophoblasten bilden nach der Adhäsion an das Uterusepithel ein Synzytium aus (eine vielkernige, sich rasch vergrößernde Zellschicht mit sich auflösenden Zellgrenzen), welches durch Modulation, Invasion und Arrosion Anschluss an die endometrialen Drüsen und Spiralarterien findet und als Synzytiotrophoblast die tragende Rolle im materno-fetalen Stoffaustausch einnehmen wird. Die innen gelegene Zellmasse des Trophoblasten

hingegen behält ihre einzellige Natur als Zytotrophoblast und liefert als schnellteilendes Gewebe zellulären Nachschub für die Proliferation und Regeneration weiteren Synzytiums [5, 8]. Die als Dezidualzellen bezeichneten Stromazellen des maternalen Endometriums modifizieren durch den Kontakt mit der Blastozyste sowie als Reaktion auf das vom Corpus luteum im Ovar sezernierte Progesteron ihre Funktion. Eine Abstoßung der Uterusschleimhaut durch Menstruation wird nach der Nidation der Blastozyste durch Sekretion großer Mengen des Peptidhormons hCG (humanes Choriongonadotropin) aus dem Trophoblasten verhindert. Das Hormon hCG ist ein LH-Rezeptor-Agonist mit weitgehenden Sequenzhomologien zum LH (Luteinisierendes Hormon) und wirkt auf die LH-Rezeptoren der Luteinzellen des Corpus luteum cyclicum. In Folge dessen persistiert das Corpus luteum cyclicum im Ovar und proliferiert zum Corpus luteum graviditatis, welches mit der Produktion von Östrogen und Progesteron weiterhin die Schwangerschaft aufrechterhält, bis in der 8.-10. SSW die Plazenta jene endokrine Funktion übernimmt [6, 9]. Die  $\beta$ -Untereinheit des hCG wird im Rahmen der Schwangerschaftstestung verwendet und kann bereits etwa eine Woche nach Schwangerschaftsbeginn im mütterlichen Blut nachgewiesen werden [10].

Aus den Zellen des Embryoblasten und Throphoblasten entstehen während der zweiten SSW die Amnionhöhle und der Dottersack, aus dem sich in den darauffolgenden Tagen die Chorionhöhle formiert [6]. In der Regel ist um den 10. Tag p.c. die Implantation abgeschlossen [11].

Durch den Kontakt des Zytotrophoblasten mit der Uterusschleimhaut der Schwangeren bildet sich zwischen dem 15. und 18. Tag p.c. die Dezidualplatte (Basalplatte) aus, welche als mehrschichtige Zellstruktur den Keim zunächst allseitig umgibt. Ausgehend vom Embryoblast bildet sich pluripotentes Bindegewebe (extraembryonales Mesoderm, ein Mesenchym), welches sich verdichtet und sich zur Chorionplatte wandelt, die später den intervillösen Raum in der Plazenta fetalseitig abgrenzt, siehe dazu auch Abb. 3 [5, 6].

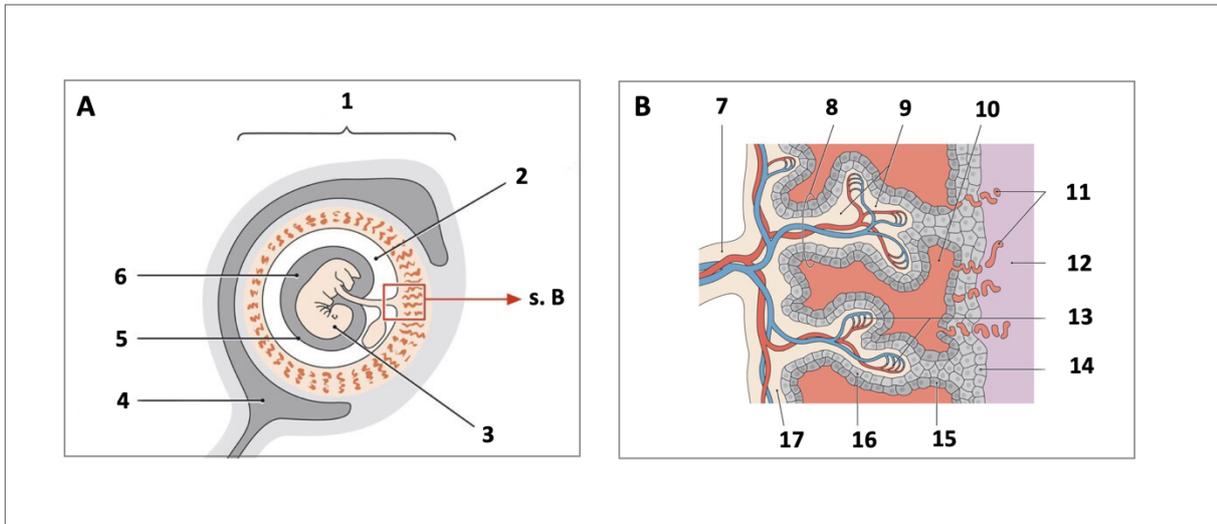


Abbildung 3: A: Schematische Darstellung eines Embryos in der 5. Schwangerschaftswoche. Corpus uteri (1), Chorionhöhle (2), Embryo (3), Cavum uteri (4), Amnion (5), Amnionhöhle (6); B: Ausschnittsvergrößerung aus Abb. A, Chorda umbilicalis (7), Stammzotte (8), Chorionmesoderm (9), intervillöser Raum (10), Aa. Spirales (11), Decidua basalis (12), Kapillaren (13), äußere Zytotrophoblastenschicht (14), Synzytiotrophoblast (15), Zytotrophoblast (16), Chorionplatte (17), modifiziert nach [7], S.8.

Zottenartige Aussprossungen hingegen treten bereits am 8.-9. Tag p.c. erstmals in Erscheinung. In diese wandern am 12. und 13. Tag p.c. Zytotrophoblastzellen ein und das Chorion-Synzytium differenziert sich allmählich zu einer Deckschicht auf den Primärzotten.

Ab dem 18. Tag dringen mesenchymale Zellen aus dem extra-embryonalen Mesoderm invasiv in die Primärzotten ein, es entsteht ein mesenchymaler Kern aus Bindegewebe, das Zottenstroma, dessen Vorkommen die Sekundärzotten charakterisiert. Ab dem 20. Tag p.c. beginnt die Vaskularisation der Zotten, es bilden sich hämangiopoetische Foci und Kapillaren sprießen ein. Die Zotten werden nun als Tertiärzotten bezeichnet [12, 13].

Die entstandenen Lakunen zwischen den Zotten bilden sowohl einen arteriellen Speicher als auch ein venöses Abflusssystem und verschmelzen in den darauffolgenden Tagen zum zusammenhängenden intervillösen Raum. Zudem verzweigen sich die Zotten bereits beginnend mit der 3. SSW, am Ende der 4. SSW befindet sich die Plazenta bereits vollständig im Tertiärzottenstadium. Es entstehen durch die Differenzierung der mesenchymalen Zotten Zottenbäume (siehe dazu auch Kapitel 1.3), welche von der Chorionplatte ausgehend in den intervillösen Raum hineinragen und so den mütterlichen mit dem kindlichen Kreislauf erstmals koppeln sowie später den materno-fetalen Stoffaustausch gewährleisten. Teils reichen die Zottenbäume auch bis an das maternale Endometrium (Decidua basalis) heran und verankern so als Haftzotten Plazenta und Embryo [13, 14].

Die Amnionhöhle vergrößert sich ab der 10. SSW stark. Gleichzeitig dehnen sich die Zotten am embryonalen Pol (Chorion frondosum) aus und entwickeln sich weiter zur reifen Plazenta. Die Zotten an der dem Embryo abgewandten Seite hingegen gehen zugrunde und bilden sich zum Chorion laeve zurück, welches später durch eine glatte Oberflächenstruktur imponiert und am Ende des dritten Monats der Schwangerschaft mit der Decidua parietalis (das dem embryonalen Pol abgewandte Endometrium) des Uterus verwächst, so dass das Uteruslumen oblitert [6].

Im Bereich der Basalplatte bleibt weiterhin maternales Gewebe der Uterusschleimhaut erhalten, welches die Plazenta durch Septen unterteilt und damit die plazentare Funktionseinheit der Kotyledonen definiert [5].

Mit Beginn der 14. SSW erreicht die Entwicklung der Plazenta ihre endgültige Grundstruktur, welche bis zur Geburt des Kindes verbleibt. Lediglich zum Ende der Schwangerschaft hin entstehen zudem Fibrinoidansammlungen unterhalb der Chorionplatte, aber auch im Bereich der Basalplatte. Diese Ablagerungen bestehen aus Fibrin-Typ Fibrinoid (einem Gerinnungsprodukt) und Matrix-Typ Fibrinoid (extrazelluläre Matrix, sezerniert von darin eingebetteten extravillösen und untergegangenen Trophoblastzellen).

Die Funktionen der Plazenta passen sich mit Voranschreiten der Schwangerschaft an die Bedürfnisse des Fetus an. Während die Plazenta bis zur 10. SSW vorrangig als schützende Barriere dient, der Fetus aber gänzlich histiotroph ernährt wird, beginnt ab der 11. SSW – da nun der intervillöse Raum mit Blut aus den uterinen Spiralarterien gefüllt ist und so ein erster primitiver uteroplazentarer Kreislauf besteht - die hämatotrophe Ernährung mit Sauerstoff und Nährstoffen.

Über die Plazentaschranke (ähnlich der Blut-Hirn-Schranke im Gehirn), die zwischen arteriellem Blut der Mutter im intervillösen Raum und andererseits fetalem Blut in den Kapillaren der Zotten überwunden werden muss und so während der gesamten Schwangerschaft eine direkte Verbindung zwischen mütterlichem und kindlichem Blutkreislauf unterbindet, wird der Fetus dabei vor möglichen exogenen Noxen abgeschirmt [15].

Während die Atemgase durch physikalische Diffusion die Plazenta passieren, können Nährstoffe nur über transepitheliale Passage in den kindlichen Kreislauf gelangen [16]. Der Austausch erfolgt dabei im Bereich der Plazentazotten, wobei sich aus der an die Kapillaren angrenzende Zottenoberfläche die für den Gasaustausch zur Verfügung stehende Austauschfläche errechnen lässt [17].

Substanzen, welche die Plazentaschranke passieren sollen, müssen dabei im Konkreten die folgenden Strukturen überwinden: die Synzytiotrophoblastenschicht, lokal vereinzelte Zytotrophoblasten, die Basallamina der Trophoblasten, das faserarme Bindegewebe der Zotten, die Basallamina der Kapillarendothelien und die Endothelzellen der Zottenkapillaren [10]. Nach dem 4. Monat besteht die Plazentaschranke schließlich nur noch aus dem Synzytiotrophoblasten, der vereinigten Basalmembran und dem Endothel der plazentaren Gefäße, wodurch die Diffusionsstrecke abnimmt und der Stoffaustausch begünstigt wird [15, 18].

Im Anschluss an die Geburt löst sich die Plazenta im Bereich der Basalplatte komplett von der Uteruswand und gleitet anschließend aus dem Cavum uteri [4]

## 1.2 Aufbau der reifen Plazenta

Um die 14. SSW hat die Plazenta ihre endgültige äußere Form erreicht (Abb. 4) [16, 19].

Die ausgereifte menschliche Plazenta wiegt zum Geburtstermin zwischen 400 – 700g bei einem Durchmesser von 20 – 25 cm und einer zentralen Dicke von 2 – 4 cm [4, 20].

Abhängig von genetischer Prädisposition, Geburtsmodus (Vaginale Geburt/ Sectio caesarea) und peripartalen Umständen findet sich eine große Variation morphometrischer Parameter [4, 21, 22].

Grundsätzlich ist eine anatomische Unterteilung der Plazenta in drei Hauptschichten möglich: die dem Fetus zugewandte Chorionplatte, die zentrale Zottenschicht mit dem intervillösen Raum, und die Basalplatte, Decidua basalis, welche durch Infiltration des maternalen Endometriums mit Trophoblasten entstanden ist und so die maternale Seite der Plazenta bildet [3].

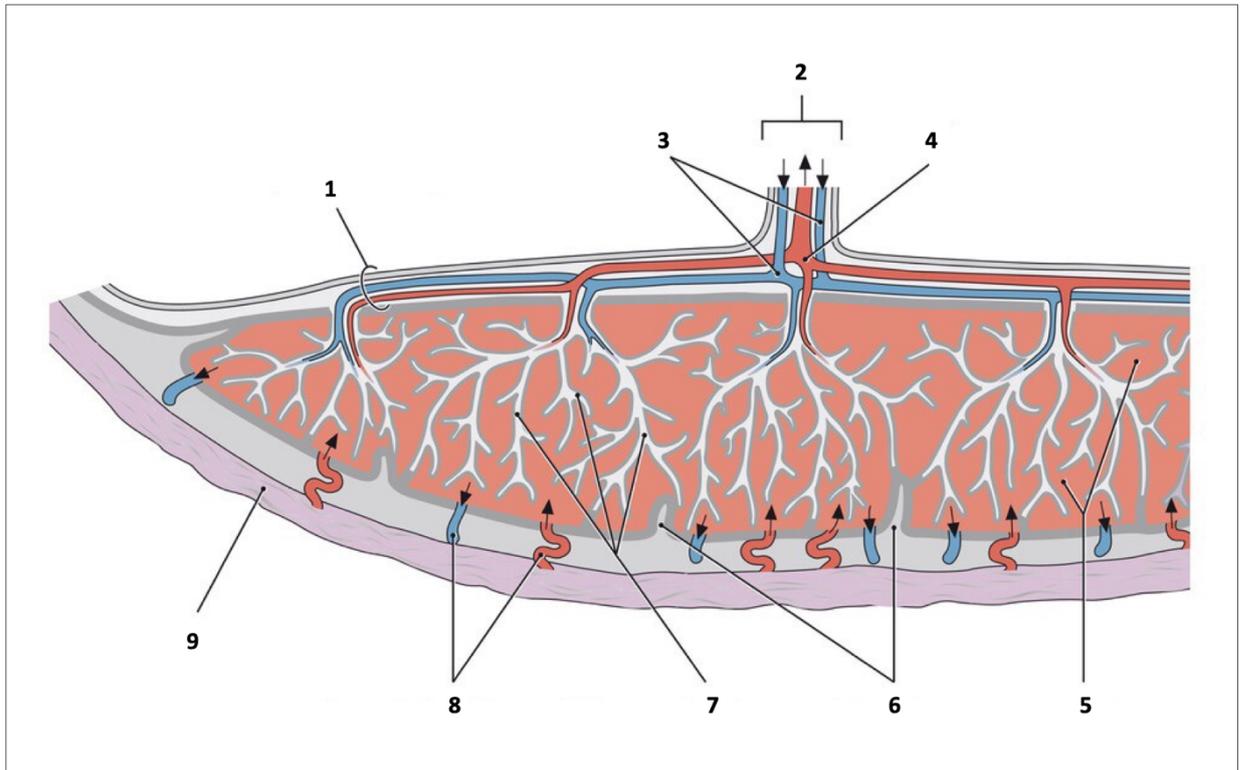


Abbildung 4: Anatomie der reifen Plazenta im Sagittalschnitt.

Chorionplatte (1), Chorda umbilicalis (2) mit Aa. umbilicales (3) und V. umbilicalis (4), Intervillöser Raum gefüllt mit maternalem Blut (5), Dezidualepten (6), Zottenbäume (7), maternale Gefäße (8), Decidua basalis (9); Modifiziert nach [7], S.9.

Die fetale Seite der Plazenta, die Chorionplatte, ist vom Amnion bedeckt, das vereinigt mit Chorion laeve und Decidua parietalis die Fruchtblase bildet, in der der Fetus heranwächst [3].

Der intervillöse Raum wird durch bindegewebige Septen in insgesamt etwa 10-40 Kotyledone unterteilt, welche eine Funktionseinheit bilden und jeweils aus ein bis vier Stammzotten und ihren Verzweigungen bestehen. Insgesamt finden sich so in einer reifen Plazenta 60-70 Zottenbäume, die sich ausgehend von den Choriongefäßen auf der Chorionplatte in die Tiefe verzweigen. Dabei entspricht ein fetales Kotyledon jeweils dem Versorgungsgebiet einer, gelegentlich auch mehrerer Arteriae spirales, [18, 21]. Entsprechend dieser funktionalen Struktur fließt über die Gefäße der Zottenbäume oxygeniertes und nährstoffreiches Blut über die Nabelschnurvene (V. umbilicalis) zum Fetus und das sauerstoffarme fetale Blut über zwei Nabelschnurarterien (Aa. umbilicales) zurück zur Plazenta [7].

### 1.3 Zottentypen, Zottenarchitektur und Branching in der humanen Plazenta

Die Klassifizierung der in der humanen Plazenta isolierten Zottentypen erfolgte bisher zumeist anhand der histologisch nachweisbaren Bindegewebsstrukturen, aber auch aufgrund der Funktion [23-25]. Unterschieden werden kann nach bisherigem Forschungsstand zwischen mesenchymalen Zotten, unreifen und reifen Intermediärzotten, Stammzotten sowie terminalen Zotten [1, 13, 24, 26]. Obwohl die verschiedenen Zottenarten sich sowohl strukturell als auch funktionell differenzieren, ist allen die gleiche anatomische Grundstruktur gemein, die sie während ihrer Differenzierung und Reifung durchlaufen (Abb.5) [27].

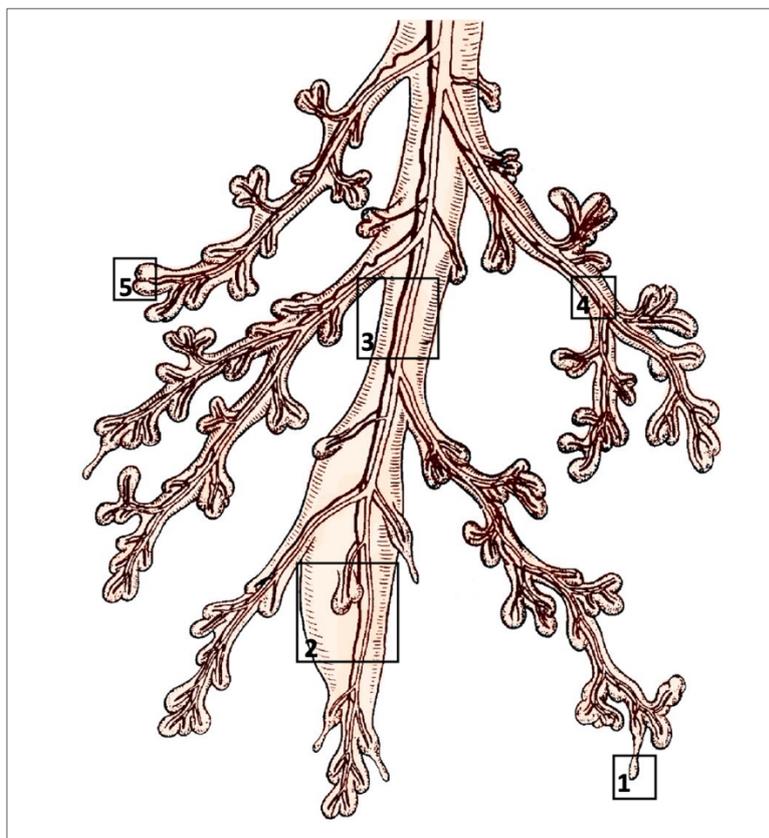


Abbildung 5: Schematisierter Zottenbaum in der physiologisch entwickelten, reifen Plazenta.

Durch das Vordringen von Mesenchym in zuvor entstandene Zottensprossungen entstehen mesenchymale Zotten (1), aus welchen sich wiederum alle anderen Zottentypen differenzieren. So entstehen großkalibrige, bindegewebsreiche unreife intermediäre Zotten (2), Stammzotten (3) mit faserreichem Stroma und voll ausgebildeten fetalen Gefäßen, schlanke reife intermediäre Zotten (4) mit engen Kapillaren und sinusoidal vaskularisierte Terminalzotten (5) als letzte periphere Verzweigung des Zottenbaumes. Modifiziert nach [28].

Von der Chorionplatte ausgehend verzweigen sich die Zotten in ihrem Verlauf in einer baumartigen Struktur, wobei einige der Zottenbäume die Basalplatte erreichen und so als Haftzotten die Fixierung und Stabilisierung des gesamten Zottensystemes sichern [2, 21].

Mesenchymale Zotten sind die Vorläufer aller anderen Zottentypen und besitzen ein äußeres Trophoblastensynzytium sowie eine darunter gelegene Schicht Zytotrophoblasten. Im Inneren wandert extraembryonales Mesoderm (Mesenchymzellen) ein, so dass anschließend von dieser Bindegewebskomponente aus die Vaskularisierung und Weiterentwicklung der Zotten gelingt [29]. Das der Zottenramifikation bis zur 20.-25. Schwangerschaftswoche überwiegend zu Grunde liegende Wachstumsmuster wird als *non-branching Angiogenese* bezeichnet und läuft unter dem Einfluss des Placental Growth Factors (PGF) ab - einem Protein aus der Familie der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Signalmoleküle. Ausgehend von einer mesenchymalen Zotte ist eine direkte oder indirekte Differenzierung in andere Zottentypen möglich, so dass diese eine zentrale Rolle in der Ausbildung der plazentaren Villi (Zotten) spielen [30, 31].

Etwa ab der vierten bis fünften SSW ist eine Reorganisation des Bindegewebes mit Ausbildung kollagenhaltiger Fasern und kanalartiger Hohlräume zu beobachten, wodurch es zu einer erheblichen Kaliberzunahme der Zotten kommt. Der auf diese Weise entstandene Zottentyp wird als unreife Intermediärzotte bezeichnet, enthält zahlreiche Makrophagen (sog. Hofbauer-Zellen) in weitleumigen länglichen Bindegewebspalten (Stromakanälen) und ermöglicht die Etablierung eines dichten Kapillarnetzes direkt unterhalb der Zottenoberfläche. Diese oberflächlichen Kapillaren stehen mit den zentral lokalisierten Arterien und Venen der unreifen Intermediärzotten in Verbindung [32].

Während der ersten beiden Trimester bilden sich auf der Oberfläche von mesenchymalen Zotten und unreifen Intermediärzotten Orte extensiven Zellwachstums, sogenannte „Hot Spots“, so dass hier durch Ausstülpungen der Trophoblastzellschichten weitere mesenchymale Villi entstehen, die das Wachstum der plazentaren Strukturen vorantreiben. Durch die Sprossung mesenchymaler Zotten auf den unreifen Intermediärzotten kann eine weitere Verzweigung dieser auftreten, es ist aber auch eine Differenzierung der Intermediärzotte zur Stammzotte möglich (siehe dazu Abbildung 6, A). Dies wiederum geschieht durch eine Umschichtung des stromalen Bindegewebes und die Ausbildung einer perivaskulären kontraktiven Manschette (PKM) in direkter Umgebung der Blutgefäße. Myofibroblasten bilden hier ein kontraktiles System aus, welches in dieser Erscheinung so ausschließlich in der Plazenta vorkommt [2, 33, 34]. Für eine Übersicht zur Zottenreifung siehe [13].

Es wird angenommen, dass durch eine longitudinale Kontraktion der perivaskulären Manschette in den Stammzotten der Widerstand in den Kapillaren moduliert wird und so eine Vasoregulation

erfolgt, mit der – unabhängig von den maternalen Gefäßen – die Porengröße des intervillösen Raumes und darüber der maternale Blutfluß, aber auch der Blutfluß in den Intermediärzotten selbst reguliert werden kann. Je peripherer die perivaskuläre Manschette im Zottenbaum auftritt, desto dünner erscheint sie. Myofibroblasten außerhalb der Gefäßwand und perivaskuläre Manschetten sind selbst in den weit peripheren Anteilen des Zottenbaumes gelegentlich zu finden [2].

Bis zur 20. SSW dominieren mesenchymale Zotten, unreife Intermediärzotten und Stammzotten das Erscheinungsbild der Plazenta, bis sich anschließend ab Beginn des dritten Trimesters unter dem Einfluss der VEGF-Signalmoleküle das Wachstumsmuster verschiebt. Auf die frühe Phase der langsamen Gewebeproliferation folgt in der Mitte der Schwangerschaft ein Gipfel der kapillären Entwicklung sowie des Längenwachstums. Zu diesem Zeitpunkt vollzieht sich der Wechsel von einer non-branching-Angiogenese hin zur *branching-Angiogenese*. Dieser Prozess, dem ein Remodeling der endothelialen Zellen zugrunde liegt, scheint mit Veränderungen des uteroplazentaren Sauerstoffdrucks und lokaler Wachstumsfaktoren assoziiert zu sein [30, 35].

Fortan differenzieren sich die mesenchymalen Zotten überwiegend zu reifen Intermediärzotten, welche länglicher und kleinkalibriger erscheinen als die unreifen Intermediärzotten und zudem reichlich mit sinusoidalen Kapillaren bestückt sind. Im Gegensatz zu den unreifen Intermediärzotten entstehen an den reifen Intermediärzotten keine weiteren Verzweigungen durch das Aussprossen von mesenchymalen Zotten, vielmehr kommt es durch kapilläre Ausstülpungen zur Ausbildung der stromaarmen Terminalzotten. Gleichzeitig findet aber weiterhin ein Prozess der Umwandlung bestehender unreifer, aber bereits gealterter Intermediärzotten zu Stammzotten statt. [13, 32].

So ist zwar die Anlage juveniler Zottenbäume in diesem Entwicklungsstadium jenseits der 20. SSW deutlich eingeschränkt, durch die massive exponentielle Zunahme von terminalen Zotten auf den reifen Intermediärzotten entsteht jedoch eine stetig wachsende Zottenoberfläche, die mit den darunter liegenden Kapillaren den materno-fetalen Stoffaustausch begünstigt. Das Fortschreiten der Schwangerschaft führt durch das abnehmende Längenwachstum zu einer Verlangsamung der Expansion des Gesamtvolumens der Plazenta und wird begleitet von einer Reifung der Villi, gekennzeichnet durch eine Zunahme der Kapillarisation, die Abnahme der Zotten- und Kapillardurchmesser, sowie Verschmälerung der villösen Membran. Sowohl die Plazentaentwicklung als auch das Wachstum der Plazenta hängen demzufolge maßgeblich von

der Reifung der terminalen Zotten und Veränderungen der Diffusionsdistanz über die villöse Membran ab [36].

Eine Übersicht über die Wachstums- und Differenzierungsmuster der ersten beiden Trimester der Schwangerschaft gegenüber dem dritten Trimester findet sich dazu in Abbildung 6.

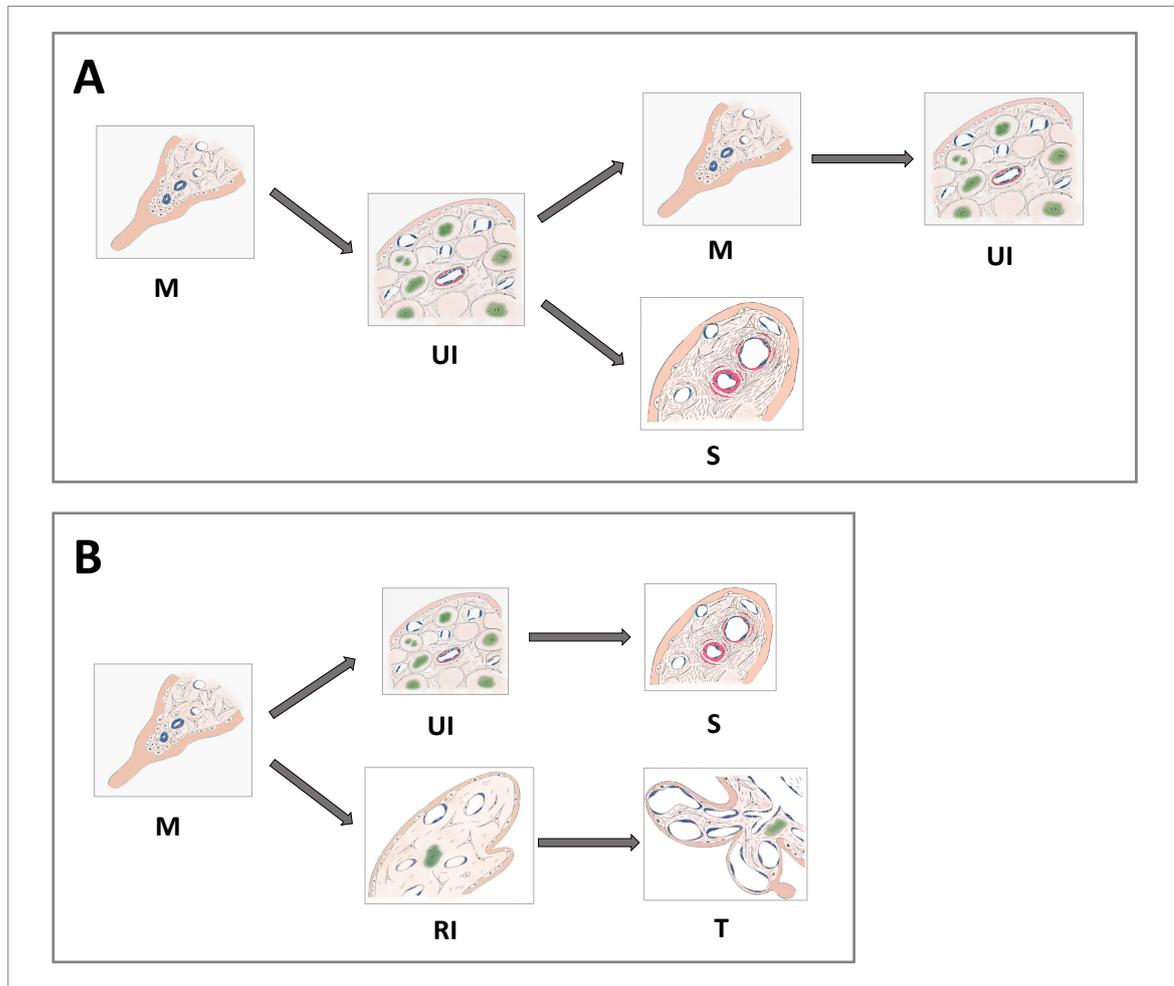


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Zottendifferenzierung der humanen Plazenta in der frühen und späten Schwangerschaft.

