

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. L. Kiesel -

**Die plazentare Syndecan-1 Expression  
im 1. und frühen 2. Trimenon:  
Ein prädiktiver Faktor für das  
kindliche Schwangerschaftsoutcome?**

**INAUGURAL – DISSERTATION  
zur  
Erlangung des doctor medicinae**

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Konietzny, Anna  
aus Telgte

**2009**



Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Klockenbusch

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. J. Vogt

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2009

Aus dem Universitätsklinikums Münster  
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. L. Kiesel-  
Referent: Prof. Dr. W. Klockenbusch  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Vogt

## **Zusammenfassung**

Die plazentare Syndecan-1 Expression im 1. und frühen 2. Trimenon:  
Ein prädiktiver Faktor für das kindliche Schwangerschaftsoutcome?

von  
Anna Konietzny

**Fragestellung:** Diese experimentelle Studie ermöglichte die deskriptive Analyse der plazentaren Syndecan-1 Expression sowie die weltweit erstmalige Untersuchung, ob durch eine frühe Chorionzottenbiopsie und immunhistochemische Markierung des Syndecan-1 ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Syndecan-1 Expression und mütterlicher Faktoren hergestellt bzw. eine Aussage über den Schwangerschaftsverlauf und das kindliche Outcome gemacht werden kann. Ziel der Studie war damit die Möglichkeit zur Etablierung eines neuen, frühen, pränataldiagnostischen Tests auszumachen und, als Schwerpunkt in dieser Studie, das Risiko einer Frühgeburtlichkeit und Wachstumsretardierung früher erkennen zu können.

**Methode:** 203 Chorionzottenbiopsien wurden im Studienzeitraum entnommen und durch Maus-Anti-CD138 (MCA681) aus dem Klon B-B4 immunhistochemisch auf Syndecan-1 gefärbt. Die Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung (konventioneller Färbescore) durch 3 geblindete Beobachter wurden mit den Daten der Patientinnen und Kinder korreliert, die mit Hilfe der PIA-Fetal Database erhoben wurden. Die statistische Auswertung erfolgte durch das Statistikprogramm SPSS mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha < 0.05$ .

**Ergebnisse:** Weltweit erstmalig konnten wir die Mikrovilli der Chorionzotten als Ort der intensivsten Syndecanexpression identifizieren. Darüberhinaus wurde durch uns erstmalig der signifikante Unterschied in der Syndecanintensität zwischen großen und kleinen Chorionzotten beschrieben (u.a.  $\alpha = 0.000$ ), der die statistischen Ergebnisse massiv beeinflusst und bislang von keinem anderen Autor vorgenommen wurde. Der hochsignifikante Zusammenhang zwischen Nikotinabusus der Mutter und der Syndecanexpression ( $\alpha = 0.003$  und  $\alpha = 0.007$ ) zeigte sich in unserer Studie weltweit erstmals. Die hochinteressanten Korrelationen der verminderten Expression mit Frühgeburtlichkeit (u.a.  $\alpha = 0.014$ ) und dem kindlichem Ausgang, d.h. lebend geborene Kinder mit vermehrter Expression ( $\alpha = 0.011$ ,  $\alpha = 0.015$ ,  $\alpha = 0.048$ ), sowie einem normalen Karyotyp bei vermehrter Syndecanexpression ( $\alpha = 0.024$ ) konnten in der Literatur durch uns weltweit erstmalig als signifikant aufgezeigt werden.

**Schlussfolgerung:** Unsere Ergebnisse machen deutlich und zeigen weltweit erstmalig, dass die immunhistochemische Färbung von Chorionzotten auf Syndecan-1 als neuer pränataldiagnostischer Test vielversprechend ist und neue Möglichkeiten hinsichtlich der sehr frühen Erkennung von Frühgeburtlichkeit, auffälligem Karyotyp, kindlichem Ausgang und evtl. fetaler Wachstumsretardierung bieten kann.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2009

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Plazenta</b>	<b>1</b>
1.1.1 Allgemeines und Historie	1
1.1.2 Plazentation - Trophoblasteninvasion	2
1.1.3 Funktionelle Plazentastörungen	4
<b>1.2 Diagnostische Möglichkeiten zur Prädiktion</b>	<b>8</b>
1.2.1 Sonographie und biochemische Marker	8
1.2.2 Dopplersonographie der A. umbilicalis	10
1.2.3 Analyse fetaler Zellen	10
1.2.4 Präimplantationsdiagnostik	11
1.2.5 Chorionzottenbiopsie	11
<b>1.3 Syndecan-1</b>	<b>17</b>
1.3.1 Syndecan-1 – ein Proteoglykan	17
1.3.2 Bindungsverhalten	20
1.3.3 Expression	22
1.3.4 Funktionen	23
<b>1.4 Fragestellung</b>	<b>28</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Patientinnenkollektiv</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Daten zu Patientinnen und Schwangerschaftsoutcome</b>	<b>30</b>
<b>2.3 Materialgewinnung – Chorionzottenbiopsie</b>	<b>31</b>
<b>2.4 Paraffineinbettung und Lagerung</b>	<b>33</b>
<b>2.5 Immunhistochemie</b>	<b>34</b>
<b>2.6 Mikroskopische Auswertung</b>	<b>35</b>
<b>2.7 Konventioneller Färbescore</b>	<b>36</b>
<b>2.8 Statistische Auswertung</b>	<b>38</b>
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Daten zum Patientinnenkollektiv</b>	<b>39</b>
3.1.1 Alter, Gewicht, Größe, BMI	39
3.1.2 Zeitpunkt der Chorionzottenbiopsie	40

---

3.1.3 Nikotin, Alkohol	40
<b>3.2 Daten zum Schwangerschaftsoutcome</b>	<b>41</b>
3.2.1 Entbindungszeitpunkt, Ausgang, Karyotyp	41
3.2.2 Customised centiles	44
3.2.3 Sonographische und postnatale Parameter, Geschlecht	45
<b>3.3 Daten zur immunhistochemischen Auswertung</b>	<b>47</b>
<b>3.4 Korrelation der immunhistochemischen Auswertung zum Patientinnenkollektiv (mütterliche Faktoren)</b>	<b>55</b>
3.4.1 Nikotin	55
3.4.2 Größe	56
3.4.3 Gewicht, BMI, Alter, Alkohol	56
<b>3.5 Korrelation der immunhistochemischen Auswertung zum Schwangerschaftsoutcome (kindliche Faktoren)</b>	<b>57</b>
3.5.1 Femurlänge, SSL, biparietaler Durchmesser, Länge, Kopfumfang	57
3.5.2 Nackentransparenz	59
3.5.3 Ausgang, Karyotyp	60
3.5.4 Customised centiles	60
3.5.5 Schwangerschaftsalter	63
3.5.6 Gewicht des Neugeborenen, Geschlecht	65
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>66</b>
<b>4.1 Kritische Betrachtung von Material und Methode</b>	<b>66</b>
4.1.1 Patientinnenkollektiv und Datenerhebung	66
4.1.2 Probengewinnung	67
4.1.3 Immunhistochemische Färbung und Auswertung	67
<b>4.2 plazentare Syndecan-1 Expression</b>	<b>70</b>
<b>4.3 Syndecan-1 als prädiktiver Faktor für das Schwangerschaftsoutcome</b>	<b>72</b>
4.3.1 Syndecan und mütterliche Faktoren	72
4.3.2 Syndecan und kindliche Faktoren	76
<b>4.4 Beurteilung dieser Studie</b>	<b>84</b>
<b>5 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>86</b>
<b>6 LEBENS LAUF</b>	<b>100</b>
<b>7 DANKSAGUNG</b>	<b>101</b>
<b>8 ANHANG</b>	<b>I</b>

---

<b>8.1 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>8.2 Tabellenverzeichnis</b>	<b>I</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Plazenta**

### **1.1.1 Allgemeines und Historie**

Die Plazenta übernimmt lebenswichtige Aufgaben für die Entwicklung des ungeborenen Kindes. Sie erlaubt die

- Nährstoffaufnahme, -weiterleitung und -verarbeitung
- Entgiftung durch Stoffwechselproduktentsorgung, sowie
- Steuerung der endokrinen Funktion von kindlichen Stoffwechselprozessen.

Die überragende Leistung der Plazenta besteht in Ausführung dieser sämtlichen Funktionen ohne Vorangehen einer vorherigen Entwicklungsphase; sie muss parallel funktionieren und ihr Wachstum regulieren.

Darüber hinaus stellt sich die Plazenta auch im wissenschaftlichen Interesse für uns besonders dar. Für Studienzwecke bietet sich die menschliche Plazenta wie kein zweites menschliches Organ an, was insbesondere in Zeiten ethischer Diskussionen von großem Interesse ist:

- Die menschliche Plazenta stellt sich uns als gesundes Organ in nahezu unbegrenztem Umfang zur Verfügung.
- Sie enthält einen fast unerschöpflichen Pool an menschlichem Genmaterial, aber auch Proteine und Hormone.
- Es kommt zu keiner ethischen Infragestellung der Nutzung der Plazenta nach der Austragung der Leibesfrucht, sei es durch Geburt oder Interruptio [69].

Wie benutzen den Begriff „Plazenta“ heute ohne seine eindeutige sprachliche Herkunft zu kennen. Man vermutet, dass Gabriele de Falloppio (1516-1559) den Begriff Plazenta geprägt hat. Andere sind der Ansicht, dass „Plazenta“, aus dem Lateinischen übersetzt, soviel bedeutet wie „flacher Kuchen“ und Realdus Columbus habe dies eingeführt. Vesalius (1514-1564) war einer der ersten Wissenschaftler, die mit Interesse den Aufbau der Plazenta erforschten. Allerdings war sein Wissen über die Plazenta noch sehr lückenhaft. Wilhelm Fabricius Hildanus (1560-1634) war es möglich die Plazenta präziser zu beschreiben, wobei aber erst durch Nicolas Haboken (1632-1678) Ansichten der Plazenta bekannt wurden, die auch heute noch Geltung finden. Seine detaillierten Beschreibungen wurden von Rainier de Graaf durch Informationen über den Mikrovilliaufbau und die Vaskularisation vervollständigt. De

Graaf ist heute allerdings eher durch den Graafschen Follikel bekannt, als durch seine Plazentaforschung. Wenig beachtet und bekannt ist Karl Ernst von Baer. Er verdient Aufmerksamkeit in Bezug auf die Erforschung der plazentaren Blutzirkulation.

Desweiteren müssen in diesem Zusammenhang Joseph Hyrtl, Professor der Anatomie aus Wien, ebenso wie Friedrich Schatz, Autor und Otto Grosser, Anatom, erwähnt werden. Sie leisteten große Beiträge zum Verständnis der Funktion und des Aufbaus der Plazenta. Die grundlegenden Erkenntnisse auf dem Gebiet des Trophoblasten und der embryonalen Entwicklung verdanken wir dem Team um Hertig und Rock. Ihre Forschungen gelten auch heute noch als Basis unseres Wissens auf diesen Gebieten [11].

### **1.1.2 Plazentation - Trophoblasteninvasion**

Die Plazentation wird am 12. Tag post conceptionem mit dem Verschluss des Endometriums über der Blastozyste abgeschlossen. Der Trophoblast am Implantationspol entwickelt sich zur späteren Plazenta, während sich der Trophoblast der zuletzt implantierten Abschnitte zum Chorion leave zurückbildet. Zu Beginn ist der Saum aus Trophoblastzellen rein synzytial, später geht die Schicht des Synzytiotrophoblasten zugrunde und der Zytotrophoblast kommt in Kontakt mit der mütterlichen Dezidua. Diese Zellen werden zum extravillösen Trophoblasten, der im ersten und zweiten Trimenon von den sogenannten Zellsäulen im Bereich der Basalplatte, die Dezidua, sowie das innere Drittel des Myometriums invadiert (interstitielle Invasion) [49]. Diese Zellen sezernieren die onkofetale Matrix, welche die Plazenta in der Uteruswand verankert. Ab der 10. SSW findet man die Trophoblastzellen auch in den Wänden der Spiralarterien (endovaskuläre Invasion) [18], deren muskuläre Anteile der Gefäßwand durch amorph-fibrinoides Gewebe ersetzt werden, in dem sich die Trophoblastzellen befinden [77]. Man vermutet, dass die invasiven Trophoblastzellen nicht proliferieren können [18] und die zunehmende Anzahl der Zellen durch kontinuierliche Invasion aus der Plazenta zustande kommt [127]. Aufgabe des extravillösen Trophoblasten ist die Umwandlung der uterinen Spiralarterien zu Gefäßen mit hoher Kapazität und geringem Widerstand, was sich in einer Erhöhung der end-diastolischen Blutflussgeschwindigkeit in der Dopplersonographie widerspiegelt [49] und dem Anspruch nach erhöhtem plazentarem Blutbedarf in der Plazenta stattgibt. Durch diesen Umbau werden die Spiralarterien der Plazenta der mütterlichen Vasomotorenkontrolle entzogen [19] [18].

Nicht nur die Trophoblastzellen führen zu einer Vasodilatation der Spiralarterien. Teilt man die Umwandlung der Spiralarterien in drei Phasen, so findet man in der ersten

Phase, schon vor der endovaskuläre Invasion durch den extravillösen Trophoblasten, eine Teildilatation der Spiralarterien, so dass vermutlich auch andere Faktoren [64], wie NO an dem Umbau der Spiralarterien zu den utero-plazentaren Arterien beteiligt sind [89]. In der zweiten Phase findet eine weitere Dilatation der Arterien statt. Der Trophoblast hat zu diesem Zeitpunkt Kontakt zu der Arterie, hat sie aber noch nicht invadiert. In der dritten Phase wird das Maximum an Dilatation, das 3 fache des Ausgangszustandes, durch Invasion der Arterienwand erreicht.

Der extravillöse Trophoblast invadiert nicht nur die Wand der Arterien, sondern auch das Lumen des Gefäßes. Im ersten Trimenon wird das gesamte Lumen durch Plaques aus Trophoblastzellen obliteriert, so dass der intervillöse Raum der Plazenta nicht von maternalem Blut durchspült werden kann. Lediglich das Plasma erreicht durch diesen Filter den intervillösen Raum und stellt die Ernährung des Feten sicher. Ab der 10. bis 12. SSW beginnt die Auflösung dieser Plaques und der Weg für das Blut wird freigegeben. Bis zu diesem Zeitpunkt verläuft die embryonale Entwicklung also unter hypoxischen Verhältnissen, vermutlich, um die vulnerable Phase der Organsystemdifferenzierung vor freien Sauerstoffradikalen zu schützen [64].

Die Sauerstoffkonzentration bestimmt aber nicht nur die korrekte Organdifferenzierung, von ihr ist auch die vollständige Vaskularisation der Plazentavilli abhängig. Zu Beginn ist die Vaskularisierung vor allem durch Verästelung der entstehenden Gefäße charakterisiert, was zur Formung der unreifen Villi führt [125] und unter dem Zeichen der physiologisch hypoxischen Zustände steht [64]. Das chronische Hypoxie auch später zu verstärkter Vaskularisation und Verästelung von Kapillaren führt, zeigte eine Studie mit dem Guinea Schwein [125], sowie die Begutachtung humaner Plazenten bei Anämie, nach Aufenthalt in großer Höhe oder bei defekter Trophoblasteninvasion. In der folgenden Phase des vermehrten Sauerstoffangebotes [64] bis zum Ende des zweiten Trimenons ist die Angiogenese durch Verlängerung der bestehenden Gefäße ohne weitere Aufzweigung gekennzeichnet. Dies führt zur Entstehung der terminalen Kapillaren. Im weiteren Verlauf des dritten Trimenons formen diese Kapillaren die reifen und terminalen Villi, die für den Gasaustausch und die Ernährung des Feten verantwortlich sind. Bei Geburt enthalten die Kapillaren ca. ein Viertel des gesamten fetoplazentaren Blutvolumens, was sich letztendlich in einem erhöhten end-diastolischen Blutfluss widerspiegelt [125].

### 1.1.3 Funktionelle Plazentastörungen

#### Präeklampsie

Das Ausmaß und die Ausgewogenheit der oben genannten Trophoblasteninvasion ist essentiell für die fetale Entwicklung. Missverhältnisse oder Unzulänglichkeiten der Invasion können Präeklampsie oder eine fetale Wachstumsretardierung zur Folge haben [77]. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der ungenügenden Trophoblasteninvasion und Präeklampsie konnte zwar bislang noch nicht erbracht werden, statisch zeigt sich diese Assoziation allerdings als hoch signifikant [100]. Den direkten kausalen Zusammenhang aufzuzeigen, erweist sich derzeit als schwierig, da es keine, mit konventionellen Methoden feststellbare, spezifische Veränderung an den präeklampsischen Plazenten zu geben scheint. Infarkte, Abruptio placentae, Fibrose der terminalen Villi, Proliferation des Zytotrophoblasten, Hypovaskularisation der Villi [49], synzytiale Zellknoten und Endangiopathia obliterans [126] sind aber typisch. Diese Pathologien sollen mit dem gestörten physiologischen Umbau der Spiralarterien in Zusammenhang stehen, der sich durch fibrinoide Nekrosen und Atherosklerose in den betroffenen Gefäßen kenntlich macht [49] [100]. Die geforderte Dilatation der mütterlichen Gefäße kann durch die fehlende oder unvollständige Trophoblasteninvasion nur unvollständig vollzogen werden, was sich in pathologischen dopplersonographischen Flüssen widerspiegelt. Hierbei soll vor allem die endovaskuläre Invasion des Trophoblasten gestört sein, während die interstitielle Invasion von untergeordneter Rolle ist [76]. Der vaskuloendotheliale Wachstumsfaktor VEGF-A und der plazentare Wachstumsfaktor PIGF werden von dem villösen und dem extravillösen Trophoblasten gebildet und sind entscheidend für die Entwicklung des plazentaren Gefäßnetzes. In Plazenten von präeklampsischen Patientinnen findet man diese Faktoren und den Rezeptor für VEGF, den VEGFR-1 vermehrt. Im plazentaren Bett hingegen ist VEGFR-1 reduziert und könnte damit zum Teil die defekte plazentare Vaskularisation bei Präeklampsie erklären [24]. Inwieweit die plazentaren Wachstumsfaktoren aber tatsächlich Einfluss auf die veränderte vaskuläre Struktur der Villi nehmen, ist heute noch nicht geklärt [125]. Gesichert ist jedoch, dass die Struktur der Villi auf zwei Arten geschädigt ist: Einerseits sieht man als Zeichen der Hypoxie (durch die unzureichende Vasodilatation) eine Zottenfrühreifung mit maximal vaskularisierten Terminalzotten. Andererseits kennzeichnen plumpe Kapillaren in unverzweigten Terminalzotten eine Zottenretardierung, was sich durch negative und fehlende Flüsse in der Dopplersonographie der A. umbilicalis verdeutlicht [58]. Weitere Ursachen der Präeklampsie scheinen sich in Veränderungen der Expression von Zell-

Adhäsionsmolekülen, Matrix Metalloproteinasen und ihren Antagonisten, Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren [77], sowie beim HLA-G und der Sauerstoffkonzentration zu finden [76]. Desweiteren kommt vermutlich eine defekte Interaktion zwischen mütterlichen Immunzellen der Dezidua, den Gefäßwänden und dem extravillösen Trophoblasten in Betracht. Der invasive Trophoblast schützt sich vor dem mütterlichen Immunsystem durch Expression von MHC-I Varianten, v.a. HLA-G. [45] und bei einigen Präeklampsiepräparaten wurde diese Expression erniedrigt vorgefunden [28], wobei nicht geklärt ist, ob dies durch eine verminderte Trophoblastenzahl oder durch eine verminderte Expression auf intakten Trophoblasten zu erklären ist.

In der Konsequenz, der noch nicht genau geklärten Ursachenkette, kommt es zur unvollständigen Erweiterung der Gefäße, welche eine Abfolge biochemischer Prozesse einleitet: Aggregation von Thrombozyten und Fibrin, sowie vermehrte Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Dies verstärkt die, ohnehin durch die verminderte Vasodilatation bestehende, plazentare Ischämie [100]. Durch Freisetzung von Stoffen aus den ischämischen Trophoblastenzellen kommt es reaktiv zur mütterlichen Präeklampsie-symptomatik [19], bzw. durch die Hypoxie zur fetalen Wachstumsretardierung [76].

Der Schweregrad der Präeklampsie und damit die Prognose des Feten können derzeit nur durch die dopplersonographische Untersuchung in engen Grenzen bestimmt werden [100]. Keine der anderen oben genannten morphologischen Veränderungen stellen ein adäquates Korrelat zum Schweregrad dar.

### **Fetale Wachstumsstörung**

Der Prozess des fetalen Wachstums wird durch genetische Faktoren (z.B. Trisomie 13, 18, 21, Mikrodeletionen, etc.), Hormone und die uteroplazentare Ernährung determiniert. Unabhängig von der zugrunde liegenden Ursache wird die intrauterine fetale Wachstumsstörung als ein Prozess definiert bei dem aufgrund eines reduzierten Nahrungsangebotes aus dem plazentaren Kreislauf zu wenig Gewebe eingelagert werden konnte und das Geburtsgewicht unterhalb der zehnten Perzentile liegt [24].