Entwicklung der plazentaren Villi während des 1. & 2. Trimesters (A) sowie während des 3. Trimesters (B). Mesenchymale Zotten (M) differenzieren sich bis zur 20. SSW zu unreifen Intermediärzotten (UI), welche sich wiederum zur Stammzotte (S) weiterdifferenzieren können oder aber erneut mesenchymale Zotten (M) ausbilden können, die in der Folge weitere unreife Intermediärzotten hervorbringen. Ab der 21. SSW ist weiterhin eine Umwandlung der unreifen Intermediärzotten zur Stammzotte möglich, darüber hinaus aber auch eine Differenzierung hin zur reifen Intermediärzotte (RI), aus der schließlich Terminalzotten entstehen. Modifiziert nach [1].

Während über die unreifen Intermediärzotten insbesondere das Längenwachstum und die Verzweigung der Zotten stattfindet, besitzen die peripheren Zottenanteile und insbesondere die Terminalzotten im Vergleich zu den anderen Zottentypen eine maximale Kapillarisation mit Sinusoiden bei gleichzeitig minimaler materno-fetaler Diffusionsstrecke, welche 1-5  $\mu\text{m}$  beträgt. Sie stellen somit den funktionell wichtigsten Teil der Plazenta dar, da hier der größte Teil des

feto-maternalen Stoffaustausches erfolgt. Es ist davon auszugehen, dass die Terminalzotten etwa 50% der Oberfläche des Zottenbaumes einnehmen. Im reifen Zottenbaum sind weiterhin vereinzelt mesenchymale und unreife Intermediärzotten vorhanden, größtenteils besteht dieser aber aus Stammzotten, reifen Intermediärzotten und Terminalzotten [23, 32].

Da auch die Intermediärzotten ausgesprochen gut kapillarisiert sind, wird angenommen, dass auch dieser Zottentyp – der in etwa weitere 25% des Zottenvolumens in der reifen Plazenta einnimmt - nicht unwesentlich am Stoffaustausch beteiligt ist [2].

Die Rate des Stoffaustausches über Diffusion stellt sich proportional zunehmend zu der Oberfläche der villösen Membranen dar, dabei ist sie umgekehrt proportional zu ihrer Dicke. So kann anhand dieser Parameter - den Fickschen Gesetzen zur Diffusion folgend - morphometrisch eine Diffusionskapazität für die Plazenta kalkuliert werden [37].

#### 1.4 Histologische Klassifizierung von Verzweigungsmustern im plazentaren Zottenbaum

Valide Aussagen über die dreidimensionale Struktur des Zottenbaumes waren in der Vergangenheit nur eingeschränkt möglich, da sich die unternommenen Analysen der Zottenverzweigung größtenteils auf die Arbeit an zweidimensionalen histologischen Schnitten beschränkten [28].

Die Entwicklung eines Untersucher-unabhängigen Modells zur Zottentypisierung durch die zweidimensionale Lichtmikroskopie oder Elektronenmikroskopie wird wesentlich durch die Probleme der zweidimensionalen Schnittanalyse erschwert. Die für die Analyse der Verzweigungsmuster entscheidenden Knotenpunkte können in der üblichen 2D-Untersuchung histologischer Schnitte nicht berücksichtigt werden, so dass Aussagen über die dreidimensionale topologische Lokalisation der Villi im Verzweigungsgeäst des Zottenbaumes nur eingeschränkt getroffen werden können [38]. Für Verzweigungspunkte im Zottenbaum hat die Histologie an dünnen Schnitten bis heute keine Nomenklatur entwickelt. Dennoch stellt die Methode der 2D-Analyse als Goldstandard ein wertvolles Tool zur morphologisch-funktionalen Untersuchung zur Typisierung von Zotten in der humanen Plazenta dar, welches mit Umsicht genutzt werden sollte [39].

Weiterhin existieren mittlerweile neue morphologische Daten zur Plazentastruktur, welche durch 3D-Mikroskopie erhoben wurden. Diese Methodik ermöglicht die Analyse von Verzweigungspunkten und macht die genaue Lage einzelner Zotten im Zottenbaum bestimmbar [38, 39].

Bereits seit den 1980er Jahren hat sich die schon unter Kapitel 1.3 erläuterte Einteilung in Stamm-, Intermediär- und Terminalzotten durchgesetzt. Durch eine rein morphologische Differenzierung sind die Zottentypen allerdings nicht immer eindeutig zu unterscheiden, so dass beispielweise immunhistochemische Marker zur Markierung spezifischer Zottenbestandteile mit Antigenen genutzt werden. Im Zuge dessen kann auch die Abhängigkeit der Ergebnisse vom Untersucher dezimiert werden [23, 24, 39, 40].

Hier sei im Zusammenhang mit den im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden insbesondere das  $\gamma$ -sm-Aktin ( $\gamma$ -smooth-muscle-Aktin) erwähnt, ein Protein des Zytoskeletts plazentarer Myofibroblasten im perivaskulären Stroma, welches eine Diskrimination zwischen peripheren und zentralen Zotten (letztere definiert durch die Gegenwart von Myofibroblasten) möglich macht, da es ausschließlich in zentraler gelegenen Bereichen des Zottenbaumes exprimiert wird [39-42].

Da die Myofibroblasten Zellen der kontraktilen perivaskulären Manschette sind, kann dieses immunhistochemische Verfahren auch als ein Nachweis der Ausdehnung dieser Struktur im Zottenbaum angesehen werden.

Um die Ausdehnung der villösen Verzweigungen mittels 2D-Mikroskopie messen zu können wurde an der Anatomischen Anstalt München in den vergangenen Jahren eine Strategie entwickelt, der die Tatsache zugrunde liegt, dass die Zottenoberfläche im Anschnitt nur dann konkav erscheint, wenn der Schnitt durch einen Verzweigungspunkt führt – nicht aber im Falle eines Anschnittes durch eine gerade oder konvexe Zottenstruktur (Abb. 7)[43, 44].

Bei dieser Vorgehensweise wird in der Sterologie dünner Schnitte letztlich der Anteil konkaver Oberflächen an Zottenanschnitten bestimmt und als Maß für die Häufigkeit von Verzweigungen im Zottenbaum interpretiert.

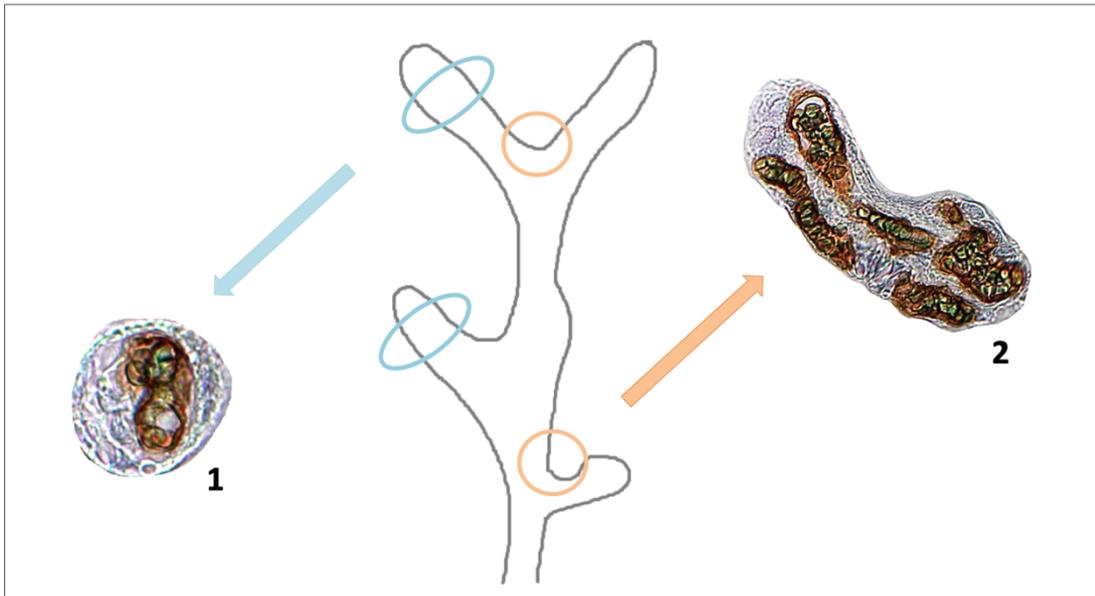


Abbildung 7: Schema eines Zottenbaums im Querschnitt.  
 Beispielhafte Darstellung eines konvexen Zottenanschnitts durch einen Zottenast (1) sowie eines konkaven Zottenanschnittes an einem Verzweigungspunkt (2).

## 1.5 Prenatal programming und IUGR

Ein Zusammenhang zwischen - klinisch teils inapparenten - Pathologien der Schwangerschaft und der Plazenta, sowie die dadurch bedingte Manifestation von Erkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter, wurde erstmals in den 1980er Jahren beschrieben und ist aus den Veröffentlichungen des britischen Epidemiologen David Barker weithin als Hypothese des Prenatal Programmings bekannt [45, 46].

Ausschlaggebend für das Auftreten von späteren Erkrankungen ist in diesem Zusammenhang eine Fehl- oder Unterversorgung des Fetus mit notwendigen Nährstoffen während der Schwangerschaft, so dass dieser sich in seiner Entwicklung metabolisch anpasst. Eben diese Modulationen können nach dieser Sichtweise dann postnatal persistieren und im Kindes- und Erwachsenenalter zur Manifestation von klinischen Krankheitsbildern führen [47, 48].

Die bedeutendsten Erkrankungen, welche mit pränatalen Faktoren assoziiert sind, sind metabolischer Art (Kardiovaskuläre Erkrankungen, Adipositas, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ II) oder dem neuropsychiatrischen Formenkreis zuzuordnen (Autismus, Schizophrenie, ADHS) [45, 49-52].

Solche langfristigen Effekte der intrauterinen Situation sind auch von klinisch fassbaren Pathologien der Schwangerschaft zu erwarten, wie es z.B. die intrauterine

Wachstumsretardierung des Fetus (IUGR, Intrauterine Growth Restriction) darstellt [53, 54]. Diese wird dann diagnostiziert, wenn der Fetus sein genetisch vorgegebenes Wachstumspotential aufgrund einer Pathologie nicht erreichen kann. In der Regel sinkt das Größenwachstums der betroffenen Kinder nach anfänglich unauffälligem Verlauf unter der 10. Perzentile ab. Oft liegen zusätzlich Auffälligkeiten wie ein Oligohydramnion oder eine pathologische Dopplersonographie der uterinen oder umbilikalen Gefäße vor. [55]

Der genaue Mechanismus, welcher die Wachstumsstörungen bedingt, ist bisher nicht bekannt, als Ursache kommen sowohl fetale, maternale als auch plazentare Faktoren in Frage.

Entscheidend für die Kontrolle der bei der Entwicklung der Plazenta eine Schlüsselrolle übernehmenden fetoplazentaren Angiogenese und der davon abhängigen Zottendifferenzierung ist die plazentare Oxygenierung [30, 56, 57]. Die Plazenta als Organ ist hochvaskularisiert und umfasst zum Ende der Schwangerschaft ein Kapillarnetzwerk von 550 Kilometern Länge und 15 m<sup>2</sup> Oberfläche [58].

Fehlerhafte Entwicklungen in der Angiogenese können daher zu intrauterinen Wachstumsretardierungen, geburtshilflichen Problemen oder dauerhaften gesundheitlichen Schwierigkeiten führen [54, 59, 60]. Da die angiogenetischen Wachstumsfaktoren auch für die Zottenverzweigung wesentlich sind, ist die Analyse der Verzweigung des Zottenbaums möglicherweise ein wichtiges Werkzeug, derartige Störungen in der Plazenta objektiv nachzuweisen.

Während bei einer präplazentar oder uteroplazentar bedingten Hypoxie (z.B. verursacht durch das Leben in einer Höhe von über 3000m NN oder eine Anämie der Kindsmutter) in der Plazenta ein zu geringer Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) vorliegt, so die branching-Angiogenese überwiegt und es zu einer pathologischen Hyperkapillarisation und -verzweigung der peripheren Zottenabschnitte kommt, liegt bei einer postplazentaren Hypoxie eine Unterentwicklung der für den Gasaustausch relevanten Zottenstruktur vor (Abb. 8) [61-63].

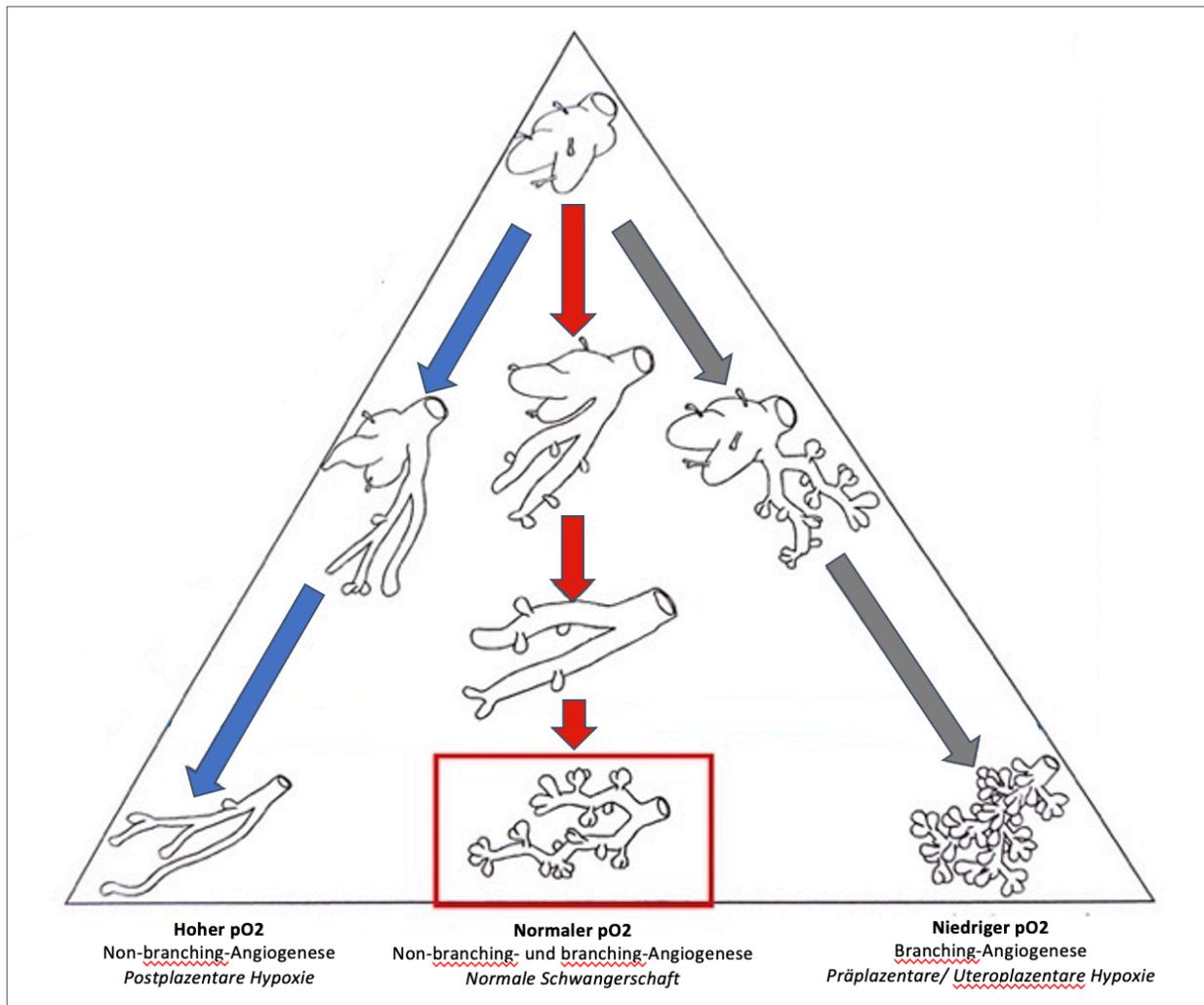


Abbildung 8: Hypoxie und ihre Auswirkungen auf die Zottendifferenzierung. Schematisch ist die Reifung von Zotten ab der 20. Woche unter dem Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffpartialdrücke ( $pO_2$ ) dargestellt. Unter dem Einfluss eines überdurchschnittlichen hohen  $pO_2$  zeigt sich eine pathologische Dominanz der non-branching Angiogenese (blaue Pfeile) mit konsekutiver Unterentwicklung der Verzweigungsstruktur. Bei regulären  $pO_2$ -Werten halten sich branching- und non-branching-Angiogenese in Balance und die Entwicklung der Plazenta verläuft normal (rote Pfeile). Im Falle eines erniedrigten  $pO_2$  in der Schwangerschaft dominiert die branching-Angiogenese und es tritt eine pathologische Überentwicklung in der Ausbildung der plazentaren Verzweigungsstruktur auf (graue Pfeile), (modifiziert nach [49, 64]).

Die fetale Hypoxie kann in einen direkten Zusammenhang mit dem Prenatal Programming für Herz, Hirn, Niere und Metabolismus im Erwachsenenalter gesetzt werden. Durch die Hypoxie kommt es zu Entwicklungsveränderung der Plazenta und des Fetus, darüber hinaus werden auch epigenetische Mechanismen in Gang gesetzt [65]. Anhand der von Bühlmeier et al. 2019 publizierten Daten konnte bereits gezeigt werden, dass das Gewichtsdefizit der Plazenten in IUGR-Schwangerschaften mit dem Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten korreliert, nicht aber mit dem Volumen des gesamten Zottenbaumes [66, 67].

Mechanismen des prenatal programming scheinen auch bei Kindern aus klinisch unauffälligen Schwangerschaften eine Rolle in der Ausbildung langfristiger Gesundheitsrisiken darzustellen [68]. In Anbetracht der Tatsache, dass intrauterine Hypoxie als Konsequenz von

Luftverschmutzung, Unterernährung, Adipositas, Stress oder Drogenabusus auftreten kann, wird zukünftig möglicherweise die Inzidenz mancher Krankheiten auch als Resultat gestörten prenatal programmings ansteigen [65].

## 1.6 Ziel der Arbeit

Der zu erwartende Zusammenhang subklinischer Veränderungen der Plazenta-Struktur mit perinatalen und postnatalen Entwicklungsstörungen benötigt eine solide morphometrische Basis in Form einer Analyse der Strukturvariabilität klinisch normaler Plazenten. So können anschließend bereits diskrete strukturelle Veränderungen der Plazenta eingeordnet und der Zusammenhang mit perinatal auftretenden Erkrankungen untersucht werden [50, 69, 70].

Kern der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, die neu etablierte immunhistochemische Unterscheidung von Zottentypen durch  $\gamma$ -sm-Aktin-Positivität in der Struktur des Zottenbaums der normalen menschlichen Plazenta anzuwenden und damit für die quantitative Mikroskopie auf eine breite Datenbasis zu stellen. Durch den Nachweis von  $\gamma$ -sm-Aktin wird die An- oder Abwesenheit der perivaskulären kontraktilen Manschette zum objektivierbaren Strukturmerkmal der Zottentypisierung.

Erstmalig kann zudem die Analyse der Verzweigung des Zottenbaumes mit dem neuen Parameter der Konkavität als Maß für die Zottenverzweigung in Zottenanschnitten etabliert und bewertet werden und damit die Datenbasis für die Struktur des Zottenbaums der normalen menschlichen Plazenta erweitern.

Korrelationen zwischen der Mikroarchitektur der Plazenta – hier vor allem der Struktur des Zottenbaums – und den klassischen klinisch-makroskopischen Daten wie Plazentagewicht und Plazentadurchmesser sollen ermittelt und diskutiert werden.

Die Daten dieser Dissertation sollen als Grundlage zur Vorbereitung weitergehender nachfolgender Studien mit Plazenten aus pathologischen Schwangerschaften (mit Wachstumsretardierung, Präeklampsie oder Diabetes mellitus) dienen. Zudem können sie valide Vergleichsdaten bereitstellen und künftig richtungsweisend für die Fallzahlab-schätzung ähnlicher Untersuchungen sein. Damit sollen sie Rückschlüsse auf die physiopathologische Relevanz zulassen und zuverlässige Aussagen über die intra- und interplazentare Variabilität hervorbringen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Es wurden 50 Plazenten aus klinisch unauffällig verlaufenen Schwangerschaften untersucht. Die Entbindungen fanden zwischen dem 4.4.2011 und dem 12.9.2011 in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikums Dritter Orden in München statt.

Diese Studie wurde von der Ethik-Kommission der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Nummer 084-11 genehmigt.

Alle Plazenten und später erhobenen Daten wurden bereits in der Klinik in eine anonymisierte Form überführt und so an die Anatomische Anstalt zur wissenschaftlichen Analyse in diesem Projekt übergeben.

Zunächst erfolgte im Labor der Anatomischen Anstalt eine genaue Dokumentation der makroskopischen Parameter (siehe Kapitel 2.3), danach wurden systematisch randomisiert Punkte zur Gewebeentnahme markiert und fotografisch dokumentiert (Abbildung 13) worauf die mehrstufige Fixierung, Paraffineinbettung und immunhistochemische Färbung der Proben folgte, welcher sich wiederum die mikroskopische Auswertung anschloss (siehe Kapitel 2.6).

Um Untersucher-abhängige Einflüsse zu minimieren wurden die Messungen am Mikroskop verblindet durchgeführt, d.h. der Untersucherin waren zum Zeitpunkt der Messungen keine weiteren Informationen zum Präparat bekannt.

Der mikroskopischen Untersuchung schloss sich dann die Auswertung der erhobenen Daten an, deren Ergebnisse unter Kapitel 3 zusammengefasst sind. Dabei wurde aufgrund unvollständiger klinisch-morphometrischer Daten eine Plazenta von der statistischen Auswertung ausgeschlossen, so dass schließlich die Daten von 49 Plazenten in den Ergebnissen berücksichtigt wurden.

### 2.2 Plazenta-Spenden

Durch eine Kooperation mit der Geburtshilfe im Klinikum Dritter Orden München (Kooperationspartner Dr. med. Franz Edler von Koch, Chefarzt der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe im Klinikum Dritter Orden, München) konnten Plazenta-Spenden von physiologisch ohne pathologische Auffälligkeiten verlaufenen Einlings-Schwangerschaften täglich abgeholt und verarbeitet werden.

Entscheidend für die Auswahl der Plazenten waren ein klinisch unauffälliger Verlauf von Schwangerschaft und Geburt, welcher vom geburtsbegleitenden Arzt bestätigt werden musste,

sowie die Bedingung, dass kein klinischer Hinweis auf pathologische Entwicklungen der Plazenta vorlag, welche eine histopathologische Untersuchung derselbigen nötig gemacht hätte.

Vorraussetzung für die Spende der Plazenten war darüber hinaus das ausdrückliche Einverständnis der Gebärenden. Lagen sprachliche Hindernisse oder psychische Probleme vor, die die Fähigkeit, unabhängig über die Plazenta-Spende zu entscheiden, hätten einschränken können, so wurden die Plazenten von der Studie ausgeschlossen.

Die verwendeten Plazenten wurden unmittelbar nach der Geburt einer Kühlung bei 4 °C - 8 °C zugeführt, welche auch während des Transportes der Plazenten vom Klinikum Dritter Orden zur Anatomischen Anstalt mit Hilfe einer handelsüblichen Kühlbox aufrecht erhalten wurde.

Anhand des Geburtszeitpunktes und der Ankunftszeit der Plazenta in der Anatomischen Anstalt konnte die Lagerungszeit bzw. zeitliche Verzögerung [DELAY] bis zur weiteren Verarbeitung der Präparate standardisiert erfasst werden, um möglicherweise dadurch entstandene Artefakte und Gewebsveränderungen in Zusammenhang zu bringen. Da sich bei der Analyse der Daten keinerlei Korrelation mit DELAY zeigte, wird im Weiteren dieser Arbeit nicht weiter darauf eingegangen.

Weitere vom Klinikum zusammen mit den Plazenten mitgeteilte Informationen waren der Entbindungsmodus [DELMOD] (vaginal/ sectio caesarea), das Geschlecht des Kindes [GENDER], das Gestationsalter in Wochen [GA] sowie das Geburtsgewicht des Kindes [GG].

### 2.3 Makroskopische Datenerhebung

Nach Ankunft der Plazenten in der Anatomischen Anstalt der LMU wurde zunächst die Nabelschnur etwa 1 cm oberhalb der Chorionplatte abgetrennt und das Plazentagewicht in Gramm [PG] ermittelt, wobei das Chorion laeve am Präparat belassen wurde (Abb. 9).

Anhand des Geburtsgewichtes [GG] und des Plazentagewichtes [PG] konnte dann, wie sowohl von Benirschke und Kaufmann [2] als auch von Klöppel et al. [71] bereits beschrieben, das Verhältnis von Plazentagewicht zu Geburtsgewicht des Kindes, die sogenannte fetoplazentare Ratio [PG\_GG\_Ratio], berechnet werden. Dabei wird das Plazentagewicht durch das Geburtsgewicht des Kindes geteilt ( $[PG] : [GG]$ ).

Dieser Plazentaquotient kann als ein Maß für die Effizienz der Plazenta angesehen werden, korreliert im Sinne eines perinatalen Programmings mit dem Risiko der späteren Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen [72]. Der Plazentaquotient ist damit ein Parameter grundsätzlicher Bedeutung. Mit zunehmender Schwangerschaftsdauer nimmt er bei

regelrechter Entwicklung von Fetus und Plazenta ab [73] und beträgt dann in der 39. Schwangerschaftswoche im Mittelwert 0,13 (g Plazenta pro g Fetus [PG\_GG\_Ratio]).

Während eine erhöhte [PG\_GG\_Ratio] bei einer Wachstumsrestriktion des Feten (IUGR) und gleichzeitigem Normalgewicht der Plazenta zu erwarten ist, gilt eine erniedrigte [PG\_GG\_Ratio] als Hinweis für eine Makrosomie des Feten bei regelrecht entwickelter Plazenta oder einen Minderwuchs der Plazenta [71].

Die Plazentadiecke in Zentimetern [DICKE] wurde sonographisch bestimmt (Convex Scanner HS3000, Honda Electronics, Tokyo, Japan). Dazu wurden die Plazenta mit der chorialen Seite nach oben zeigend in eine flachen Schale gelegt und der Ultraschallkopf vorsichtig und ohne Anwendung von Druck neben der Nabelschnurinsertion positioniert.

Mit Hilfe eines handelsüblichen Lineals, das auf der chorialen Seite der Plazenta durch die Nabelschnurinsertion aufgelegt wurde, konnten der längste Durchmesser der Plazenta in Zentimetern [LDM] sowie der kürzeste Durchmesser der Plazenta in Zentimetern [KDM] ermittelt werden.

Aus diesen beiden Werten wiederum wurde dann die Oberfläche der Plazenta in  $\text{cm}^2$  mit der Formel  $OF = \frac{1}{4} \times \pi \times LDM \times KDM$  errechnet [51].



Abbildung 9: Plazenta vor der weiteren Verarbeitung in der Anatomischen Anstalt, Nabelschnur bereits entfernt, modifiziert nach [22].

## 2.4 Stereologie

Der Begriff Stereologie ist in seinem Ursprung bezeichnend für wissenschaftliche Methoden, bei denen anhand von Untersuchungen zweidimensionaler Schnittpräparate Aussagen über die dreidimensionale Struktur im Inneren eines Objektes oder Organs angestellt werden können, z.B. auch über Volumenanteile von Untereinheiten einer Gesamtstruktur [74, 75]. Die

Anwendung ist auch ausserhalb der Medizin, beispielsweise bei geologischen Fragestellungen etabliert.

Basierend auf den theoretischen Kenntnissen der stochastischen Geometrie werden in der Stereologie Strukturen morphometrisch erfasst. Sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen können Gewebe quantitativ-strukturell charakterisiert und auf Basis der randomisierten und damit repräsentativen Probenentnahme statistisch valide Daten gewonnen werden [76].

Das Prinzip der Stereologie ist ein statistisches Verfahren, das bereits die Probenentnahme in den statistischen Prozess einbezieht. Unter Zuhilfenahme der Stereologie können sowohl Volumina als auch Oberflächen, zelluläre Kompartimente oder intrazelluläre Distanzen effizient bestimmt werden. In der Plazenta im Speziellen können solche Daten mit Bezug auf beispielsweise die fetale Angiogenese, die Trophoblastenentwicklung, das Zottenwachstum, Diffusionsdistanzen und schließlich auch die Funktionalität des Organs zum Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind interpretiert werden [77].