Die Störung im plazentaren Kreislauf wird, wie bei der Präeklampsie, auf einen defekten Umbau der Spiralarterien zurückgeführt [99] [104]. Bei der intrauterinen Wachstumsstörung wurden ganz ähnliche Veränderungen der Spiralarterien festgestellt, wie bei den präeklampsischen Plazenten, einhergehend mit einer abnormalen uterinen Dopplersonographie [49], wie fehlendem oder umgekehrtem end-diastolischem Fluss in der Umbilikalarterie. Dies korreliert mit einer geringen Entwicklung der peripheren Villi, die zum Gasaustausch unabdingbar sind. Dieser Umstand führt zu einem erhöhten Risiko für chronische fetale Hypoxie und Azidose

[125]. Man konnte nachweisen, dass solche Patientinnen, bei denen sich eine abnormale Doppler-Flussgeschwindigkeit nachweisen lässt, in eine Gruppe fallen, die häufiger plazentar-vaskuläre Komplikationen erleidet, als solche mit intrauteriner Wachstumsverzögerung ohne Auffälligkeiten in der Dopplersonographie [49]. In den meisten Fällen der fetalen Wachstumsstörung sind aber weder ein fehlender noch ein normaler Fluss eruierbar, sondern milde Abnormalitäten, wie geringe, aber positive end-diastolische Flussgeschwindigkeiten. Wichtig zu beachten ist dabei, dass fehlende oder umgekehrte enddiastolische Flussgeschwindigkeiten häufiger zu Frühgeburtlichkeit führen als milde Abnormalitäten (Median von 28 Wochen zu einem Median von 34 Wochen) [125] und mit einer höheren perinatalen Mortalität von 41% belastet sind [103].

Man geht davon aus, dass bei den Schwangerschaften mit positiv enddiastolischen Flussgeschwindigkeiten Kompensationsmechanismen greifen können, die bei fehlenden oder umgekehrten Flüssen nicht mehr zur Verfügung stehen. So kann man als Zeichen der Hypoxie bei einigen Plazenten mit positiv end-diastolischen Flussgeschwindigkeiten stark verästelte Kapillaren finden, die zumindest anteilig den reduzierten Blutfluss kompensieren können [125].

Neuere Studien zeigen aber, dass nicht einzig eine gestörte Trophoblasteninvasion mit defektem Gefäßumbau als Ursache der fetalen Wachstumsstörung angesehen werden kann, sondern auch von einer Störung im villösen Transportsystem, aus der ein reduziertes Nahrungsangebot resultiert, ursächlich in Betracht gezogen werden muss. Es wurde gezeigt, dass das Aminosäuretransportersystem A, sowie ein Glukosetransporter in ihrer Aktivität eingeschränkt sein können. Die Ionenporter scheinen im Rahmen der intrauterinen Wachstumsverzögerung ebenfalls eine Rolle zu spielen. Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase ist in ihrer Aktivität und Expression erniedrigt, während die  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase eine erhöhte Aktivität aufweist. Die Expression plazentarer Wachstumsfaktoren wie VEGF-A und PIGF wurden auch im Rahmen der intrauterinen Wachstumsstörung untersucht, mit dem Ergebnis einer erhöhten Expression dieser Moleküle.

Welche dieser Veränderungen als primär anzusehen und damit mit der Entwicklung der Wachstumsstörung vergesellschaftet sind und welche als sekundäre Ereignisse der einwirkenden Hypoxie zu betrachten sind, muss noch geklärt werden [24].

### **Thrombosen**

Allgemeine Risikofaktoren einer Venenthrombose sind das Alter, eine frühere Thrombose, Immobilisation oder Operation, ebenso maligne Erkrankungen, orale Kontrazeptiva, eine Schwangerschaft, etc. Allein durch eine Gravität erhöht sich das

Risiko eines thrombembolischen Ereignisses um das ca. fünf bis sechs fache in Bezug zu nicht schwangeren Frauen [4]. Frauen über 30 Jahre, mit Adipositas, Multiparität oder einer Sectio-Entbindung haben, dabei eine nochmals erhöhte Wahrscheinlichkeit, eine Thrombose zu erleiden. Hinzu kann eine positive Familienanamnese, Antithrombinmangel, Mangel an Protein C und S oder das Antiphospholipidsyndrom kommen, wodurch das Risiko weiter steigt [101]. Eine Kombination dieser Risikofaktoren erhöht die Wahrscheinlichkeit zu verschiedenen Graden um ein Vielfaches. Folgen einer Thrombose im uteroplazentaren Kreislauf können dramatische Ausmaße annehmen und zu Aborten, intrauteriner Wachstumsverzögerung, intrauterinem Fruchttod, vorzeitiger Plazentalösung oder Präeklampsie führen [54] [110].

## **1.2 Diagnostische Möglichkeiten zur Prädiktion**

Zwar sind die therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung vieler intrauterin auftretender Komplikationen, wie der fetalen Wachstumsretardierung und von einigen Schwangerschaftsassozierten mütterlichen Erkrankungen, wie der Präeklampsie, gering, eine frühzeitige Erkennung der Erkrankungen aber wünschenswert, um Komplikationen und Risiken von Mutter und Kind vorhersehen, abwenden, bzw. gegebenenfalls frühzeitig therapieren zu können.

Zur frühzeitigen und verlässlichen Erkennung von Erkrankungen ist die Etablierung eines standardisierten Screening-Verfahrens notwendig, das folgende Bedingungen erfüllen muss:

- a) eine frühe Erkennung des Problems,
- b) eine hohe Sensitivität (Erkennung der Erkrankten),
- c) eine hohe Spezifität (niedrige Anzahl falsch als Kranke erkannte) und somit
- d) einen hohen positiven Vorhersagewert.

Zu Beginn einer jeden Schwangerschaft sollte die ausführliche Anamnese stehen, um eventuelle Risikofaktoren wie Erstgebärende, Alter über 40 Jahre, familiäre Prädispositionen, Präeklampsie in vorangegangenen Schwangerschaften, Mehrlingsschwangerschaft, vorbestehende Hypertonie oder eine chronische Nierenerkrankung, zu eruieren. Auch ein schwangerschaftsinduzierter Diabetes und die diabetische Nephropathie mit arterieller Hypertonie sind Risikofaktoren für eine komplizierte Schwangerschaft. Nach neueren Erkenntnissen führen Protein-S-Mangel, APC Resistenz, Antiphospholipid-Antikörper und Hypercysteinämie zu einer erhöhten Präeklampsieinzidenz und sollten deshalb ebenfalls anamnestisch erhoben werden [100].

### **1.2.1 Sonographie und biochemische Marker**

Im Rahmen der pränatalen Diagnostik ist vor allem die Sonographie von ausschlaggebender Relevanz. Routinemäßig werden im Rahmen der Vorsorgeuntersuchungen heute 3 sonographische Untersuchungen (um die 10., die 20., und die 30. SSW) des Feten vorgenommen, die, je nach Befund, zu weitergehenden Untersuchungen (z.B. einer Nackentransparenzbestimmung oder einer Chorionzottenbiopsie) führen. Die Sonographie kann nicht nur Organanomalien feststellen, und bei der Diagnostik der fetalen Wachstumsstörung behilflich sein, sondern vor allem die Möglichkeit bieten, frühzeitig die Suche nach

Chromosomenanomalien zu unterstützen. Dabei spielt die Messung der fetalen Nackentransparenz eine große Rolle, eine Methode, entwickelt von der Fetal Medicine Foundation London [56]. Sie kann neben der Detektion von Chromosomenanomalien auch Hinweise auf Herzfehler und andere strukturelle Anomalien geben [35] [115] [132] und stellt damit ein nicht invasives Screeningverfahren für viele kindliche Erkrankungen dar. Die Messung der fetalen Nackentransparenz kann zu 76.8% die Kinder mit Trisomie 21 identifizieren, kombiniert man diese Messung mit dem mütterlichen  $\beta$ -hCG Wert aus dem Serum, so kann man den Vorhersagewert auf 87.0% erhöhen. Comstock postuliert, dass bei einer Nackentransparenzdicke von  $>3.0\text{mm}$  ein Abwarten der Serumparameter fast keinen Vorteil und bei einer Dicke von  $>4.0\text{mm}$  keinen Vorteil mehr bietet und sofort eine Chorionzottenbiopsie durchgeführt werden kann, um die Diagnose einer Chromosomenanomalie durch Chromosomenanalyse vollständig abzusichern [30]. Sonographisch lässt sich aber auch durch die Nasenbeinlänge ein Hinweis auf Chromosomenstörungen finden [111]. Durch den fehlenden Nachweis eines Nasenbeins lässt sich die Trisomie 21-Wahrscheinlichkeit mit 69% angeben. Nimmt man die indirekten sonographischen Zeichen einer Chromosomenaberration wie fetale Wachstumsstörung, Tachykardie, Exomphalozele und eine singuläre Nabelarterie hinzu, so kann die Diagnose einer Trisomie 21 mit einer 90-97%igen Wahrscheinlichkeit gestellt werden [90] [26].

Auch biochemische Marker können Aufschluss geben über das Erkrankungsrisiko an Trisomie 21, z.B. das mütterliche  $\beta$ -hCG-,  $\alpha$ -Fetoprotein und das unkonjugiertes Östradiol [130] [116]. Die Bestimmung dieser drei Marker wird auch als Triple-Test bezeichnet. [5]. Der humane plazentare Wachstumsfaktor [7] und erhöhte PAPP-A Spiegel im mütterlichen Serum können ebenfalls Hinweise auf fetale Anomalien sein [117]. Die Kombination von Serummarkern, Sonographie und dem Alter der Mutter ist heute das sicherste Verfahren zur frühen Erkennung einer Trisomie 21 mit einer Identifizierungsrate von bis zu 91% [6].

Blutparameter spielen aber auch im Rahmen der Prädiktion anderer Erkrankungen eine Rolle. Ein schon in der 10. – 14. SSW erhöhtes Serum ActivinA findet man bei im Verlauf der Schwangerschaft auftretender Präeklampsie oder schwangerschafts-induzierter Hypertonie [93]. Die Messung eines erhöhten plazentaren Wachstumsfaktors im Serum, zwischen der 11. - 14. vollendeten SSW [92], sowie die Bestimmung von  $\alpha$ -Fetoprotein, Inhibin A und unkonjugiertem Östradiol zusammen mit dem mütterlichen Normalgewicht und dem Rauchverhalten, kann auf eine fetale Wachstumsretardierung hindeuten [63]. Einen allgemeinen Hinweis auf das Auftreten von Komplikationen während der Schwangerschaft gibt die Bestimmung eines erhöhten PAPP-A und  $\beta$ -hCG Spiegels im mütterlichen Serum [94]. Neben der

Bestimmung von Blutparametern hat man versucht, das C-reaktive Protein, den Glukosespiegel und die Anzahl von Leukozyten aus der Amnionflüssigkeit im Rahmen einer Amniozentese in Beziehung zur Frühgeburtlichkeit zu setzen. Dabei fanden Tarim et.al. heraus, dass ein niedriger Glukosespiegel im Zusammenhang mit einer späteren Geburt vor der 37. SSW steht [123].

### **1.2.2 Dopplersonographie der A. umbilicalis**

Viele Versuche zur Entwicklung und Etablierung eines Screening-Verfahrens für die Präeklampsie sind an nicht reproduzierbaren Ergebnissen, nicht genügender Signifikanz oder an der fehlenden Möglichkeit der Früherkennung der Erkrankung gescheitert. Roll-over Tests mit Blutdruckmessung und Angiotensin-II Bestimmungen, Nachweise erhöhter thrombozytärer AT-II-Bindungsstellen, sowie erhöhtes humanes Choriongonadotropin im 2. Trimenon, verminderte Kallikreinexkretion oder verminderte Kalziumausscheidung im Urin zeigten sich zwar teilweise als statistisch relevant, aber zu keinem Zeitpunkt effektiv genug, um als Screeningmethode etabliert werden zu können. Den betroffenen Patientinnen kann derzeit nur durch die Dopplersonographie als diagnostische Maßnahme und Screening-Methode geholfen werden. Eine Veränderung in den dopplersonographischen messbaren Flussgeschwindigkeiten muss aber nicht zwingend vorliegen, ein normaler Befund schließt eine Präeklampsie nicht aus. Findet man Abnormalitäten, so sind diese meist in der utero-plazentaren Strombahn zu finden und mit konsekutiver Hypoxie der fetalen Anteile der Plazenta assoziiert. Charakteristikum hierfür ist die postsystolische Inzisur der Hüllkurve der A. uterina. Die Dopplersonographie der A. umbilicalis kann 50% der Frauen identifizieren, die im weiteren Verlauf der Schwangerschaft eine Präeklampsie mit eventueller Wachstumsretardierung des Feten entwickeln. Keine andere Methode weist einen ebenso hohen Vorhersagewert auf [100].

### **1.2.3 Analyse fetaler Zellen**

Eine noch nicht in der Praxis etablierte weitere Methode zur pränatalen Diagnostik beinhaltet die Isolierung fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut. Hierbei werden vor allem die kindlichen Erythrozyten der PCA oder FISH-Technik zugeführt. Noch ergeben sich aber durch die zu geringen Mengen an genetischen Material und der Verunreinigung durch mütterliche Zellen Schwierigkeiten bei der Verwertbarkeit der Ergebnisse. Die potentielle wenig invasive Möglichkeit zum Zugang kindlichen Materials ist aber viel versprechend [118] [81].

### **1.2.4 Präimplantationsdiagnostik**

Neben der pränatalen Diagnostik ermöglicht auch die Präimplantationsdiagnostik seit ca. 15 Jahren [39] im Rahmen von in-vitro Fertilisationen eine Vorhersage über den kindlichen Chromosomensatz und genetische Voraussetzungen des sich noch nicht im mütterlichen Leib befindlichen Kindes. Dabei werden im 8 Zell-Stadium zwei Zellen entnommen und z.B. der Fluoreszenz in situ Hybridisierung zugeführt. Somit können schon vor dem Einsetzen des Embryos genetische Erkrankungen diagnostiziert und das Geschlecht des Kindes bestimmt werden. Diese Methodik ist allerdings mit starken ethischen Bedenken belastet [57] [124] und in Deutschland derzeit verboten.

Trotz der Fülle an pränataldiagnostischen Möglichkeiten ist eine zuverlässige Vorhersage vieler Erkrankungen und Schwangerschaftskomplikationen, wie z.B. der fetalen Wachstumsretardierung oder der Frühgeburtlichkeit, immer noch nicht möglich. Somit besteht auch nach Jahren der Forschung im Bereich der pränatalen Diagnostik noch immer Bedarf nach neueren und besseren Methoden.

### **1.2.5 Chorionzottenbiopsie**

#### **Zeitlicher Verlauf**

1968 wurde erstmals die Technik der Chorionzottenbiopsie (CVS) zur pränatalen Diagnostik durch zytogenetische Testung von Hahnemann und Mohr vorgestellt [82]. Schnell war nicht mehr nur die zytogenetische Testung der Zellen möglich, sondern es bestand, durch die Gewinnung und Diagnostik von DNA aus den Chorionzotten, auch die Möglichkeit, schon im ersten Trimenon monogenetische Erkrankungen nachzuweisen. Dadurch gewann die CVS enorm an Popularität, was sich in der Anzahl der ausgeführten Chorionzottenbiopsien niederschlug. Als in den 90er Jahren von einigen Autoren angenommen wurde, dass fetale Körperglieddefekte (siehe unten) durch die Zottenbiopsie hervorgerufen würden, verlor sie kurzzeitig an Bedeutung [21]. Nachfolgende Studien konnten aber keine Zusammenhänge zwischen der CVS und limb defects herstellen, wenn die Punktion nach der 9. SSW vollzogen wird (siehe unten) [95] [33].

Heute können immer mehr genetisch determinierte Krankheiten durch die CVS frühzeitig und sicher diagnostiziert werden [84]. Voraussetzung für eine erfolgreiche Durchführung ist die Kenntnis über alle diagnostizierbaren genetischen Erkrankungen und die sich ständig verbessernden Labormethoden [72].

Da die Amniozentese nicht gleichwertige qualitative Ergebnisse erzielen kann, wenn Testung durch DNA Gewinnung im Vordergrund steht [95], gilt die Chorionzottenbiopsie heute weltweit als Methode der ersten Wahl zur Chromosomenanalyse bei Chromosomenanomalien und anderen genetischen Erkrankungen.

### **Indikationen**

Eine CVS bieten sich immer dann an, wenn nach einer zytogenetischen- oder einer molekulargenetischen Untersuchung des Feten oder nach einer Enzymdiagnostik gefragt ist. Dies ist vor allem bei fortgeschrittenem Alter der Mutter oder sonographischen Auffälligkeiten der Fall [112]. Aber auch bei Wunsch der Eltern, v.a. bei positiver Familienanamnese und bei Unregelmäßigkeiten der biochemischen Marker im Blutbild der Mutter [95], z. B. Triple Test, kann die Indikation zur CVS gestellt werden. Da die CVS aber eine invasive Diagnostik nötig macht, ersetzt heute z.B. das sonographisch durchführbare Nackentransparenz-Screening zunehmend die invasiven Diagnostiken. Hierdurch reduziert sich, nach unseren Erfahrungen, die Anzahl der Chorionzottenbiopsien zum Teil um bis zu 40%.

### **Chorionzottenbiopsie vs. Amniozentese**

Pränatale Diagnostik ermöglicht z.B. eine optimale Planung einer eventuell post partum notwendigen Intervention. Auch über eine schon intrauterin durchführbare Therapie kann nachgedacht werden (z.B. Stammzelltransplantation), wenn der Karyotyp des Kindes bekannt ist [112]. Durch die Chorionzottenbiopsie hat sich, im Gegensatz zur Amniozentese, die Möglichkeit eröffnet, auch das erste Trimenon der Schwangerschaft, der Medizin und Wissenschaft zugänglich zumachen, da sie schon ab der 11. SSW verlässlich durchgeführt werden kann [73]. Die pränatale Diagnostik im ersten Trimenon wird von den meisten Frauen gegenüber dem Screening im zweiten Trimenon bevorzugt [115], denn sie kann Vorteile bieten, die vor allem für Eltern aus Risikogruppen interessant sind, da sich der emotionale Stress durch Warten auf das zweite Trimenon reduziert, oder aber frühzeitige Schwangerschaftsabbrüche durch negative Ergebnisse reduziert bzw. verhindert werden [16] [33]. Eine verlässliche Amniozentese wird zwischen der 16. und 20. SSW [95], nach anderen Angaben zwischen der 15. und 17. SSW durchgeführt [17]. Dies ist ein Zeitpunkt, zu dem die Mutter schon Bewegungen ihres Kindes spürt und ein Abbruch der Schwangerschaft emotional belastender ist [95]. Darüber hinaus sind die sozialen Konsequenzen, nach Abbruch einer sichtbaren Schwangerschaft, nicht zu unterschätzen [17]. Die lange Wartezeit [112] von ca. 1 bis 3 Wochen auf ein Ergebnis nach Amniozentese, stellte

bis vor einiger Zeit eine zusätzliche Belastung dar, wobei sich dieses Problem durch die heute angewendete FISH und PCR-Diagnostik (innerhalb von 24-48h möglich) gelöst zu haben scheint (Steinhard für PCR) [96] und ein Ergebnis ähnlich zeitnah wie nach einer CVS mitgeteilt werden. Die Zellen des Zytotrophoblasten, die durch die CVS entnommen werden, können entweder direkt oder nach einer kurzen, 24 bis 48 h dauernden Kultur (im Rahmen der FISH oder PCR), befundet werden. Nach spätestens zwei Tagen kann somit material- und zeitsparend schon in frühen Schwangerschaftswochen eine Diagnose gestellt werden [17] [95].

Die Chorionzottenbiopsie ist allerdings kein Verfahren, das auf frühe Schwangerschaftswochen beschränkt bleiben müsste; auch bei Indikationsstellung im 2. oder 3. Trimenon einer Schwangerschaft kann auch auf die Chorionzottenbiopsie zurückgegriffen werden. Dies zeigen die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen. [59] [91].