Die Vorteile gegenüber konventionellen Untersuchungsmethoden liegen in der hohen Effizienz, Transparenz, Flexibilität sowie der einfachen Anwendung. Durch die systematisch randomisierte Probenauswahl (Systematic Random Sampling, siehe dazu Kapitel 2.5.1) und standardisierte stereologische Zählmethoden können Experimente mit reduzierter Gefahr von Bias durchgeführt werden. Das Systematic Random Sampling wird durchgeführt, damit jeder Teil des untersuchten Organs die gleiche Chance erhält, für die Analyse als Stichprobe selektiert zu werden. Potentielle Ursachen für die statistische Streuung bei Anwendung der Stereologie stellen das Sampling selbst, die Probenpräparation, der Einsatz annahmebasierter Methoden sowie die Durchführung der Messungen durch den Untersucher dar [74, 77].

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die stereologische Quantifizierung der untersuchten Plazenten zum einen durch die Reduktion der Präparatgröße anhand des Samplings (Kapitel 4.5.1), zum anderen durch die Reduktion der Dimension von 3D auf 2D im Schnittpräparat. Dabei wurden auf einen möglichst genau definierten Referenzrahmen (reference space) bezogene absolute Werte erhoben, die dann als Grundlage für die weiteren Auswertungen dienten [77].

## 2.5 Schnittpräparate

### 2.5.1 Probenauswahl / Systematic random sampling

Die Untersuchungsergebnisse der Stereologie können nur dann sinnvoll interpretiert werden, wenn zuvor eine zufällige Probenauswahl, ein sogenanntes „random sampling“ erfolgt [77]. So kann die Stereologie als geometrische Variante der Stichprobenerhebung gesehen werden, die auf den Überlegungen von Miles und Davy beruht [78].

Die zufällige Stichprobenauswahl verleiht jedem Teil der Plazenta die gleiche Chance, als Stichprobe ausgewählt zu werden, was insbesondere in Anbetracht der positionsabhängigen Inhomogenität menschlichen Gewebes ein wichtiger Bestandteil der Stereologie als statistisches Verfahren ist [77]. Dabei ist zu beachten, dass das „systematic random sampling“ effizienter ist als ein einfaches „random sampling“ [79].

So wird beim „systematic random sampling“ zwar die Position des ersten Markers zufällig bestimmt, alle anderen Entnahmestellen werden jedoch nach einem vorbestimmten Muster ausgesucht, über das sie ebenfalls das Kriterium der Zufallsauswahl erhalten (Abb. 10).

Eingesetzt werden kann das systematic random sampling in allen Stufen der Probenauswahl.

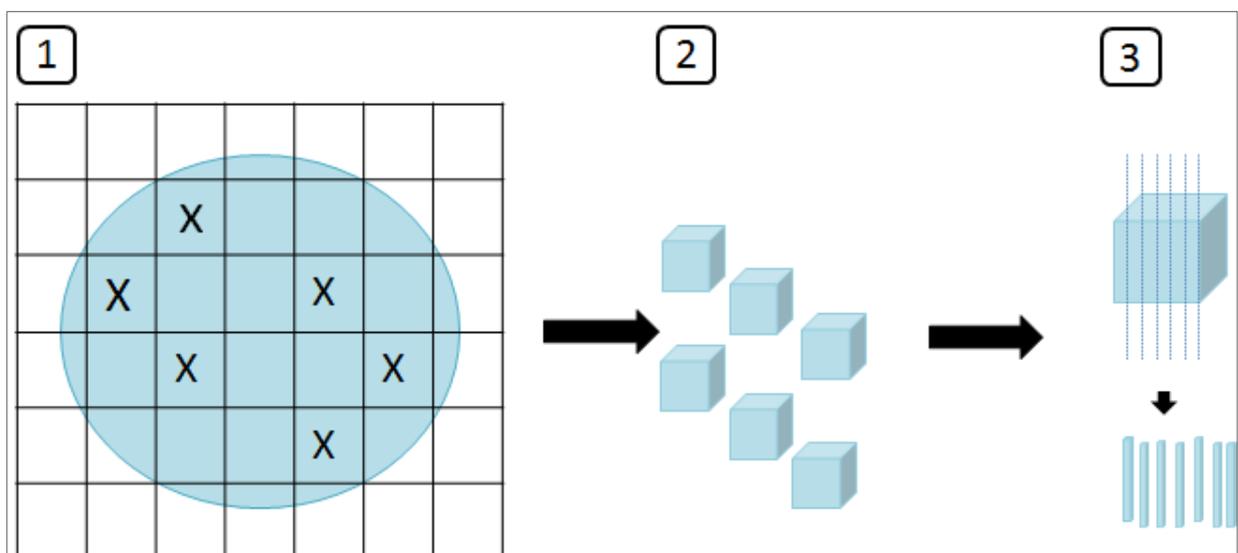


Abbildung 10: Mehrstufiges systematic random sampling der Plazenta. (1) Projektion des Rasters auf die Plazenta, Markierung der Entnahmestellen (2), Entnahme von Gewebelöcken (3), Herstellung histologischer Schnittpräparate. (modifiziert nach [77])

So wurde in der Anatomischen Anstalt mit einem Projektor (SceneLights Technologie, Mini-LED LB 936, PEARL, Buggingen, Germany) ein vorher festgelegtes Punkteraster auf die chorale Seite der Plazenta projiziert, welche auf einem Tablett positioniert war. Beginnend mit dem ersten

Punkt, der vollständig auf der Plazenta lag, wurden anschließend pro Plazenta sechs Entnahmeorte bestimmt, die bei großen Plazenten im Intervall von vier Projektionspunkten, bei kleinen Plazenten im Intervall von drei Projektionspunkten, mit einem Pin markiert wurden (siehe Abb. 11 und 12).

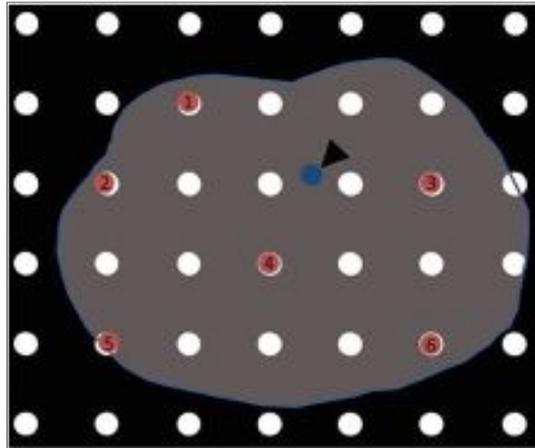


Abbildung 11: Schematische Darstellung der randomisierten Gewebeentnahme mit einem auf die Plazenta projizierten Punkteraster.

Die Plazenta ist vor schwarzem Hintergrund als grauer Schatten erkennbar. Das Punkteraster des Projektors überlagert die gesamte Zone. Der erste Lichtpunkt, der oben links auf die Plazenta fällt, wird zur Probenentnahmestelle 1. Von dort aus wird in einem Abstand von drei bzw. vier Lichtpunkten (so, dass 6 Probenentnahmestellen auf der Plazenta untergebracht werden können), eine weitere Probeentnahmestelle angelegt und durch einen Pin markiert. Rote Pins: Entnahmestellen. Blauer Pin: Nabelschnurinsertion. (aus [22]).

### 2.5.2 Verarbeitung der nativen Präparate

Zur Dokumentation der Lage der Gewebeprobe im Organ wurde die Plazenta vor der Probenentnahme zusammen mit einem Lineal (Standardlineal, 30 cm) fotografiert (Kamera: Power Shot G12, Canon, Krefeld, Deutschland) und die Probenentnahmestellen markiert (siehe Abb. 12).

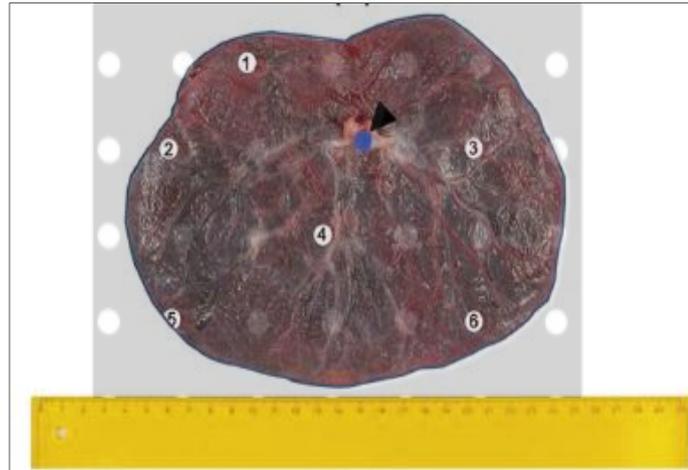


Abbildung 12: Choriale Seite einer Plazenta nach der Markierung mit nummerierten weißen Pins. Das Lineal wurde als institutsinterner Standard zur Größenkontrolle mitfotografiert. 1-6: Probenentnahmeorte, vor Entnahme der Gewebeprouben. Blauer Pin: Nabelschnurinsertion. In Anlehnung an Abb. 11 wurde hier erneut das Raster zur Bestimmung der Probeentnahmestellen überblendet (modifiziert nach [22]).

Mit einer chirurgischen Schere wurden anschließend an den sechs zuvor markierten Punkten Gewebeprouben mit einer Kantenlänge von 0,5 cm – 1 cm entnommen, die alle Gewebsschichten von der Chorion- bis zur Basalplatte enthielten.

### 2.5.3 Fixierung, Paraffineinbettung, Schneiden

Die zuvor anhand des systematic random sampling bestimmten Gewebeprouben wurden in 4,5%iger Formaldehydlösung fixiert (Roti-Histofix: 4,5%, säurefrei, phosphatgepuffert, pH 7; #2213.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und so bis zur weiteren Verarbeitung, mindestens aber 24 Stunden, bei 4°C aufbewahrt.

Zur Vorbereitung auf die Paraffineinbettung im Gewebeproubenbettautomat (Leica ASP200S) wurden die Präparate unter fließendem Leitungswasser 2-6 Stunden lang ausgewaschen, anschließend wurden die Proben einem Standardprotokoll folgend in flüssiges Paraffin überführt (Tabelle 1). Verwendet wurden zur Einbettung die folgenden Chemikalien: Ethanol 99% vergällt (Fa. CLN), Xylol (Merck Produktnr.: 1.08681.1000), Paraffin (Paraplast Bulk, Schmelzpunkt 56°C; #39602012, Leica Biosystems, Nußloch). Es wurde das hausinterne Standardverfahren zur Einbettung angewandt (Tab. 1).

Station	Lösung	Dauer
1	50% Ethanol	1,5 h
2	50% Ethanol	1,5 h
3	70% Ethanol	3h
4	70% Ethanol	3h
5	80% Ethanol	3h
6	96% Ethanol	3h
7	100% Ethanol	3h
8	100% Ethanol	3h
9	Xylol 1	3h
10	Xylol 2	3h
11	Paraffin 1	3h
12	Paraffin 2	3h
13	Paraffin 3	3h

Tabelle 1: Standardeinbettungsprotokoll für Plazenten. Labor der Anatomischen Anstalt München, Lehrstuhl II

Im Anschluss wurden die Gewebeprobe bei 57°C an einer Ausgießstation (Thermo Fisher Scientific, Microm EC350-1) in Paraffinblöcken eingebettet und bei -6°C auf der Kühlplatte abgekühlt. Mittels eines Schlittenmikrotoms (SM2000R, Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) mit Einmalklingen (S35, Fa. Feather, Osaka, Japan) wurden 4 µm dünne Schnitte angefertigt.

Danach wurden die Schnitte im Wasserbad gestreckt, auf Superfrost-plus Objektträger (Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und luftgetrocknet.

#### 2.5.4 Immunhistochemische Doppelfärbung mit Antikörpern gegen $\gamma$ -sm-Aktin und CD34

Um zentrale und periphere Zottentypen unabhängig ihres Kalibers differenzieren zu können, wurde eine immunhistochemische Färbung angewandt, die es ermöglicht, das  $\gamma$ -sm-Aktin der perivaskulären Manschette, welche überwiegend in den zentral gelegenen Plazentazotten zu finden ist, anzufärben. Das  $\gamma$ -sm-Aktin ist ein zytoskelettales Markermolekül plazentarer Myofibroblasten, die die zelluläre Grundlage der perivaskulären Manschette bilden [34, 40, 80]. Nur wenige der peripheren Zottentypen (am Ende der Zottenbäume liegenden Zotten) weisen solche Myofibroblasten in perivaskulärer Position auf. Damit ist die Einteilung in myofibroblastenhaltige und myofibroblastenfreie Zottenanschnitte qualitativ nicht

gleichzusetzen mit der Einteilung in Stammzotten einer- und periphere Intermediär- und Terminalzotten andererseits [24, 34, 40, 67]. Die Unterscheidung nach der Gegenwart von Myofibroblasten ist allerdings weniger subjektiv als die klassische Unterteilung nach Stamm-Intermediär- und Terminalzotten und liefert eine Untersucher-unabhängig reproduzierbare Unterscheidung von Zottentypen.

Dass die klassische morphologische Zottenunterteilung in Stammzotten, Intermediärzotten und Terminalzotten sehr Untersucher-unabhängig und für morphometrische Untersuchungen wenig geeignet ist, wurde in einer detaillierten Validierungsstudie festgestellt [39]. In derselben Studie wurde auch der immunhistochemische Nachweis von  $\gamma$ -sm-Aktin als Möglichkeit empfohlen, die Analyse von dem Problem der subjektiven Unterscheidung von Zottentypen zu entlasten. In der hier vorliegenden Arbeit werden daher nur zwei Typen von Zotten differenziert: Zotten mit perivaskulären Myofibroblasten und Zotten ohne perivaskuläre Myofibroblasten.

Zur Markierung der selbigen wurde eine bereits von Demir et al. beschriebene Methode weiterentwickelt, die eine immunhistochemische Anfärbung von Zytoskelett-Markern der Zellen der perivaskulären kontraktiven Manschette durch Antikörper gegen  $\gamma$ -sm-Aktin ermöglicht [40]. Dabei gelingt die isolierte Anfärbung der perivaskulären kontraktiven Manschette ohne unerwünschte Nebenreaktionen in umgebenden Geweben durch eine genau festgelegte Konzentration der Antikörper während der Färbung.

Vor Beginn der immunhistochemischen Färbung wurden die auf Objektträger aufgebrauchten Schnitte zweimal für zehn Minuten in Xylol entparaffiniert und abschließend in absteigender Alkoholreihe (100%-96%-80%-70%-50%-Aqua dest.) jeweils drei Minuten lang rehydriert.

Die Arbeitsschritte zur Färbung der Präparate erfolgten an zwei aufeinander folgenden Tagen, wie in Tabelle 2 und Tabelle 3 angegeben. Neben dem  $\gamma$ -sm-Aktin wurde auch der plazentare Endothelmarker CD34 nachgewiesen. Durch diesen letzteren Nachweis kann stets zweifelsfrei geklärt werden, dass der  $\gamma$ -sm-Aktin Nachweis eine perivaskulär liegende Zelle darstellt. Auch kollabierte und im Hämatoxylin-Bild der Immunreaktion dann schwierig zu lokalisierende Kapillaren werden noch erkennbar.

Im Ergebnis dieser Doppelfärbung können damit über Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD-34 (Tabelle 2) sowie gegen das  $\gamma$ -sm-Aktin der perivaskulären kontraktiven Zellen (Tabelle 3) das gesamte Kapillarendothel und die perivaskuläre Manschette der Plazentazotten spezifisch und gut unterscheidbar markiert werden. Zur Darstellung der Zellkerne wurde abschließend eine Hämalaun-Gegenfärbung nach Mayer durchgeführt (Schritt 28, Tabelle 3) durchgeführt [81].

Alle Reaktionen, ausgenommen die Aufbewahrung über Nacht bei 4°C (Arbeitsschritt 16) sowie die Visualisierung bei 37°C (Arbeitsschritt 25), fanden bei Raumtemperatur statt. Der pH-Wert der Pufferlösungen (PBS) betrug an Tag 1 durchgehend 7,45, an Tag 2 pH 7,6 (gemäß der Empfehlungen im Data-Sheet der verwendeten Antikörper). Die verwendeten Chemikalien sind in den Tabellen 2 und 3 unter den entsprechenden Arbeitsschritten aufgeführt.

#	Arbeitsschritt	Verwendete Substanzen	Dauer
1	Entparaffinieren	Xylol	2 x 10 min
2	Rehydrieren	Ethanolreihe (100-96-80-70-50-Aqua dest.)	6 x 3 min
3	Spülen	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), 10 mM Natriumphosphat (Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ), 150 mM Natriumchlorid (NaCl), pH 7,4, Merck, #107209, Darmstadt, Deutschland)	5 min
4	Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität im Gewebe mit 3 %igem Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	180 ml PBS + 20 ml Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 3%ig	30 min
5	Spülen	PBS	5 min
6	Blocking mit 5%igem Ziegen-O-Serum (GOS)	50 µl Ziegen-O-Serum 5%ig (Vector Labs, #S1000, Burlingame, CA, USA) + 950 µl PBS	30 min
7	Inkubation mit primärem Antikörper anti-CD34, 1:900 Verdünnung	899 µl GOS-PBS (analog zu Schritt 6) + 1 µl Primärantikörper (anti-CD34; QBEnd/10; Maus, Thermo Fisher Scientific, #MS-363-PO, Fremont, CA, USA)	45 min
8	Spülen	PBS	3 x 5 min
9	Inkubation mit sekundärem biotinyliertem Ziegen-α-Maus-IgG-Antikörper, H&L, 1:200 Verdünnung	Lösung A (2%ig): 0,02 g bovines Serumalbumin (BSA, Sigma- Aldrich, #2153, München, Deutschland) in 1 ml PBS Danach: 995 µl Lösung A + 5 µl sekundärer Antikörper (biotinyliert, Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper, Vector #BA9200, Vector Labs, Burlingame, CA, USA, Verwendung zur Inkubation)	45 min
10	Spülen	PBS	3 x 5 min
11	Inkubation mit Avidin-Peroxidase-Konjugat – Streptavidin, Vectastain-Peroxidase-Standard-Kit (ABC-Komplex)	1 ml PBS (30 min vor Reaktion angesetzt) + 10 µl Avidin DH + 10 µl biotinylierte - Peroxidase (VECTASTAIN® Elite® ABC HRP Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)	45 min
12	Spülen	PBS	3 x 5 min
13	Visualisierung - Peroxidase-Nachweis mit Diaminobenzidin (DAB) als Substrat	1 ml DAB, (#5905, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) (0,67 mg/ml) + 2 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (#8070.4, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	20 min
14	Stoppen	Leitungswasser	kurz
15	Spülen	PBS	2 x 5 min
16	Aufbewahrung bei 4°C	PBS	über Nacht

Tabelle 2: Immunhistochemische Färbung der histologischen Präparate. Arbeitsschritte, Tag 1, Markierung des Kapillarendothels (Antigen CD34).

Abkürzungen verwendeter Substanzen: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, Phosphat Buffered Saline), Natriumphosphat (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), Natriumchlorid (NaCl), Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Ziegen-Null-Serum (GOS), BSA (Bovines Serum Albumin), Diaminobenzidin (DAB).

#	Arbeitsschritt	Verwendete Substanzen	Dauer
17	Spülen	PBS (Phosphat Buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung)	5 min
18	Blocking mit 5%igem Ziegen-Null-Serum (GOS)	995 µl PBS + 50 µl 5%ig GOS	30 min
19	Inkubation mit primärem Antikörper $\gamma$ -sm-Aktin, 1:900 Verdünnung	899 µl 0,1%ig bovines Serumalbumin (BSA, Sigma- Aldrich, #2153, München, Deutschland)-PBS, 0,1% Natriumazid in PBS (pH 7,6) + 1 µl $\gamma$ -sm-Aktin Antikörper (#69133, Mab Clone B4 Maus, MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland)	120 min
20	Spülen	PBS	3 x 5 min
21	Inkubation mit sekundärem biotinyliertem Ziegen- $\alpha$ -Maus-IgM-Antikörper, 1:200 Verdünnung	995 µl 5%ig GOS-PBS (analog zu #18) + 5 µl sekundärer Antikörper	45 min
22	Spülen	PBS	3 x 5 min
23	Inkubation mit Streptavidin- $\beta$ -Galactosidase-Konjugat, 1:100 Verdünnung	990 µl PBS + 10 µl Streptavidin- $\beta$ -Galactosidase-Konjugat (Invitrogen #S931, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)	40 min
24	Spülen	PBS	mind. 30 min
25	Visualisierung - Nachweis der Galactosidase mit X-Gal-Puffer als Substrat, Verdünnung 1:40	975 µl X-Gal Puffer (nach Herstellerangaben hergestellt)+ 25 µl X-Gal Stammlösung (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid, #B1690, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), Durchführung bei 37°C	25 min
26	Spülen	PBS	3 x 5 min
27	Spülen	Aqua dest.	kurz
28	Gegenfärbung	Hämalaun	30 sek
29	Bläuen	Leitungswasser	5 min
30	Spülen	Aqua dest.	kurz

Tabelle 3: Immunhistochemische Markierung der kontraktile Zellen der perivaskulären Manschette über  $\gamma$ -sm-Aktin. Arbeitsschritte, Tag 2. Abkürzungen verwendeter Substanzen: PBS (Phosphat Buffered Saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung), Ziegen-Null-Serum (GOS), BSA (Bovines Serum Albumin).

Abschließend erfolgte das Eindecken der gefärbten Gewebeschnitte in Kaisers Glycingelatine (#109242, Merck, Darmstadt, Deutschland). Um das Austrocknen der Präparate zu vermeiden, wurden diese weiter mit handelsüblichem, transparentem Nagellack umrandet und bis zur stereologischen Untersuchung im Laborkühlschrank bei 2°C bis 8°C gelagert.

## 2.6 Lichtmikroskopische Auswertung durch Stereologie („unbiased Stereology“)

Pro entnommenem Gewebekblock wurde jeweils ein histologischer Schnitt stereologisch analysiert, so dass insgesamt 300 Präparate aus 50 verschiedenen Plazenten (je 6 Schnitte pro Plazenta) untersucht wurden. Eine der analysierten Plazenten musste von der Analyse ausgeschlossen werden, so dass 49 Plazenten mit insgesamt 294 Präparaten in die finale Auswertung der Daten mit einbezogen wurden.

Die gesamte Auswertung erfolgte an kodierten Präparaten unter Blindbedingungen, die untersuchende Doktorandin hatte bis zum Abschluss aller Untersuchungen keine Kenntnis über makroskopische Parameter und perinatale Daten.

### 2.6.1 Stereologischer Arbeitsplatz

Um eine reproduzierbare Messung gewährleisten zu können, wurden für die mikroskopische Untersuchung der Plazenten zwei computergesteuerte stereologische Arbeitsplätze genutzt.

Kernstücke dieser Arbeitsplätze waren die Lichtmikroskope Axioskop (Zeiss, Jena) und BX50 (Olympus, Tokyo), die für die computergesteuerte automatisierte Stichprobendurchführung mit einem motorisierten Objektisch (MBF Bioscience) und einer dazugehörigen Steuereinheit (Typ MAC 6000; Ludl Electronics, Hawthorne, NY, USA) verbunden waren.

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)

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 (Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY USA), Messtaster MT 1271 (Dr. Johannes Heidenhain, Traunreut, Deutschland) und Digitalkamera (1/2" CCD Chip, 1392x1040 Pixel, MBF Bioscience, Williston, VT, USA)

Zur Steuerung der Mikroskope waren diese an Computer des Fabrikates Hewlett Packard angeschlossen, welche unter MS Windows 7 konfiguriert waren, zur stereologischen Auswertung kam die Software Stereo Investigator (Version 10.31) von MBF Biosciences zum

Einsatz. Diese Software steuert den Objektstisch des Mikroskops, dessen Bewegungen absolut kalibriert sind. Die Kalibrierung wird mit einer speziell dazu vorgesehenen und vom Hersteller gelieferten Strichplatte unter dem Mikroskop in der Software hinterlegt. Das mikroskopische Bild wird simultan auf den Monitor des Computers übertragen, wo die kalibrierten Längenangaben dann auf dem Monitor für jedes der beteiligten Objektive zur Verfügung gestellt werden. Die Software übernimmt die selbständige Ansteuerung der Messfelder im Präparat, die ebenfalls innerhalb der Software nach den Kriterien des systematic random sampling ausgewählt wurden.

## 2.6.2 MBF Biosciences Stereo Investigator

### 2.6.2.1 Mess-Algorithmus

Zunächst erfolgte die Messung von Trainingsschnitten, um die Durchführung der Untersuchungen zu erlernen, dann eine weitere Testmessung mit zwölf Plazenten, um die Validität der Daten zu überprüfen. Danach schloss sich die Hauptmessung mit 50 Plazenten (= 300 Einzelpräparate) an. Die Bearbeitungsdauer für ein Präparat betrug dabei je nach Präparatgröße zwischen 30 Minuten und 3,5 Stunden.

### 2.6.2.2 Voreinstellungen

Die Einlage des Schnittpräparates auf dem Objektstisch erfolgte immer mit Ausrichtung des Labels nach links aus Sicht des Untersuchers. Bei einer Vergrößerung von 1,25x wurde ein Reference Point am Rand des Präparates gesetzt, anschließend wurde mit dem Contour-Tool eine Umrandung des relevanten Messbereiches festgelegt, die Region of Interest (ROI), welche das plazentare Gewebe beinhaltete.

Um mit der Messung beginnen zu können, wurde zunächst der Counting Frame (Zählrahmen) auf eine Größe von  $x=50\ \mu\text{m}$  und  $y=100\ \mu\text{m}$  festgesetzt.

### 2.6.2.3 Nearest Neighbor

Das im Programm Stereo Investigator integrierte Tool Nearest Neighbor bietet eine Methode zur dreidimensionalen Analyse von Geweben im Kontext des bereits beschriebenen systematic random sampling [82]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Nearest Neighbor genutzt, um Diffusionsdistanzen vom am Zottenrand liegenden Synzytiotrophoblasten bis zum jeweils nächstgelegenen Gefäß (kürzeste Distanz ermittelt mit Hilfe des Nearest Neighbor Tools) zu messen und dabei gleichzeitig die Konkavitäten der Oberflächen von Zotten und Gefäßen unter Berücksichtigung der  $\gamma$ -sm-Aktinpositivität zu erfassen.

### 2.6.2.4 Ablauf der Messentscheidungen

Nach dem Start des Nearest Neighbor Tools wurden die randomisiert festgelegten Messpunkte, deren Anzahl je nach Größe des umrandeten Bereichs variierte, von der Software Stereo Investigator automatisch angesteuert. Anhand der Umrandung des relevanten Messbereiches und dessen gitterförmige Unterteilung in gleich große Felder von  $550\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$  Größe, konnte so unter einer Vergrößerung von 40x jedes Feld einzeln randomisiert mit dem Mikroskop angefahren und - innerhalb des durch rote und grüne Linien markierten Counting Frames – eine Messung durchgeführt werden (Abbildung 13).

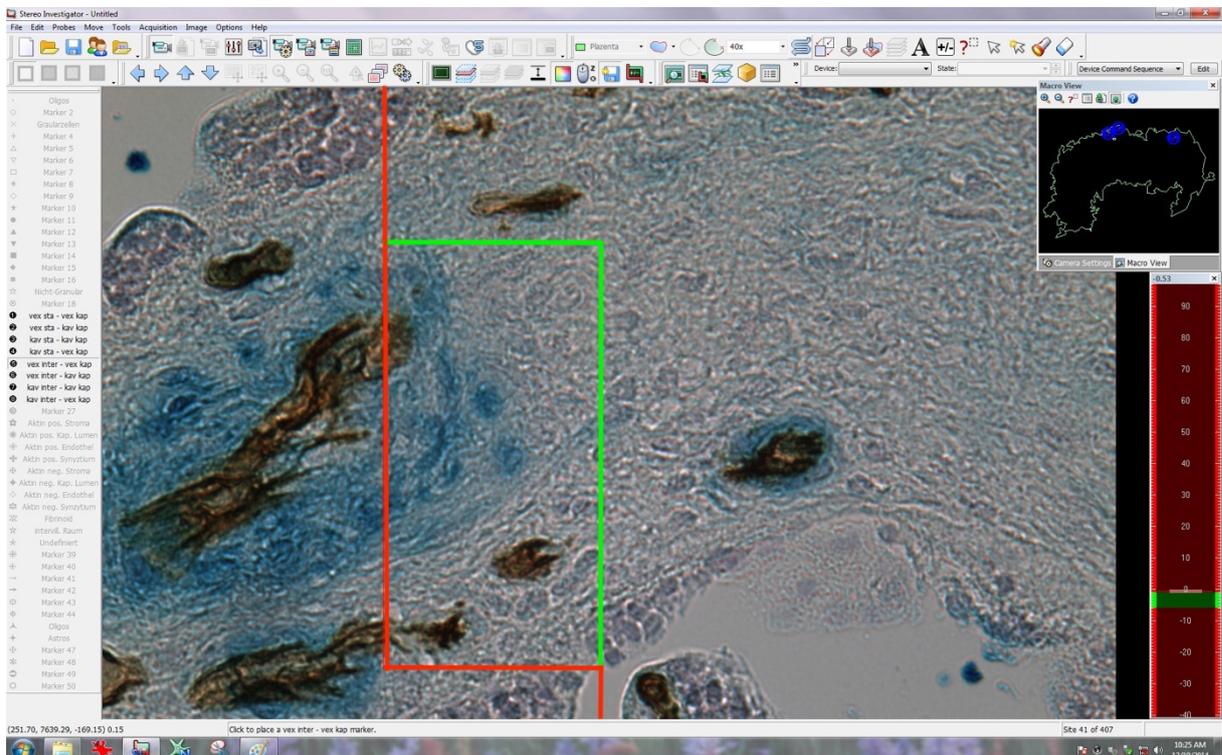


Abbildung 13:  $\gamma$ -sm-Aktin-positive Zotte im Programm Stereo Investigator  $50 \times 100\ \mu\text{m}$  großer Zählrahmen (Counting Frame, rote und grüne Linien) und Messgerade (grün-rote vertikale Linie im Zählrahmen rechts). Zur grafischen Verdeutlichung werden die farbigen Linien in der Abbildung verdickt dargestellt.

Sequentiell wurde dabei eine Routine mit folgenden Entscheidungen nach folgenden Kriterien abgearbeitet:

Ausgehend von der von der oberen rechten Ecke des Counting Frames getroffenen Struktur (grüne Linie), wurde zunächst die zu messende Zotte bestimmt (Abbildung 14).

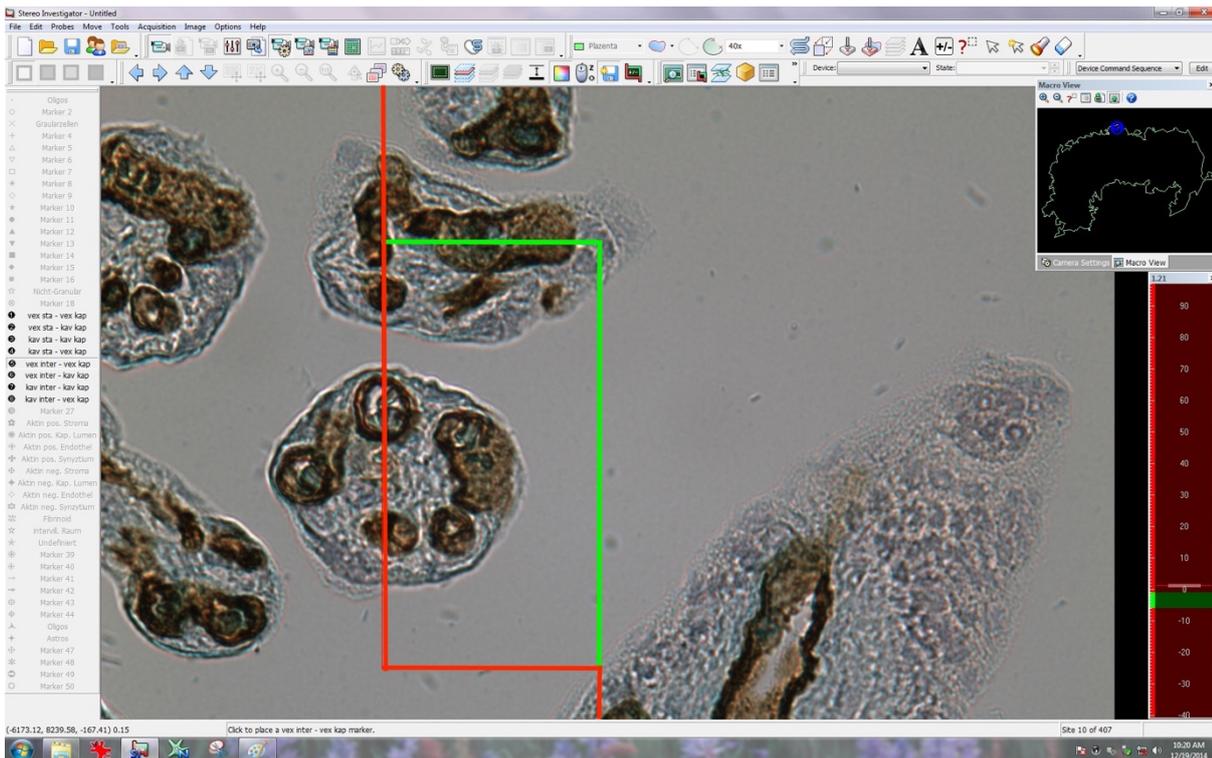


Abbildung 14: Messung einer  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotte im Programm Stereo Investigator 50x100  $\mu$ m großer Zählrahmen (Counting Frame, rote und grüne Linien) und Messgerade (grün-rote vertikale Linie im Zählrahmen rechts). Zur grafischen Verdeutlichung werden die farbigen Linien in der Abbildung verdickt dargestellt.

Im Anschluss daran wurde bewertet, welche der folgenden Kombinationen von Zotten- und Gefäßmorphologie sowie Aktinpositivität vorlag und der entsprechende Marker ausgewählt, um auf Höhe der vertikalen grünen Messgerade den Trophoblastenrand und den nächstgelegenen Gefäß- bzw. Kapillarrand zur Erfassung der Diffusionsdistanz zu markieren (Abbildung 15).

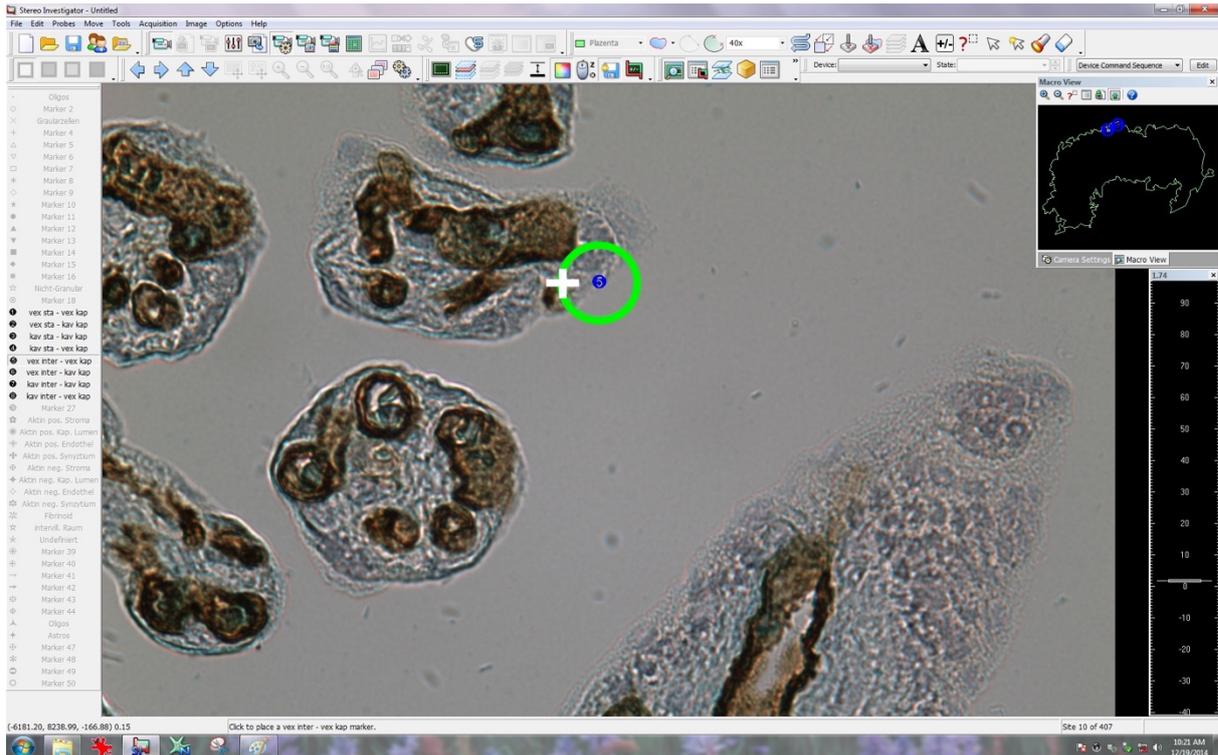


Abbildung 15: Messung einer  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotte im Programm Stereo Investigator. Nach erfolgter Markierung des Trophoblastenrandes (blauer Punkt) wurde der nächstgelegene Gefäßrand aufgesucht und ebenso markiert (weißes Kreuz). Der Morphologie des Zottenrandes entsprechend wurde der passende Marker zur Kategorisierung bei konvexer Zotte und konvexem Gefäß ausgewählt (in diesem Fall: vex inter. – vex kap). Der grüne Kreis diente hierbei der Ermittlung des geringsten Abstandes von Trophoblastenrand zu Gefäß. Zur grafischen Verdeutlichung werden die farbigen Linien in der Abbildung verdickt dargestellt.

Das Vorliegen einer Aktinpositivität und somit die Einordnung einer Zotte als  $\gamma$ -sm-Aktin-positive Zotte konnte anhand der azurblauen Färbung (siehe bspw. Abbildung 13) der perivaskulären Manschette erfolgen.

Eine Oberfläche im Schnitt wurde dann als konvex oder konkav bewertet, wenn der Zotten- oder Gefäßrand an seiner Oberfläche im Bereich der zuvor festgelegten Messpunkte eine dementsprechende nach außen gekrümmte (konvexe) oder nach innen gekrümmte (konkave) Morphologie aufwies. Sofern der Zottenanschnitt an der zu bewertenden Stelle gerade war, wurde er als konvex gezählt.

Die für die Klassifizierungsentscheidung der gemessenen Zotten ausschlaggebende Morphologie und immunhistochemische Aktin-Positivität erlaubten dabei die Unterteilung in folgende Gruppen:

Gemessene histologische Strukturen	Marker
Konvexe $\gamma$ -sm-Aktin-positive Zotte – Konkaves Gefäß	vexsta-vexkap
Konvexe $\gamma$ -sm-Aktin-positive Zotte – Konkaves Gefäß	vexsta-kavkap
Konkave $\gamma$ -sm-Aktin-positive Zotte – Konkaves Gefäß	kavsta-vexkap
Konkave $\gamma$ -sm-Aktin-positive Zotte – Konkaves Gefäß	kavsta-kavkap
Konvexe $\gamma$ -sm-Aktin-negative Zotte – Konkaves Gefäß	vexinter-vexkap
Konvexe $\gamma$ -sm-Aktin-negative Zotte – Konkaves Gefäß	vexinter-kavkap
Konkave $\gamma$ -sm-Aktin-negative Zotte – Konkaves Gefäß	kavinter-vexkap
Konkave $\gamma$ -sm-Aktin-negative Zotte – Konkaves Gefäß	kavinter-kavkap

Tabelle 4: Übersicht aller acht möglichen Messkonstellationen der stereologischen Auswertung von Plazenta-Präparaten anhand von Markern im Messprogramm Stereo Investigator – Nearest Neighbor Analyse. Zur terminologischen Vereinfachung wurden innerhalb der Messung die  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten als Stammzotte und die  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten als Intermediärzotten erfasst. Ebenso wurden Gefäße ohne weitere Differenzierung als Kapillare benannt, die Begriffe wurden synonym verwendet.

Alle Messpunkte wurden für die (Teil-) Volumenbestimmungen benutzt. Von der Bestimmung der Zottenstruktur mit den in Tabelle 4 beschriebenen Messkonstellationen nicht erfassten Messpunkte - welche in fibrinoidem Gewebe lagen (Abb. 16), so dass die Zottenmorphologie nicht mehr eindeutig identifizierbar war, wie auch diejenigen, die sich im intervillösen Raum wiederfanden – wurden ebenso in die Volumenbestimmungen eingeschlossen. In diesen speziellen Fällen erfolgte keine Markierung und Messung von Diffusionsdistanzen, sondern die Messpunkte gingen als intervillöser Raum in die relative Volumenbestimmung ein.

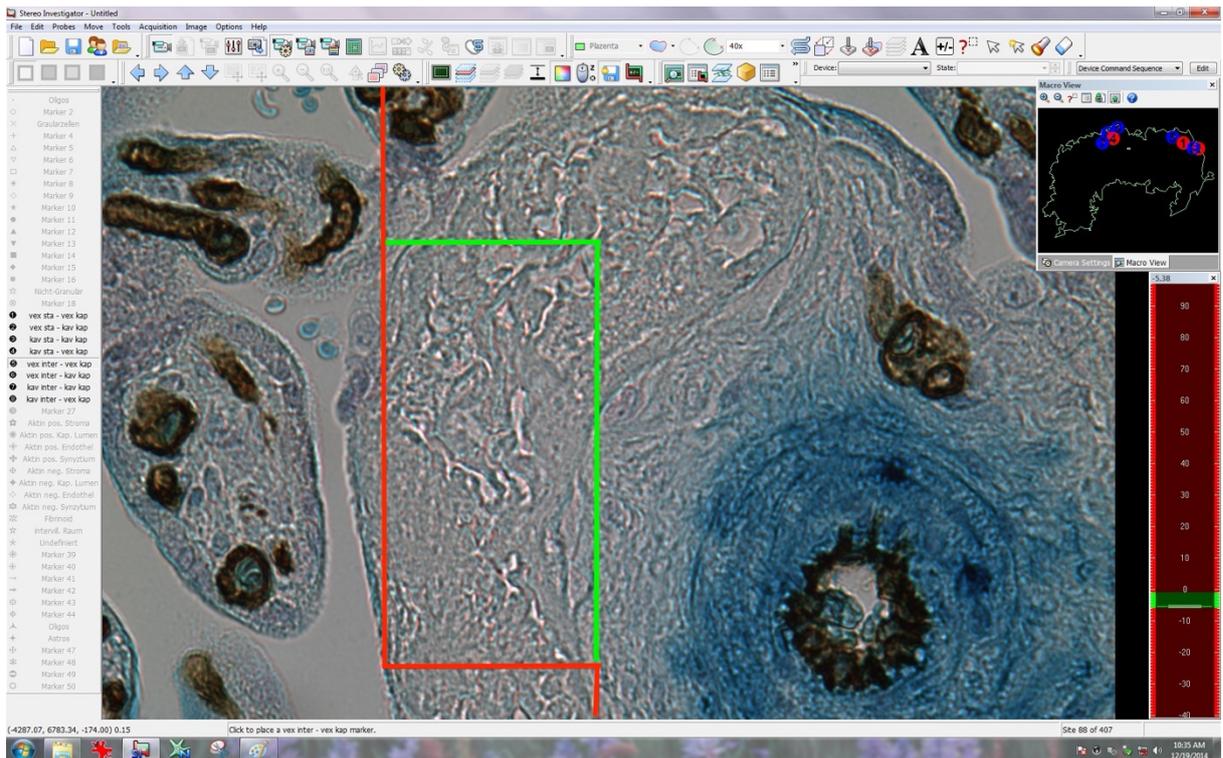


Abbildung 16: Messung im Programm Stereo Investigator. Der Referenzpunkt des Zählrahmens liegt in fibrinoidem Gewebe, so dass der Messpunkt als intervillöser Raum in die Datenerhebung eingegangen ist. Zur grafischen Verdeutlichung werden die farbigen Linien in der Abbildung verdickt dargestellt.

Messpunkte, welche innerhalb einer Zotte lagen, aber eine Messung nicht zuließen, da aufgrund des Anschnittes oder der Zottengröße im gesamten sichtbaren Messbereich kein Trophoblastenrand zu markieren war, wurden anhand einer Strichliste, die die Anzahl von  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen und  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten festhielt, in die Datenerhebung mit einbezogen (siehe dazu bspw. Abb. 17).

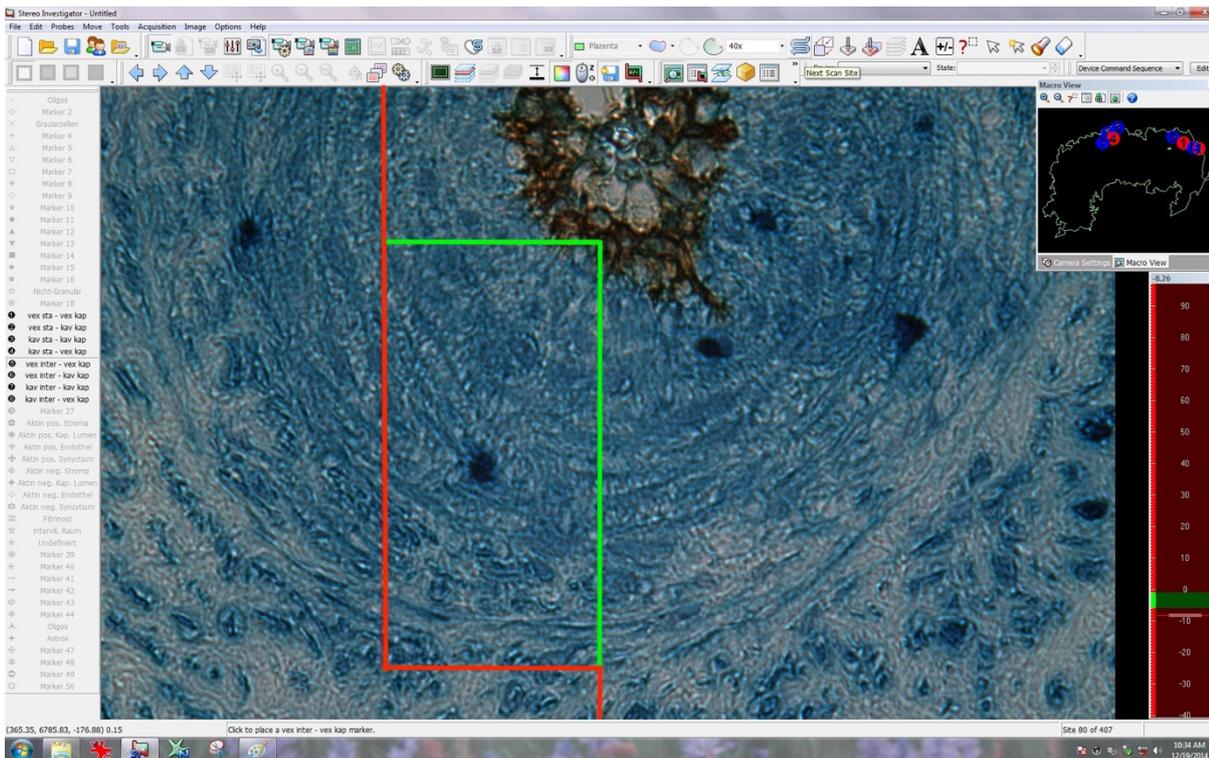


Abbildung 17: Messung einer  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotte ohne Anschnitt des Throphoblastenrandes im Programm Stereo Investigator.

Zur grafischen Verdeutlichung werden die farbigen Linien in der Abbildung verdickt dargestellt.

Nach Abschluss der Messung wurden alle generierten Rohdaten zur weiteren Auswertung aus dem Messprogramm in Excel-Tabellen exportiert und die angefertigten Strichlisten manuell in Excel ergänzt.

### 2.6.3 Erhobene mikroskopische Parameter

Anhand der erhobenen Messungen konnten, entsprechend dem zugrundeliegenden Prinzip der point counting technique nach Thompson [83], Rohdaten über Volumenanteile (Volume fractions) des intervillösen Raums (INTRO), der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven und -negativen Zotten (posVILLI/ negVILLI) und der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven und -negativen Kapillaren (posCAP/ negCAP) gesammelt werden, welche anschließend genutzt wurden, um die absoluten Volumina zu errechnen [76, 84]. Dazu wurde zunächst das anteilige Verhältnis (Ratio) der einzelnen gemessenen Strukturen zur Gesamtzahl der Messpunkte ermittelt (Volume fractions) und die so erhobenen, geschätzten Volumenanteile zur Berechnung der absoluten Volumina mit der Dichte des placentaren Gewebes (1,05g/ml) multipliziert [85].

Auch wurden bei jeder durchgeführten Messung die prozentualen Anteile von Konkavität der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven und -negativen Zotten (posVILLIconcavity [%]/negVILLIconcavity [%]) und der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven und -negativen Kapillaren (posCAPconcavity [%]/negCAPconcavity [%]) erfasst.

Ferner konnten zudem die Diffusionsdistanzen vom Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven und – negativen Zottenanschnitten (posDIFdistance [ $\mu\text{m}$ ]/negDIFdistance [ $\mu\text{m}$ ]) quantifiziert werden.

## 2.7 Statistische Analyse

Um die Daten der erhobenen mikroskopischen und makroskopischen Parameter sowohl miteinander als auch untereinander vergleichen zu können wurden zunächst die Mittelwerte (das arithmetische Mittel) aus den sechs histologischen Schnitten pro Plazenta zu einem Wert zusammengeführt und im Folgenden die aggregierten Daten genutzt (s. Tabellen 5 und 6).

### 2.7.1 Verwendete Software & Tests

Die Auswertung und Visualisierung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism (Version 5.04, GraphPad Software, San Diego, USA) und der Software R (R Core Team, Wien, Österreich, 2021) sowie der darin enthaltenen Packages [86]. Zur Erstellung der Streudiagramme wurde die Funktion `scatterplotMatrix` aus dem Package `car` der Software R genutzt [87]. Die Heatmaps für die Korrelationen wurden mit der Funktion `corrplot` aus dem gleichnamigen Package angefertigt [88].

Die Signifikanz-Tests wurden mithilfe der Funktion `corr.test` aus dem Package `psych` durchgeführt. Es folgte die multiple bivariate Korrelationsanalyse nach Spearman, hier wurde mit R eine sogenannte Rangkorrelation mit p-Wert-Ranking entwickelt.

Im Anschluss wurde, um das Auftreten von  $\alpha$ -Fehlern (Annahme von Alternativhypothese bei korrekter Nullhypothese) zu reduzieren, eine Korrektur nach Holm durchgeführt.

Um die Signifikanz der ausgewählten Zusammenhänge im Anschluss graphisch überprüfen zu können und potentielle Außreißerwerte, die zu einer Verfälschung der Signifikanz hätten führen könnten, zu detektieren, wurden lineare Regressionsanalysen und die dazugehörigen Punktverteilungen mit GraphPad Prism erstellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Immunhistochemische Identifizierung von $\gamma$ -sm-Aktin und Differenzierung von histologischen Strukturen der Plazentazotte

Anhand der bereits in Kapitel 2.5.4 ausführlich beschriebenen immunhistochemischen Anfärbung der perivaskulären Manschette und der Myofibroblasten konnte während der stereologischen Messung der histologischen Präparate zwischen Anschnitten  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver und  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten unterschieden werden. Diese Unterscheidung in zwei immunhistochemisch definierte Zottentypen erwies sich als einfacher durchzuführen als die umständlichere Unterscheidung der Zottentypen nach komplexen morphologischen Kriterien in drei verschiedene Zottentypen [39].

Abbildung 18 veranschaulicht in 40-facher Vergrößerung die immunhistochemische Nachweisreaktion für  $\gamma$ -sm-Aktin, die beim Vorliegen einer perivaskulären Manschette die Myofibroblasten in der Plazentazotte intensiv indigo-blau erscheinen lässt.

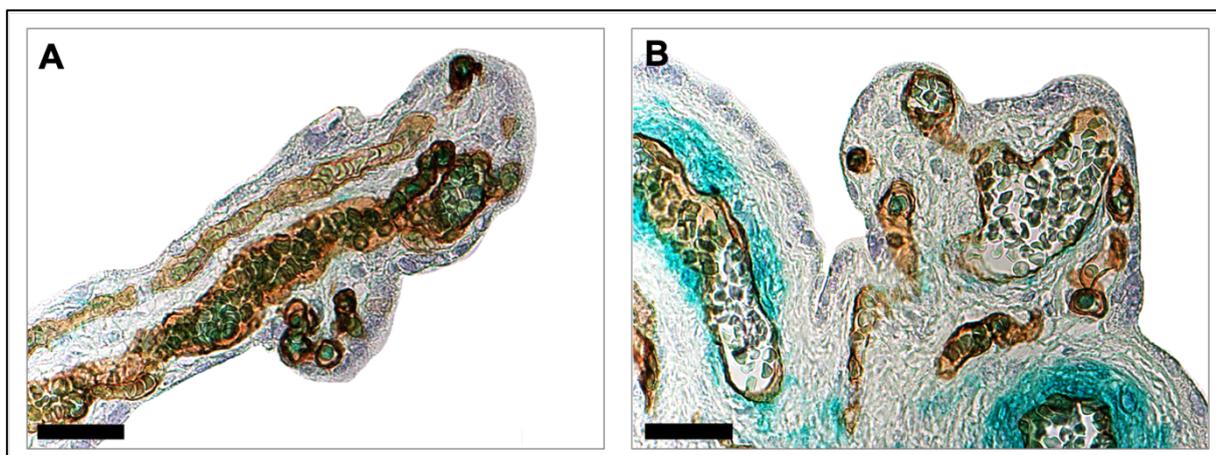


Abbildung 18: Bestimmung von Subtypen der Zottenbäume durch Immunhistochemie. Abbildung A zeigt eine  $\gamma$ -sm-Aktin-negative Zotte in 40facher mikroskopischer Vergrößerung (40x). Braunes Reaktionsprodukt markiert das CD34-positive Endothel der Kapillaren, die mit Erythrozyten gefüllt sind. In Abbildung B ist eine  $\gamma$ -sm-Aktin-positiv Zotte zu sehen, deren perivaskuläre Manschette immunhistochemisch typisch indigo-blau angefärbt wurde. Der Messbalken entspricht 25  $\mu$ m.

---

Darüber hinaus konnte unter Zuhilfenahme des Stereoinvestigator Tools „Nearest Neighbor“ - wie ebenso bereits in Kapitel 2.6.2 erläutert – während der Messung der Diffusionsdistanzen vom Syzytiotrophoblastenrand der Zotten bis zum nächstgelegenen Kapillarrand eine Differenzierung und weitere Unterteilung der Zotten vorgenommen werden. Dabei ergaben sich insgesamt zwölf verschiedene Meßvarianten bzw. Meßkombinationen, abhängig von der Zottenmorphologie.

Es wurden (bezogen auf die Zottenoberfläche im Schnitt) konvexe und konkave  $\gamma$ -sm-Aktin-positive sowie  $\gamma$ -sm-Aktin-negative Zotten mit wiederum sowohl konvexen als auch konkaven Kapillaroberflächen gemessen. Darüber hinaus fanden sich Messpunkte, welche in fibrinoidem Gewebe, im intervillösen Raum oder gänzlich innerhalb einer Zotte lagen und so die vorgesehene Messung von Syzytiotrophoblast zu Kapillarrand nicht zuließen. Eine Übersicht über alle möglichen Messvarianten inklusive der markierten Messpunkte bzw. des Zählrahmens finden sich in 40-facher Vergrößerung in Abbildung 19.

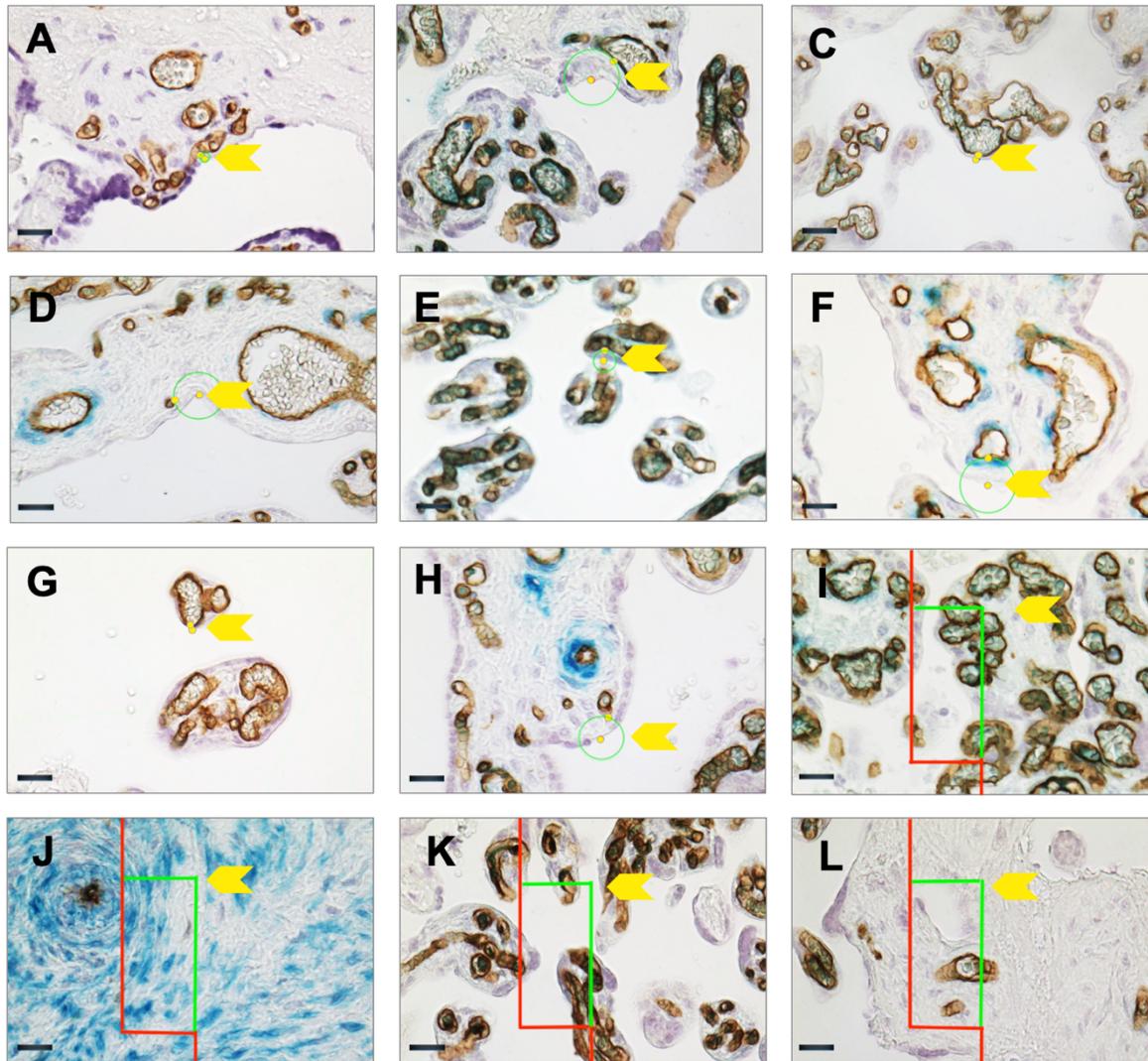


Abbildung 19: Screenshots von Meßkonstellationen in Stereo Investigator.