### **Limb defects**

Wie oben bereits erwähnt, kam es in den 90er Jahren zu einem Rückgang der Popularität der CVS, da kindliche Gliedmaßendefekte auf die Durchführung einer Chorionzottenbiopsie zurückgeführt wurden. Auch heute lassen sich teratogene Folgen durch eine Chorionzottenbiopsie nicht gänzlich auszuschließen, v.a. wenn sie vor der 10. SSW vollzogen wird. Störungen der Gliedmaßenentwicklung sind in der Literatur beschrieben. Fast alle Studien, die dieses Problem schildern, zeichnen sich aber durch mangelhafte Erfahrung der Operateure, mangelnde technische Ausstattung, Durchführung der Chorionzottenbiopsie noch vor der 9. SSW und kleine Kollektivzahlen aus [73] [33]. Daher ist es eher wahrscheinlich, dass große plazentare Traumen durch Gefäßverletzung zu Gewebshypoxie geführt und damit dem Embryo geschadet haben [17] [137]. Embolisation durch Chorionzottenmaterial in der fetalen Blutzirkulation könnte ebenfalls der Grund für die Störung sein [73], sowie die Punktion der Amnionhöhle, welche aber durch gute sonographische Kontrolle vermieden werden kann [87]. Andere Studien, mit größeren Kollektiven, haben keinen Zusammenhang zwischen der fetalen Gliedmaßenentwicklungsstörung und der Chorionzottenbiopsie feststellen können [73] [72]. Ebenso ergab die Analyse von 138.000 Fällen nach Chorionzottenbiopsie durch die WHO keinen Zusammenhang zwischen der Chorionzottenbiopsie und fetaler Malformation [17]. Heute wird die frühe Chorionzottenbiopsie vor der 10. Woche als Risiko für die Limb-defects angesehen, so dass bei einer CVS nach der 11. SSW von keinem erhöhten Risiko für fetale Körpergliedmaßendefekte mehr auszugehen ist [73].

**Zeitpunkt der Durchführung**

Um der Gefahr der limb defects Rechnung zu tragen wird die Chorionzottenbiopsie heute nach allgemeiner Lehrmeinung nach der 8. [72] bis 9. vollendeten Schwangerschaftswoche p.c. durchgeführt, wenn die empfindlichste Phase der Gliedmaßenentwicklung abgeschlossen ist [95]. Darüberhinaus zeigen aber technische Probleme der Materialaufbearbeitung der Methode zu sehr frühen Schwangerschaftszeitpunkten Grenzen auf, da die Plazenta vor der 9. Woche noch relativ wenig Material bietet. Für bestimmte Tests, v.a. DANN-Diagnostik wie z.B. für die Diagnose der Zystischen Fibrose, benötigt man derzeit noch mindestens 20-40 mg plazentares Gewebe [65], so dass die große Mehrheit der Chorionzottenbiopsien zwischen der 11. und 12. SSW durchgeführt wird [95].

**Risiken**

Allgemein lässt sich aus der Literatur eruieren, dass Frühgeburten oder gar Todgeburten bei Schwangerschaften nach CVS nicht häufiger als in der Kontrollgruppe auftreten [95]. Das durchschnittliche Risiko liegt zwischen 2% bis 3% [72], wobei dies je nach Erfahrung einer Klinik variiert [73].

Bevor die Chorionzottenbiopsie in der pränatalen Diagnostik etabliert wurde, war die Amniozentese für ca. zwei Jahrzehnte das bewährte Verfahren, um Informationen über die genetischen Voraussetzungen des Embryos zu erlangen. Da diese Methode altbewährt, geprüft und relativ leicht durchführbar ist [17], wird sie heute in Studien herangezogen, um einen Vergleich zu neueren Methoden [95], wie der Chorionzottenbiopsie, herzustellen. In der Literatur gilt allgemein, dass das Risiko bei Amniozentese, transzervikaler und transabdominaler Chorionzottenbiopsie in etwa gleich hoch ist [95] [3], solange erfahrene Operateure die Zellgewinnung durchführen [17]. Das Risiko der zu erwartenden Komplikationen ist bei der Chorionzottenbiopsie allerdings etwas höher einzustufen als bei der Amniozentese, nach den Angaben einer europäischen Multizenterstudie um 4,4%, wobei die Erfahrung der an der Studie teilnehmenden Operateure jedoch gering war. Das Risiko eines spontanen Abortes liegt bei transzervikal durchgeführter Chorionzottenbiopsie höher als nach transabdominaler CVS oder nach Amniozentese, deren Risiko von einigen Autoren als gleich hoch bei 1% beziffert wird [95] [73] [2]. Eine dänische Studie fand bei transabdominaler Chorionzottenbiopsie sogar ein geringeres Risiko für einen spontanen Abort als nach Amniozentese [113].

Zusammenfassend gilt, dass die Chorionzottenbiopsie im ersten Trimenon ähnlich risikoarm ist, wie die Amniozentese im zweiten Trimenon [72] und zu beachten bleibt, dass einem angegebenen höheren Eingriffsrisiko für die Chorionzottenbiopsie, auch

das natürliche Abortrisiko enthalten ist, welches nach dem Eingriff nicht mehr ursächlich vom alleinigen Eingriffsrisiko zu trennen ist und, je nach Schwangerschaftsalter, zwischen 2 - 4% beträgt, mit einem höheren Risiko in früheren Schwangerschaftswochen. Trotzdem hat sie sich nach nunmehr über 10 jähriger Erfahrung nicht im gleichen Ausmaß außerhalb der Zentren etablieren können wie die Amniozentese [78].

Um das geringe Risiko und den großen Erfahrungsschatz der Amniozentese mit den Vorteilen einer Chorionzottenbiopsie im ersten Trimenon zu vereinen, hat man versucht, eine Amniozentese im ersten Trimenon zu etablieren. Eine Studie hat die frühe Amniozentese mit der Chorionzottenbiopsie verglichen: Die Rate der erfolgreichen Probengewinnung war in beiden Fällen gleich groß, wobei die Rate der erfolgreich daraufhin durchgeführten Zellkulturen bei der frühen Amniozentese signifikant niedriger war. Die Rate des spontanen Abortes, und Extremitätenfehlstellungen, wie Klumpfüße des Feten, waren nach früher Amniozentese signifikant höher [72]. Alle anderen untersuchten Endpunkte, wie durchschnittliche Schwangerschaftsdauer oder Geburtsgewicht bei Entbindung, ergaben keine signifikanten Differenzen. Das erhöhte Risiko eines Schwangerschaftsabbruchs nach früher Amniozentese (ca. 2 - 3%) kann letztendlich nicht zu einer dauerhaften Etablierung dieses Verfahrens führen [17].

### **Reaktionen des Feten auf die Chorionzottenbiopsie**

Verschiedene Autoren haben Untersuchungen zu fetalen Reaktionen nach einer CVS publiziert. Die Hämodynamik des Feten verändert sich, v.a. durch die sinkende oder steigende Herzfrequenz [137]. Durch das plazentare Trauma kann es zum Blutaustausch zwischen Mutter und Kind kommen, auch Hämatome und Hämorrhagien sind beobachtet worden, wobei ihr Ausmaß abhängig ist von der Nadelgröße und der Anzahl der entnommenen Biopsien. Da jedes Hämatom mit einem fetalen Blutverlust einhergeht, der bei einem Blutvolumen von 2.7 – 4 ml in der 12. SSW, von enormer Bedeutung sein kann, müssen Hämatome der Plazenta in jedem Fall vermieden werden [95].

Die fetalen Bewegungen hingegen bleiben nach Boogert et al. von einer CVS vollkommen unbeeinflusst [14].

### **Methodik**

In der Literatur sind mehr als 10 verschiedene Techniken zur Gewinnung von Chorionzotten beschrieben. Grundsätzlich sind dabei zwei Zugangswege zu

unterscheiden: transzervikal und transabdominal [15]. Beide Methoden werden unter sonographischer Kontrolle durchgeführt [95].

Die Entscheidung welche der beiden Techniken gewählt wird, hängt von verschiedenen Faktoren ab. In erster Linie entscheidet die Lokalisation der Plazenta. Liegt die Plazenta tief und hinten, wählt man die transzervikale Methode, liegt sie allerdings hoch und vorne, sollte die transabdominal Technik vorgezogen werden. Die Position der Plazenta kann zu einem gewissen Grad auch durch die Blasenfüllung positiv beeinflusst werden. Desweiteren spielt der Winkel zwischen Zervix und Uterus eine Rolle, da bei zu spitzem Winkel der transzervikal eingeführte Katheter eventuell nicht richtig manövriert werden kann. Bei Erstgebärenden kann der Zervixkanal zu eng für eine Katheterpassage sein. Sind bei Zwillingsschwangerschaften die beiden Plazenten klar voneinander abzugrenzen, ist eine Chorionzottenbiopsie grundsätzlich durchführbar. Ein kombinierter Eingriff kann dann nötig sein [15]. Stellen sich genitale Warzen, eine Infektion mit genitalem Herpes simplex oder Gruppe B Streptokokken dar, muss das Risiko der Keimverschleppung in den Uterus individuell geprüft werden. Grundsätzlich sei in diesen Fällen die Amniozentese oder die transabdominale Chorionzottenbiopsie der transzervikalen Methode vorzuziehen. Sollte trotzdem die transzervikale CVS zum Einsatz kommen, wird zu einer Ampicillintherapie vor der Biopsie geraten. Von vielen Frauen wird die transzervikale Methode aufgrund der einfacheren Durchführbarkeit und des höheren Komforts bevorzugt [65].

### **1.3 Syndecan-1**

Syndecan ist ein Proteoglykan der Zelloberfläche. Moleküle der Zelloberfläche sind essentiell, um die Interaktion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (EZM) zu gewährleisten und sind dadurch für ein geordnetes Zellverhalten unabkömmlich [107].

In der Fachliteratur haben sich verschiedene Autoren mit der Struktur, dem Aufbau und der Funktion des Syndecanmoleküls beschäftigt. Zusammenfassend gilt: Das Syndecanmolekül besteht aus einer extrazellulären Domäne, einer transmembranösen und einer zyttoplasmatischen Domäne. Über die extrazelluläre Domäne werden verschiedene Komponenten der EZM sowie Wachstumsfaktoren gebunden. Über diese Bindungen spielt Syndecan eine Rolle bei der Regulation mannigfaltiger Phänomene wie Zellkontakte, Erhalt der Morphologie und Stabilität von Zellverbänden, Differenzierung, Proliferation, Migration, Regeneration und der embryonalen Entwicklung [102] [31] [13] [105] [43] [46] [32] [67] [79] [106] [68] [8] [9].

Der genaue Ablauf der Regulationsmechanismen ist heute noch unbekannt. Darüberhinaus werden noch viele weitere Funktionen der Syndecanfamilie vermutet, die aber noch nicht erforscht sind [42].

#### **1.3.1 Syndecan-1 – ein Proteoglykan**

##### **Familie der Syndecane**

Die Familie der Syndecane gehört zu den Proteoglykanen. Der Begriff Syndecan stammt von dem griechischen Wort „syndein“ was soviel bedeutet wie „zusammenbinden“ [107]. Die Syndecane sind Zelloberflächenproteine [68] [9], die durch Vesikelfusion mit der Membran ihre Position dort einnehmen und diese durch Endozytose oder Abstoßung in den perizellulären Raum wieder verlieren. Syndecane stehen als Oberflächenmoleküle in engem Kontakt mit der EZM, einem unlöslichen Amalgam aus multiplen großen multidomänen Proteinen.

Bis heute sind vier verschiedene Syndecane in Säugetieren bekannt, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung von eins bis vier nummeriert wurden. Größe, Glykosaminoglykanbindungsstellen und die Proteinsequenz indizieren eine enge strukturelle Verwandtschaft zwischen Syndecan-1 und 3, sowie zwischen Syndecan 2 und 4 [13] [31].

Die vier Syndecane unterscheiden sich nicht nur durch ihr Auftreten in verschiedenen Geweben, sondern auch durch den Aufbau ihrer extrazellulären Domäne, wobei Länge, Größe, Ladung und Glykosylierung variieren können [107]. Ein molekularer

Vergleich der vier Syndecane untereinander, aber auch Vergleiche von Syndecan-1 Molekülen von Mäusen, Hamster, Ratten und Menschen zeigen, dass die zytoplasmatischen und transmembranösen Domänen bis auf eine zentrale Region innerhalb der Domänen hoch homolog sind. Dies weist darauf hin, dass diese für die Funktion der Syndecane unabkömmlich sind [79]. Deutliche Unterschiede zeigen sich beim Vergleich der extrazellulären Domänen [31]. Bis auf feine Sequenzen um die Bindungsstellen der Glykosaminoglykane und eine Stelle, die vermutlich eine Protease beinhaltet, sind die extrazellulären Domänen sehr different. Die extrazellulären Domänen von Sydecan 1 der Maus und des Menschen sind nur zu 70% identisch [79]. Diese Unterschiede sind für die unterschiedlichen Funktionen der Syndecane verantwortlich [107], wohingegen die homologen Anteile der extrazellulären Domänen ebenfalls funktionell wichtig zu sein scheinen [13].

Syndecan 2 findet man überwiegend auf Fibroblasten und Hepatozyten. Syndecan 3 ist das größte der Syndecanmoleküle und wird vor allem auf neuronalen Zellen exprimiert, weshalb man es auch N-Syndecan nennt. Außerdem ist es im Muskelgewebe präsent. Syndecan 4 ist das kleinste, aber am meisten verbreitete Syndecanmolekül. Es findet sich auf Epithel, Endothel, Fibroblasten, Muskelzellen, neuronalen Zellen und Chondrozyten [31]. Das meist studierte und bekannteste Syndecan ist das Syndecan-1 [13]. Es wurde zuerst aus epithelialen Brustzellen der Maus isoliert [79].

### **Aufbau von Syndecan-1**

Das Syndecan-1 Gen liegt auf dem humanen Chromosom 2p23 und ist 310 bzw. 311 Aminosäuren lang mit einem Molekulargewicht von 32,868 D. Als Mitglied der integralen Membranproteine besteht es aus drei Domänen: [13] [31] [107] [79].

Die extrazelluläre Domäne, Ektodomäne, enthält Heparansulfat und Chondroitinsulfat [102] [43] [32] [44], wodurch sich Syndecan als ein Hybrid-Proteoglykan klassifiziert [106]. Die transmembranöse Domäne ist 25 Aminosäuren lang [79] und lipophil. Über diese Domäne kann sich das Protein in der Ebene der Membran bewegen. Die zytoplasmatische Domäne besteht aus 34 Aminosäuren. Aufgrund ihrer evolutionären Stabilität ist es vermutlich nicht falsch, sie in funktionelle Verbindung mit ebenfalls evolutionär stabilen Komponenten, wie dem Zytoskelett (z.B. Aktin) oder regulatorischen Proteinen (z.B. Calmodulin) zu setzen [13] [79] [107].

**Heparansulfat / Chondroitinsulfat**

Glykosaminoglykane bestehen aus repetitiven Dissachariden, welche zu unterschiedlichen Graden sulfatiert sind [102]. Heparansulfat ist das Glykosaminoglykan mit der größten strukturellen Variabilität und ist seit 1971 als Zelloberflächenmolekül bekannt. Kraemer zeigte es damals auf mehreren kontaktierenden Zelltypen in Kultur. Zusammen mit Heparin ist es eines der am meisten negativ geladenen Moleküle, die von Vertebraten gebildet werden können. Intrazelluläres Heparansulfat wird in Vesikeln gelagert, extrazellulär findet man es in der Matrix und an Basalmembranen, an der Zelloberfläche wiederum ist es ein Bestandteil der integralen Membranproteine [13]. Die Heparansulfatkette bindet das Syndecan an seine Liganden. Die genaue Funktion der Chondroitinsulfatkette ist bis heute noch nicht bekannt [31], man vermutet aber, dass sie das Bindungsverhalten beeinflussen könnte [43].

**Glykosylierung**

Syndecan-1 kommt in verschiedenen Geweben vor. Durch die postranskriptionale zell- und gewebetypische Glykosylierung [31] [68] entstehen polymorphe Formen von Syndecan-1, die sich in der Anzahl und der Größe der Glykosaminoglykanketten, in der Lokalisation auf der Zelloberfläche und Unterschiede im Bindungsverhalten unterscheiden [106] [44]. Welcher Mechanismus für die Regulation der Größe, Anzahl, und Feinstruktur des bindenden Glykosaminoglykans verantwortlich ist, ist bis heute noch unverstanden [13].

Fünf verschiedene Stellen stehen zur Anheftung von Glykosaminoglykanen an den Positionen 37, 45, 47, 206 und 216 der Proteinsequenz der extrazellulären Domäne zur Verfügung [79]. In der Mehrzahl der Fälle ist die extrazelluläre Domäne mit drei distal gelegenen Heparansulfatketten und zwei proximal gelegenen Chondroitinsulfatketten substituiert, wobei deren Kettenlängen variieren können [31]. Heparansulfat und Chondroitinsulfat binden kovalent [67] [43] [46] [106] über eine Xylo-Seite [107] an eine Hydroxylgruppe eines Serin-Restes des Proteins. Die Bindungsstelle des Glykosaminoglykans mag durch eine spezifische Zuckersequenz gekennzeichnet sein, eine allgemein geltende Sequenz ist bis heute aber nicht gefunden. Alternativ könnten diese Bindungen auch ladungsabhängig sein [13] [102].

### 1.3.2 Bindungsverhalten

#### Was bindet Syndecan

Syndecan bindet in seiner Position an der Zelloberfläche über das Heparansulfat der extrazellulären Domäne [79] [102] an eine große Variation von Molekülen, v.a. solche der EZM [13] [31] [107] [67] [68] [32].

Es fungiert dabei als Rezeptor sowohl für lösliche als auch für nicht lösliche Moleküle [8] [10]. Es bindet selektiv an fibrilläres Kollagen Typ I, III und V [79] [107] [31] [13] [106] [105], an Thrombospondin [32] [79] [107] [31] [13] [105] [46], an die heparinbindenden Domänen von Fibronectin [46] [43] [107] [106] [31], an Antithrombin III [68] [31], an Tenascin [8] [31] [13] [105] und an Wachstumsfaktoren [32] [10] [68] [107] [13] [46], z.B. an den hepatocytic growth factor (HGF), den fibroblastic growth factor (FGF-2) [107] [31] [8] sowie an den heparin-binding-growth factor [42] [9]. Zu Proteinase-Inhibitoren [31] und Lipoprotein-Lipase kann ebenfalls eine Bindung erfolgen [107]. Keine Bindung erfolgt zu Typ IV Kollagen, Vitronectin, oder Laminin. [32] [106]

#### Wie bindet Syndecan

Es ist zu vermuten, dass die strukturelle Spezifität, das Ausmaß und die Positionen der Sulfatierung, sowie die Epimerisation von glucuronic acid zu iduronic acid der Heparansulfatkette keine Zufälle sind und spezifische Sequenzen der Heparansulfatkette die Liganden binden. Die Heparansulfatketten von Syndecan verschiedener Zelllinien können Variabilitäten in ihren 6-O- Sulfatierungen zeigen, was z.B. zu einem unterschiedlichen Bindungsverhalten zu Typ I Kollagen führt [31].

Bis heute ist es nicht bekannt, ob auch bei den Liganden spezifische Proteinsequenzen zur Bindung notwendig sind [107]. Die Bindungen scheinen in jedem Falle ladungsabhängig zu sein, da die Höhe der Bindungsaffinität primär vom Grad der Sulfatierung [102] und damit der hoch anionischen Sulfatgruppen [13], der Heparansulfatkette, abhängt. Je höher die Sulfatierung, desto besser wird z.B. Fibronectin gebunden [102]. Neben der Sulfatierung spielen aber auch die Bindungssequenz und die Morphologie der beteiligten Moleküle eine Rolle bei der Bindungsfestigkeit. Die Art der Bindung muss hier aber nicht zwingenderweise die Bindungsaffinität reflektieren. Unterschiede in der Sequenz oder Morphologie führen z.B. bei der Bindung von Antithrombin III oder Fibronectin zu keiner Änderung der Affinität von ca. 1nM [13]. Des Weiteren wird das Bindungsverhalten durch die Größe des Glykosaminoglykans und/oder durch die Anzahl der gebundenen Glykosaminoglykane am Syndecanmolekül

beeinflusst. Große Glykosaminoglykane können stärker z.B. an Fibronectin binden. Man vermutet, dass dieses eine Glykosaminoglykanmolekül multiple Interaktionen mit vielleicht nur einem Liganden eingehen kann [102]. Ein Syndecanmolekül kann mehrere Heparansulfatketten enthalten, wodurch die Möglichkeit besteht, dass ein Syndecanmolekül gleichzeitig mehrere EZM-Komponenten binden kann. Diese Bindungen scheinen ebenfalls von besonders hoher Affinität zu sein [107].

Alle Bindungen des Heparansulfats zu seinen Liganden sind unabhängig von Calcium- und Magnesium-Ionen und alle Bindungen können durch die Einwirkung von Trypsin zerstört werden [13].

### **Syndecan als Co-Rezeptor**

Syndecan fungiert als Co-Rezeptor für den fibroblast growth factor [67]. FGF2 scheint das Heparansulfat oder Heparin zu benötigen, um die Möglichkeit zu haben, an einen Hoch-Affinitäts-Rezeptor zu binden. Die Bindung von FGF2 an das Heparansulfat führt somit zu einer Erhöhung der biologischen Aktivität des Wachstumsfaktors. Darüber hinaus wurde aber auch auf dem Heparansulfat selbst eine Sequenz entdeckt, die eine hohe Affinität zu FGF2 aufweist. Bindet FGF2 an diese Sequenz und wird es daraufhin internalisiert, so erreicht es aber ein anderes intrazelluläres Kompartiment als nach Präsentation an den FGF-Hoch-Affinitäts-Rezeptor.