Bilder A-L: Screenshots der Meßsituationen bei der Auswertung histologischer Schnittpräparate der Plazenta mit der Software Stereo Investigator in 40-facher Vergrößerung (40x) während der Nearest Neighbor Analyse der Diffusionsdistanzen nach Subtypisierung von Zottenbäumen durch Immunhistochemie. Die blaue Immunreaktion markiert die Gegenwart von  $\gamma$ -sm-Aktin in perivaskulären Zonen. Die braune Immunreaktion (Nachweis von CD34 als Endothelmarker) markiert das Endothel der Blutgefäße. Die Punkte sind zusätzlich durch große gelbe Pfeile markiert und bezeichnen die Messpunkte am Kapillar- bzw. Trophoblastenrand. In Bild I-L sind keine Messpunkte, sondern lediglich der Zählrahmen zu sehen, dessen rechte obere Ecke sich sowohl innerhalb als auch außerhalb messbarer Zottenstrukturen befinden kann. Die Bilder zeigen folgende speziellen Messsituationen: Bild A: Konkave  $\gamma$ -sm-Aktin-negative Zotte mit konkaver Kapillare. Bild B: Konkave  $\gamma$ -sm-Aktin-positive Zotte mit konkaver Kapillare. Bild C: Konkave  $\gamma$ -sm-Aktin-negative Zotte mit konvexer Kapillare. Bild D: Konkave  $\gamma$ -sm-Aktin-positive Zotte mit konvexer Kapillare. Bild E: Konvexe  $\gamma$ -sm-Aktin-negative Zotte mit konkaver Kapillare. Bild F: Konvexe  $\gamma$ -sm-Aktin-positive Zotte mit konkaver Kapillare. Bild G: Konvexe  $\gamma$ -sm-Aktin-negative Zotte mit konvexer Kapillare. Bild H: Konvexe  $\gamma$ -sm-Aktin-positive Zotte mit konvexer Kapillare. Bild I: Zählrahmen in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotte. Bild J: Zählrahmen in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotte. Bild K: Zählrahmen im intervillösen Raum. Bild L: Zählrahmen im Fibrinoid. Der am unteren linken Bildrand befindliche Meßbalken entspricht jeweils 25  $\mu$ m.

### 3.2 Deskriptive Statistik

Insgesamt wurden im Rahmen des experimentellen Teiles dieser Dissertation 50 Plazenten untersucht, aus welchen wiederum jeweils 6 Einzelpräparate (siehe Kapitel 4.2.1) zur histologischen Analyse lichtmikroskopisch genutzt wurden. Da eine Plazenta aufgrund unvollständiger morphometrischer Daten aus der Auswertung ausgeschlossen werden musste, flossen lediglich die Daten von 49 Plazenten in die endgültige Auswertung ein.

In der ausgewerteten Plazentapopulation waren von den 25 männlichen Neugeborenen 12 per Sectio und 13 vaginal entbunden worden, bei den 24 weiblichen Neugeborenen fand in 11 Fällen eine Sectio und in 13 Fällen eine vaginale Geburt statt.

Zottenbezogene mikroskopische Messparameter wurden nach der immunhistochemischen Reaktion im perivaskulären Stroma der untersuchten Zotte in  $\gamma$ -sm-Aktin-positive (Vorsilbe „pos“) und  $\gamma$ -sm-Aktin-negative (Vorsilbe „neg“) Teil-Parameter aufgeteilt und getrennt ausgewertet. Die Trennung in diese beiden Hauptkategorien unterteilt für die betroffenen Parameter den Zottenbaum nach der immunhistochemischen Gegenwart bzw. Abwesenheit von  $\gamma$ -sm-Aktin als Markermolekül für Myofibroblasten der perivaskulären kontraktiven Manschette. Innerhalb dieser beiden Hauptkategorien wurden sowohl das Volumen der Zotten (posVILLI/negVILLI in [ml]), die Konkavität der Zotten (posVILLIconcavity/negVILLIconcavity in [%]), das Volumen der Kapillaren (posCAP/negCAP in [ml]), die Konkavität der Kapillaren (posCAPconcavity/negCAPconcavity in [%]) als auch die Diffusionsdistanz vom Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand (posDIFdistance/negDIFdistance in [ $\mu$ m]) analysiert. Das Volumen des intervillösen Raumes (INTRO in [ml]) wurde in Gänze ohne diese Aufteilung ausgewertet.

Tabelle 5 veranschaulicht zusammenfassend die absoluten Mittelwerte und Standardabweichungen der makroskopisch erfassten Parameter, während Tabelle 2 die absoluten Mittelwerte und Standardabweichungen zu den mikroskopischen Daten der untersuchten Plazentapopulation bietet. Die jeweiligen Werte sind Mittelwerte aus der Auswertung von 49 Plazenten à 6 Einzelpräparate pro Plazenta.

Die ausgewerteten makroskopischen Parameter umfassen das Gestationsalter (GA in [Wochen]), das Geburtsgewicht (GG in [g]), das Gewicht der Plazenta (PG in [g]), das Verhältnis von Plazenta- zu Geburtsgewicht (PG\_GG\_Ratio), den längsten Durchmesser der Plazenta (LDM in [cm]), den

kürzesten Durchmesser der Plazenta (KDM in [cm]), die Oberfläche der Plazenta (OF in [cm<sup>2</sup>]) sowie die Dicke der Plazenta (DICKE in [cm]).

n=49	Mittelwert	± SA
GA [Wochen]	39,6	± 1,2
GG [g]	3404	± 426
PG [g]	502	± 94
PG_GG_Ratio	0,15	± 0,03
LDM [cm]	19,6	± 1,8
KDM [cm]	16,3	± 2,0
OF [cm <sup>2</sup> ]	1011	± 178
DICKE [cm]	1,6	± 0,3

Tabelle 5: Deskriptive Statistik der Makroskopie der gesamten untersuchten Plazentapopulation (n=49) mit Mittelwerten und Standardabweichung (SA).

Dargestellt sind Gestationsalter (GA [Wochen]), Geburtsgewicht (GG [g]), Plazentagewicht (PG [g]), Verhältnis von Plazenta- zu Geburtsgewicht (PG\_GG\_Ratio), längster Durchmesser der Plazenta (LDM [cm]), kürzester Durchmesser der Plazenta (KDM [cm]), Oberfläche der Plazenta (OF [cm<sup>2</sup>]) und Dicke der Plazenta (DICKE [cm]).

Tabelle 6 stellt die Mittelwerte und Standardabweichungen für die mikroskopisch erhobenen Parameter dar, den intervillösen Raum (INTRO in [ml]), das Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLI in [ml]), die Konkavität der Oberfläche  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLIconcavity in [%]), das Volumen der Kapillaren in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posCAP in [ml]), die Konkavität der Oberfläche der Kapillaren in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posCAPconcavity in [%]), die Diffusionsdistanz vom Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posDIFdistance in [cm]), das Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLI in [ml]), die Konkavität der Oberfläche  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLIconcavity in [%]), das Volumen der Kapillaren in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negCAP in [ml]), die Konkavität der Oberfläche der Kapillaren in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negCAPconcavity in [%]) sowie die Diffusionsdistanz vom Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negDIFdistance in [ $\mu$ m]).

n=49	Mittelwert	± SA
INTRO [ml]	292,97	± 61,75
posVILLI[ml]	212,94	± 80,35
posVILLIconcavity [%]	8,67	± 4,82
posCAP [ml]	88,12	± 56,09
posCAPconcavity [%]	0,46	± 0,68
posDIFdistance [µm]	15,80	± 3,87
negVILLI [ml]	289,98	± 94,82
negVILLIconcavity [%]	5,88	± 3,96
negCAP [ml]	261,08	± 83,06
negCAPconcavity [%]	0,91	± 1,26
negDIFdistance [µm]	7,07	± 1,61

Tabelle 6: Deskriptive Statistik der Mikroskopie der gesamten untersuchten Plazentapopulation (n=49) mit Mittelwerten und Standardabweichungen (SA).

Dargestellt sind Intervillöser Raum (INTRO [ml]), Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLI [ml]), Konkavität der Oberfläche  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLIconcavity [%]), Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Kapillaren (posCAP [ml]), Konkavität der Oberfläche der Kapillaren in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posCAPconcavity [%]), Diffusionsdistanz vom Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posDIFdistance [µm]), Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLI [ml]), Konkavität der Oberfläche  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLIconcavity [%]), Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Kapillaren (negCAP [ml]), Konkavität der Oberfläche der Kapillaren in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negCAPconcavity [%]) sowie Diffusionsdistanz vom Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negDIFdistance [µm]).

Zur genaueren Ausführung der Messwerte enthält Tabelle 7 anschließend zudem die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen gemessenen Plazenten (n=49) der bereits oben aufgeführten  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Teilparameter und des intervillösen Raumes. Die entsprechenden Auswertung für die bereits erwähnten  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Teilparameter ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

Nr		INTRO [ml]	posVILLI [ml]	posVILLI concavity [%]	posCAP [ml]	posCAP concavity [%]	posDIF distance [ $\mu$ m]
1	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	349,44 $\pm$ 57,56	410,83 $\pm$ 66,39	11,56 $\pm$ 3,16	242,8 $\pm$ 60,78	0,76 $\pm$ 1,86	10,94 $\pm$ 3,18
2	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	284,06 $\pm$ 52,18	410,51 $\pm$ 56,72	14,11 $\pm$ 2,09	265,68 $\pm$ 47,74	1,26 $\pm$ 1,56	8,17 $\pm$ 2,41
3	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	255,63 $\pm$ 39,15	320,47 $\pm$ 75,80	17,62 $\pm$ 4,38	180,35 $\pm$ 55,02	1,12 $\pm$ 0,80	10,12 $\pm$ 1,03
4	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	261 $\pm$ 20,37	273,93 $\pm$ 57,12	17,39 $\pm$ 8,73	122,77 $\pm$ 72,30	0,27 $\pm$ 0,67	10,96 $\pm$ 2,43
5	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	311,01 $\pm$ 15,77	215,53 $\pm$ 69,37	10,42 $\pm$ 9,92	90,88 $\pm$ 36,29	0,725 $\pm$ 1,78	13,79 $\pm$ 4,61
6	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	256,03 $\pm$ 28,70	128,13 $\pm$ 34,61	7,21 $\pm$ 8,60	48,36 $\pm$ 19,88	0,46 $\pm$ 1,13	14,56 $\pm$ 2,78
7	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	384,74 $\pm$ 74,87	277,26 $\pm$ 64,90	4,14 $\pm$ 5,07	90,95 $\pm$ 39,30	0,9 $\pm$ 2,21	16,56 $\pm$ 4,13
8	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	371,5 $\pm$ 17,30	430,07 $\pm$ 102,10	8,26 $\pm$ 4,36	220,32 $\pm$ 46,56	0,49 $\pm$ 0,58	8,96 $\pm$ 1,18
9	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	228,23 $\pm$ 19,65	104,46 $\pm$ 31,58	9,62 $\pm$ 20,02	29,95 $\pm$ 11,33	0 $\pm$ 0	16,9 $\pm$ 5,03
10	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	223,35 $\pm$ 15,23	109,78 $\pm$ 23,31	6,36 $\pm$ 9,87	31,21 $\pm$ 13,67	0 $\pm$ 0	18,48 $\pm$ 4,63
11	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	450,61 $\pm$ 46,54	216,43 $\pm$ 51,78	5,9 $\pm$ 7,95	72,47 $\pm$ 9,29	0 $\pm$ 0	20,17 $\pm$ 7,25
12	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	435,01 $\pm$ 60,79	239,99 $\pm$ 39,32	1,74 $\pm$ 2,14	83,35 $\pm$ 24,73	0 $\pm$ 0	20,48 $\pm$ 4,95
13	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	383,46 $\pm$ 48,74	225,02 $\pm$ 24,98	6,06 $\pm$ 4,25	63,27 $\pm$ 15,98	0 $\pm$ 0	20,46 $\pm$ 5,20
14	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	287,9 $\pm$ 33,58	179,4 $\pm$ 48,86	5,46 $\pm$ 2,80	62,29 $\pm$ 23,63	0 $\pm$ 0	18,63 $\pm$ 5,22
15	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	214,56 $\pm$ 22,58	123,02 $\pm$ 26,03	4 $\pm$ 3,29	42,15 $\pm$ 11,76	0 $\pm$ 0	19,36 $\pm$ 2,63
16	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	195,9 $\pm$ 31,54	151,87 $\pm$ 17,46	3,65 $\pm$ 2,60	54,14 $\pm$ 13,55	0,23 $\pm$ 0,58	18,83 $\pm$ 3,06
17	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	247,33 $\pm$ 29,19	182,32 $\pm$ 31,47	2,4 $\pm$ 2,01	67,49 $\pm$ 10,07	0 $\pm$ 0	15,2 $\pm$ 1,44
18	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	280,54 $\pm$ 18,94	156,97 $\pm$ 32,03	5,09 $\pm$ 4,38	43,12 $\pm$ 8,35	0 $\pm$ 0	20,95 $\pm$ 3,85
19	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	337,45 $\pm$ 19,83	199,56 $\pm$ 17,08	4,1 $\pm$ 3,67	81,17 $\pm$ 16,59	0 $\pm$ 0	16,47 $\pm$ 1,96
20	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	357,8 $\pm$ 37,57	210,75 $\pm$ 49,10	7,13 $\pm$ 6,07	67,39 $\pm$ 13,38	0 $\pm$ 0	16,31 $\pm$ 3,61
21	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	301,52 $\pm$ 38,90	238,98 $\pm$ 49,55	6,16 $\pm$ 5,59	41,84 $\pm$ 16,40	0 $\pm$ 0	24,91 $\pm$ 5,10
22	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	282,29 $\pm$ 36,68	171,62 $\pm$ 26,24	4,12 $\pm$ 3,94	54,45 $\pm$ 8,74	0 $\pm$ 0	21,47 $\pm$ 3,20
23	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	330,67 $\pm$ 20,76	209,22 $\pm$ 23,16	2,99 $\pm$ 4,48	80,04 $\pm$ 20,40	0 $\pm$ 0	20,08 $\pm$ 3,15
24	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	242,52 $\pm$ 22,98	130,4 $\pm$ 29,16	2,43 $\pm$ 3,82	33,09 $\pm$ 21,66	0 $\pm$ 0	20,6 $\pm$ 5,51
25	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	252,99 $\pm$ 22,48	154,49 $\pm$ 25,73	9,18 $\pm$ 6,12	39,91 $\pm$ 13,68	1,39 $\pm$ 3,40	18,54 $\pm$ 4,89
26	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	318,01 $\pm$ 24,09	154,67 $\pm$ 47,84	2,16 $\pm$ 3,43	41,24 $\pm$ 24,13	1,28 $\pm$ 3,14	18,14 $\pm$ 2,50
27	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	256,25 $\pm$ 32,85	99,36 $\pm$ 24,02	2,66 $\pm$ 5,02	29,24 $\pm$ 10,48	0 $\pm$ 0	19,6 $\pm$ 3,57
28	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	356,16 $\pm$ 16,19	158,39 $\pm$ 36,62	5,65 $\pm$ 6,35	58,42 $\pm$ 27,73	0 $\pm$ 0	15,02 $\pm$ 3,52
29	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	240,72 $\pm$ 14,86	182,57 $\pm$ 32,17	6,6 $\pm$ 2,69	71,44 $\pm$ 21,59	0 $\pm$ 0	15,57 $\pm$ 4,48
30	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	236,58 $\pm$ 25,54	143,38 $\pm$ 21,84	3,3 $\pm$ 5,16	38,97 $\pm$ 11,80	0 $\pm$ 0	17,53 $\pm$ 5,39
31	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	371,91 $\pm$ 25,02	238,23 $\pm$ 52,50	6,59 $\pm$ 5,19	90,82 $\pm$ 24,85	0,57 $\pm$ 1,41	14,77 $\pm$ 3,11
32	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	264,79 $\pm$ 14,28	257,36 $\pm$ 81,40	7,03 $\pm$ 2,63	121,43 $\pm$ 46,12	0,21 $\pm$ 0,51	11,71 $\pm$ 2,15
33	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	223,59 $\pm$ 30,38	194,24 $\pm$ 79,17	10,43 $\pm$ 6,73	63,61 $\pm$ 20,98	0 $\pm$ 0	14,41 $\pm$ 2,14
34	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	255,84 $\pm$ 26,84	179,38 $\pm$ 22,74	12,93 $\pm$ 7,60	88,83 $\pm$ 18,48	0 $\pm$ 0	14,95 $\pm$ 1,95
35	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	283,37 $\pm$ 33,96	232,64 $\pm$ 63,02	8,86 $\pm$ 6,22	67,2 $\pm$ 35,32	0 $\pm$ 0	18,15 $\pm$ 2,89
36	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	209,23 $\pm$ 10,69	185,51 $\pm$ 39,78	18,7 $\pm$ 5,40	83,94 $\pm$ 27,65	0,22 $\pm$ 0,54	9,87 $\pm$ 3,72
37	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	245,88 $\pm$ 22,28	146,15 $\pm$ 37,17	13,26 $\pm$ 3,79	52,71 $\pm$ 25,68	1,04 $\pm$ 2,55	15,86 $\pm$ 3,71
38	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	328,87 $\pm$ 63,06	232,88 $\pm$ 35,76	14,14 $\pm$ 5,59	125,33 $\pm$ 36,89	1 $\pm$ 1,20	13,18 $\pm$ 3,94
39	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	275,45 $\pm$ 17,26	281,44 $\pm$ 46,20	11,87 $\pm$ 6,33	86,49 $\pm$ 28,27	0 $\pm$ 0	13,13 $\pm$ 1,96
40	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	284,17 $\pm$ 22,69	207,11 $\pm$ 85,08	11,04 $\pm$ 3,54	99,79 $\pm$ 54,82	0 $\pm$ 0	15,57 $\pm$ 4,58
41	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	415,79 $\pm$ 37,79	218,25 $\pm$ 89,44	10,78 $\pm$ 6,66	83,59 $\pm$ 31,94	0 $\pm$ 0	21,95 $\pm$ 7,01
42	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	332,11 $\pm$ 28,08	233,66 $\pm$ 67,32	10,6 $\pm$ 2,93	84,59 $\pm$ 36,53	0 $\pm$ 0	15,66 $\pm$ 2,42
43	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	268,36 $\pm$ 28,50	179,67 $\pm$ 39,91	10,94 $\pm$ 7,19	85,78 $\pm$ 36,64	2,98 $\pm$ 3,99	12,19 $\pm$ 5,55
44	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	255,06 $\pm$ 43,66	137,11 $\pm$ 20,93	14,39 $\pm$ 13,06	70,26 $\pm$ 17,81	1,86 $\pm$ 2,13	11,32 $\pm$ 1,69
45	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	335,14 $\pm$ 38,08	398,95 $\pm$ 51,90	12,57 $\pm$ 5,93	210,61 $\pm$ 51,97	0 $\pm$ 0	11,08 $\pm$ 1,27
46	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	190,95 $\pm$ 15,62	149,75 $\pm$ 23,99	19,38 $\pm$ 6,91	72,6 $\pm$ 27,32	2 $\pm$ 1,70	11,31 $\pm$ 2,17
47	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	330,56 $\pm$ 31,40	197,4 $\pm$ 62,45	7,31 $\pm$ 5,03	75,39 $\pm$ 22,06	1,55 $\pm$ 2,72	16,47 $\pm$ 6,08
48	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	269,23 $\pm$ 16,57	204,99 $\pm$ 61,03	18,69 $\pm$ 6,04	101,55 $\pm$ 47,67	1,18 $\pm$ 1,00	13,39 $\pm$ 2,55
49	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung	282,11 $\pm$ 25,62	349,9 $\pm$ 49,57	7,61 $\pm$ 2,94	204,56 $\pm$ 35,55	1,13 $\pm$ 1,06	11,52 $\pm$ 2,49

Tabelle 7: Deskriptive Statistik der Mikroskopie der gesamten untersuchten Plazentapopulation (n=49) mit Mittelwerten und Standardabweichungen. Dargestellt sind Intervillöser Raum (INTRO [ml]), Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLI [ml]), Konkavität  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLIconcavity [%]), Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Kapillaren (posCAP [ml]), Konkavität der Kapillaren in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posCAPconcavity [%]), Diffusionsdistanz vom Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posDIFdistance [ $\mu$ m]).

Nr		negVILLI [ml]	negVILLI concavity [%]	negCAP [ml]	negCAPconcavity [%]	negDIF distance [µm]
1	Mittelwert ± Standardabweichung	154,17 ± 66,39	14,69 ± 5,27	146,33 ± 62,63	0,38 ± 0,93	6,61 ± 0,99
2	Mittelwert ± Standardabweichung	97,49 ± 56,72	12,87 ± 7,12	92,51 ± 52,80	1,57 ± 2,45	6,52 ± 2,38
3	Mittelwert ± Standardabweichung	130,53 ± 75,80	13,28 ± 3,33	122,48 ± 69,09	1,85 ± 1,46	6,46 ± 0,66
4	Mittelwert ± Standardabweichung	215,07 ± 57,12	13,5 ± 1,82	194,91 ± 51,21	1,54 ± 1,59	6,19 ± 0,54
5	Mittelwert ± Standardabweichung	369,47 ± 69,37	6,546 ± 3,19	335,97 ± 69,29	3,37 ± 1,98	5,6 ± 0,80
6	Mittelwert ± Standardabweichung	276,87 ± 34,61	2,65 ± 1,93	260,11 ± 33,60	0,29 ± 0,71	7,16 ± 0,61
7	Mittelwert ± Standardabweichung	307,74 ± 64,90	6,8 ± 2,80	272,34 ± 76,22	0,68 ± 0,93	8,88 ± 3,29
8	Mittelwert ± Standardabweichung	188,93 ± 102,10	5,69 ± 2,87	175,95 ± 94,08	1,37 ± 1,23	5,78 ± 0,90
9	Mittelwert ± Standardabweichung	299,54 ± 31,58	1,89 ± 1,58	250,86 ± 41,20	0,3 ± 0,74	6,86 ± 0,72
10	Mittelwert ± Standardabweichung	255,22 ± 23,31	3,11 ± 3,00	231,82 ± 21,47	0,88 ± 0,98	8,07 ± 0,82
11	Mittelwert ± Standardabweichung	540,57 ± 51,78	2,86 ± 1,56	473,98 ± 67,17	0,8 ± 1,28	6,98 ± 0,87
12	Mittelwert ± Standardabweichung	491,01 ± 39,32	1,83 ± 2,00	443,1 ± 30,89	0,64 ± 0,86	6,08 ± 0,85
13	Mittelwert ± Standardabweichung	384,98 ± 24,98	2,33 ± 2,03	343,8 ± 23,83	0,11 ± 0,28	8,59 ± 1,36
14	Mittelwert ± Standardabweichung	312,6 ± 48,86	1,91 ± 1,57	289,06 ± 46,70	0,26 ± 0,30	7,42 ± 1,27
15	Mittelwert ± Standardabweichung	292,98 ± 26,03	2,57 ± 1,61	260,09 ± 25,81	0,1 ± 0,25	8,62 ± 0,75
16	Mittelwert ± Standardabweichung	212,13 ± 17,46	2,99 ± 1,42	191,02 ± 23,45	0,15 ± 0,36	8,75 ± 0,59
17	Mittelwert ± Standardabweichung	327,68 ± 31,47	2,03 ± 0,61	292,26 ± 29,93	0,48 ± 0,41	6,2 ± 0,94
18	Mittelwert ± Standardabweichung	322,03 ± 32,03	3,86 ± 1,68	281,94 ± 31,93	0,25 ± 0,43	7,25 ± 0,91
19	Mittelwert ± Standardabweichung	395,44 ± 17,08	2,3 ± 1,72	366,93 ± 22,68	0,1 ± 0,23	6,99 ± 0,99
20	Mittelwert ± Standardabweichung	355,25 ± 49,10	5,22 ± 3,95	320,98 ± 49,82	1,08 ± 0,92	7,12 ± 0,78
21	Mittelwert ± Standardabweichung	330,02 ± 49,55	1,98 ± 1,05	269,77 ± 41,02	0,11 ± 0,26	10,34 ± 1,28
22	Mittelwert ± Standardabweichung	317,38 ± 26,24	1,88 ± 1,29	290,16 ± 28,28	0,84 ± 0,64	7,21 ± 0,92
23	Mittelwert ± Standardabweichung	376,78 ± 23,16	2,16 ± 1,23	347,76 ± 16,37	0,14 ± 0,35	8,43 ± 1,26
24	Mittelwert ± Standardabweichung	326,6 ± 29,16	2,61 ± 1,67	294,68 ± 22,27	0,11 ± 0,28	8,2 ± 1,20
25	Mittelwert ± Standardabweichung	278,51 ± 25,73	2,59 ± 1,66	245,04 ± 27,62	0,88 ± 0,99	8,04 ± 0,40
26	Mittelwert ± Standardabweichung	368,33 ± 47,84	1,74 ± 1,65	313,34 ± 42,76	0,23 ± 0,55	8,77 ± 1,39
27	Mittelwert ± Standardabweichung	360,64 ± 24,02	3,15 ± 1,68	322,28 ± 20,91	0,48 ± 0,46	6,56 ± 0,99
28	Mittelwert ± Standardabweichung	433,61 ± 36,62	3,15 ± 1,47	383,42 ± 26,48	0,2 ± 0,32	6,36 ± 0,45
29	Mittelwert ± Standardabweichung	249,43 ± 32,17	4,53 ± 1,70	232,33 ± 28,92	0,45 ± 0,50	6,14 ± 0,84
30	Mittelwert ± Standardabweichung	285,62 ± 21,84	3,16 ± 2,70	248,92 ± 25,30	0,35 ± 0,54	7,15 ± 1,08
31	Mittelwert ± Standardabweichung	421,77 ± 52,50	5,26 ± 3,02	386,11 ± 46,46	0 ± 0	5,5 ± 0,56
32	Mittelwert ± Standardabweichung	225,64 ± 81,40	6 ± 3,64	202,99 ± 75,03	0,49 ± 1,20	5,84 ± 0,63
33	Mittelwert ± Standardabweichung	201,76 ± 79,17	8,24 ± 2,87	174,75 ± 74,79	0,72 ± 1,22	7,58 ± 0,91
34	Mittelwert ± Standardabweichung	298,62 ± 22,74	7,21 ± 2,92	279,96 ± 20,48	0,72 ± 1,22	6,47 ± 0,64
35	Mittelwert ± Standardabweichung	255,36 ± 63,02	7,69 ± 2,35	230,4 ± 54,02	8 ± 0,67	0,56 ± 1,07
36	Mittelwert ± Standardabweichung	202,49 ± 39,78	15,47 ± 5,72	182,31 ± 42,07	1,16 ± 1,47	7,72 ± 0,85
37	Mittelwert ± Standardabweichung	234,85 ± 37,17	7,97 ± 3,71	220,31 ± 40,16	0,7 ± 0,85	7,28 ± 0,66
38	Mittelwert ± Standardabweichung	312,12 ± 35,76	10,2 ± 5,09	282,61 ± 33,69	2,4 ± 1,75	5,77 ± 0,75
39	Mittelwert ± Standardabweichung	201,56 ± 46,20	7,05 ± 2,02	184,7 ± 39,31	0,13 ± 0,31	6,4 ± 0,58
40	Mittelwert ± Standardabweichung	242,89 ± 85,08	4,08 ± 4,03	225 ± 73,18	0,64 ± 1,57	6,68 ± 0,73
41	Mittelwert ± Standardabweichung	455,75 ± 89,44	6,11 ± 1,92	407,13 ± 91,27	0,41 ± 0,53	11,1 ± 2,08
42	Mittelwert ± Standardabweichung	332,34 ± 67,32	6,9 ± 2,25	289,22 ± 59,26	0,48 ± 0,55	9,7 ± 0,87
43	Mittelwert ± Standardabweichung	245,33 ± 39,91	8,04 ± 2,97	219,91 ± 37,66	1,38 ± 1,91	5,3 ± 1,17
44	Mittelwert ± Standardabweichung	317,89 ± 20,93	7,9 ± 3,36	277,98 ± 29,02	0,7 ± 0,82	5,15 ± 0,43
45	Mittelwert ± Standardabweichung	168,06 ± 51,90	10,84 ± 2,39	157,61 ± 47,28	0,82 ± 1,41	8,01 ± 1,74
46	Mittelwert ± Standardabweichung	177,25 ± 23,99	13,74 ± 1,72	165,34 ± 23,48	1,43 ± 1,17	6,01 ± 0,87
47	Mittelwert ± Standardabweichung	306,6 ± 62,45	2,22 ± 1,79	286,04 ± 51,48	0,56 ± 0,65	7,63 ± 0,72
48	Mittelwert ± Standardabweichung	238,01 ± 61,03	10,69 ± 3,64	216,31 ± 46,61	0,7 ± 0,84	8,52 ± 0,85
49	Mittelwert ± Standardabweichung	114,1 ± 49,57	6,6 ± 4,68	110,3 ± 43,25	2,95 ± 2,25	5,96 ± 0,88

Tabelle 8: Deskriptive Statistik der Mikroskopie der gesamten untersuchten Plazentapopulation (n=49) mit Mittelwerten und Standardabweichungen. Dargestellt sind Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLI [ml]), Konkavität  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLIconcavity [%]), Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Kapillaren (negCAP [ml]), Konkavität der Kapillaren in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negCAPconcavity [%]) sowie Diffusionsdistanz vom Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negDIFdistance [µm]).

### 3.3 Befunde der multivariaten Korrelationsanalysen

Die mit dem Programm R durchgeführte multivariate Korrelationsanalyse wird hier zur besseren Übersichtlichkeit in zwei Abschnitten zusammengefasst. Zum Einen wurden die verschiedenen klinisch-makroskopischen Parameter untereinander korreliert (Abb. 20). Zum Anderen wurden die verschiedenen mikroskopischen Parameter untereinander korreliert. In letztere Analyse wurde auch das Plazentagewicht als einer der wichtigsten klinisch-makroskopischen Parameter mit einbezogen (Abb. 21).

Zur graphischen Veranschaulichung der Ergebnisse der Korrelationsanalyse wurden jeweils ein Matrix-Scatterplot mit Regressionsgeraden sowie eine Korrelations-Heat-Map erstellt (Abb. 20 & 21). Anhand der Farbcodierung ist die Stärke der Korrelation abzulesen, welche Werte von -1 bis +1 annehmen kann, wobei -1 eine starke negative Korrelation, +1 eine starke positive Korrelation und der Wert 0 das Fehlen einer Korrelation anzeigt. Korrelationen, die nach einer Korrelation nach Spearman signifikant erschienen, wurden nach Durchführung eines t-Tests und einer Korrektur des Signifikanztests nach Holm gesondert in den entsprechenden Feldern innerhalb der Grafiken gekennzeichnet (\* für  $p < 0.05$ , \*\* für  $p < 0.01$ , \*\*\* für  $p < 0.001$ ).

Die Korrelationsanalyse der makroskopischen Parameter (Abb. 20) zeigt, daß es signifikante positive Korrelationen zwischen der Oberfläche der Plazenten (OF) und ihrem kürzesten und längsten Durchmesser (KDM bzw. LDM) gibt. Das Verhältnis von Plazentagewicht zu Geburtsgewicht (PG\_GG\_Ratio, hier als PG/GG dargestellt) korreliert signifikant positiv mit der Dicke (DICKE) der Plazenten und dem Plazentagewicht (PG), aber es korreliert signifikant negativ mit dem Gestationsalter (GA). GA korreliert signifikant positiv mit dem Geburtsgewicht (GG) und GG korreliert signifikant positiv mit dem Plazentagewicht (PG). PG korreliert signifikant positiv mit DICKE.

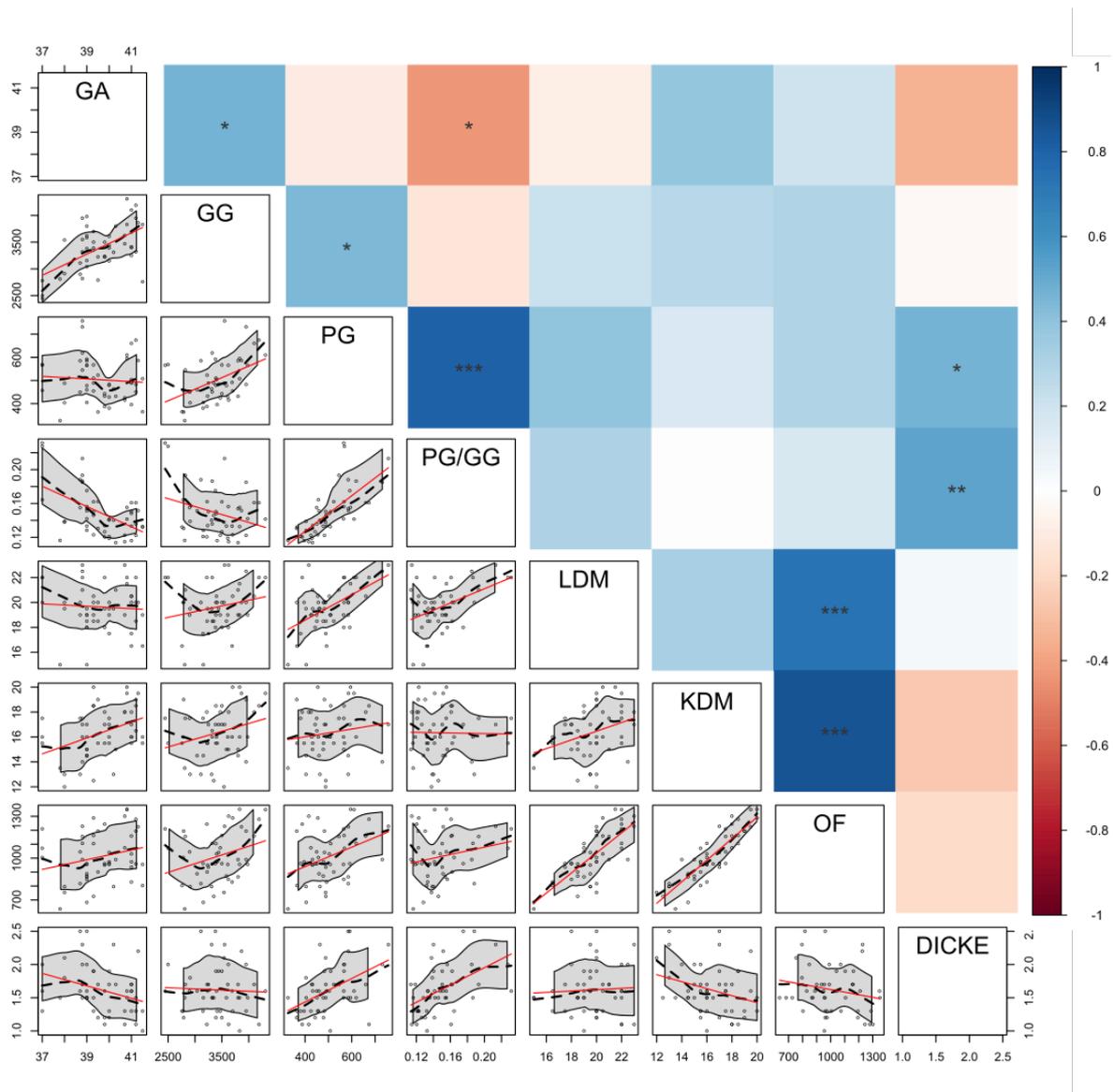


Abbildung 20: Matrix-Scatterplot mit Regressionsgeraden sowie Korrelations-Heat-Map der erhobenen makroskopischen Parameter gegeneinander zur graphischen Veranschaulichung der Ergebnisse der Korrelationsanalyse.

Abgebildet sind Gestationsalter (GA [Wochen]), Geburtsgewicht (GG [g]), Plazentagewicht (PG [g]), Verhältnis von Plazenta- zu Geburtsgewicht (PG/GG), längster Durchmesser der Plazenta (LDM [cm]), kürzester Durchmesser der Plazenta (KDM [cm]), Oberfläche der Plazenta (OF [cm<sup>2</sup>]) und Dicke der Plazenta (DICKE [cm]). Die unterhalb der mittigen Diagonalen befindlichen Felder enthalten das jeweils zugehörige Streudiagramm einer R-Analyse mit Darstellung der erhobenen Daten als schwarze Punkte, rot hervorgehobener Regressionsgerade sowie grau hinterlegtem Konfidenzintervall. Die Stärke der Korrelation nach Spearman ist in der über der mittigen Diagonalen abgebildeten Heatmap farblich kodiert zwischen -1 (negative Korrelation, rot), 0 (keine Korrelation) und +1 (positive Korrelation, blau). Werte, die nach einer Korrektur nach Holm statistisch signifikant waren, sind mit Sternen markiert, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

In der Korrelationsanalyse des Plazentagewichtes mit den mikroskopischen Parametern fällt auf, dass eine positive Korrelation mit dem intervillösen Raum (INTRO), dem Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLI), dem Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLI) sowie dem Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Kapillaren (negCAP) besteht. Die mikroskopischen Parameter untereinander zeigen eine positive Korrelation zwischen INTRO und negVILLI sowie negCAP. Das

Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLI) korreliert stark positiv mit dem Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Kapillaren (posCAP).

Darüber hinaus besteht eine positive Korrelation der Konkavität  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLIconcavity) mit posCAP, mit der Konkavität der Kapillaren in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posCAPconcavity), mit der Konkavität  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLIconcavity) und mit der Konkavität der Kapillaren in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negCAPconcavity). Eine stark negative Korrelation von posVILLIconcavity konnte mit der Diffusionsdistanz vom Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posDIFdistance), mit negVILLI und mit negCAP nachgewiesen werden. posCAP wiederum korreliert stark negativ mit posDIFdistance und stark positiv mit negVILLIconcavity. posCAPconcavity korreliert negativ mit posDIFdistance, während sich für posDIFdistance positive Korrelationen mit negVILLI, negCAP und die Diffusionsdistanz vom Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negDIFdistance) und weitere negative Korrelationen mit negVILLIconcavity sowie negCAPconcavity zeigen. negVILLIconcavity korreliert stark negativ mit negVILLI sowie negCAP und stark positiv mit negCAPconcavity. Für negVILLIconcavity und negDIFdistance hingegen konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden (Abb. 21).

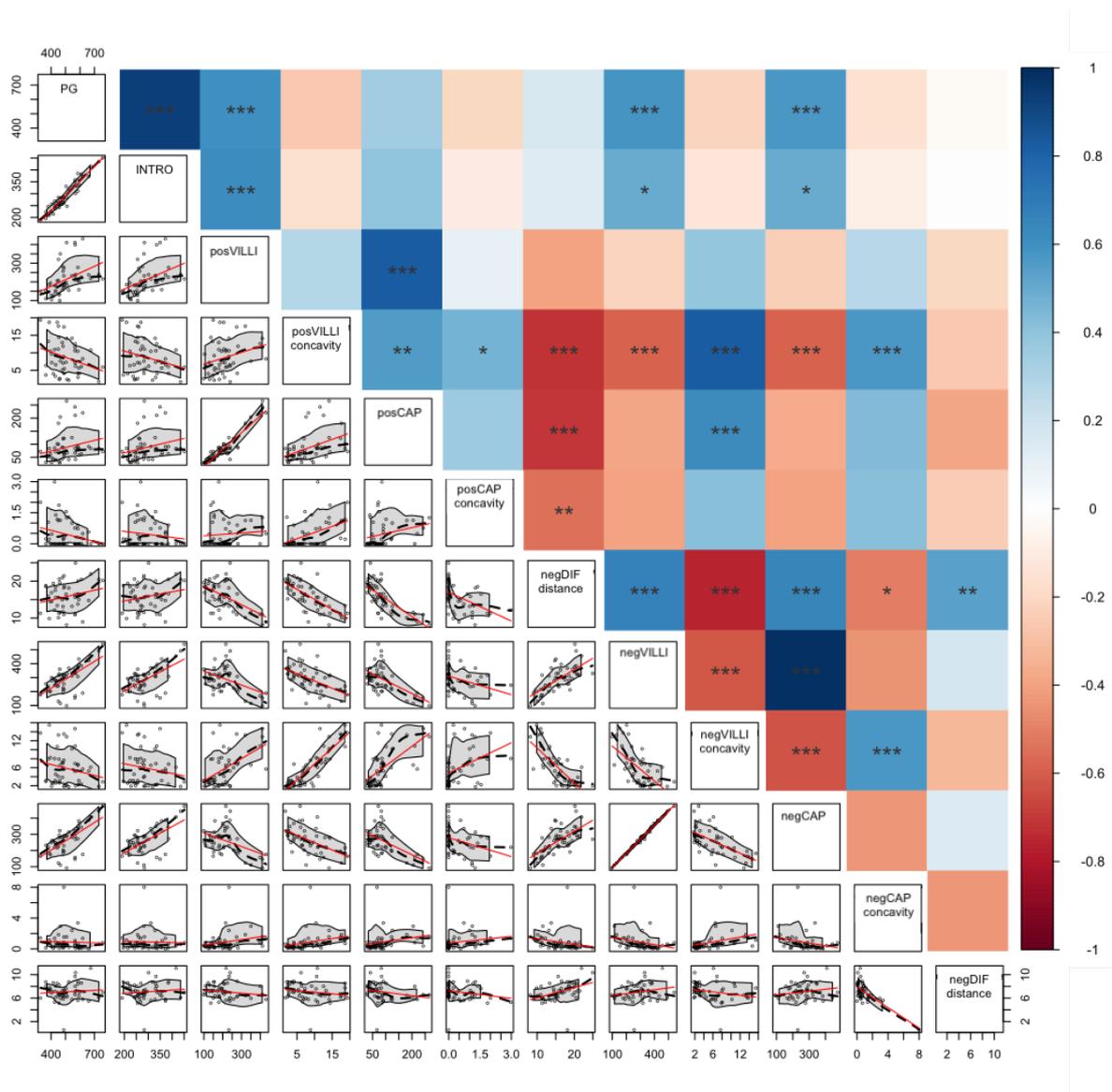


Abbildung 21: Matrix-Scatterplot mit Regressionsgeraden und Korrelations-Heat-Map der erhobenen mikroskopischen Parameter und des Plazentagewichtes gegeneinander zur graphischen Veranschaulichung der Ergebnisse der Korrelationsanalyse.

Abgebildet sind Plazentagewicht (PG [g]), Intervillöser Raum (INTRO [ml]), Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLI [ml]), Konkavität  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLIconcavity [%]), Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Kapillaren (posCAP [ml]), Konkavität der Kapillaren in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posCAPconcavity [%]), Diffusionsdistanz vom Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posDIFdistance [ $\mu$ m]), Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLI [ml]), Konkavität  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLIconcavity [%]), Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Kapillaren (negCAP [ml]), Konkavität der Kapillaren in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negCAPconcavity [%]) sowie Diffusionsdistanz vom Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negDIFdistance [ $\mu$ m]). Die unterhalb der mittigen Diagonalen befindlichen Felder enthalten das jeweils zugehörige Streudiagramm einer R-Analyse mit Darstellung der erhobenen Daten als schwarze Punkte, rot hervorgehobener Regressionsgerade sowie grau hinterlegtem Konfidenzintervall. Die Stärke der Korrelation nach Spearman in der über der mittigen Diagonalen abgebildeten Heatmap ist farblich kodiert zwischen -1 (negative Korrelation, rot), 0 (keine Korrelation) und +1 (positive Korrelation, blau). Werte, die nach einer Korrektur nach Holm statistisch signifikant waren, sind mit Sternen markiert, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

### 3.4 Ergebnisse und Analyse ausgewählter Korrelationen

#### 3.4.1 Plazentagewicht vs. Konkavität und Diffusionsdistanz

Die Konkavität der Oberfläche  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posVILLIconcavity in [%]) korrelierte signifikant mit dem Plazentagewicht, während sich sowohl für die Konkavität der  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negVILLIconcavity in [%]) als auch die Diffusionsdistanzen in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven (posDIFdistance in [ $\mu$ m]) und  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negDIFdistance in [ $\mu$ m]) keine signifikante Korrelation mit dem Plazentagewicht ergab.

Hohe Plazentagewichte traten dann auf, wenn die Konkavität in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten gering war, während für die Konkavität in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten ebenso wie für die Länge der Diffusionsdistanzen keinen Einfluss auf das Plazentagewicht nachgewiesen werden konnte. Als p-Werte der linearen Regressionsanalyse von Konkavität in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten und Plazentagewicht ergaben sich  $p=0,0402$  und  $R^2=0,08483$  (Abb. 22).

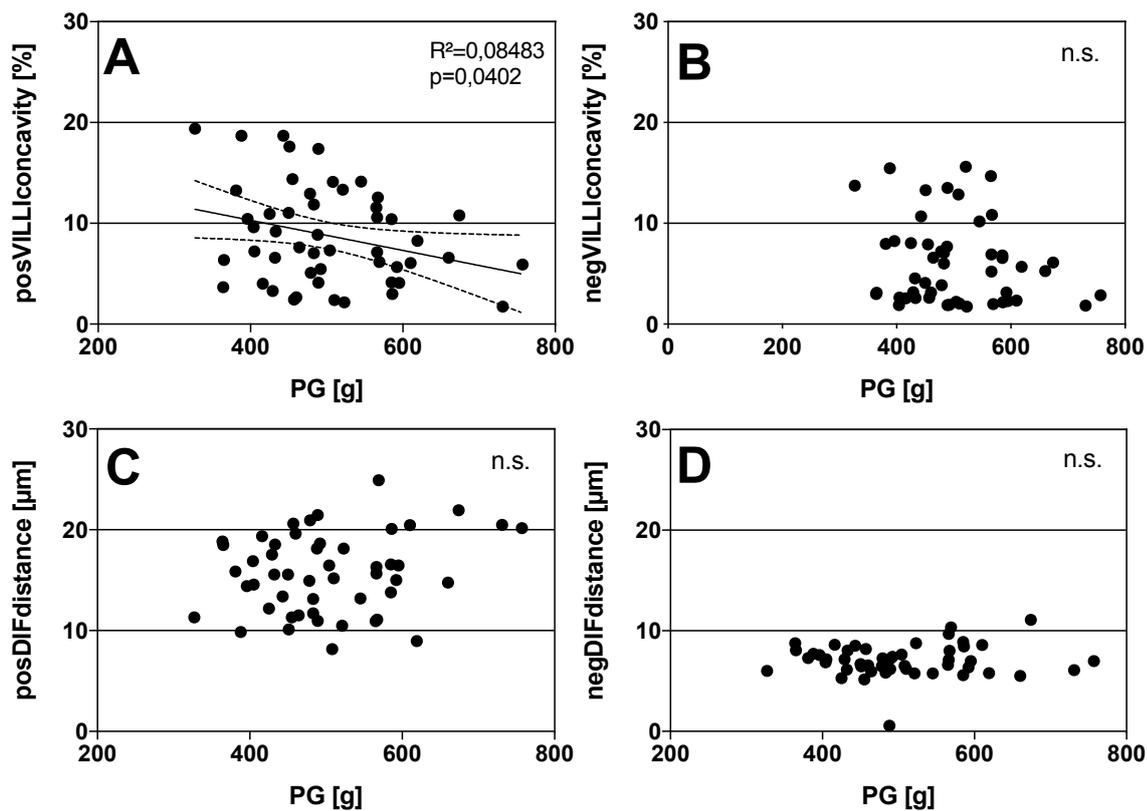


Abbildung 22: Plazentagewicht vs. Konkavität und Diffusionsdistanz

Diagramm A und B: Lineare Regressionsanalysen der Konkavität in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posVILLIconcavity [%]), sowie in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negVILLIconcavity [%]) mit dem Plazentagewicht (PG [g]). Diagramm C und D: Lineare Regressionsanalysen von Diffusionsdistanz (Trophoblastenrand bis zum Kapillarrand) in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posDIFdistance [ $\mu$ m]) sowie in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negDIFdistance [ $\mu$ m]) mit dem Plazentagewicht (PG in [g]). Die Datenpunkte in den einzelnen Graphen entsprechen jeweils einer Plazenta, zudem sind für Abbildung A die Regressionsgerade (durchgezogene Linie) und das 95% Konfidenzintervall (gestrichelte Linie) dargestellt. Die p-Werte (Steigung unterschiedlich von Null) der linearen Regressionsanalyse ergab sich für Diagramm A zu  $p=0,0402$ , angegeben ist hier zudem der  $R^2$ -Wert der linearen Regressionsanalyse ( $R^2=0,08483$ ). Für die Diagramme B, C und D ergab sich  $p > 0,05$  und somit keine Signifikanz (n.s.).

### 3.4.2 Plazentagewicht-Geburtsgewicht-Ratio vs. Konkavität, Diffusionsdistanz und Intervillöser Raum

In der Korrelationsanalyse der Plazentagewicht-Geburtsgewicht-Ratio (PG-GG-Ratio) zeigten sich signifikante Korrelationen mit dem Volumen des intervillösen Raumes (INTRO in [ml]), der Konkavität in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posVILLIconcavity in [%]) sowie der Diffusionsdistanz in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posDIFdistance in [ $\mu$ m]). Für die Konkavität in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negDIFdistance in [%]) sowie die Diffusionsdistanz in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negDIFdistance [ $\mu$ m]) zeigte sich keine signifikante Korrelation mit der Plazentagewicht-Geburtsgewicht-Ratio (PG-GG-Ratio) (Abb. 23).

Die p-Werte ergaben sich für den INTRO und die PG-GG-Ratio zu  $p < 0,0001$ , für posVILLIconcavity und PG-GG-Ratio zu  $p = 0,04$  sowie für posDIFdistance und PG-GG-Ratio zu  $p < 0,03$ . Die  $R^2$ -Werte der linearen Regressionsanalyse betragen für INTRO und PG-GG-Ratio  $R^2 = 0,4932$ , für posVILLIconcavity und PG-GG-Ratio  $R^2 = 0,08492$  sowie für posDIFdistance und PG-GG-Ratio  $R^2 = 0,09692$ .

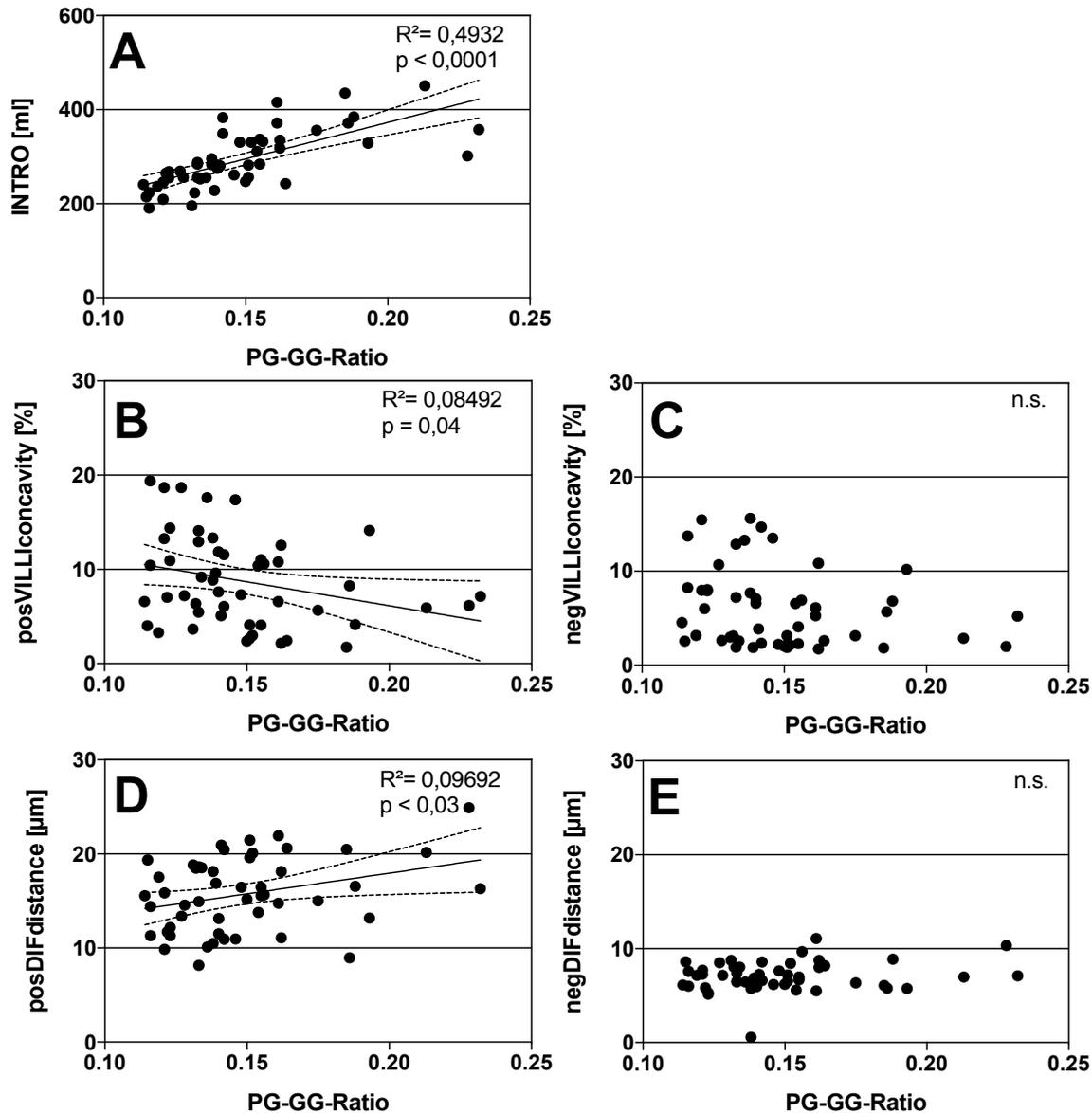


Abbildung 23: Plazentagewicht-Geburtsgewicht-Ratio vs. Konkavität, Diffusionsdistanz und Intervillöser Raum  
 Diagramm A: Lineare Regressionsanalyse des Intervillösen Raums (INTR0 [ml]), mit der Plazentagewicht-Geburtsgewicht-Ratio (PG-GG-Ratio). Diagramm B und C: Lineare Regressionsanalysen der Konkavität in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posVILLIconcavity [%]) sowie in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negVILLIconcavity [%]) mit der Plazentagewicht-Geburtsgewicht-Ratio (PG-GG-Ratio). Diagramm D und E: Lineare Regressionsanalysen der Diffusionsdistanz in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posDIFdistance [ $\mu\text{m}$ ]) sowie in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negDIFdistance [ $\mu\text{m}$ ]) mit der Plazentagewicht-Geburtsgewicht-Ratio (PG-GG-Ratio). Die Datenpunkte in den einzelnen Graphen entsprechen jeweils einer Plazenta, zudem sind für Diagramme A, B und D die Regressionsgerade (durchgezogene Linie) und das 95% Konfidenzintervall (gestrichelte Linie) dargestellt. Die p-Werte (Steigung unterschiedlich von Null) der linearen Regressionsanalyse ergaben sich für Diagramm A zu  $p < 0,0001$ , für Diagramm B zu  $p = 0,04$  und für Diagramm D zu  $p < 0,03$ . Angegeben sind hier zudem die  $R^2$ -Werte der linearen Regressionsanalyse (Diagramm A:  $R^2 = 0,4932$ , Diagramm B:  $R^2 = 0,08492$ , Diagramm D  $R^2 = 0,09692$ ). Für die Diagramme C und E ergab sich  $p > 0,05$  und somit keine Signifikanz (n.s.).

### 3.4.3 Plazentagewicht und Plazentadicke vs. Volumina sowie Plazentadicke vs. Konkavität

Das Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver (posVILLI in [ml]) sowie  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLI in [ml]) korrelierte signifikant mit dem Plazentagewicht (PG in [g]) der untersuchten Plazenten. Ebenso fand sich eine positive Korrelation zwischen dem Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten und der Dicke der Plazenten (DICKE in [cm]), während sich für das Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten mit der Plazentadicke keine signifikante Korrelation ergab.

Höhere Plazentagewichte lagen dann vor, wenn das Zottenvolumen hoch war, sowohl in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven als auch in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten. Mit zunehmendem Volumen in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten erhöhte sich die Plazentadicke, während das Volumen in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten keinen signifikanten Einfluss auf die Dicke der Plazenten zeigte.

In der linearen Regressionsanalyse von posVILLI und PG zeigten sich  $p < 0,002$  und  $R^2 = 0,1774$ , für negVILLI und PG sind  $p = 0,0001$  und  $R^2 = 0,4028$  angegeben. Für die Korrelation von negVILLI und DICKE entsprechen  $p = 0,02$  sowie  $R^2 = 0,1059$ .

Bei Vorliegen eines geringeren Verzweigungsindex fiel in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posVILLIconcavity in [%]) eine signifikante Zunahme der Plazentadicke auf, hier ergaben sich in der linearen Korrelationsanalyse  $p = 0,0163$  und  $R^2 = 0,1167$  (Abb. 24).