Heparansulfat könnte auch im Zusammenhang mit Viren als Co-Rezeptor fungieren. Es ist allerdings nicht geklärt ob beim viralen Eintritt in die Zelle noch ein weiterer Rezeptor nötig ist.

Der Einsatz von Heparansulfat als Co-Rezeptoren ermöglicht einer kleineren Anzahl von Rezeptoren ein größeres Repertoire an Regulation, z.B. kann Heparansulfat durch die Bindung seiner Liganden, deren Konzentration an einer Stelle erhöhen, sie vor Abbau schützen oder durch Konformationsänderung die biologische Aktivität verändern [31] [13].

### **Lösung / Verhinderung der Bindungen von Syndecan**

Die Zellen, die durch Syndecan-1 z. B. an die EZM gebunden sind, können sich aus dieser Verbindung lösen, indem sie durch eine Protease-verdächtige Stelle an der transmembranösen Domäne [13] die extrazelluläre Domäne abspalten und sich damit von der EZM trennen [79] [46]. Dieser Mechanismus ist einzigartig [107], bisher nur aus der Zellkultur bekannt [13] und geschieht v. a., wenn die Zellen ihre Morphologie verändern [106]. Andererseits können lösliche Proteoglykane, wie Syndecan-1, Zellkontakt verhindern. Es ist z. B. möglich, die Bindungsstelle des Fibronectin am Glykosaminoglykan eines anderen Proteoglykans zu besetzen oder aber die Bindung

von Fibronectin an ein Integrin zu verhindern, indem es an der dortigen Bindungsstelle ein sterisches Hindernis darstellt [102].

### **1.3.3 Expression**

#### **Orte der Expression**

Syndecan-1 wird vor allem auf epithelialem Gewebe exprimiert, z. B. stratified squamous Epithel [10]. Bei einfachem Epithel findet man Syndecan basolateral lokalisiert, bei stratified squamous Epithel sind die Zellen ganz mit Syndecan umgeben. Neurale Zellen, Leydig-Zellen, die B-Zellreihe [13] [107], Plasmazellen [8], Keratinozyten [9], Gehirngewebe [79] sowie plazentare Zellen [68] exprimieren Syndecan auf ihrer Zelloberfläche. Keine Expression findet man auf mononukleären Zellen, Lymphozyten und endometrialen Stromazellen [9].

#### **Suppression und Induktion der Expression**

Die Expression von Syndecan-1 verändert sich, sobald ein Syndecan-1 exprimierendes Gewebe nicht mehr stabil ist [10], z.B. während der embryonalen Entwicklung oder nach Verletzung. Die Regulationsmechanismen, welche die Syndecanexpression steuern, sind aber noch nicht eindeutig geklärt [31]. Bestimmte Bestandteile der EZM könnten die Expression von Syndecan fördern. Interessanterweise besteht die EZM heilender Wunden v.a. aus Komponenten, die von Syndecan-1 gebunden werden, wie Fibronectin, Typ 5 Kollagen und Tenascin. Typ 4 Kollagen und Laminin können nicht von Syndecan erkannt werden und befinden sich nicht in der EZM heilender Wunden [44].

Auch für das Wundflüssigkeitspeptid PR-39 ist eine regulatorische Komponente für die Syndecan-1 Expression beschrieben worden [31]. Wachstumsfaktoren könnten ebenfalls die vermehrte Expression von Syndecan fördern [44] oder zumindest einen Anteil an der Regulation ihrer Expression haben. Dies gilt für den TGF $\beta$  und den FGF2. Die meisten Änderungen der Syndecanexpression während der embryonalen Entwicklung sollen auf das Einwirken von Wachstumsfaktoren zurückgehen.

Ein Experiment mit Epithelzellen der Brustdrüse hat einen Zusammenhang zwischen der Syndecanexpression und der Expression anderer Adhesionsmoleküle der Zelloberfläche hergestellt. Suppression von Syndecan führt konsekutiv zu einer Suppression der E-Cadherin Expression. Intergrine bleiben unverändert. Andere Autoren sind der Meinung, dass auch  $\beta$ 1 Integrin und das Zytoskelett von einer Syndecansuppression betroffen sind [13] [31]. Suppression der Syndecanexpression

findet vermutlich auch bei Apoptosen statt, z.B. bei ruhenden Haarfollikeln. Kontakte zur Matrix und zu anderen Zellen sowie die Einbindung von Wachstumsfaktoren werden nicht mehr benötigt und die Syndecanexpression nimmt ab [10].

### **1.3.4 Funktionen**

Syndecan-1 werden mehrere große Funktionsbereiche zugeordnet: Rezeptor für die EZM, Bindung von Wachstumsfaktoren [9], Regulation der Zell-Zell- [44] und der Zell-Matrix-Kontakte, Regulation von Migration und Proliferation [9], Differenzierung und Morphologie [10] sowie Stabilisation im Zellverband [107]. Syndecane können auch eine Rolle beim Eintritt viraler Bestandteile in Zellen spielen [31].

#### **Zellkontakte**

Syndecane scheinen eine Rolle bei Zellkontakten zu spielen [67] [44] [8] [9], da man auf allen Zellen, die in einer Form Zellkontakte unterhalten, Syndecan-1 nachweisen kann [107]. Gewebe, das morphologisch aktiv ist, zeigt regelmäßig eine fleckenförmige Expression von Syndecan. Auch Schwan - Zellen mit Syndecanexpression plätten sich und bilden Bündel von Mikrofilamenten aus, die in einem Zellkontakt terminieren. Syndecan und Bündel von Mikrofilamenten sind oft zusammen mit E-Cadherin und  $\beta 1$  Integrin an den Zellkontaktstellen lokalisiert. Es wäre also möglich, dass Syndecan-1 Teil eines größeren Komplexes ist, der die Zellkontakte aufrechterhält, ohne dabei selber zwingend an den den Zellkontakten beteiligt zu sein [13] [31]. Bei der Untersuchung der Syndecanexpression in Haarfollikeln hat man festgestellt, dass die Zellen, die der Basalmembran aufsitzen, zwar an den Kontaktstellen zu anderen Zellen positiv für Syndecan sind, nicht aber an der Kontaktseite zur Basalmembran [10]. Sobald Zellen ihren Kontakt zu anderen Zellen verloren haben, verlieren sie auch ihr Syndecan. Es wird erst bei Re-Kontakt erneut exprimiert [13].

#### **Proliferation und Migration**

Wird eine Verletzung der Epidermis hervorgerufen, so lässt sich einer erhöhte Expression von Syndecan in den migrierenden und proliferierenden Zellen in oder nahe der Wunde, im Vergleich zur Peripherie der Verletzung, finden. Man hat festgestellt, dass es sich um ein Kontinuum handelt mit dem die Syndecanexpression von der Peripherie zum Wundrand hin zunimmt. 24 Stunden nach Setzung der Wunde ist die Syndecanexpression stark erhöht und noch bis 14 Tage nach der Verletzung ist eine erhöhte Expression in Bezug zum Ausgangswert nachweisbar. Die stärkste Expression findet nach 3 bis 5 Tagen statt, wenn die meisten Keratinozyten

proliferieren und migrieren. Betrachtet man primär migrierende Zellen und primär proliferierende Zellen getrennt, so stellt man fest, dass wandernde Zellen wesentlich weniger Syndecan exprimieren als die proliferierenden Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass Syndecan-1 bei der Zellproliferation, der morphologischen Differenzierung und bei der Zellmigration eine Rolle spielt [32] [8, 9], wobei die Rolle bei der Zellmigration von untergeordneter Priorität zu sein scheint [44].

### **Differenzierung**

Eine Studie von Bayer-Garner befasst sich mit der Syndecan Expression in Haarfollikeln. Im Follikel des wachsenden Haares zeigt sich vermehrt Syndecan, im Verlauf des Zyklus zum ruhenden Haar nimmt die Syndecanexpression jedoch ab. Es wird vermutet, dass dies mit der Ausdifferenzierung der Keratinozyten zusammenhängt, wobei die Menge an Syndecanmolekülen bis zum Zeitpunkt der Ausdifferenzierung der Keratinozyten im Haarfollikel zunimmt. Die Größe des einzelnen Syndecanmoleküls nimmt in diesem Verlauf aber ab. Dieses Phänomen kann durch die verschiedenen Ansprüche der Zellen an ihre Umgebung, wie Zellkontakte, EZM und Wachstumsfaktoren im Prozess ihrer Differenzierung erklärt werden und zeigt sich auch bei der terminalen Differenzierung der Zellen des stratified squamous epithelia und bei sich selbsterneuernden Epithelien, wie der Vagina [10]. Ebenso verlieren B-Zellen nach ihrer Ausreifung und Entlassung in die Zirkulation ihr Syndecan-1. Sie exprimieren es erst wieder bei der Differenzierung zu Plasmazellen im lymphoidalen Gewebe. Bernfield et al sind der Ansicht, dass terminale Differenzierung sogar mit dem permanenten Verlust von Syndecan einhergeht [13].

Entartete Zellen verlieren oft ihr Syndecan. Sie können dann zwar noch proliferieren, sind aber nicht mehr in der Lage, einen differenzierten Phänotypen zu entwickeln [44].

### **Verlust von Syndecan und seine Folgen**

Syndecan-1 hat wichtige Aufgaben im Erhalt der epithelialen Morphologie bestimmter Gewebe. Unkontrollierter Verlust von Syndecan 1 kann daher zwar mit maligner Entartung einhergehen, ist aber auf der anderen Seite physiologischerweise kontrolliert zwingend erforderlich, um Differenzierung zu stoppen, Zellkontakte zu lösen und morphologische Zellveränderungen möglich zu machen, die durch Milieuveränderungen erforderlich werden [13]. Betrachtet man normale, das heißt, nicht entartete epitheliale Brustzellen ohne Syndecan, so kann man beobachten, wie diese ihren epithelialen Phänotypen nicht beibehalten, sondern mesenchymale Form und mesenchymales Verhalten annehmen [10].

Durch unkontrollierten Verlust von Syndecan-1 können sich Zellen ihrer Kontakte im Zellverband entledigen und sind an keinen Differenzierungsplan gebunden, was in der Ausbildung invasiver Neoplasien münden kann [44]. Wird von NMuMG Zellen von Mäusen Syndecan zu 55% entfernt, so wachsen diese Zellen als Inseln, haben die Zellen nur noch 10% ihres Syndecans, so wachsen sie einzeln als fusiforme Zellen, die sich teils überlappen, ohne ein morphologisch intaktes Gewebe zu bilden. Viele maligne entartete Zellen, wie z. B. neoplastische Maus Epidermis oder maligne entartete humane Keratinozyten, zeigen eine supprimierte Syndecan-1 Expressionsrate, wobei die Proliferationsfähigkeit bei gestörter Differenzierung erhalten bleibt [13] [40] [105]. Dies zeigt, dass Erhaltung der Morphologie in epithelialen Geweben, sowie Einschränkung von Neoplasieausbildung in den Funktionsbereich von Syndecan fallen [44].

### **Stabilisation im Zellverband**

Wenn die Ektodomäne an der Zelloberfläche einen Liganden gebunden hat, kann intrazellulär über die zytoplasmatische Domäne eine Verbindung zum Aktinzytosklett aufgenommen werden [107] [106]. Im Sedimentationsassay kann isoliertes Syndecan direkt und indirekt an F-Aktin binden [13]. Außerdem ist es in der Lage, die Organisation der Aktinfilamente zu fördern [102]. Syndecan stellt also eine Verbindung der EZM zum Zytosklett her und epitheliale Zellschichten werden stabilisiert [106]. Die Tatsache, dass ein Syndecanmolekül gleichzeitig mehrere Matrixkomponenten binden kann, könnte zu der hohen Bindungsaffinität von Syndecan zu fibrillärem Kollagen führen (3mal höher als die der Integrine). Dadurch kommt es ebenfalls zu einer Stabilisation der Zellverbindungen [107], wobei interessanterweise die extrazellulär gebundenen Liganden nach Verknüpfung der zytoplasmatischen Domäne mit dem Zytosklett resistent gegen nichtionische Detergenzien werden [31] und länger in ihrer Bindung verbleiben, was wiederum zu einer anhaltenden Stabilität führt [13].

### **Embryonale Entwicklung**

Tierstudien haben gezeigt, dass schon im Vierzellstadium Syndecan-1 gebildet wird [13], wobei die Expression während der embryonalen Entwicklung zeitlich und räumlich variiert [67] [44]. Wenn sich das Epithelium zurückbildet und Raum macht für migrierende mesenchymale Zellen, ist eine abnehmende Expression zu beobachten, während bei der Formation der Organe, also während der Proliferation und Differenzierung der mesenchymalen Zellen, die Expression zunimmt [10] [107]. Sobald die Differenzierung der mesenchymalen Zellen abgeschlossen ist, verliert sich das Syndecan-1 wieder, so dass die Syndecanexpression mesenchymaler Zellen während

der embryonalen Entwicklung morphologischen und nicht histologischen Grenzen folgt [105] [43].

### **Angiogenese**

Im heilenden Wundgebiet wird eine Syndecanexpression auch in Kapillaren beobachtet. Allerdings ist die Anfärbung der Kapillaren selektiv, einige sind angefärbt, andere nicht [44].

Die vermehrte Syndecanexpression in Haarfollikeln des wachsenden Haares wird teilweise auch darauf zurückgeführt, dass die Follikel der wachsenden Haare besser durchblutet sind und durch die Syndecan-positiven Kapillaren eine vermehrte Syndecanexpression resultieren kann [10].

### **Plazenta**

Die genaue Aufgabe des Syndecans in der Plazenta ist heute noch nicht bekannt [68]. Beschrieben wird eine fehlende Anfärbbarkeit auf Syndecan-1 von Zytotrophoblast und Stroma durch Jokimaa, bei streng apikale Expression von Syndecan-1 im Bereich des Synzyotrophoblasten, die Crescimanno als inhomogen beschreibt. [32] Diese streng apikale Lokalisation innerhalb einer Zelle ist bisher einzigartig. Aufgrund dieser Lokalisation und der Fähigkeit, Antithrombin III binden zu können, könnte Syndecan-1 eine Rolle bei der Antikoagulation im intervillösen Raum innehaben [67]. In einer Studie von Jokimaa et al. hat man normal verlaufende Schwangerschaften (Kontrollgruppe) mit solchen, verkompliziert durch Präeklampsie oder fetale Wachstumsverzögerung, verglichen. Bei den normalen Schwangerschaften gab es keinen Fall negativ für Syndecan oder mit nur sehr wenig Syndecan-1. In 14 von 30 Fällen mit Präeklampsie war kein oder nur sehr wenig Syndecan nachweisbar. Keinen Unterschied gab es allerdings zwischen den Präeklampsien mit und ohne Infarkt, womit Syndecan-1 wohl keine restriktive antikoagulatorische Funktion in der Plazenta innehat. In den Fällen mit kindlicher Wachstumsverzögerung gab es keine Unterschiede zum Normalverlauf, genauso wenig fand man einen Unterschied beim Vergleich verschiedener Schwangerschaftsalter.

Weitere Funktionen des Syndecan-1 innerhalb der Plazenta werden angenommen: Über die Interaktion mit dem basic fibroblastic growth factor (bFGF) könnte Syndecan eine Rolle bei der feto-maternalen Kommunikation spielen [68]. Für diese Annahme sprechen auch die sehr frühe embryonale Expression von Syndecan, sowie die apikale Lokalisation des Syndecanmoleküls, zur Ausführung von Rezeptoraktivitäten [67]. Außerdem ist bekannt, dass über Syndecan-1 Lipoproteine internalisiert werden können und Syndecan somit an der fetalen Ernährung beteiligt sein könnte [68]. Da die

Plazenta ein schnell wachsendes Organ darstellt, sind Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren für ihre korrekte Entwicklung unabkömmlich, so dass man, z. B. durch Bindung von Wachstumsfaktoren, wie FGF2, eine Rolle Syndecans beim Wachstum der plazentaren Villi oder der Differenzierung des Trophoblasten ableiten könnte [67] [32].

Alle Funktionen des Syndecan hängen auch in der Plazenta von der Glykosylierung des Syndecan-1 ab. Da sich die Glykosylierung des Syndecans in der Plazenta von der in anderen Geweben unterscheidet, sollte dies auch hinsichtlich neuer oder anderer Funktionen des Syndecans in der Plazenta bedacht werden. Western Blot Analysen haben gezeigt, dass außergewöhnlich wenig Isoformen in der Plazenta exprimiert werden, was wiederum auf die ungewöhnliche Glykosylierung hindeutet [67, 68].

### ***1.4 Fragestellung***

Da trotz der großen Menge an diagnostischen Möglichkeiten viele intrauterine Vorgänge mit kindlicher Beeinflussung und die Auswirkung mütterlicher Kofaktoren unverstanden und somit kaum vorherzusehen sind, ist das Interesse an neuen Methoden zur pränatalen Diagnostik noch immer groß. Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob durch eine frühe Chorionzottenbiopsie und Markierung des plazentaren Syndecans durch eine immunhistochemische Färbung ein Zusammenhang zu mütterlichen Faktoren hergestellt, bzw. eine Aussage über den Schwangerschaftsverlauf und das kindliche Outcome gemacht werden kann. Die Etablierung eines neuen pränataldiagnostischen Tests wäre damit möglich.

Besonderes Augenmerk soll in dieser Studie auf die erreichte Schwangerschaftsdauer, die kindliche Percentile und den kindlichen Ausgang bzw. Karyotypen gelegt werden, um somit eventuell durch eine frühe Chorionzottenbiopsie und immunhistochemische Färbung das Risiko einer Frühgeburtlichkeit, einer Wachstumsretardierung, bzw. eines ungünstigen Ausgang der Schwangerschaft oder eines auffälligen Karyotypes abschätzen zu können.

Des Weiteren sollen auch andere kindliche Erkrankungen und mütterliche (Risiko-) Faktoren in Korrelation zur Stärke der Syndecanexpression in der Plazenta gesetzt werden.

## 2 Material und Methoden

### ***2.1 Patientinnenkollektiv***

Das Kollektiv der Patientinnen, denen die Chorionzotten entnommen wurden, setzt sich aus Frauen zusammen, die aufgrund genetischer Vorbelastung, auffälliger sonographischer Befunde, wie einer erhöhten fetalen Nackentransparenz, hohem mütterlichen Alter oder dem eigenen Wunsch nach einer Biopsie und Abklärung des Karyotypen ihres ungeborenen Kindes in die pränataldiagnostische Abteilung der Universitätsklinik Münster kamen.

Im Studienzeitraum, vom 29.10.2001 bis zum 14.1.2004, wurden insgesamt 235 Chorionzottenbiopsien asserviert, von denen 203 zur Auswertung herangezogen wurden. 26 Biopsien konnten aufgrund zu schlechter Färbung, mangels genügend Chorionmaterials oder wegen fehlender Daten über die Mutter oder zum Schwangerschaftsverlauf bzw. –outcome für diese Studie nicht verwendet werden.

Die Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Durchführung der CVS zwischen 19 und 43 Jahren alt. Die Mehrzahl der Chorionzottenbiopsien wurde zwischen der 10. und 14. Schwangerschaftswoche durchgeführt, in 15 Fällen aber auch zu einem späteren Zeitpunkt (15. bis 36. SSW).

Im Rahmen dieser Studie wurde nur überschüssiges Material verwendet, welches nach der zytogenetischen oder molekularbiologischen Untersuchung nicht mehr benötigt wurde. Somit war kein weiterer invasiver Eingriff zum Erhalt des Chorionmaterials für diese Studie erforderlich, wodurch die Schwangerschaft nicht unnötig gefährdet wurde, der Patientin kein zusätzlicher Untersuchungsaufwand entstand und die Qualität der eigentlichen Untersuchung war zu keinem Zeitpunkt gefährdet war.

## ***2.2 Daten zu Patientinnen und Schwangerschaftsoutcome***

Die relevanten Informationen über die Schwangere wie Alter, Rauchverhalten, Alkoholkonsum, Größe, Normalgewicht, BMI, Entbindungszeitpunkt, Zeitpunkt der CVS und über das kindliche Outcome wie Geschlecht, Länge, Gewicht, Kopfumfang, sonographisch Femurlänge, Scheitel-Steiß-Länge, biparietaler Durchmesser, aber auch die Nackentransparenz sowie Karyotyp und Ausgang der Schwangerschaft wurden über die PIA-Fetal Database, View Point (GE Medical Systems Company) abgerufen und zu einer Datentabelle zusammengefasst.

Um vergleichbare Perzentilen der Kinder zu erhalten, errechneten wir, mit Hilfe des Centile Calculator des Perinatal Institutes (UK), ein an das mütterliche Gewicht und an das Schwangerschaftsalter am Entbindungstermin adaptiertes Geburtsgewicht. Für die Berechnung bezeichneten wir unser gesamtes Patientinnenkollektiv als europäisch für die ethnische Gruppe und als Erstgebärende in der Parität (=0). Für alle anderen Eingaben nutzen wir die Daten, die wir aus der PIA-Fetal Database gewonnen hatten. Der Centile Calculator bezieht sich als Referenzgruppe auf Daten von United Kingdom (Notts) mit einer Kollektivgröße von 40.000.