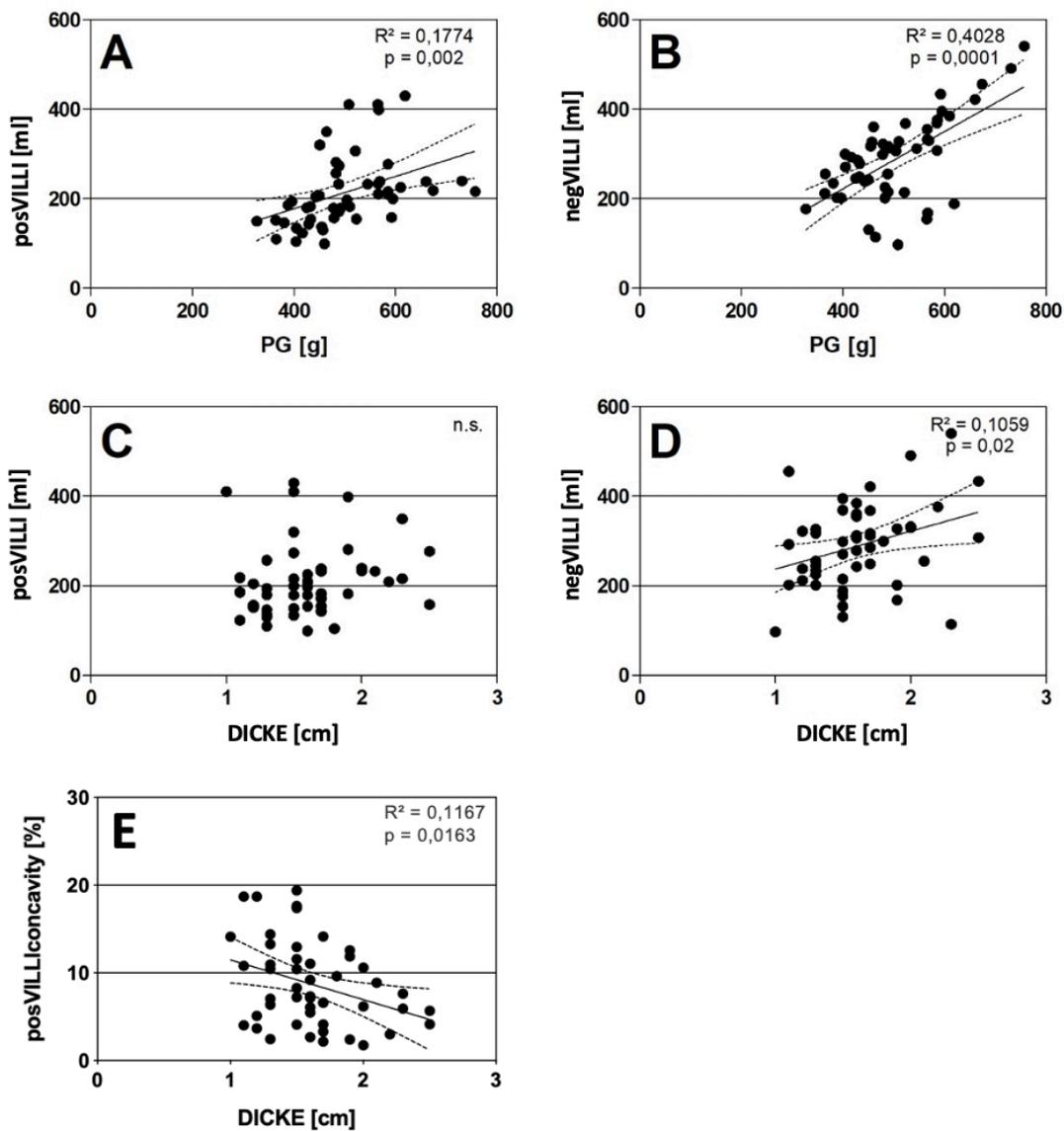


Abbildung 24: Plazentagewicht und Plazentadicke vs. Volumina sowie Plazentadicke vs. Konkavität  
 Diagramm A und B: Lineare Regressionsanalysen des Volumens  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLI [ml]) sowie des Volumens  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negVILLI [ml]) mit dem Plazentagewicht (PG [g]). Diagramm C und D: Lineare Regressionsanalyse des Volumens  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLI [ml]) sowie des Volumens  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negVILLI [ml]) mit der Plazentadicke (DICKE [cm]). Diagramm E: Lineare Regressionsanalyse der Konkavität der Oberflächen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLIconcavity in [%]) mit der Plazentadicke (DICKE [cm]). Die Datenpunkte in den einzelnen Graphen entsprechen jeweils einer Plazenta, zudem sind für die Abbildungen A, B, C und E die Regressionsgerade (durchgezogene Linie) und das 95% Konfidenzintervall (gestrichelte Linie) dargestellt. Die p-Werte (Steigung unterschiedlich von Null) der linearen Regressionsanalyse ergab sich für Diagramm A zu  $p = 0,002$ , angegeben ist hier zudem der  $R^2$ -Wert der linearen Regressionsanalyse ( $R^2=0,1774$ ). In Diagramm B entspricht  $p = 0,0001$  und  $R^2 = 0,4028$ , in Diagramm D ist  $p = 0,02$  und  $R^2 = 0,1059$  angegeben, in Diagramm E ist  $p = 0,0163$  und  $R^2 = 0,1167$ . Für Diagramm C ergab sich  $p > 0,05$  und somit keine Signifikanz (n.s.).

#### 3.4.4 Konkavität und Volumina vs. $\gamma$ -sm-Aktin-Positivität und Diffusionsdistanzen

Die Konkavität der Oberflächen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLIconcavity in [%]) korrelierte signifikant mit dem Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLI [ml]), der Konkavität der Oberflächen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLIconcavity in [%]), dem Volumen der Kapillaren  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negCAP [ml]), der Konkavität der Oberflächen der Kapillaren  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posCAPconcavity in [%]) und den Diffusionsdistanzen in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posDIFdistance [ $\mu$ m]).

Für die Konkavität der Oberflächen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLIconcavity in [%]) und die Diffusionsdistanzen in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negDIFdistance [ $\mu$ m]) hingegen konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden.

In der linearen Regressionsanalyse von posVILLIconcavity und negVILLI zeigten sich  $p < 0,0001$  und  $R^2 = 0,2932$ , für posVILLIconcavity und negVILLIconcavity sind  $p = 0,0001$  und  $R^2 = 0,7245$  angegeben. Für die Korrelation von posVILLIconcavity und negCAP entsprechen  $p = 0,0001$  sowie  $R^2 = 0,2878$ . Die lineare Regression zwischen posVILLIconcavity und negCAPconcavity ergaben sich  $p < 0,05$  sowie  $R^2 = 0,0822$ , für posVILLIconcavity und posDIFdistance lagen  $p = 0,0001$  sowie  $R^2 = 0,4672$  (Abb. 25).

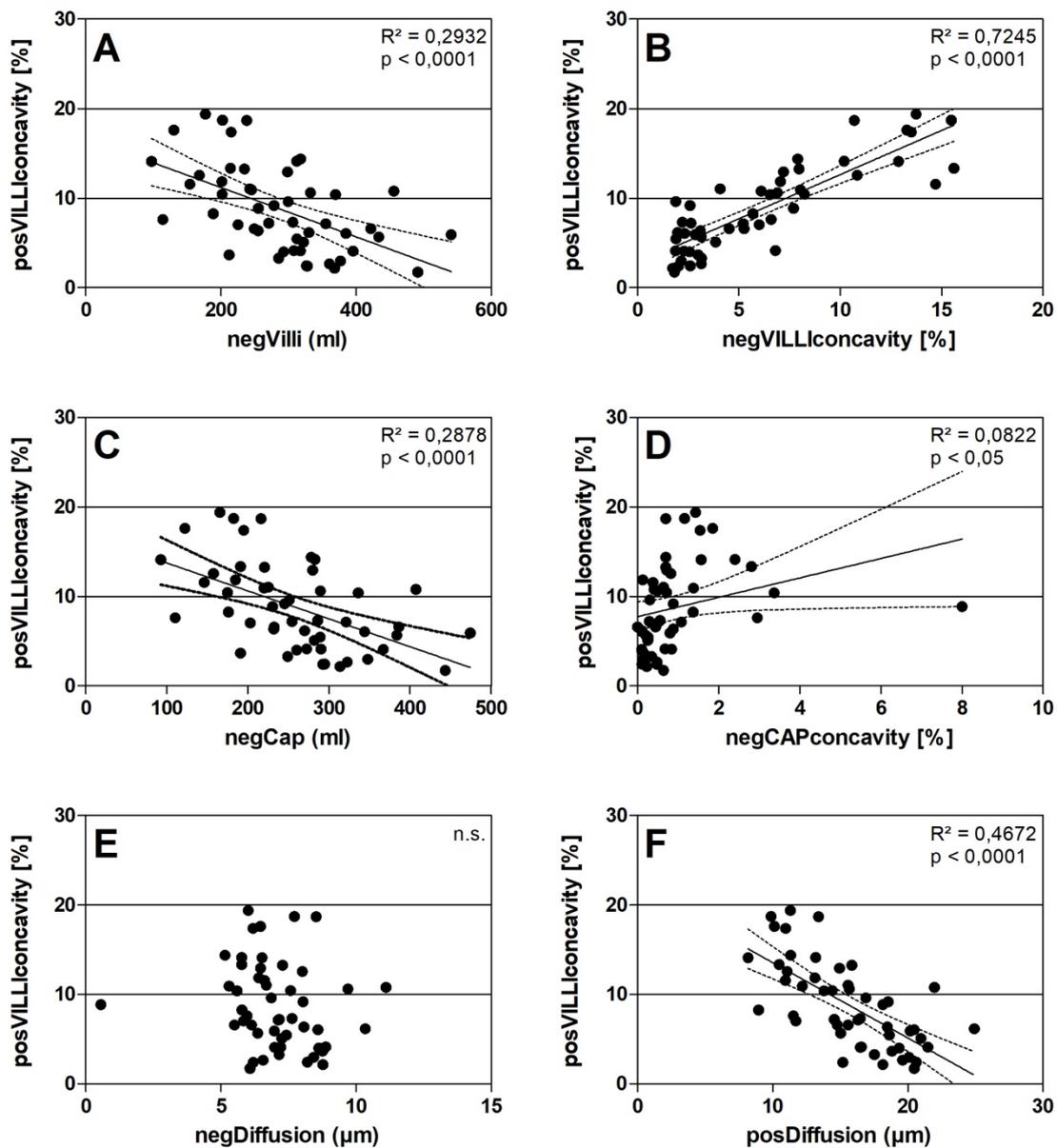


Abbildung 25: Konkavitäten und Volumina von Zotten sowie villösen Gefäßen in Abhängigkeit von  $\gamma$ -sm-Aktin-Positivität und Diffusionsdistanzen.

Diagramm A und B: Lineare Regressionsanalysen der Konkavität der Oberflächen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLIconcavity in [%]) mit dem Volumen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLI [ml]) sowie der Konkavität der Oberflächen  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negVILLIconcavity in [%]). Diagramm C und D: Lineare Regressionsanalyse der Konkavität der Oberflächen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLIconcavity in [%]) mit dem Volumen der Kapillaren  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Zotten (negCAP [ml]) sowie der Konkavität der Oberflächen der Kapillaren  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posCAPconcavity in [%]). Diagramm E und F: Lineare Regressionsanalyse der Konkavität der Oberflächen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten (posVILLIconcavity in [%]) mit den Diffusionsdistanzen in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten (negDIFdistance [ $\mu$ m]) sowie den Diffusionsdistanzen in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten (posDIFdistance [ $\mu$ m]). Die Datenpunkte in den einzelnen Graphen entsprechen jeweils einer Plazenta, zudem sind für die Abbildungen A, B, C, D und F die Regressionsgerade (durchgezogene Linie) und das 95% Konfidenzintervall (gestrichelte Linie) dargestellt. Die p-Werte (Steigung unterschiedlich von Null) der linearen Regressionsanalyse ergab sich für Diagramm A, B, C und F zu  $p < 0,0001$ , für Diagramm D ist  $p < 0,05$ . Angegeben ist zudem der  $R^2$ -Wert der linearen Regressionsanalyse. Für Diagramm A ergab sich  $R^2 = 0,2932$ , in Diagramm B entspricht  $R^2 = 0,7245$ , in Diagramm C ist  $R^2 = 0,2878$ , für Diagramm D ist  $R^2 = 0,0822$  und für Diagramm F als  $R^2 = 0,4672$  angegeben. Für Diagramm E ergab sich  $p > 0,05$  und somit keine Signifikanz (n.s.).

## 4 Diskussion

### 4.1 Referenzwerte klinischer und makroskopischer Daten

In der vorliegenden Studie wurden aus einer Stichprobe von 49 Plazenten klinisch unauffälliger Schwangerschaften klinische und makroskopische Daten erhoben (u.a. Gestationsalter, Geburtsgewicht, Plazentagewicht, Verhältnis von Plazenta- zu Geburtsgewicht und Plazentadicke), für die bereits Referenzwerte in der Literatur vorliegen [22, 73, 89].

Die erhobenen Daten passen zu diesen bekannten Daten und bestätigen, dass die hier untersuchte Population von Plazenten bezüglich der klinischen und makroskopischen Parameter unkomplizierten Schwangerschaften entspricht. Auf der Basis dessen kann davon ausgegangen werden, dass auch die übrigen erhobenen Daten im Bereich der normalen statistischen Schwankungen den Werten von Plazenten aus unkomplizierten Schwangerschaften entsprechen.

### 4.2 Methodische Besonderheiten der vorliegenden Studie

#### 4.2.1 Immunhistochemische Zottenklassifizierung

Im Rahmen dieser Arbeit werden grundsätzlich zwei Typen von plazentaren Zotten unterschieden - Zotten mit perivaskulären Myofibroblasten (posVILLI) und Zotten ohne Myofibroblasten (negVILLI). Die Myofibroblasten sind der Zelltyp, der konstitutiv für die perivaskuläre kontraktile Manschette (PKM) in Zotten der menschlichen Plazenta ist [33, 34, 62, 90-93]. Der Nachweis dieses Zelltyps ist daher gleichbedeutend mit dem Nachweis der perivaskulären kontraktilen Manschette im Zottenstroma.

Die Unterscheidung der beiden Zottentypen im histologischen Dünnschicht-Präparat wird dabei durch eine immunhistochemische Markierung mit Antikörpern gegen das Protein  $\gamma$ -sm-Aktin ( $\gamma$ -smooth-muscle-Aktin) der Myofibroblasten ermöglicht. Periphere Zottenanteile enthalten weder eine perivaskuläre Manschette noch Myofibroblasten, sie erscheinen unter der genannten Färbung als  $\gamma$ -sm-Aktin-negativ.

Während die Funktion des perivaskulären Kontraktionsapparates weiter diskutiert wird, scheint es bereits eindeutig, dass die dem Gewebe obliegenden Eigenschaften für die Verwendung einer nicht mehr stromalen, sondern funktionalen Einteilung der plazentaren Villi sprechen. Die Herangehensweise der immunhistochemischen Determinierung zentraler und peripherer Zottenanteile ist für den Untersucher einfacher umsetzbar und birgt mehrere Vorteile. Einerseits

kann eine überwiegend untersucherunabhängige und somit objektive Datengewinnung gewährleistet werden, andererseits werden Zottenabschnitte, welche eine perivaskuläre  $\gamma$ -sm-Aktin-Reaktivität aufweisen, ungeachtet ihres Kalibers, als funktionale Fraktion zusammengefasst. Daher eignet sich die Methode zur sicheren Identifizierung zentraler Zottenstrukturen [40, 41].

Das neuerliche Konzept histologischer Grundlagenforschung am humanen Plazentapräparat, welches sich auf immunhistochemische Nachweise stützt, weicht von der klassischen histologischen Nomenklatur ab, wie sie in den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts von Kaufmann und Sen etabliert und seither vielfach angewandt wurde [23, 24].

In der reifen Plazenta unterscheidet diese rein histologische Klassifizierung zwischen Terminalzotten, reifen Intermediärzotten und Stammzotten; hinzu kommen noch die selten anzutreffenden mesenchymalen Zotten. Letztere Klassifikation von Zottenanschnitten stützt sich auf komplexe stromale und angioarchitektonische Merkmale, die der jeweilige Untersucher unter Anwendung konventioneller Anfärbungen wie beispielsweise der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und anhand des Zottendurchmessers sowie der zellulären Stromazusammensetzung beurteilen muss. Eine eindeutige Zuordnung der Strukturen ist oft schwer oder gar nicht möglich, auch weil Zotten mit einem Durchmesser von unter  $60\mu\text{m}$  klassischerweise als Intermediär- bzw. Terminalzotte eingeordnet werden, Zotten mit einem Durchmesser von mehr als  $50\mu\text{m}$  als Stammzotte, so dass eine Überschneidung der beiden Abgrenzungen von  $10\mu\text{m}$  verbleibt [8, 23, 35, 39, 61, 94, 95].

In einer Validierungsstudie zur Klassifizierung des plazentaren Zottenbaumes wurde nachgewiesen, dass die vermuteten subjektiven Abhängigkeiten der Ergebnisse einer rein histologischen Zottenklassifizierung vom klassifizierenden Untersucher tatsächlich auch gegeben waren und diese Vorgehensweisen nicht den wissenschaftlichen Ansprüchen an ein objektives und untersucherunabhängiges Studiendesign genügen [39].

Die Unterscheidung in terminale und intermediäre Zotten aufgrund von Zottenanschnitten entsprach nur sehr ungenau der tatsächlichen Position der Zottenanschnitte im Zottenbaum. Für quantitative Untersuchungen der Morphologie der Plazenta wurde davon abgeraten, die bis dato vorherrschenden rein histologischen Konzepte der Zottenklassifikation weiter einzusetzen, da sie selbst bei versierten und erfahrenen Untersuchern aufgrund der großen Streuung nicht für quantitative Analysen geeignet seien. Stattdessen wurde die immunhistochemische

unterstützte Vorgehensweise als Alternative empfohlen, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter methodisch etabliert werden konnte [39].

Um die hier erarbeiteten Ergebnisse in Anbetracht existierender Publikationen verständlicher diskutieren zu können, wird der Terminus der zentralen „ $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotte“ vorübergehend im Rahmen der Diskussion mit der konventionellen stromalen Klassifizierung der Stammzotte, während die Intermediär- und Terminalzotten entsprechend unter dem Begriff „ $\gamma$ -sm-Aktin-negativen“ Zotten subsummiert werden. Die  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten umfassen allerdings einen kleinen Anteil kleinkalibriger Zotten, die in der klassischen Nomenklatur auch als Intermediär- oder Terminalzotten klassifiziert worden wären. Dieser Aspekt sollte bei der folgenden Diskussion stets im Hintergrund mit beachtet werden.

#### 4.2.2 Stereologische Abschätzung der Verzweigungsintensität

Eine wesentliche Problematik zweidimensionaler Schnittanalytik, wie sie in der Histologie üblicherweise durchgeführt wird, liegt darin, dass dreidimensionale Strukturen im histologischen Schnitt nur als zweidimensional reduzierte Artefakte erscheinen. Bei der Untersuchung des plazentaren Zottenbaumes fallen insbesondere die Verzweigungspunkte der Zottenbäume in diesen mikroskopisch unerreichbaren Untersuchungsbereich: sie sind oft nicht eindeutig angeschnitten oder liegen gänzlich oberhalb oder unterhalb der Schnittebene. Es ist darum auffallend, dass es eine histologische Nomenklatur der Zotten selbst gibt, aber keine der zugehörigen Verzweigungspunkte [23, 24].

Auch die Stereologie leidet grundsätzlich unter diesem Problem - allerdings ist es nicht so, dass Verzweigungspunkte in den Anschnitten unsichtbar sind. Zotten weisen als runde und wenig gekrümmte Struktur im histologischen Anschnitt meist gerade (Längsschnitt) oder aber nach aussen gekrümmte (konvexe) Oberflächen auf. Nach innen gekrümmte (konkave) Oberflächen in Zottenanschnitten treten lediglich dann auf, wenn die Schnittfläche durch einen dreidimensionalen Verzweigungspunkt führt (s. dazu auch Kapitel 1.4, Abbildung 7). Der in der vorliegenden Arbeit bestimmte Konkavitätsindex der Zottenoberflächen ist daher ein indirektes Maß für die räumliche Dichte von Verzweigungspunkten im Plazentagewebe und kann daher auch als Verzweigungsindex oder Branching-Index bezeichnet werden [80]. Als Messgröße beschreibt er die räumlichen Dichte von Verzweigungspunkten und deutet – je höher er ausfällt – auf eine ausgeprägtere Verzweigung des untersuchten Zottenbaumes hin.

Diese Methodik zur Entschlüsselung der villösen Verzweigungsstruktur im plazentaren Zottenbaum der humanen Plazenta wurde erstmalig als Pilotstudie auf der IFPA (International Federation of Placenta Associations Meeting) 2017 vorgestellt und hat sich zwischenzeitlich bereits bei der Analyse von Veränderungen im Zottenbaum bei Schwangerschaften mit intrauteriner Wachstumsretardierung bewährt [44].

### 4.3 Korrelationsmuster zwischen den Parametern

Um die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen makroskopischen und mikroskopischen Parametern zu beurteilen, wurden multivariate Korrelationsanalysen durchgeführt. Dabei wurden für die klinischen und makroskopischen Parameter bereits bekannte Korrelationen bei klinisch unauffälligen Schwangerschaften bestätigt [22, 67].

Insbesondere die Messung der Diffusionsdistanzen an der Zottenoberfläche und die Erfassung der Parameter zur Konkavität der Zottenoberflächen (Verzweigungsindices) gehen aber über die bisher publizierten Daten hinaus und waren bisher nicht bekannt (siehe dazu Kapitel 4.5.1 sowie 4.5.2).

### 4.4 Die perivaskuläre kontraktile Manschette und ihre funktionelle Bedeutung

Mit der zuvor beschriebenen immunhistochemischen Klassifizierung des Zottenbaumes werden Zottenanschnitte nach Gegenwart oder Abwesenheit der Myofibroblasten in der perivaskulären kontraktile Manschette (PKM) klassifiziert. Diese Klassifikation hat möglicherweise funktionelle Bezüge, denn mit ihr konnte bereits gezeigt werden, dass der Teil des Zottenbaumes mit PKM derjenige ist, der bei Plazenten mit IUGR spezifische Defizite aufweist. Die Gewichtsrestriktion solcher Plazenten ist im Wesentlichen auf das Fehlen  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten mit PKM zurückzuführen [80]. Damit ist die in der vorliegenden Studie verwandte immunhistochemische Unterteilung nicht nur für quantitative Studien geeignet, sondern ist auch in der Lage, Störungen der Zottenreifung bei geburtshilflichen Krankheitsbildern wie der IUGR zu erfassen.

Damit rückt aber auch die Frage in den Blick, welche funktionelle Bedeutung die PKM hat.

Zunächst handelt es sich bei der PKM um eine Ansammlung von Myofibroblasten ausserhalb der Media der fetoplazentaren Gefäße [33, 34, 62, 90-92, 96]. Ihre Anordnung und Kontraktionsachse ist nicht stochastisch orientiert, sondern längs der Gefäß-Hauptachse und damit parallel zur Blutströmung ausgerichtet. In der vaskulären Tunica media der Gefäße jedoch

sind die glatten Muskelzellen zirkulär und damit senkrecht zum Blutstrom ausgerichtet. Die PKM kann in großkalibrigen Stammzotten mehrere Lagen dick sein und dünnt sich nach peripher im Zottenbaum hin immer mehr aus, bis schliesslich nur noch einzelne perivaskuläre Myofibroblasten ausserhalb der sonst kapillaren Gefäße erkennbar sind.

Diese Beschreibung der Morphologie verdeutlicht, dass die kontraktile Zellen der PKM bei isometrischer Kontraktion die Wandspannung um die Gefäße herum erhöhen bzw. grundsätzlich modifizieren können. Die Wandspannung ist ein Faktor, der diese fetoplazentaren Gefäße vor möglichen Druckschwankungen im maternalen Kreislauf – dem intervillösen Raum – bewahren kann. Wenn die Wandspannung mindestens dem Druck im intervillösen Raum gleicht, kann aus dem intervillösen Raum keine komprimierende Kraft mehr freigesetzt werden und das Lumen verengen. Damit ändert sich der Durchmesser der innerhalb der PKM liegenden Gefäße nicht zwangsläufig mit dem intervillösen Druck und ist von diesem unabhängig. Indirekt kann die PKM damit aufgrund ihrer präkapillaren Lokalisierung die Wandspannung des Gefäßes modulieren und so Einfluss auf den fetoplazentaren Gefäßwiderstand nehmen, damit der Widerstand in der fetoplazentaren Zirkulation ganz unter der Kontrolle fetaler Gefäße bleibt [13, 28, 33, 34, 40].

Im Falle einer isotonischen Kontraktion – wenn es also zur Verkürzung ganzer Zotten in der Längsachse kommt – kommt ein weiterer Faktor hinzu. Diese Änderungen machen die Spalträume zwischen den Zotten enger und erhöhen damit potenziell den Widerstand im materno-fetalen Kreislauf. Bis hierher sind diese funktionellen Betrachtungen aus der anatomischen Position der PKM abgeleitet. Ob diese Faktoren aber tatsächlich – und wenn ja, ob alle von ihnen – zur Physiologie der Plazenta beitragen, ist unklar [28, 33, 34, 40].

Die funktionelle Bestimmung der  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten, welche eine ausgeprägte Kapillarisation und eine im Vergleich zu den  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten verhältnismäßig geringe Diffusionsdistanz vom Trophoblastenrand bis zum Gefäß aufweisen, ist im materno-fetalen Stoffaustausch zu verorten [35, 64].

Die in der vorliegenden Studie verwandte immunhistochemische Systematik der Zottenuntergliederung minimiert also nicht nur den Interpretationsspielraum (und damit die mögliche Streuung der Messwerte) der mikroskopischen Untersucher; vielmehr zielt sie auch auf eine besondere und mindestens für die IUGR bereits funktionell relevante Substruktur des Zottenbaumes ab. Damit lässt sich nicht nur eine technisch-methodische Überlegenheit der immunhistochemischen Herangehensweise dieser Studie zeigen, sondern auch ein besserer

funktionaler Bezug zur Effizienz des Zottenbaums etablieren, als dies bei der klassischen histologischen Zottenklassifikation möglich ist.

Aufgrund dessen wäre es wünschenswert, zukünftig die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten aus klinisch unauffälligen Schwangerschaften den Daten vergleichbarer Untersuchungen an pathologischen Plazenten (beispielsweise kombiniert mit einer intrauterinen Wachstumsretardierung des Fetus), gegenüberstellen zu können, um so weitreichendere Erkenntnisse über die Zusammenhänge von morphologischer Pathologie, Funktionsstörungen der Plazenta und perinatalen Erkrankungen gewinnen zu können.

## 4.5 Spezielle mikroskopische Daten der vorliegenden Studie

### 4.5.1 Konkavitäten (Verzweigungsindex)

Der unter Kapitel 4.2.2 bereits erläuterte Verzweigungsindex kann als Parameter zur Einschätzung der Verzweigung ganzer Zottenbäume dienen, was sich durch die nachgewiesene signifikante Korrelation zwischen den Konkavitätsindices  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver und  $\gamma$ -sm-Aktin-negativer Strukturen erklärt.

Der Zusammenhang zwischen zentralem und peripherem Verzweigungsgrad könnte darauf hindeuten, dass die Verzweigungsmuster in einer physiologischen Schwangerschaft durchweg konstant gehalten werden, steht aber der Annahme, die branching-Angiogenese setze erst ab der 20. SSW ein, gegenüber [30, 35]. Ebenso wäre im Hinblick auf eine insbesondere in den periphereren Zottenanteilen stattfindende branching-Angiogenese zu erwarten gewesen, dass die Konkavität in den  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zottenanteilen höher ausfällt als in den zentralen Anteil, das Gegenteil ist aber der Fall.

### 4.5.2 Diffusionsdistanz

Die Gegenüberstellung der gemessenen absoluten Diffusionsdistanzen von Trophoblastenrand bis zur villösen Kapillare, zeigte in  $\gamma$ -sm-Aktin-positivem Gewebe deutlich längere Distanzen als im  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Gewebe. Das überrascht nicht und untermauert die These, dass diese Zottentypen nicht nur immunhistochemisch, sondern auch funktional unterschiedliche Subtypen sind und der feto-maternale Stoffaustausch sich überwiegend in den  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Arealen abspielt.

Darüber hinaus fiel der relative Anteil des Volumens  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten am gesamten Volumen deutlich höher aus, als vorausgegangene Publikationen erwarten ließen [66, 67].

## 4.6 Ausgewählte Korrelationen klinisch-makroskopischer Daten mit mikroskopischen Parametern

In der klinisch-gynäkologischen Beurteilung einer Schwangerschaft können sowohl das Plazentagewicht als auch das Gewicht des Fetus als etablierte Prognosefaktoren für das Auftreten von perinatalen Erkrankungen angesehen werden. Insbesondere fetoplazentare Diskordanzen können mit Entwicklungsstörungen assoziiert sein [97]. Die Korrelationen des Geburtsgewichts und des Plazentagewichtes als auch der Plazentadicke mit verschiedenen mikroskopischen Parametern werden hier in linearen Korrelationsanalysen genauer dokumentiert.

### 4.6.1 Korrelationen von Plazentagewicht und Plazentadicke

#### 4.6.1.1 Korrelation mit Konkavität und Diffusionsdistanz

Hohe Plazentagewichte traten dann auf, wenn die Konkavität in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten gering war (Abb. 22). Gleichzeitig konnte eine Erhöhung der Plazentadicke ermittelt werden (Abb. 24) während für die Konkavität in in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten ebenso wie für die Diffusionsdistanzen kein Zusammenhang mit dem Plazentagewicht und der Plazentadicke nachgewiesen werden konnte (Abb. 22).

Die simultan vorliegende Erhöhung von Plazentagewicht und Plazentadicke wurde in der Literatur bereits mehrfach erwähnt [38, 64]. In besonderer Weise wird hier unterstrichen, dass der hier bestimmte Parameter der Konkavität negativ mit diesen beiden Werten korreliert.