### **2.3 Materialgewinnung – Chorionzottenbiopsie**

Nach Aufklärung der Patientin und sonographischer Untersuchung des Kindes, einschließlich Lokalisation der Plazenta, Bestimmung der Nackentransparenz und Organscreening, wurde die Frage des Zugangsweges (transzervikal oder transabdominal) geklärt. Hierbei spielte neben Infekten der Vagina, v. a. die Lokalisation der Plazenta die entscheidende Rolle.

Bei der transzervikalen Methode wurde in Steinschnittlage, nach sterilem Abdecken der Patientin und Einkleidung des Operateurs mit sterilen Handschuhen, ein Entenschnabelspekulum eingeführt und die Portio dargestellt. Mit einem trockenen Tupfer wurde der Zervixschleim entfernt und die Portio und das Scheidengewölbe mit Octenisept® von Schülke & Mayr GmbH lokal desinfiziert. Sich im hinteren Scheidengewölbe angesammeltes Antiseptikum wurde mit einem trockenen Tupfer entfernt. Unter sonographischer Darstellung des Zervixkanal durch eine zweite Person, konnte der Operateur die Führungsnadel aus dem Bard Angiomed Chorionzottenentnahme-Set mit 24 cm nach Holzgreve in seiner Form dem Zervixkanal anpassen und einführen. Es erfolgte der Vorschub bis in das Chorion. Nach Versehen des Endes der Punktionsnadel mit einer 20 ml Spritze wurde unter ruckartigen Bewegungen und Sog an der Spritze zurückgezogen. In der Spritze befanden sich 5 ml RPMI-Lösung (1640 Medium ohne Glutamat) von der Firma Invitrogen. Klinikintern wurde dem 1640 Medium Penicillin, Streptomycin und Amphotericin in einer Dosierung von 10 000 U/ml (1%iges Antibiotikum, 5 ml auf 500 ml Medium), sowie Heparin in einer Dosierung von 1 ml auf 500 ml Medium beigefügt. Im Anschluss an die Gewinnung des Materials wurde dieses lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein einer ausreichenden Menge an Chorionzotten überprüft. Der Zielwert war > 10 – 50 mg Zotten. Wurde dieser Wert nicht erreicht erfolgte eine Re – Chorionzottenbiopsie. Bis zu maximal dreimal wurde die Prozedur durchgeführt, um eine ausreichende Menge zu erhalten. Die reinen Zotten wurden in dem Medium von Dezidua, Schleim und unreinen Zotten getrennt und zur Diagnostik verschickt. Das überschüssige Material wurde im Rahmen dieser Studie als Untersuchungsmaterial genutzt.

Bei der transabdominellen Chorionzottenbiopsie wurde die Patientin in Rückenlage unterhalb der Schamharrgrenze steril abgedeckt. Nach lokaler Anästhesie mit Scandicain 1% wurde mit der Kombinationsnadel aus dem Transabdominellen-Chorionzotten-Entnahme – Set ULTRA von SOMATEX® mit einer Länge von 220 mm und einem Durchmesser von 1,3 x 150 mm, unter sonographischer Kontrolle, durch die

Bauchdecke die Plazenta angestochen. An der in der Führungsnadel liegenden zweiten Nadel wurde ebenfalls eine 20 ml Spritze befestigt und im Weiteren wie bei der transzervikalen Methode verfahren.

## ***2.4 Paraffineinbettung und Lagerung***

Die Fixierung der Gewebeschnitte erfolgte verblindet, unabhängig von der Entnahme durch ein Labor, welches nicht in die Behandlung der Patientin involviert war. Die Proben wurden umgehend nach Gewinnung in eine Formalinlösung gegeben und darin für 24h fixiert. Nach Auswaschung mit Leitungswasser und jeweils 4 bis 5 stündiger Lagerung in 50% und nachfolgend 70% EtOH, folgte für jeweils 1h die Lagerung in 96% und 100% EtOH. Danach wurde das Gewebe für 4 Stunden in Methylbenzoat überführt. Die Paraffinierung erfolgte durch Histowachs mit einem Schmelzpunkt zwischen 56 und 58°C.

Die Fixierung des Materials fand unabhängig von Werk- oder Wochenendtagen immer in gleichen zeitlichen Abständen statt, so dass alle Präparate gleiche Fixierungsbedingungen erfahren haben.

## **2.5 Immunhistochemie**

Die Syndecanexpression wurde durch die immunhistochemische Färbung mit dem DAKO Envision Kit K 4004 deutlich gemacht. Dazu wurden die paraffineingebetteten Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 70% zu je 10 Minuten) entparaffiniert und rehydriert. Zur Antigendemaskierung wurden die Präparate im Citratpuffer = pH 6.0 25 min bei einer Temperatur von ca. 95°C im Steamer inkubiert und in der Lösung für ca. 45 bis 60 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend folgte eine Waschung mit TBS (Tribuffersaline) und Tween für jeweils 10 Minuten. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, erfolgte die Inkubation mit 0.3% Peroxidase für 10 Minuten bei Raumtemperatur und es wurde ein weiteres Mal gewaschen. Als Primärantikörper haben wir Maus-Anti-CD138 (MCA681) aus dem Klon B-B4 von SEROTEC genutzt. Der Antikörper erkennt Syndecan-1 [40]. Der Kontakt zum Primärantikörper fand über Nacht im Kühlschrank statt. Um überschüssige Antikörper vom Präparat zu entfernen, wurde anschließend gewaschen. Zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen wurde der gebrauchsfertige Peroxidase labelled Polymer HRP anti-Maus für 30 Minuten auf die Schnitte gegeben und nachfolgend ein weiteres Mal gewaschen. Für die Immunreaktion benutzten wir das Chromogen DAB aus dem DAKO Kit K 5001. Nach 10 minütiger Einwirkzeit von AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol) und dem Chromogen wurden die Schnitte mit aqua destillata abgespült und sehr kurz mit Hämatoxylin nach Meyer gegengefärbt. Anschließend wurden die Präparate für 10 Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Vor Eindeckung der Schnitte mit DePex von Serva führten wir zur Dehydrierung eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100% EtOH) für je 10 Minuten durch. Die Kontrollen wurden ohne Hinzufügen des Primärantikörpers mit dem Antibody Diluent S 2022 von Dako Cytomation durchgeführt.

## **2.6 Mikroskopische Auswertung**

Die lichtmikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte durch das Leitz Labor LUXS Mikroskop von Leica. Dazu wurden von jedem Gewebeschnitt mikroskopische Bilder mit der Canon Power Shot A95 AiAF und dem Computerprogramm Canon Utilities ZoomBrowser EX 4.6 Version 4.6.1.35 aufgenommen. Die Einstellungen des Mikroskops, wie Blende, Kondensator und Belichtung, wurden zu Beginn der Studie festgelegt. Ebenso wurde eine Standardeinstellung des Computerprogramms und damit auch der Kamera bestimmt. Die Photographien entstanden ohne Blitz, mit einer Filmempfindlichkeit von 100, einer Belichtungskorrektur von +2/3 und einem 3fach optischen Zoom. Das Mikroskop war vor jeder ersten Photographie des Tages 30 Minuten in der Standardeinstellung in Betrieb, um für jedes Bild gleiche Belichtungsverhältnisse zu garantieren, falls die Lichtquelle eine Aufwärmzeit benötigte.

Zu jedem Präparat wurden drei Bilder gemacht: Ein Übersichtsbild mit dem 5er Objektiv des Mikroskops und jeweils eine Aufnahme einer großen und einer kleinen Zotte mit der 25fachen Vergrößerung. Die großen Zotten wurden definiert als eine Zotte, größer als die Hälfte des Bildausschnitts des Mikroskops, während die kleinen Zotten gleich groß oder kleiner als ein Viertel des Bildausschnitts sein mussten. Dieses entspricht einer Größe von maximal 104,33  $\mu\text{m}$  x 156,51  $\mu\text{m}$  der großen Zotten und einer Größe von maximal 104,33  $\mu\text{m}$  x 78,28  $\mu\text{m}$  der kleinen Zotten. Standen verschiedene Zotten in einem Präparat zur Auswahl, so wurde die rundeste Zotte mit der homogensten und intensivsten Färbung ausgewählt. Ebenso wurde bei den Übersichtsbildern verfahren, wo der Bildausschnitt mit der intensivsten Färbung fotografiert wurde.

In 36 Fällen konnten die Kriterien für die große Zotte nicht erfüllt werden, so dass nur ein Übersichtsbild und eine kleine Zotte aufgenommen werden konnten. In einem Fall existierte weder eine kriteriengerechte große noch eine kleine Zotte, so dass nur ein Übersichtsbild resultierte.

## 2.7 Konventioneller Färbescore

Da die Auswertung der Bilder nicht computergestützt erfolgte, wurden drei geblindete Personen mit der Bewertung der Bilder nach bestimmten Kriterien beauftragt, um eine objektive Auswertung zu gewährleisten. Die Bilder der kleinen und großen Chorionzotten standen ohne Belichtungs- oder Farbkorrekturen entwickelt, zur Auswertung zur Verfügung, während die Übersichtsbilder direkt am Computerbildschirm bewertet wurden. Keiner der drei Personen war das Outcome der Schwangerschaften bekannt, so dass eine Verblindung der Studie gegeben war. Die Daten zu den Patientinnen und dem Outcome der Schwangerschaften wurden erst nach der Bewertung der Gewebeschnitte mit den Daten eben dieser Auswertung zusammengeführt.

Nach folgenden Kriterien wurden pro Bild Punkte verteilt: Die Übersichtsbilder wurden nach der Homogenität und Intensität der Färbung im Bereich der Mikrovilli bewertet. Die Bilder der großen und kleinen Zotten wurden ausgewertet nach der Homogenität und Intensität der Färbung im Bereich der Mikrovilli, sowie der Intensität der Färbung im Bereich der einzelnen Kompartimente der Zotte, wie Synzytiotrophoblast, Zytotrophoblast und Stroma. Außerdem wurde die Dicke des angefärbten Mikrovillisaumes unabhängig von seiner Färbung bewertet.

Bei der Bewertung der *Homogenität* konnten Punkte von 0 bis 4 vergeben werden:

- 0 = gar keine Färbung
- 1 = 1 - 33% des Saumes ist angefärbt
- 2 = 34 - 66% des Saumes ist angefärbt
- 3 = 67 - 99% des Saumes ist angefärbt
- 4 = 100% des Saumes ist positiv für Syndecan-1.

Bei den Übersichtsbildern wurde diese Bewertung auf den gesamten Bildausschnitt bezogen, d.h. z.B. 1 - 33% der Mikrovilli aller Zotten ist gefärbt für Syndecan-1.

Die *Intensität* der Färbung wurde durch Punkte von 0 bis 3 definiert.

- 0 = ungefärbt
- 1 = schwach gefärbt
- 2 = mittel stark gefärbt
- 3 = stark positiv für Syndecan-1.

Die Bewertung erfolgte durch den Vergleich aller Zotten untereinander.

Ebenfalls im Vergleich der Zotten wurde die *Dicke des Mikrovillisaumes* bestimmt:

0 = kein Saum angefärbt

1 = schmaler Saum angefärbt

2 = mittel-dick angefärbter Saum

3 = dick angefärbter Saum.

Des Weiteren wurden die Differenzen dieser Auswertung von den großen – der kleinen Zotten zur Berechnung der Signifikanzen herangezogen. Ebenso wurden die Summen gebildet. Dies erfolgte, um einen Gesamteindruck von der Färbung, unabhängig von großer oder kleiner Zotte, zu erhalten.

Die Auswertung erfolgte durch die drei Personen unabhängig voneinander. Stimmt alle Punktwerte überein oder stimmten zwei Personen im Punktwert überein und lag der dritte Wert nur ein Punkt darunter oder darüber, so wurden jeweils diese Punktwerte übernommen. Für alle anderen Konstellationen musste eine Einigung in einem zweiten gemeinsamen Bewertungsdurchgang gefunden werden. Dies war aber nur bei wenigen Präparaten der Fall, so dass man im Ganzen von eindeutig zuschreibbaren Punktwerten ausgehen kann.

Anschließend wurden die Ergebnisse der Chorionzottenauswertung mit den Daten der Patienten-Datenbank korreliert.

## ***2.8 Statistische Auswertung***

Zur Berechnung der Mittelwerte und Signifikanzen sowie zur deskriptiven Statistik und graphischen Darstellung wurde das Statistikprogramm SPSS (SPSS für Windows, Version 11.5.1, 2002, SPSS Inc., Chicago, USA) genutzt. Eine Normalverteilung der Daten war in dem Patientenkollektiv nachweislich nicht gegeben, so dass die Signifikanzen mit Hilfe des nichtparametrischen Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben, dem nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben und dem Qui-Quadrat Test errechnet wurden. Der Qui-Quadrat Test galt bei unseren Berechnungen als erster Hinweis und wurde im Falle eines relevanten Signifikanzniveaus immer von einem Mann-Whitney-U Test begleitet. Im Folgenden finden sich deshalb immer die differenzierteren Angaben aus dem Mann-Whitney-U Test. Es galt das Signifikanzniveau von  $\alpha = <0.05$ .

Um einen Bias durch verstorbene Kinder oder durch abgebrochene Schwangerschaften auszuschließen, die aber eine normale Syndecanexpression hätten aufweisen können, führten wir alle Berechnungen mit dem Gesamtkollektiv und dem Kollektiv aus nur lebend geborenen Kindern durch. In einzelnen Fällen wurden noch weitere Selektionen vorgenommen, die an zugehöriger Stelle vermerkt sind.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Daten zum Patientinnenkollektiv

#### 3.1.1 Alter, Gewicht, Größe, BMI

Die 203 Frauen unseren Kollektivs waren zum Zeitpunkt der Chorionzottenbiopsie zwischen 19 und 43 Jahren alt mit einem Mittelwert von 34,61 Jahren (Standardabweichung 4,66). Das Normalgewicht der Frauen betrug zwischen 45 und 110 kg bei einer Größe zwischen 150 und 181 cm, mit den Mittelwerten von 68,27 kg und 168,42 cm (Standardabweichung 0,81 und 0,44). Daraus ergibt sich ein BMI zwischen 17 und 38 mit dem Mittelwert 24,26 (Standardabweichung 0,27).

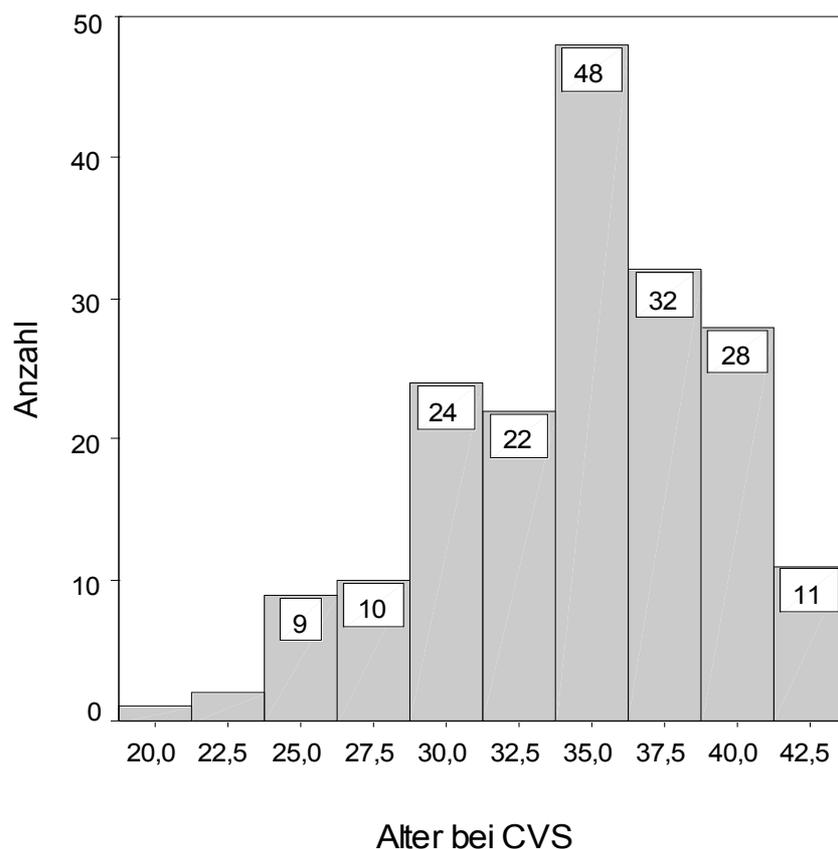


Abbildung 1: Alter bei CVS

### 3.1.2 Zeitpunkt der Chorionzottenbiopsie

In der Mehrzahl der Fälle wurde die Biopsie zwischen der 10. und 14. SSW entnommen. Der früheste Zeitpunkt in dieser Studie war die 10,14. SSW und der späteste Zeitpunkt die 36,86. SSW. Im Mittel wurde die Biopsie in der 12,57 SSW Woche vorgenommen. (Standardabweichung 1,53).

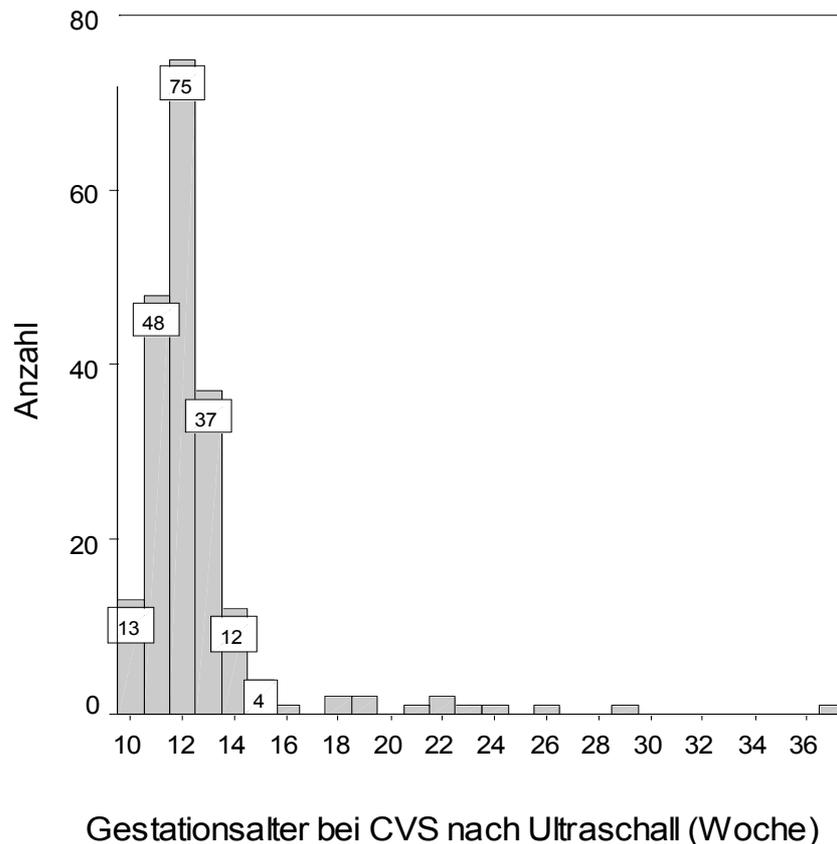


Abbildung 2: Gestationsalter bei CVS

### 3.1.3 Nikotin, Alkohol

159 Frauen gaben an während der Schwangerschaft nicht zu rauchen, 37 gaben Nikotinabusus an und zu 7 Patientinnen fehlten dazu die Informationen. Alkoholabusus wurde von 6 Frauen angegeben. 191 tranken während der Schwangerschaft keinen Alkohol und zu 6 Patientinnen gab es dazu keine Informationen.

### 3.2 Daten zum Schwangerschaftsoutcome

#### 3.2.1 Entbindungszeitpunkt, Ausgang, Karyotyp

Das erreichte Schwangerschaftsalter lag zwischen der 12. und der 44,43. SSW. (Mittelwert 35,7. SSW, Standardabweichung 57,53) Von diesen insgesamt 203 Schwangerschaften wurden 162 (79,8 %) Kinder lebend geboren. Das erreichte Schwangerschaftsalter bei den lebend geborenen Kindern lag zwischen der 24,3. SSW und der 44,43. SSW, im Mittel bei der 39,1. SSW (Standardabweichung 16,055).