Wenn der Verzweigungsindex  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten kleiner wird und gleichzeitig die Plazentadicke zunimmt, so liegt nahe, dass die  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten längere Intervalle zwischen ihren Verzweigungspunkten aufweisen. In der vorliegenden Studie wurde derartigen Veränderungen kein Krankheitswert beigemessen. Sie lassen aber vermuten, dass schon die normale Zottenreifung gewichtsrelevante Schwankungen bei der Verzweigungsstruktur und der Länge der internodalen Segmente der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Elemente des Zottenbaums aufweisen kann. Darüber hinaus wird klar, dass die  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten tatsächlich eine gewichtsrelevante Untereinheit des Zottenbaums darstellen. Eine geringere Konkavität  $\gamma$ -sm-Aktin-positiver Zotten führt zu schwereren Plazenten – während sich die Diffusionsdistanzen

nicht ändern. Dieser Gewichtsbezug wurde grundsätzlich bereits beschrieben und bekräftigt sich hier erneut [67, 80]. Auch in der vorliegenden Studie konnte bestätigt werden, dass die  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Anteile des Zottenbaum keinen entsprechenden starken Einfluss auf das Plazentagewicht haben, wie er hier für die  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Anteile beschrieben wurde.

Es ist bekannt, dass besonders starke Gewichtsdefizite von Plazenten mit einer starken Reduktion der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zottenbestandteile einhergehen. Im Falle der IUGR ist auch bekannt, dass dies mit fetoplazentaren Perfusionsstörungen vergesellschaftet ist, die sich als absent or reversed diastolic flow im umbilikalen Doppler bemerkbar machen [98-101]. Es ist also durchaus denkbar, dass Zusammenhänge nicht nur mit dem Gewicht von Plazenten bei der Geburt bestehen, sondern auch der Intensität der fetoplazentaren Perfusion der Plazenten geschuldet sind. Für letzteres allerdings liefert die vorliegende Studie – ohne Dopplerdaten – nur Indizien, keine Nachweise. Trotzdem wird deutlich, dass die Frage nach der Rolle der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Bestandteile des Zottenbaums für die fetoplazentare Perfusion vertieft in weitergehenden Studien wird analysiert werden müssen.

Bei der Analyse der transtrophoblastären (feto-maternalen) Diffusionsdistanzen zeigte sich zwar, dass diese Distanzen in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zottenbestandteilen länger waren als in  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zottenbestandteilen, allerdings konnte kein Zusammenhang mit dem Plazentagewicht beobachtet werden. Die kürzeren Diffusionsdistanzen sind damit auf den Bereich des Zottenabums in der Peripherie des Baums konzentriert, in dem der maternofetale Stoffaustausch hauptsächlich stattfindet. Das ist physiologisch sicher sinnvoll und ist auch ein Indiz für die Validität der erhobenen Daten.

#### 4.6.1.2 Korrelationen mit Zottenvolumina

Die vorliegende Studie zeigt klare Korrelationen zwischen dem Plazentagewicht und dem Volumen sowohl der  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen als auch der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zottenbestandteile. Für die  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zottenbestandteile ist dies auch für die Dicke der Plazenta der Fall; die Werte variieren hier parallel zum Plazentagewicht. Mit den Daten zum Plazentagewicht und seiner Korrelation mit beiden Zottenbestandteilen werden bereits vorliegende Daten aus der Literatur untermauert [67]. Allerdings wurde in der Arbeit von Buehlmeyer et al. eine Korrelation der Plazentadicke mit dem Volumen der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zottenbestandteile beschrieben, nicht aber mit den  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zottenbestandteilen, da keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Die Studie von Buehlmeyer et al. hatte eine

ähnliche statistische Power (50 Plazenten) wie die vorliegende Arbeit, mit der klassischen Cavalieri-Methode allerdings einen primär auf die Volumenbestimmung ausgerichteten Ansatz. Die durch die Bestimmung von Diffusionsdistanzen und Verzweigungsindices erhöhte Komplexität der Messmethodik der vorliegenden Studie spricht dafür, dass hier die Studie von Bühlmeier et al. über die stärkere Aussagekraft verfügen könnte. Allerdings kann dieser Unterschied zur vorliegenden Studie an dieser Stelle nicht abschliessend geklärt werden. Auch dazu müssten weitere Untersuchungen – ggf. auch mit höheren Fallzahlen – durchgeführt werden.

#### 4.6.2 Plazentaquotient vs. Konkavität, Diffusionsdistanz und Intervillöser Raum

Der fetoplazentare Quotient (PG\_GG\_Ratio) spiegelt das Verhältnis von Plazentagewicht zum Geburtsgewicht des Fetus wieder. Während ein erhöhter Plazentaquotient bei normgewichtiger Plazenta auf eine fetale Wachstumsrestriktion (beispielweise ausgelöst durch eine gestörte Entwicklung der Zotten bei fetalem Alkoholsyndrom oder Nikotinabusus) hindeutet, kann ein erniedrigter Plazentaquotient entweder in Richtung eines Plazentaminderwuchses oder einer Makrosomie des Fetus weisen [97].

Ein normwertiger Plazentaquotient hingegen schließt das Vorliegen schwerwiegender Wachstums- und Reifestörungen der Plazenta und des Fetus nicht aus, wird aber dennoch als Kenngröße zur Einschätzung Plazentaeffizienz empfohlen [102].

Da in den Quotienten (PG\_GG\_Ratio) das Plazentagewicht mit eingeht, ist es zunächst nicht sehr überraschend, dass der Verzweigungsindex der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zottenbestandteile ebenso wie das PG auch negativ mit der PG\_GG\_Ratio korreliert. In diesem Zusammenhang überrascht aber, dass die Diffusionsdistanzen der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zottenbestandteile positiv mit der PG\_GG\_Ratio korrelieren. Weniger Verzweigung und verkürzte Diffusionsdistanzen in den  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten haben dementsprechend gegenläufige Korrelation mit der PG\_GG\_Ratio:

- Ein niedrigerer Verzweigungsindex in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten korreliert mit einer erhöhten PG\_GG\_Ratio
- Eine größere Diffusionsdistanz in  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten korreliert mit einer erhöhten PG\_GG\_Ratio

Nicht nur ein geringer Branching-Index, sondern auch verlängerte Diffusionsdistanzen treten also gehäuft in Schwangerschaften mit höheren Plazentaquotienten auf. Höhere PG\_GG\_Ratio-Werte hingegen werden mit einer weniger effizienten Plazenta in Verbindung gebracht [102].

Die naheliegenden Interpretationen verdeutlichen, dass eine stärkere Verzweigung des Zottenbaumes zu einer höheren Effizienz des placentaren Austauschsystems führt; ebenso trifft dies für eine kürzere Diffusionsdistanz an der Zottenoberfläche zu.

Hier gilt es allerdings noch weitere Aspekte zu untersuchen, denn die  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zottenbestandteile mit ihrem Verzweigungsindex und den Diffusionsdistanzen korrelieren nicht mit der PG\_GG\_Ratio. Die  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zottenbestandteile sind aber die im Wesentlichen für den Stoffaustausch verantwortlichen Zottenabschnitte. Diese Fragestellung kann anhand der Daten der vorliegenden Studie nicht abschließend geklärt oder beantwortet werden. Hierfür werden weitere, spezifisch auf dieses Problem fokussierte Nachfolgeuntersuchungen durchgeführt werden müssen, welche womöglich auch grundlegende Rückschlüsse auf den Zusammenhang dieser strukturellen Veränderungen mit perinatalen Pathologien (Wachstumsretardierung, Präeklampsie oder Diabetes mellitus) zulassen werden.

#### 4.6.3 Interpretation von Verzweigungsanalysen und Diffusionsdistanzen des placentaren Zottenbaumes

Dieser Abschnitt widmet sich dem hier neu eingeführten Verzweigungsindex der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Bestandteile des Zottenbaumes. Dieser zeigt in der linearen Korrelationsanalyse mit mehreren der untersuchten mikroskopischen Parametern Korrelationen, die von null signifikant verschieden sind.

Zunächst ist hier das Volumen der  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zottenbestandteile zu nennen, das negativ mit dem Verzweigungsindex der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zottenbestandteile korreliert. Je weniger stark verzweigt die  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten sind, desto weniger Volumen findet sich in den  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten. Auf den ersten Blick erscheint dieser Zusammenhang anti-intuitiv; allerdings klärt sich die Problematik rasch, wenn präzisiert wird, dass der Verzweigungsindex der beiden Zottenkompartimente offensichtlich eng miteinander verknüpft ist. Dort, wo weniger  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Verzweigungen existieren, da sind auch die anschliessenden  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten weniger verzweigt. Der hervorzuhebende zentrale Befund ist hier, dass die Verzweigungsindices der beiden Zottenbäume eng miteinander verbunden sind, was auf eine individuelle Plazenta-spezifische und die ganze Plazenta durchziehende Intensität der Verzweigung hinweist. Welche Voraussetzungen zu dieser engen

Verknüpfung führen, kann aus den Daten der vorliegenden Studie alleine nicht abgeleitet werden. Aber es läßt sich feststellen, dass die Zottenverzweigung durch die Schwangerschaft hindurch zu konstanten Verzweigungsdichten führt, während viele der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten zeitlich vor den  $\gamma$ -sm-Aktin-negativen Zotten entstehen [80]. Wenn die Verzweigungsdichten dieser beiden Abschnitte so strikt miteinander verbunden sind, wie es diese Studie aufzeigen kann, dann müssen die für die Verzweigungsdichte der Zotten wesentlichen Faktoren über lange Phasen der Schwangerschaft hinweg in der Plazenta gleich bleibend sein.

Ein Faktor, der dem eine wesentliche und unmittelbare Rolle für die Verzweigung der Zotten zugesprochen wird, ist die Angiogenese der fetoplazentaren Gefäße [30, 103, 104]. Tatsächlich zeigen die Daten der vorliegenden Studie auch, dass eine abnehmende Verzweigungsdichte der Gefäße mit einer abnehmenden Verzweigungsdichte der Zotten einhergeht. Dies unterstützt die Annahme einer Verbindung zwischen Angiogenese und Zottenverzweigung, kann aber im Rahmen der Studie zur Entschlüsselung der zugrunde liegenden Mechanismen nicht direkt etwas beitragen. Der so bestätigte Zusammenhang zwischen Gefäßverzweigung und Zottenverzweigung ist aber wiederum als ein Plausibilitätsmerkmal der Daten der vorliegenden Studie zu sehen.

Eine weitere Korrelation stellt die negative Korrelation der Verzweigungsdichte der  $\gamma$ -sm-Aktin-positiven Zotten mit der Diffusionsdistanz an der Oberfläche der Zotten dar. Die Diffusionsdistanz wird kleiner je weniger verzweigt die Zotten sind. An dieser Stelle ist auch ein methodischer Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern nicht auszuschliessen. An den Verzweigungsstellen des Zottenbaums liegen die Gefäße nicht in allen Bereichen optimal wandnah. Damit steigt an Verzweigungsstellen die Wahrscheinlichkeit, längere Distanzen zwischen Trophoblastoberfläche und Gefäßinnenseite zu messen. Wenn die Verzweigungsdichte insgesamt steigt, steigt darum potenziell auch der Mittelwert für die Diffusionsdistanz tendenziell an. Ob der beschriebene Zusammenhang ein primär methodischer ist oder ob es sich tatsächlich um eine Veränderung der Schichtdicke handelt, kann allerdings nur durch weiterführende Studien geklärt werden.

## Literaturverzeichnis

- 1 Castellucci M, Schepe M, Scheffen I. The development of the human placental villous tree. *Anatomy and Embryology*. 1990. 117-128.
- 2 Benirschke K, Kaufmann P. *Pathology of the human placenta*. New York Springer. 2000.
- 3 Brehmer A, Waldeyer A, Anderhuber F. *Anatomie des Menschen*. Berlin. De Gruyter. 2012. 113-173.
- 4 Rath W, Gembruch U, Schmidt S. *Geburtshilfe und Perinatalmedizin - Physiologie der Schwangerschaft*. Stuttgart. Thieme. 2010. 2-29.
- 5 Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. *Funktionelle Embryologie*. Stuttgart. Schattauer. 2012. 11-26.
- 6 Sadler TW, Langman J. *Medizinische Embryologie*. X. Stuttgart. Thieme. 2003. 2-137.
- 7 Schünke M, Schulte E, Schumacher U. *Prometheus - LernAtlas der Anatomie, Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. Stuttgart Thieme. 2007. 8-12.
- 8 Aherne W, Dunnill MS. Morphometry of the human placenta. *British Medical Bulletin*. 1966. 22(1). 5-8.
- 9 Aplin JD. Developmental cell biology of human villous trophoblast: current research problems. *International Journal of Developmental Biology*. 2010. 54(2-3). 323-329.
- 10 Welsch U, Sobotta J. *Atlas Histologie*. München. Elsevier, Urban & Fischer. 2005. 445.
- 11 Stauber M, Weyerstahl T, Beham A. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart. Thieme. 2013. 437-448.
- 12 Castellucci M, Kosanke G, Verdenelli F, et al. Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Human Reproduction Update*. 2000. (Vol. 6, No. 5). 485-494.
- 13 Frank H-G. 10 - Placental Development. In: Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW, editor. *Fetal and Neonatal Physiology (Fifth Edition)*. Elsevier. 2017. 101-113.
- 14 Kaufmann P, Frank H-G. Placental Development. In: Polin R, Fox W, Abman S, editor. *Fetal and Neonatal Physiology*. Third Edition 2004. 85-97.
- 15 Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, et al. Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*. 2004. 114(5-6). 397-407.
- 16 Schneider H, Raio L, Knöfler M. Präimplantation, Implantation und Plazentation. In: Schneider H, Husslein P, Schneider K-TM, editor. *Die Geburtshilfe*. 3. Berlin. Springer. 2006. 3-16.
- 17 Aherne W, Dunnill MS. Quantitative aspects of placental structure. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1966. (91(1)). 123-139.

- 18 Scholz C. Physiologie und Pathologie der Schwangerschaft. In: Gätje R, Eberle C, Scholz C, Lübke M, Solbach C, editor. Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart. Thieme. 2011. 347-382.
- 19 Merz E. Sonographie von Plazenta, Nabelschnur und Fruchtwasser - Plazenta. Sonographische Diagnostik in Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart. Georg Thieme. 2002. 388-402.
- 20 Laga EM, Driscoll SG, Munro HN. Quantitative Studies of Human Placenta II. Biology of the Neonate. 1973. (3(3)). 260-283.
- 21 Kaufmann P. Basic morphology of the fetal and maternal circuits in the human placenta. Contributions to Gynecology and Obstetrics. 1985. 13. 5-17.
- 22 Haeussner E, Schmitz C, von Koch F, et al. Birth weight correlates with size but not shape of the normal human placenta. Placenta. 2013. 34(7). 574-582.
- 23 Sen D, Kaufmann P, Schweikhart G. Classification of human placental villi - II. Morphometry. Cell and Tissue Research. 1979. (200(3)). 425-434.
- 24 Kaufmann P, Sen D, Schweikhart G. Classification of human placental villi - I. Histology. Cell and Tissue Research. 1979. (200). 409-423
- 25 Baergen RN. Chorionic Villi: Histology and Villous Development. Manual of Pathology of the Human Placenta. Boston. Springer. 2011. 69-83.
- 26 Kosanke G, Castellucci M, Kaufmann P, et al. Branching patterns of human placental villous trees: Perspectives of topological analysis. Placenta. 1993. 14(5). 591-604.
- 27 Leiser R, Kaufmann P. Placental structure: in a comparative aspect. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes. 1994. 102(3). 122-134.
- 28 Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Basic Structure of the Villous Trees. Pathology of the Human Placenta. Berlin/Heidelberg. Springer. 2012. 55-100.
- 29 Kurjak A, Kupesic S. Beurteilung der frühen Plazentabildung und der Blutzirkulation des Embryos mittels Dopplersonographie. In: Schmidt WO, Bahlmann F, editor. Farbdopplersonographie in Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart. Thieme. 2001.
- 30 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.
- 31 Wang Y, Zhao S. Vascular Biology of the Placenta. Integrated Systems Physiology: from Molecules to Function to Disease. San Rafael. Morgan & Claypool Life Sciences. 2010. 1-98.
- 32 Schweikhart G. Morphologie des Zottenbaumes der menschlichen Plazenta - Orthologische und pathologische Entwicklung und ihre klinische Relevanz. Habilitationsschrift. Universität Mainz 1985.
- 33 Graf R, Langer J-U, Schönfelder GO, T., et al. The extra vascular contractile system in the human placenta. Morphological and immunocytochemical investigations. Anatomy and Embryology. 1994. 190(6). 541-548.
- 34 Graf R, Schönfelder G, Mühlberger M, et al. The perivascular contractile sheath of human placental stem villi: Its isolation and characterization. Placenta. 1995. (16(1)). 57-66.

- 
- 35 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.
- 36 Jackson MR, Mayhew TM, Boyd PA. Quantitative description of the elaboration and maturation of villi from 10 weeks of gestation to term. *Placenta*. 1992. 13(4). 357-370.
- 37 Mayhew TM, Burton GJ. Stereology and its impact on our understanding of human placental functional morphology. *Microscopy Research and Technique*. 1997. 38(1-2). 195-205.
- 38 Haeussner E, Buehlmeier A, Schmitz C, et al. Novel 3D microscopic analysis of human placental villous trees reveals unexpected significance of branching angles. *Scientific Reports*. 2014. 4. 6192.
- 39 Haeussner E, Aschauer B, Burton G, 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.
- 40 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.
- 41 Kohnen G, Kertschanska S, Demir R, et al. Placental villous stroma as a model system for myofibroblast differentiation. *Histochemistry and Cell Biology*. 1996. 105(6). 415-429.
- 42 Matsumura S, Sakurai K, Shinomiya T, et al. Biochemical and immunohistochemical characterization of the isoforms of myosin and actin in human placenta. *Placenta*. 2011. 32(5). 347-355.
- 43 Nyengaard JR, Marcussen N. The number of glomerular capillaries estimated by an unbiased and efficient stereological method. *Journal of Microscopy*. 1993. (171 (1)). 27-37.
- 44 Haeussner E, Renz K, Schmitz C, et al. Pilot study on immunohistochemical subtyping of human villous trees combined with subtype-specific branching analysis by a concavity index. *Placenta*. 2017. 57. 322-223.
- 45 Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clinical Science*. 1998. 95(2). 115-128.
- 46 Sayer AA, Cooper C, Barker DJ. Is lifespan determined in utero? *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition*. 1997. 77(3). 162-164.
- 47 Remacle C, Bieswal F, Reusens B. Programming of obesity and cardiovascular disease. *International Journal of Obesity*. 2004. 28(3). 46-53.
- 48 Hoffman MC. Stress, the Placenta, and Fetal Programming of Behavior: Genes' First Encounter With the Environment. *American Journal of Psychiatry*. 2016. 173(7). 655-657.
- 49 Haeussner E. Three-dimensional microscopic topology of the human placental villous tree reveals relationships with placental function in health and obstetric disease. Ludwig-Maximilians-Universität München. Fakultät für Biologie. 2016.
- 50 Perry BN, Tsao JW. The placenta and human developmental programming. *Journal of the Neurological Sciences*. 2013. 322(1-2). 157.

- 51 Burton GJ, Barker DJP, Moffett A. The maternal and placental origins of chronic disease. *The Placenta and human Developmental Programming*. Cambridge. Cambridge University Press. 2010. 5-16.
- 52 Jirkovská M, Kubínová L, Janáček J, et al. Topological Properties and Spatial Organization of Villous Capillaries in Normal and Diabetic Placentas. *Journal of Vascular Research*. 2002. 39(3). 268-278.
- 53 Kingdom JC, Kaufmann P. Oxygen and placental vascular development. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1999. 474. 259-275.
- 54 Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, et al. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2000. 92(1). 35-43.
- 55 Kehl S, Dötsch J, Hecher K. Intrauterine Growth Restriction. *Guideline of the German Society of Gynecology and Obstetrics*. S2k-Level, AWMF Registry No015/080. 2017.
- 56 Gill JS, Salafia CM, Grebenkov D, et al. Modeling oxygen transport in human placental terminal villi. *Journal of Theoretical Biology*. 2011. 291. 33-41.
- 57 Gordon Z, Eytan O, Jaffa AJ, et al. Fetal Blood Flow in Branching Models of the Chorionic Arterial Vasculature. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007. 1101. 250-265.
- 58 Burton GJ, Jauniaux E. Sonographic, stereological and Doppler flow velocimetric assessments of placental maturity. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1995. 102(10). 818-825.
- 59 Burton GJ, Charnock-Jones DS, Jauniaux E. Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction*. 2009. 138(6). 895-902.
- 60 Kingdom JC, Kaufmann P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta*. 1997. 18(8). 613-621.
- 61 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.
- 62 Leiser R, Luckhardt M, Kaufmann P, et al. The fetal vascularisation of term human placental villi. I. Peripheral stem villi. *Anatomy and Embryology*. 1985. 173(1). 71-80.
- 63 Mayhew TM. Changes in fetal capillaries during preplacental hypoxia: growth, shape remodelling and villous capillarization in placentae from high-altitude pregnancies. *Placenta*. 2003. 24(2-3). 191-198.
- 64 Benirschke K, Burton G, Baergen RN. *Pathology of the human placenta*. Berlin [u.a.]. Springer. 2012.
- 65 Fajersztajn L, Veras MM. Hypoxia: From Placental Development to Fetal Programming. *Birth Defects Research*. 2017. 109(17). 1377-1385.
- 66 Buehlmeier A. *Stereologische Volumenbestimmung immunhistochemisch differenzierter Strukturbestandteile der menschlichen Plazenta*. Ludwig-Maximilians-Universität München. Fakultät für Medizin. 2018.

- 
- 67 Buehlmeier A, Barapatre N, Schmitz C, et al. The volume of villi with  $\gamma$ -sm-actin positive perivascular cells correlates with placental weight and thickness. *Placenta*. 2019. 85. 24-31.
- 68 Baschat AA. Neurodevelopment following fetal growth restriction and its relationship with antepartum parameters of placental dysfunction. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2011. 37(5). 501-514.
- 69 Schmitz C, Frank H-G. Discrete Placental Dysfunction: The Overlooked Player in Prenatal Roots of Neuropsychiatric Diseases? *Neuroembryology*. 2002. 1(4). 169-175.
- 70 Lahti-Pulkkinen M, Cudmore MJ, Haeussner E, et al. Placental Morphology Is Associated with Maternal Depressive Symptoms during Pregnancy and Toddler Psychiatric Problems. *Scientific Reports*. 2018. 8(791). 1-12.
- 71 Klöppel G, Remmele W, Dietel M. *Pathologie - Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen*. Berlin. Springer. 2013. 505-541.
- 72 Thornburg KL, O'Tierney PF, Louey S. Review: The placenta is a programming agent for cardiovascular disease. *Placenta*. 2010. 31. 54-59.
- 73 Burkhardt T, Schäffer L, Schneider C, et al. Reference values for the weight of freshly delivered term placentas and for placental weight–birth weight ratios. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2006. 128(1-2). 248-252.
- 74 Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*. 2005. 130(4). 813-831.
- 75 Weibel ER. Stereology in perspective: a mature science evolves. *Acta Stereologica*. 1992. 11. 1-13.
- 76 Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology*. Abingdon. BIOS Scientific Publ. . 2005. 1-277.
- 77 Mayhew TM. Stereology and the Placenta: Where's the Point? – A Review. *Placenta*. 2006. 27. 17-25.
- 78 Miles RE, Davy PJ. Precise and general conditions for the validity of a comprehensive set of stereological fundamental formulae. *Journal of Microscopy*. 1976. 211-226.
- 79 Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction\*. *Journal of Microscopy*. 1987. 147. 229-263.
- 80 Barapatre N, Kampfer C, Henschen S. Growth restricted placentas show severely reduced volume of villous components with perivascular myofibroblasts. *Placenta*. 2021. 109. 19-27.
- 81 Mulisch M, Welsch U. *Romeis Mikroskopische Technik*. Heidelberg. Spektrum. 2010. 181-91.
- 82 MBF Bioscience. *Stereo Investigator Users Guide*. Version 9. Vermont, USA. 2009. [https://www.mbfbioscience.com/help/stereo\\_vault/Si9.pdf](https://www.mbfbioscience.com/help/stereo_vault/Si9.pdf).
- 83 Russo D, Van Roy B, Kazerouni A, et al. A Tutorial on Thompson Sampling. 2018. 11(1). 1-96.
- 84 Thomson E. Quantitative Microscopic Analysis. *The Journal of Geology*. 1930. 38(3). 193-222.

- 85 Mayhew TM, Sampson C. Maternal diabetes mellitus is associated with altered deposition of fibrin-type fibrinoid at the villous surface in term placentae. *Placenta*. 2003. 24(5). 524-531.
- 86 R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna. 2021. <https://www.R-project.org/>
- 87 Fox J, Weisberg S. An R companion to applied regression. Los Angeles. Sage. 2019.
- 88 Wei T, Simko V. R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix. (Version 0.90). 2021. <https://github.com/taiyun/corrplot>.
- 89 Almog B, Shehata F, Aljabri S, et al. Placenta weight percentile curves for singleton and twins deliveries. *Placenta*. 2010. 32(1). 58-62.
- 90 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 and Tissue Research*. 1997. 290(3). 601–607.
- 91 Graf R, Neudeck H, Gossrau R, et al. Elastic fibres are an essential component of human placental stem villous stroma and an integrated part of the perivascular contractile sheath. *Cell and Tissue Research*. 1995. 282(1). 133-141.
- 92 Graf R, Frank H-G, Öney T. Histochemical and Immunocytochemical Investigations of the Fetal Extravascular and Vascular Contractile System in the Normal Placenta and During Preeclampsia. Risk Assessment of Prenatally-Induced Adverse Health Effects. Berlin/Heidelberg. Springer. 1992. 537–550.
- 93 Krantz KE, Parker JC. Contractile properties of the smooth muscle in the human placenta. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 1963. 6(1). 26-38.
- 94 Almasry S, Eldomiaty M, Elfayomy A, et al. Structural analysis of human placental stem and terminal villi from normal and idiopathic growth restricted pregnancies. *Journal of Molecular Histology*. 2012. 43(3). 263-271.
- 95 Boyd JD, Hamilton WJ. The human placenta. Cambridge. Heffer. 1970.
- 96 Spanner R. Mütterlicher und kindlicher Kreislauf der menschlichen Placenta und seine Strombahnen: Mit Unterstützung aus Mitteln der deutschen Forschungsgemeinschaft. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*. 1935. 105. 163–242.
- 97 Vogel M. Pathologie der Plazenta: Spätschwangerschaft und fetoplazentare Einheit. In: Klöppel G, Kreipe H, Remmele W, Dietel M, editor. *Pathologie: Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen*. Berlin/Heidelberg. Springer. 2013. 541-632.
- 98 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.
- 99 Su EJ. Role of the fetoplacental endothelium in fetal growth restriction with abnormal umbilical artery Doppler velocimetry. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015. 213(4). 123-130.
- 100 Babic I, Mejia A, Wroblewski J-A, et al. Intraplacental Villous Artery Doppler as an Independent Predictor for Placenta-Mediated Disease and Its Comparison with Uterine Artery Doppler

- 
- and/or Placental Biochemical Markers in Predictive Models: A Prospective Cohort Study. *Fetal diagnosis and therapy*. 2020. 47(4). 292-300.
- 101 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. *Obstetrics and gynecology*. 1990. 75(04). 578-583.
- 102 Hayward CE, Lean S, Sibley CP, et al. Placental Adaptation: What Can We Learn from Birthweight:Placental Weight Ratio? *Frontiers in Physiology*. 2016. 7. 28.
- 103 Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta*. 2004. 25(2-3). 103-113.
- 104 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.

## Danksagung

Zum Gelingen dieser Dissertation haben viele Menschen beigetragen und ihnen allen gebührt mein großer Dank - insbesondere denjenigen, die mich in den letzten Jahren immer wieder ermutigt haben, diese Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Mein geschätzter Doktorvater Prof. Dr. med. Hans-Georg Frank stellte mir nicht nur dieses interessante Thema zur Verfügung, sondern fing mich mit seiner außergewöhnlichen Expertise auf dem Gebiet der Plazentologie und seiner konstruktiven Gutmütigkeit auch in den schwierigen Phasen der Promotion auf. Danke für die viele Inspiration, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die intensive Unterstützung.

Hervorheben möchte ich auch die zeitaufwändige Betreuung und Förderung durch Dr. rer. nat. Nirav Barapartre und Dr. rer. nat. Eva Häußner, sowohl während des experimentellen als auch während des analytischen Teils meiner Arbeit.

Besondere Anerkennung darf ich für die erfahrene Unterstützung und Mitarbeit an das gesamte Team des Lehrstuhls II der Anatomischen Anstalt der LMU München unter der Leitung von Prof. Dr. Christoph Schmitz richten; insbesondere sind hier namentlich Beate Aschauer, Astrid Baltruschat, Ute Fazekas, Sibylle Kerling, Barbara Mosler und Sabine Tost zu erwähnen.

Ebenso danke ich den gynäkologischen Kollegen und Mitarbeitern des Klinikums Dritter Orden, welche unter der Leitung von Dr. Franz Edler von Koch die klinische Arbeit dieser Studie mit großem Engagement und Sorgfalt ermöglicht haben.

Zuletzt möchte ich meinen Großvater, meine Eltern, meine Schwester, meine Mimi und meine Lollo sowie meinen Partner Benedikt erwähnen. Danke für die bedingungslose Liebe und die seelisch-moralische Stärke, die ihr mir schenkt – nicht nur für diese Doktorarbeit, sondern in allen Lebenslagen.

## Affidavit

### Eidesstattliche Erklärung

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

*„Die Mikroarchitektur der humanen Plazenta und ihre Korrelation mit dem Plazentagewicht in physiologischen Schwangerschaften“*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient 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 habe.

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

München, den 08.08.2022

**Katharina Renz**

.....

Katharina Isabel Sophia Renz

*Excusez-moi, ma vie m'attend.*