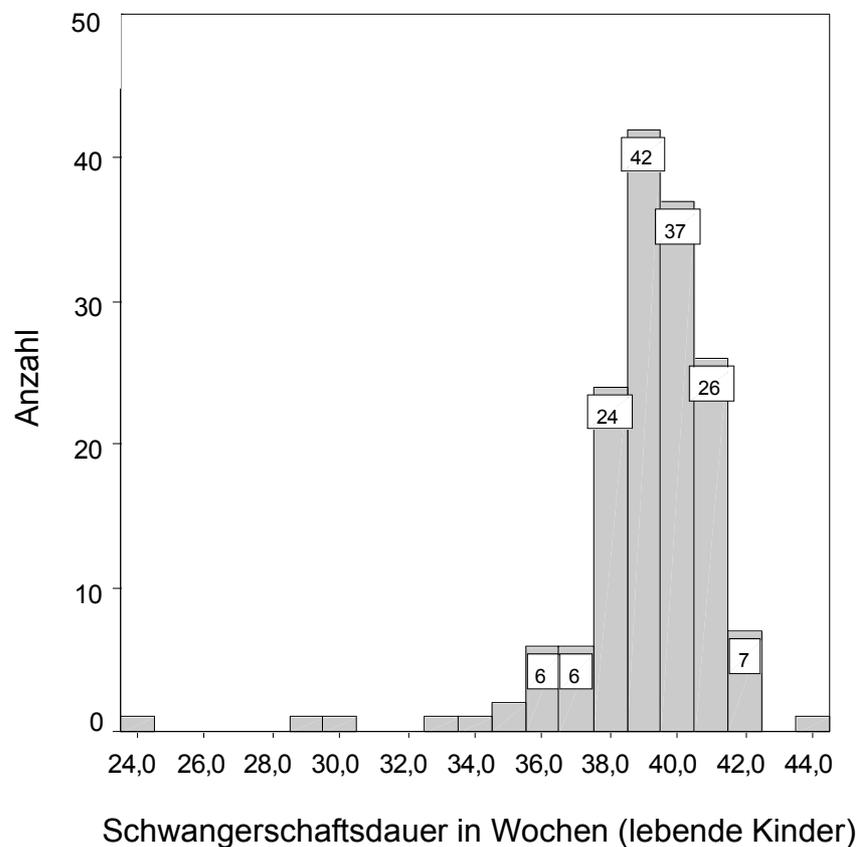


Abbildung 3: Schwangerschaftsdauer

Zur Frühgeburtlichkeit mit Nichterreichen der 37. SSW p.m. kam es im Gesamtkollektiv in 46 Fällen. Davon kamen 15 Kinder lebend zur Welt, 8 Kinder starben durch intrauterinen Fruchttod und 2 durch Spontanabort/Todgeburt. Bei 21 Kindern führte ein Abbruch zum vorzeitigen Ende der Schwangerschaft. 24 der 203 Kinder wurden im

Bereich des worst pregnancy outcomes geboren (<25. SSW), nur ein Kind kam davon lebend zur Welt. Übertragen, dass heißt > 42. SSW, wurden in diesem Kollektiv 5 Kinder, alle lebten. In 9 Fällen kam es zum intrauterinen Fruchttod, in 6 Fällen zum Spontanabort oder zur Todgeburt und in 26 Fällen wurde ein Abbruch vorgenommen. Per definitionem lag ein intrauteriner Fruchttod vor, wenn das Kind vor der 24. SSW entbunden wurde Nach diesem Zeitpunkt kam es zum Spontanabort. Zum Ausgang von 13 Schwangerschaften lagen keine Informationen vor.

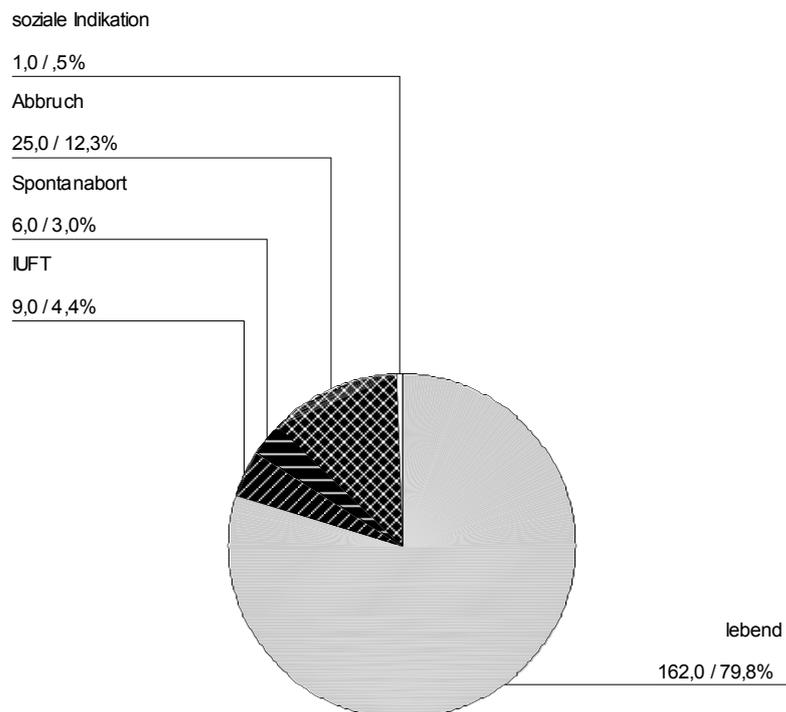


Abbildung 4: Ausgang aller Schwangerschaften

182 Kinder wiesen einen normalen Karyotyp auf (davon einmal eine balancierte Translokation 46XX, t(2p;7q)), 21 Kinder zeigten Auffälligkeiten bei der Chromosomenanalyse.

Auffälliger Karyotyp	Anzahl	Schwangerschaftsausgang	Anzahl
Trisomie 21	7	Abbruch	7
Trisomie 18	5	Abbruch	5
Trisomie 13	1	IUFT	1
Turner Syndrom	1	lebend	1
Markerchromosom	2	lebend	1
		Abbruch	1
Mosaik	2	lebend	2
balanciert	2	lebend	2
fraglich	1	IUFT	1

**Tabelle 1: Karyotyp und Schwangerschaftsausgang**

6 Kinder mit auffälligen Karyotypen wurden lebend geboren. Die restlichen 156 lebend geborenen Kinder hatten einen normalen Karyotypen. 7 Kinder mit normalem Karyotypen starben durch IUFT, 6 durch eine Totgeburt/Spontanabort, 12 durch Abortio und zu einem karyotypisch gesunden Kind gibt es keine Information. Jeweils bei einem Kind wurde eine Omphalozele, ein Anhydramnion bzw. Oligohydramnion festgestellt. Alle Kinder hatten einen normalen Karyotypen. Bei dem Kind mit der Omphalozele wurde ein Abbruch vorgenommen, eine Totgeburt/Spontanabort ereignete sich bei der Schwangerschaft mit dem Anhydramnion und zu einem intrauterinen Fruchttod kam es bei dem Oligohydramnion.

### 3.2.2 Customised centiles

Die vergleichbaren Perzentilen, an das mütterliche Gewicht und an das Schwangerschaftsalter am Entbindungstermin adaptierte Geburtsgewichte, zeigen in unserem Kollektiv keine Normalverteilung. Es gibt viele Kinder mit zu niedrigen und zu hohen Perzentilen im Vergleich zur Normalverteilung in der Bevölkerung. Im Gegensatz dazu, zu wenige Kinder, die der Norm entsprechend, um die 30. bis 70. Perzentile liegen. Unter der 10. angeglichenen Perzentile (Wachstumsretardierung) lagen 27 Kinder von denen 17 lebend geboren wurden. 25 Kinder wurden mit einem adaptierten Geburtsgewicht über der 90. Perzentile (Makrosomie) geboren. Alle Kinder waren lebend.

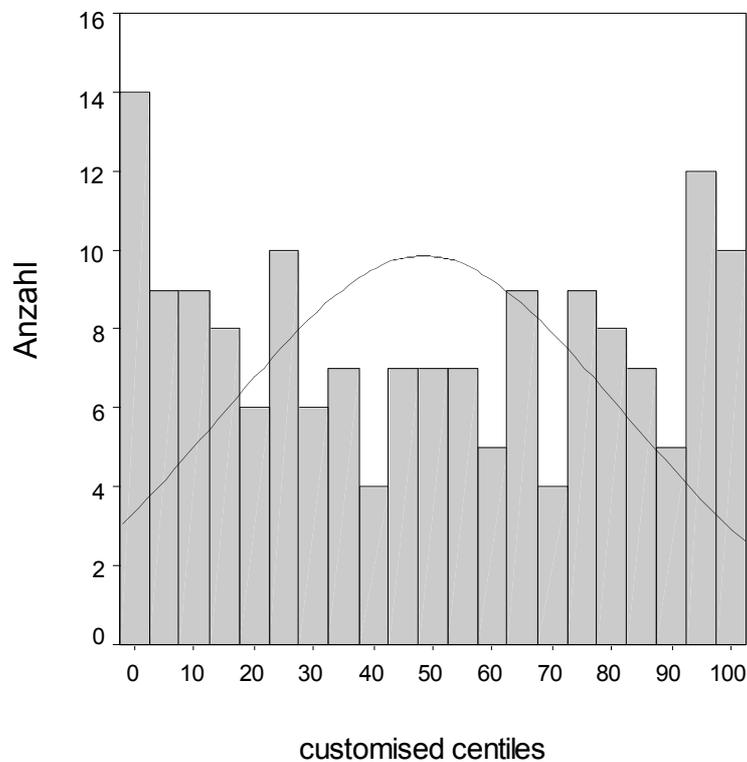


Abbildung 5: customised centiles

### 3.2.3 Sonographische und postnatale Parameter, Geschlecht

Sonographisch wurden die Femurlänge, die Scheitel–Steiß–Länge, der biparietale Durchmesser sowie die Nackentransparenz gemessen:

	n	Minimum	Maximum	Mittel	Standardabweichung
Femurlänge in mm	165	3	46	8,96	6,793
Scheitel-Steiß-Länge in mm	179	34	92	56,82	11,861
Biparietaler Durchmesser in mm	186	12	109	22,28	10,91
Nackentransparenz in mm	160	1	9	1,92	1,303

Tabelle 2: sonographische Parameter

Von den 160 Kindern, bei denen eine Nackentransparenzbestimmung vorgenommen wurde, waren 18 mit einer Länge von >3mm auffällig. 8 von diesen Kindern hatten tatsächlich einen auffälligen Karyotypen. Insgesamt zeigten 21 Kindern Auffälligkeiten in der Chromosomenanalyse, so dass bei 13 Kindern trotz Chromosomenfehler keine erhöhte Nackentransparenz nachgewiesen werden konnte.

Karyotyp	Nackentransparenz (mm)											gesamt	Mittel	Standardabweichung
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	fehlt				
normal	69	56	14	4	1	2	1				35	182	1,73	2,44
auffällig	5				6	1			1	8	21	3,99	0,97	

Tabelle 3: Nackentransparenz und Karyotyp

Als postnatale Parameter wurden die Länge des Kindes, der Kopfumfang und das Gewicht bestimmt (Angaben zu lebend geborene Kinder):

	n	Minimum	Maximum	Mittel	Standardabweichung
Länge in cm	94	42	68	51,69	3,179
Kopfumfang in cm	93	29	40	34,79	1,759
Gewicht in g	158	1200	4610	3401,59	580,928

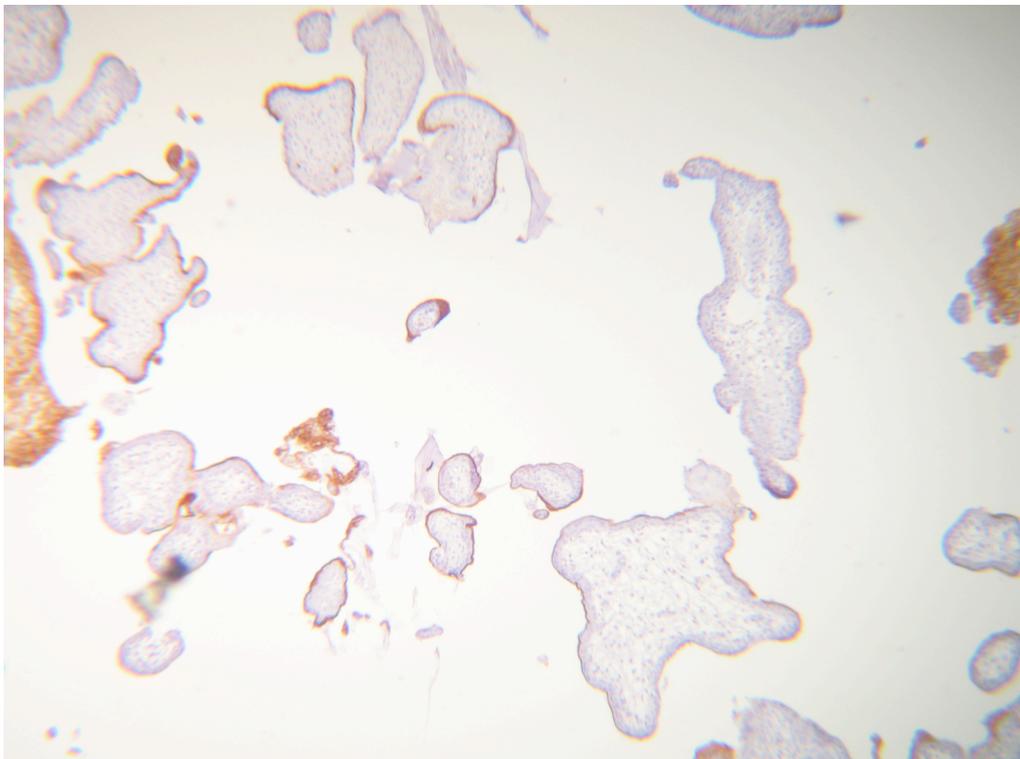
Tabelle 4: postnatal erhobene Parameter

---

Geschlecht: Insgesamt wurden 100 Jungen und 103 Mädchen geboren, bei 13 Kindern gab es keine Angaben zum Geschlecht. Von den 162 lebend geborenen Kindern kamen 83 Jungen und 79 Mädchen zur Welt. Im Durchschnitt wogen die männlichen 242,34 g mehr als die weiblichen Kinder.

### **3.3 Daten zur immunhistochemischen Auswertung**

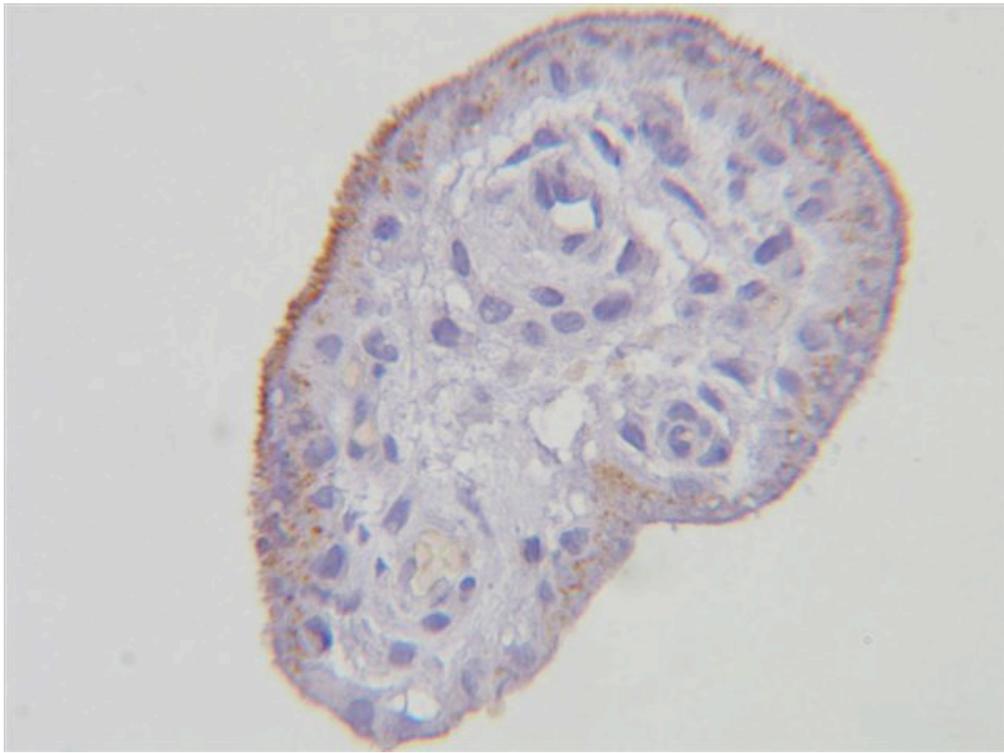
In sämtlichen Gewebeproben konnte per lichtmikroskopischer Betrachtung eine Syndecan-1 Expression festgestellt werden. Einige Präparate waren weniger, andere mehr angefärbt. Es fiel auf, dass die Syndecan-1 Expression nicht homogen, sondern in einem inhomogenen Muster die Zotten umgibt. Strecken von starker Expression werden abgelöst durch weniger intensive Expression oder durch fehlenden Nachweis von Syndecan-1. Ebenso waren stark angefärbte Zotten neben Zotten zu finden, denen eine Färbung fehlte. Somit waren nicht nur die Zotten in sich inhomogen angefärbt, sondern auch die verschiedenen Zotten innerhalb eines Präparates. Es gab keine Gewebeprobe, in der alle Zotten homogen angefärbt waren.



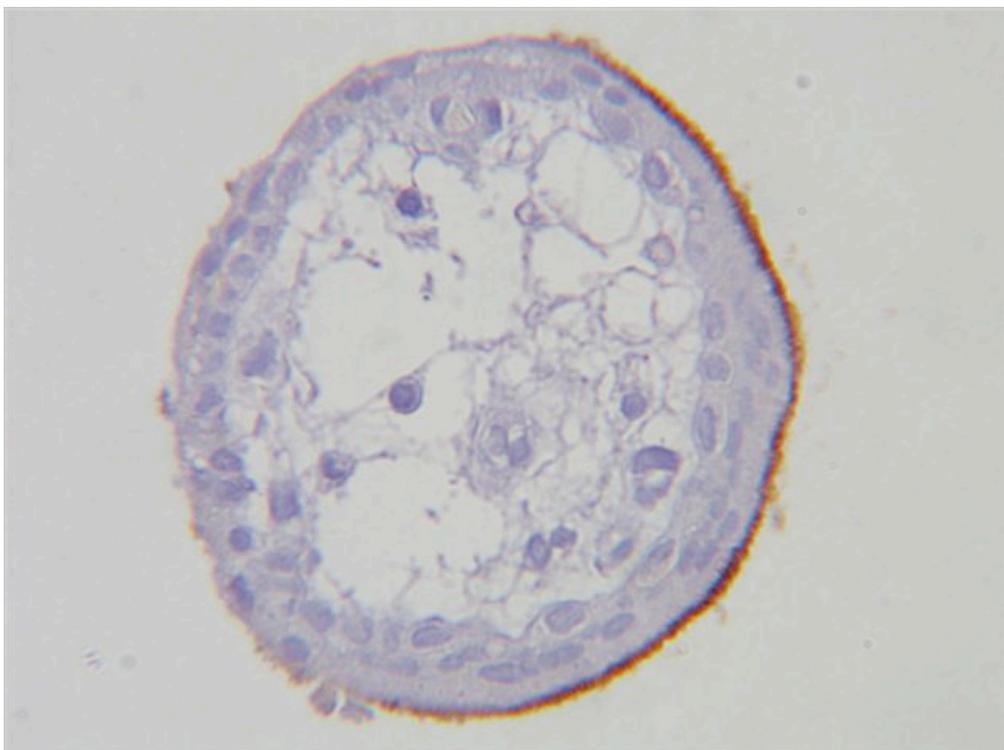
**Abbildung 6: Beispiel für Inhomogenität im Übersichtsbild**

Die großen und kleinen Zotten wurde anhand der Homogenität der Syndecan-1 Expression, sowie anhand ihrer Intensität und durch die Dicke des angefärbten Mikrovillisaumes charakterisiert. Die folgenden Bilder sollen beispielhaft jeweils eine Zotte einer bestimmten Kategorie aufzeigen.

Die *Homogenität* anhand großer Zotten:



**Abbildung 7: Homogenität 1 (1-33% des Saumes sind angefärbt)**



**Abbildung 8: Homogenität 2 (34-66% des Saumes sind angefärbt)**

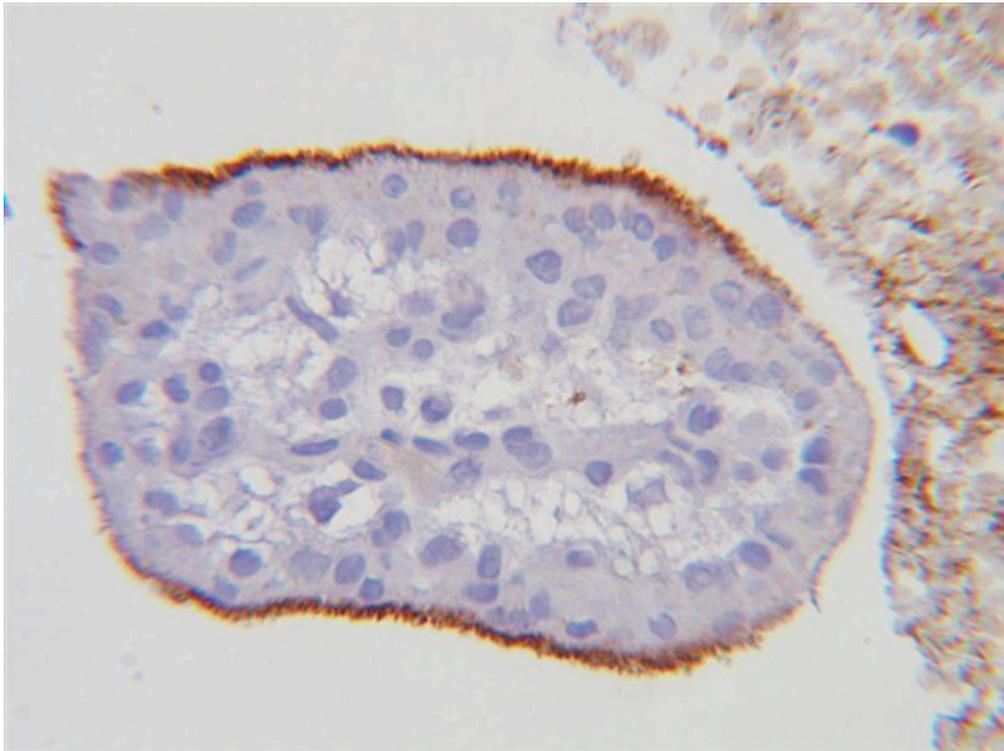


Abbildung 9: Homogenität 3 (67-99% des Saumes sind angefärbt)

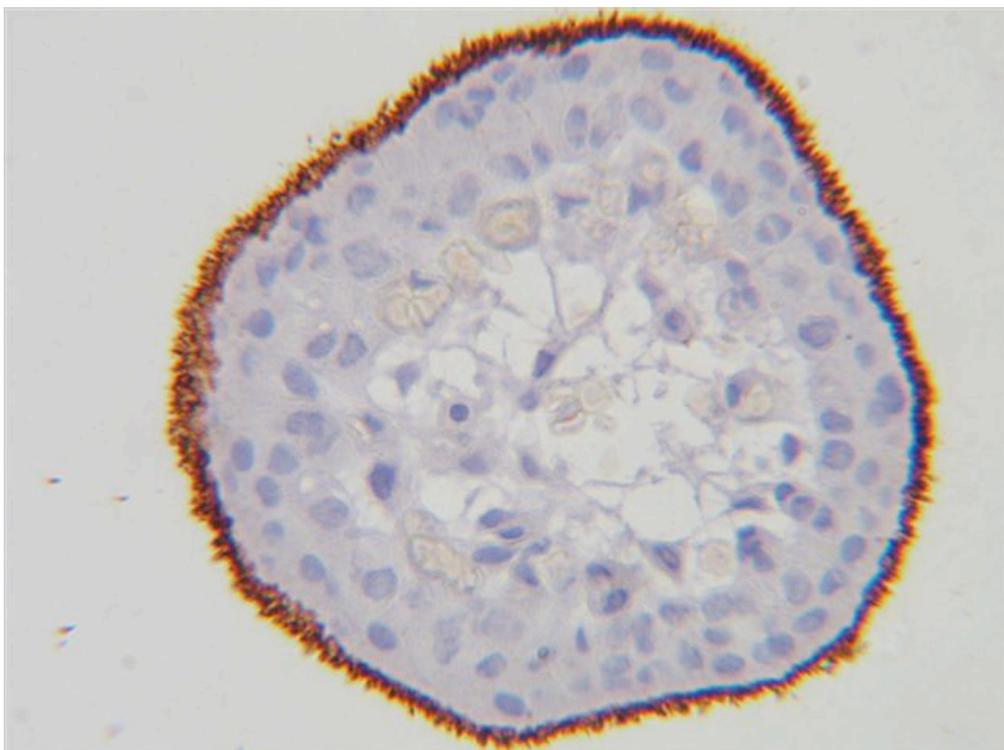
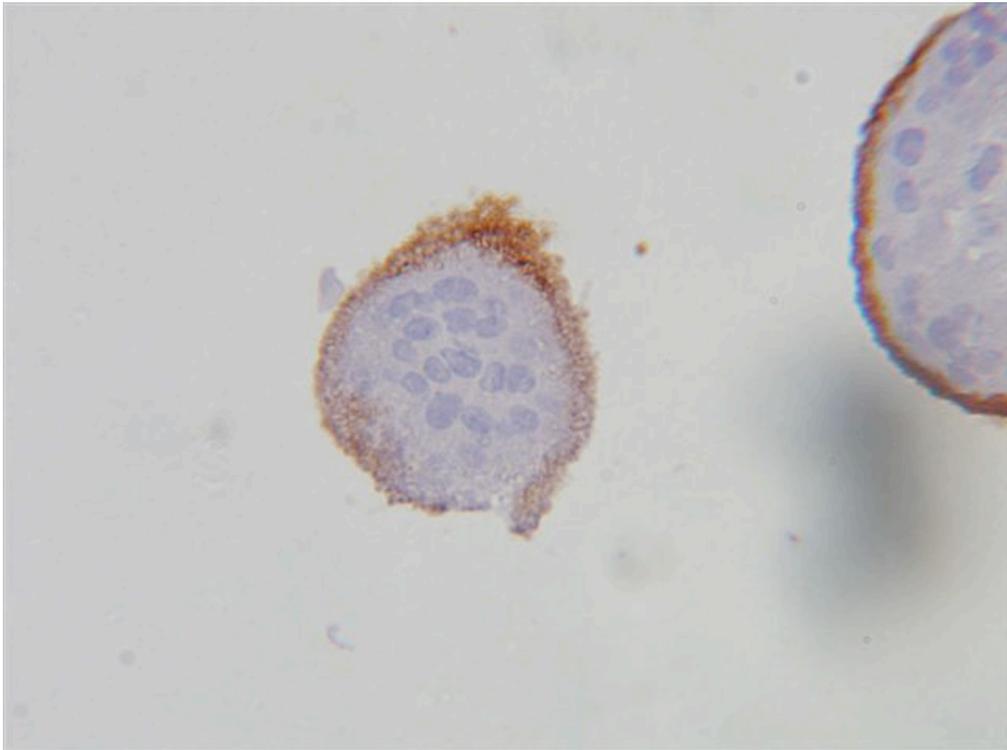
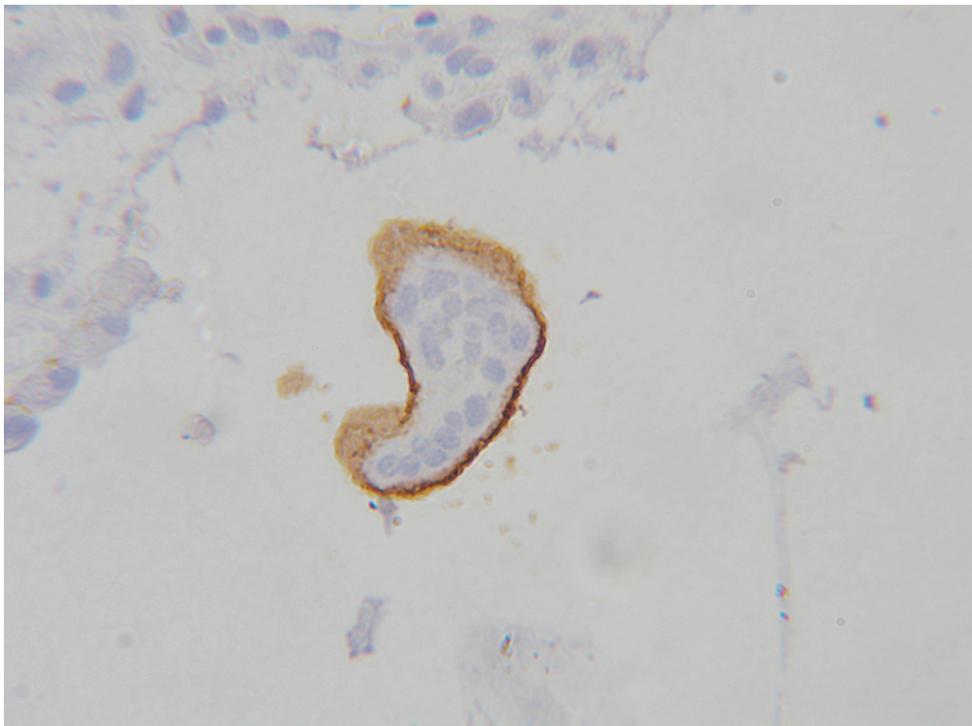


Abbildung 10: Homogenität 4 (100% des Saumes angefärbt)

Die *Intensitäten* anhand kleiner Zotten:



**Abbildung 11: Intensität 1 (schwach gefärbt)**



**Abbildung 12: Intensität 2 (mittelstark gefärbt)**

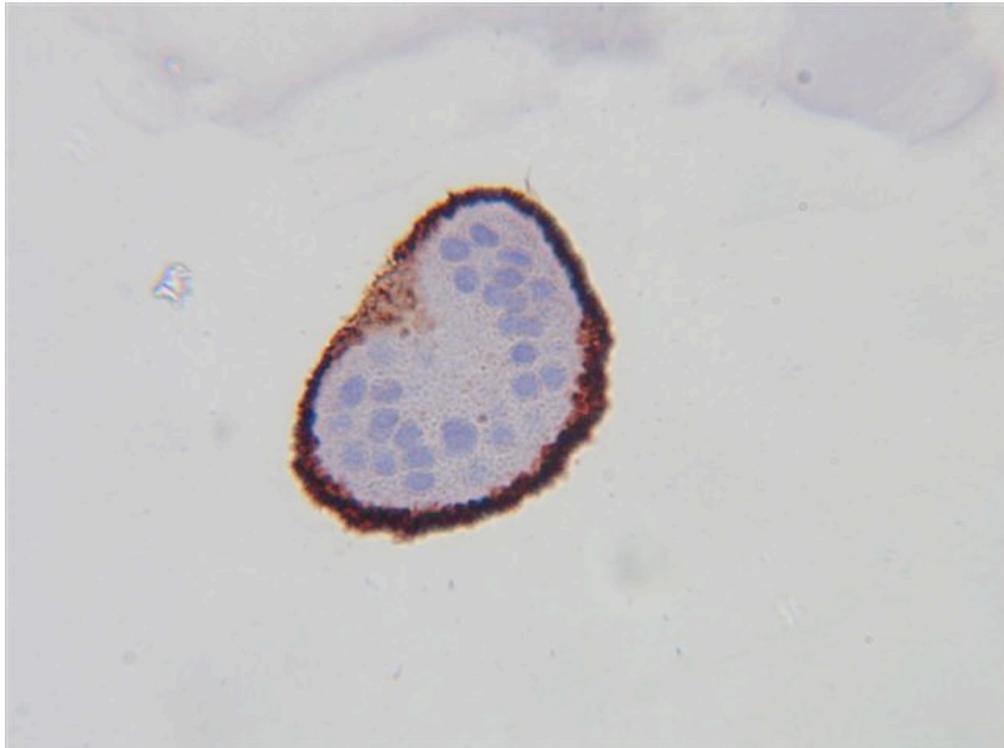


Abbildung 13: Intensität 3 (stark gefärbt)

Die Dicke des Mikrovillisaumes anhand großer Zotten:

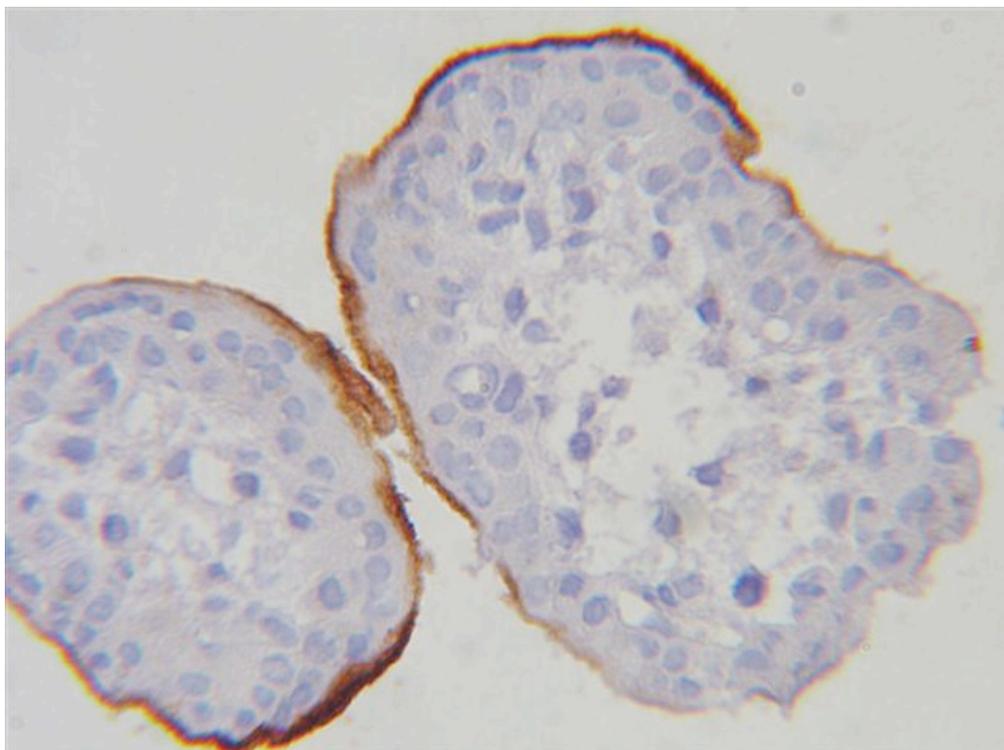


Abbildung 14: Mikrovillisaum 1 (schmal)

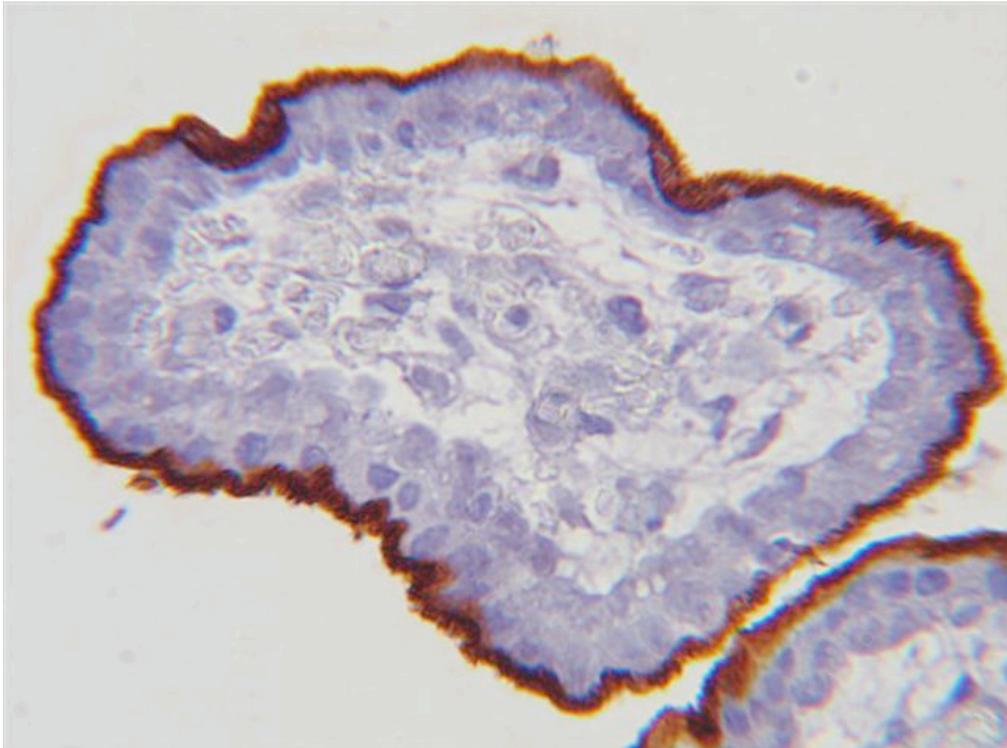


Abbildung 15: Mikrovillisaum 2 (mittel)

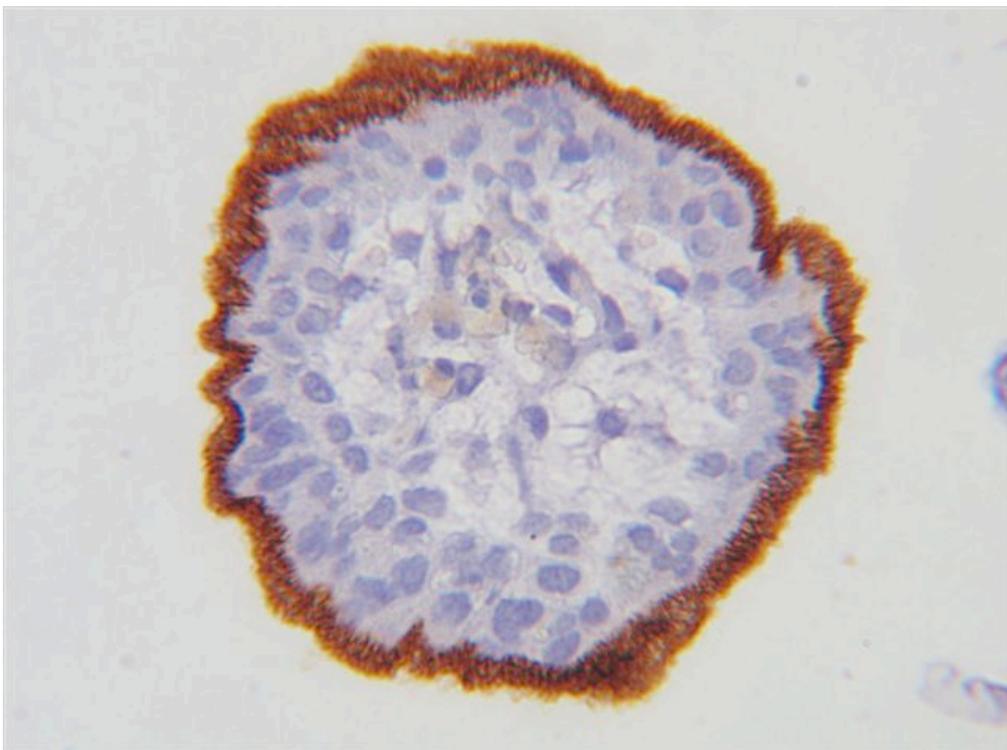


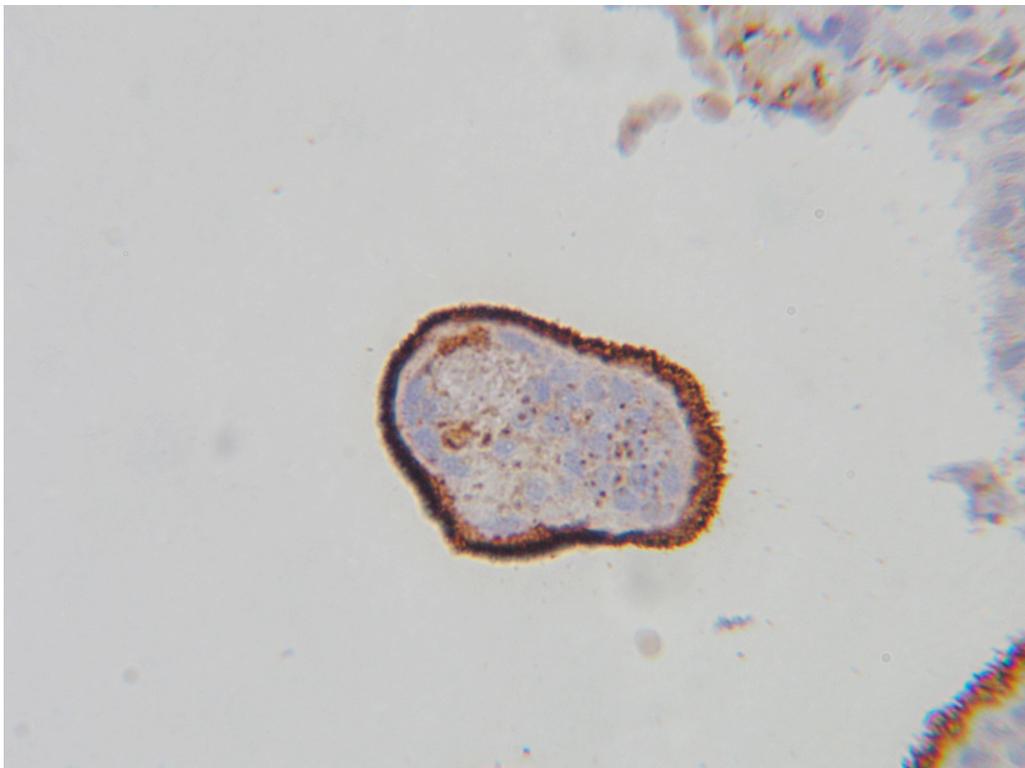
Abbildung 16: Mikrovillisaum 3 (dick)

Des weiteren fiel auf, dass kleine Zotten eine signifikant stärkere Syndecan Expression aufweisen als die Größeren, was sich durch die Auswertung mit dem konventionellen Färbescore bestätigen ließ.

	Anfärbung der kleinen Zotte im Vergleich zur großen Zotte für					
	Homogenität der Mikrovilli	Intensität der Mikrovilli	Intensität im Synzytiotrophoblasten	Intensität im Zytotrophoblasten	Intensität im Stroma	Dicke des angefärbten Mikrovillisaumes
Asympt. Signifikanz (2-tailed)	0,000	0,000	0,016	0,330	0,438	0,000

**Tabelle 5: Signifikanzen kleine Zotten gegen große Zotten**

Vor allem der Bereich der Mikrovilli zeigt sich als außerordentlich interessant hinsichtlich der Syndecan-1 typischen immunhistochemischen Färbung. Er scheint nicht nur der Ort der häufigsten, sondern auch der Ort der intensivsten positiven Reaktionen auf Syndecan-1 zu sein. Der Zytotrophoblast und der Synzytiotrophoblast waren in stark reduziertem Ausmaß angefärbt und das Stroma nur noch in seltenen Ausnahmen.



**Abbildung 17: kleine Zotte mit Mikrovilli- und Synzytiotrophoblast-Expression**

Die folgende Abbildung soll jeweils die Mittelwerte der einzelnen Kategorien für große und kleine Zotten verdeutlichen und zeigt ebenfalls die höhere Expression bei kleineren Zotten sowie die abnehmende Expressionsrate von Mikrovilli Richtung Stroma:

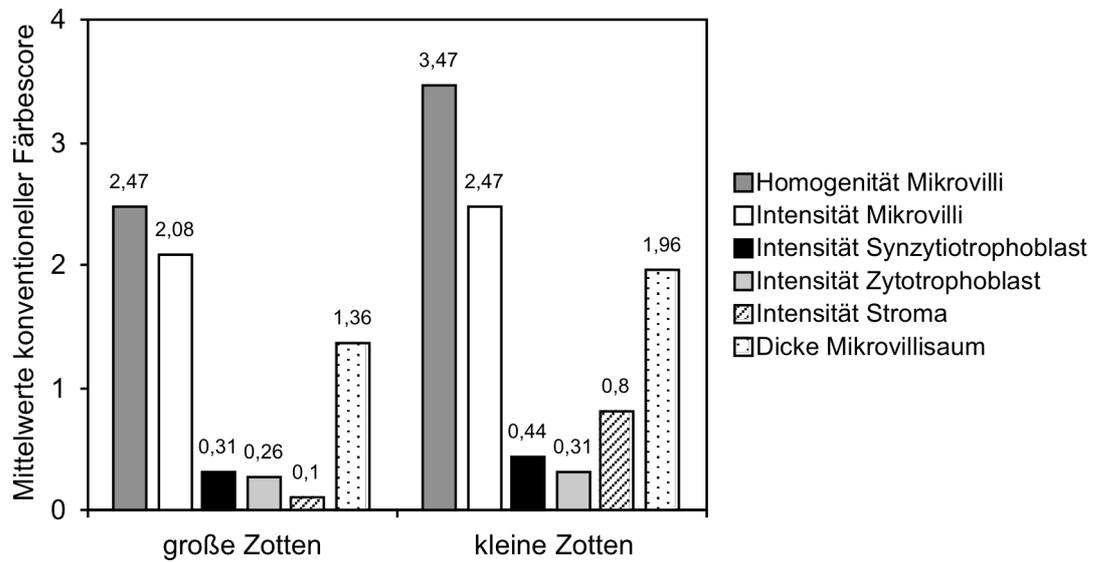


Abbildung 18: Mittelwerte konventioneller Färbescore von großen und kleinen Zotten

### 3.4 Korrelation der immunhistochemischen Auswertung zum Patientinnenkollektiv (mütterliche Faktoren)

Zu Beginn der Korrelation von Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung und Daten von Mutter bzw. Kind musste eine Abhängigkeit der Färbeintensitäten vom Gestationsalter bei der CVS ausgeschlossen werden, da nicht alle Chorionzottenbiopsien zum gleichen Schwangerschaftszeitpunkt vorgenommen worden waren und somit eine Vergleichbarkeit nicht mehr gegeben gewesen wäre.

Weder bei den Übersichtsbildern noch bei den kleinen oder den großen Zotten konnte in einer der Kategorien (Mikrovilli, Synzytiotrophoblast, Zytotrophoblast, Stroma, Dicke des Mikrovillisaumes) durch den Mann-Whitney-U Test oder den Qui-Quadrat Test eine Signifikanz festgestellt werden.

#### 3.4.1 Nikotin

Bei der Berechnung der Abhängigkeit der Intensität der Färbung des Zytotrophoblasten einer großen Zotte vom Nikotinabusus der Mutter während der Schwangerschaft durch den Mann-Whitney-U Test ergaben sich zwei hohe Signifikanzniveaus. Kinder von Raucherinnen zeigten mit einer Signifikanz von  $\alpha=0.003$  weniger Syndecan-Intensität im Bereich des Zytotrophoblasten als die von Nichtraucherinnen. (Zwischen gar nicht und nur schwach angefärbtem Zytotrophoblast (Kategorie 0 und 1) der großen Zotten.)

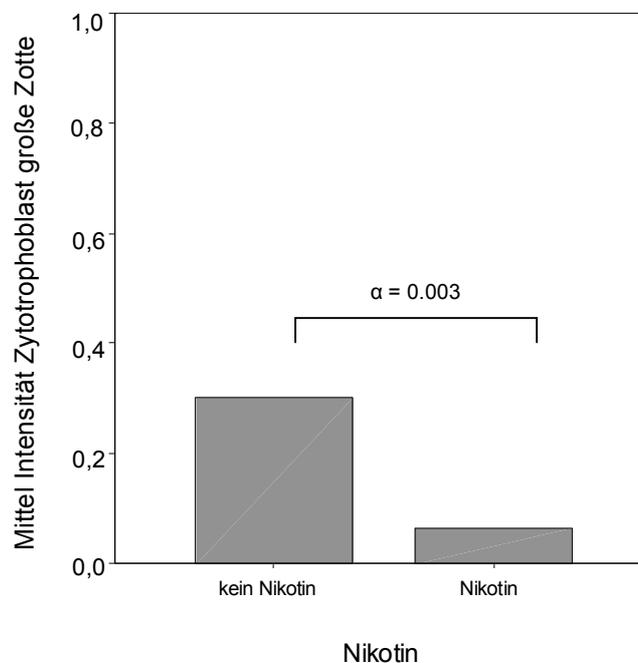


Abbildung 19: Nikotin und Intensität im Zytotrophoblasten

Dies bestätigte sich mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0.007$  und ebenfalls erniedrigter Intensität bei den Kindern der Raucherinnen im Zytotrophoblasten der großen Zotten zwischen schwach und mittel intensiv gefärbten Zytotrophoblast.

### **3.4.2 Größe**

Auch die Größe der Mutter korreliert nach unseren Berechnungen (Mann-Whitney-U Test) mit der Syndecanexpression der Plazenta. Die Chorionzotten von Kindern größerer Mütter scheinen demnach eine stärkere Expression aufzuweisen, als die von kleinerer Mütter. Dies zeigte sich bei den Mikrovilli großer Zotten zwischen den Kategorien mittel und stark angefärbt ( $\alpha=0.005$ ), bei großen Zotten (nur bei lebend geborenen Kindern) zwischen gar nicht und schwach gefärbtem Zytotrophoblast ( $\alpha=0.021$ ) und im Zytotrophoblast kleiner Zotten zwischen den Kategorien gar nicht und mittel gefärbt ( $\alpha=0.022$ ) sowie den Kategorien schwach und mittel gefärbt ( $\alpha=0.014$ ).

Eine Signifikanz deutete allerdings an, dass die Chorionzotten von Kindern größerer Mütter tendenziell weniger Färbintensität zeigen als Kinder kleinerer Mütter (in den Kategorien mittel gegen stark gefärbte Mikrovilli der großen Zotten).

### **3.4.3 Gewicht, BMI, Alter, Alkohol**

Zu Gewicht, BMI, Alter und Alkohol konnten durch den Mann-Whitney-U Test und den Qui-Quadrat Test keine Korrelationen zwischen der Syndecan-1 Expression und den Daten der Patientinnen hergestellt werden.

### **3.5 Korrelation der immunhistochemischen Auswertung zum Schwangerschaftsoutcome (kindliche Faktoren)**

Zur Korrelation der immunhistochemischen Auswertung durch den konventionellen Färbescore haben wir bei allen Berechnungen einmal mit dem Gesamtkollektiv der Kinder unabhängig vom Ausgang gerechnet. Eine zweite Berechnung wurde mit einem selektierten Kollektiv, der nur lebend geborenen Kinder, durchgeführt, um einen eventuellen Bias durch abgebrochene Schwangerschaften bei gesunden Kindern mit vermutlich normaler Syndecanexpression, bzw. durch intrauterin verstorbene Kinder mit fraglich normaler Syndecanexpressionsrate auszuschließen.

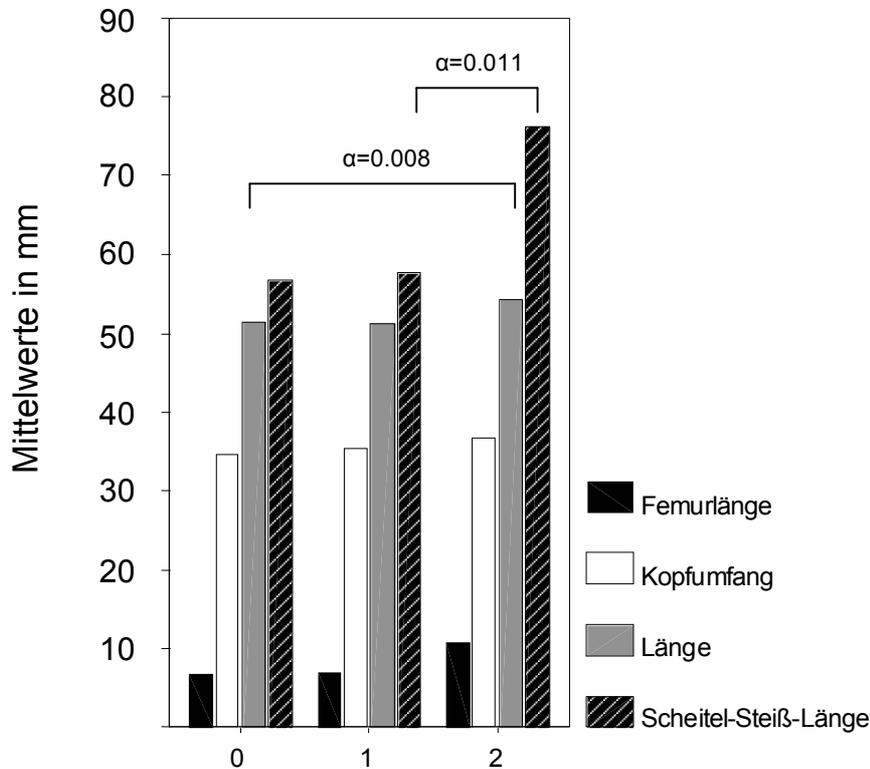
#### **3.5.1 Femurlänge, SSL, biparietaler Durchmesser, Länge, Kopfumfang**

Unsere Auswertungen der pränatal sonographisch und der postnatal erhobenen Parameter zeigen, dass in diesem Zusammenhang vor allem die Syndecanexpression der kleinen Zotten von Interesse ist. Diese korreliert mit der Femurlänge, der Scheitel-Steiß-Länge, der Länge des Kindes und dem Kopfumfang in der Form, dass je mehr Sydecanexpression eruiert wurde, die angegebenen Parameter in ihren Maßzahlen steigen.

Kindlicher Faktor	Ort der Expression	Verglichene Kategorien	Mann-Whitney-U-Test
Femurlänge	Intensität im Zytotrophoblast der kleinen Zotte	gar nicht und mittel intensiv	0.013
		schwach und mittel intensiv	0.021
Scheitel-Steiß-Länge	Intensität im Zytotrophoblast der kleinen Zotte	gar nicht und mittel intensiv	0.005
		schwach und mittel intensiv	0.011
biparietaler Durchmesser	Intensität der Mikrovilli der kleinen Zotte (alle und nur lebende Kinder)	schwach und mittel intensiv	0.032
Länge	Intensität im Zytotrophoblast der kleinen Zotte	gar nicht und mittel intensiv	0.008
Kopfumfang	Intensität im Zytotrophoblast der kleinen Zotte	gar nicht und mittel intensiv	0.008
	Intensität im Zytotrophoblast der kleinen Zotte (nur lebende Kinder)	gar nicht und mittel intensiv	0.006
	Dicke des Mikrovillisaumes der großen Zotte	gar kein und mittlerer Saum	0.041

**Tabelle 6: Signifikanzen kindliche Faktoren**

Die folgende Abbildung zeigt bildlich die Korrelationen und die wichtigsten Signifikanzen zwischen der Intensität des Zytotrophoblasten der kleinen Zotten und der Femurlänge, der Scheitel-Steiß-Länge, der Länge des Kindes und des Kopfumfanges:



Int. im Zytotrophoblasten der kleinen Zotten

**Abbildung 20: Intensität im Zytotrophoblast der kleinen Zotten und pränatal-sonographische Parameter**

Auch beim biparietalen Durchmesser lässt sich diese Tendenz erkennen, allerdings ergaben sich bei dieser Berechnung durch den Mann-Whitney-U-Test auch zwei Ergebnisse, die der umgekehrten Hypothese zusprechen würden, dass heißt, ihre Aussage bestand darin, dass bei weniger Intensität der Färbung im konventionellen Färbescore, der biparietale Durchmesser größer war. (Intensität der Mikro villi der kleinen Zotten zwischen den Kategorien gar nicht und schwach intensive Färbung bei allen Kindern und bei den nur Lebenden, mit einer Signifikanz von jeweils  $\alpha=0.29$ ).

Dagegen stehen allerdings 10 Signifikanzen, die der Korrelation in erst genannter Form entsprechen würden (Tabelle 6).

### 3.5.2 Nackentransparenz

Der ebenfalls pränatal-sonographisch erhobene Parameter der Nackentransparenz wurde unter den oben genannten Voraussetzungen berechnet, aber zusätzlich dazu noch gegen das Kollektiv nur lebend geborener und karyotypisch gesunder Kinder. Somit sollte der Bias, der durch eine Chromosomenaberrationen möglicherweise entstehen könnte, herausgenommen werden. Die Störungen, die auch auf Proteinebene durch einen Chromosomenfehler hervorgerufen werden können, waren im Rahmen dieser Studie nicht absehbar, so dass eine einwandfreie Berechnung der Nackentransparenz mit dem Gesamtkollektiv alleine, bzw. der nur lebend geborenen Kinder nicht sinnvoll erschien.

Unter den verschiedenen Berechnungsbedingungen kamen jedoch nur gleiche Ergebnisse zustande. In jeder Konstellation stellte sich die Korrelation zwischen der Nackentransparenz und der Syndecan-1 Expression in der Weise dar, dass eine höhere Intensität, Homogenität oder Mikrovillisaumdicke zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer verbreiterten Nackentransparenz führt. Der Mann-Whitney-U Test zeigte im Gesamtkollektiv eine Signifikanz im Zytotrophoblasten der kleinen Zotten. Bei den nur lebend geborenen Kindern zeigte sich die Korrelation in der Homogenität der Mikrovilli der großen Zotten und im Kollektiv der karyotypisch unauffälligen Kinder war dies in den Summen der Intensität des Synzytiotrophoblasten und Zytotrophoblasten sowie in der Summe der Dicke des Mikrovillisaumes zu finden, d.h. die in der Summe mehr angefärbten Zotten korrelierten mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine verbreiterte Nackentransparenz. (Die Summen wurden durch den Wert, z. B. der Intensität im Bereich des Zytotrophoblasten der großen Zotte plus der kleinen Zotte errechnet, um der Gesamtintensität Rechnung zu tragen.)

kindlicher Faktor	Ort der Expression	Verglichene Kategorien	Mann-Whitney-U Test
Nackentransparenz	Homogenität der Mikrovilli der großen Zotte	gar keine und 100% Homogenität	0.032
	(nur lebende Kinder)	66-99% und 100% Homogenität	0.042
	Intensität im Zytotrophoblasten der kleinen Zotte	gar nicht und mittel intensiv	0.032
	Summe der Intensität im Synzytiotrophoblasten (große Zotte plus kleine Zotte)	Summe 1 und 3	0.034
		Summe 0 und 3	0.009
	Summe der Intensität im Zytotrophoblasten (große Zotte plus kleine Zotte)	Summe 0 und 3	0.000
		Summe 1 und 3	0.000
		Summe 2 und 3	0.046
	Summe der Mikrovillisaumdicken (große Zotte plus kleine Zotte)	Summe 0 und 4	0.033
		Summe 2 und 4	0.029

Tabelle 7: Signifikanzen Nackentransparenz

Im Qui-Quadrat Test ergaben sich auch jeweils Signifikanzen für die Intensität im Synzytiotrophoblasten sowie im Stroma der großen Zotten und für die Intensität im Zytotrophoblasten der kleinen Zotten. Diese ließen sich aber im Mann-Whitney-U Test nicht reproduzieren, so dass diese Ergebnisse in die Endbewertung für die Nackentransparenz nicht eingegangen sind.

### 3.5.3 Ausgang, Karyotyp

Bei der Auswertung der Ergebnisse des Qui-Quadrat und des Mann-Whitney-U Tests fiel auf, dass, sowohl beim Ausgang als auch beim Karyotyp (mit den Kategorien auffällig und unauffällig), nur kleine Zotten ausschlaggebend waren. Je höher die Intensität der immunhistochemischen Färbung, desto größer war die Wahrscheinlichkeit auf ein lebend geborenes Kind, bzw. ein Kind mit einem unauffälligen Chromosomensatz. 4 Signifikanzen bestätigten die Hypothese, wobei durch keinen Test eine widersprüchliche Signifikanz gefunden werden konnte.

kindlicher Faktor	Ort der Expression	Verglichene Kategorien	Mann-Whitney-U Test
lebende Kinder	Intensität der Mikrovilli der kleinen Zotte	gar nicht und mittel intensiv	0.048
		schwach und mittel intensiv	0.015
		schwach und stark intensiv	0.011
normaler Karyotyp	Intensität im Zytotrophoblast der kleinen Zotte	gar nicht und schwach	0.024

Tabelle 8: Signifikanzen Ausgang und Karyotyp

### 3.5.4 Customised centiles

Für die Berechnung der angeglichenen Perzentilen haben wir, über die Berechnung mit den fortlaufenden Perzentilenzahlen hinaus, zwei weitere Abstufungen gebildet, die von klinischer Bedeutung sind.

1. cc3:

1 = alle Kinder < 3. Perzentile

2 = alle Kinder zwischen der 30. und 70. Perzentile

3 = alle Kinder > 97. Perzentile

0 = alle Kinder, die in keine dieser Kategorien passen

2. *cc10*:

1 = alle Kinder &lt; 10. Perzentile

2 = alle Kinder zwischen der 30. und 70. Perzentile

3 = alle Kinder &gt; 90. Perzentile

0 = alle Kinder, die in keine dieser Kategorien passen

Diese neuen Kategorien wiederum wurden in die Berechnung mit dem Gesamtkollektiv und mit dem selektierten Kollektiv aus nur lebend geborenen Kindern miteinbezogen. Die Syndecanexpression der großen Zotten scheint über der Bedeutung der kleinen Zotten zu liegen, wenn man die angeglichenen Perzentilen betrachtet. Nur die Berechnung der Intensitäten und Homogenitäten der großen Zotten zeigten, neben den Differenzen der Intensitäten (Wert der großen Zotte minus Wert der kleinen Zotte), in den Bereichen der Mikrovilli und des Synzytiotrophoblasten signifikante Ergebnisse bei der Korrelation. Höheren angeglichenen Perzentilen konnten, nach Betrachtung aller Ergebnisse, niedrigere Intensitäten bzw. Homogenitäten zugeordnet werden.

kindlicher Faktor	Ort der Expression	Verglichene Kategorien	Mann-Whitney-U Test
<b>cc3</b>	Intensität der Mikrovilli der großen Zotte	gar nicht und mittel intensiv	0.023
	Homogenität der Mikrovilli der großen Zotten	>97. Perzentile und Kategorie 0	0.020
		gar nicht und 100% homogen	0.038
	Homogenität der Mikrovilli der großen Zotten (nur lebende Kinder)	>97. Perzentile und Kategorie 0	0.022
gar nicht und 100% homogen		0.047	
<b>cc10</b>	Differenz der Intensität im Synzytiotrophoblasten (große-kleine Zotte)	mehr Intensität bei <10. als bei 30.-70. Perzentile	0.019
	Differenz der Intensität im Synzytiotrophoblasten (große-kleine Zotte) (nur lebende Kinder)	mehr Intensität bei <10. als bei 30.-70. Perzentile	0.011

Tabelle 9: Signifikanzen customised centiles

Die folgenden Abbildungen machen einige der o. g. Korrelationen bildlich deutlich:

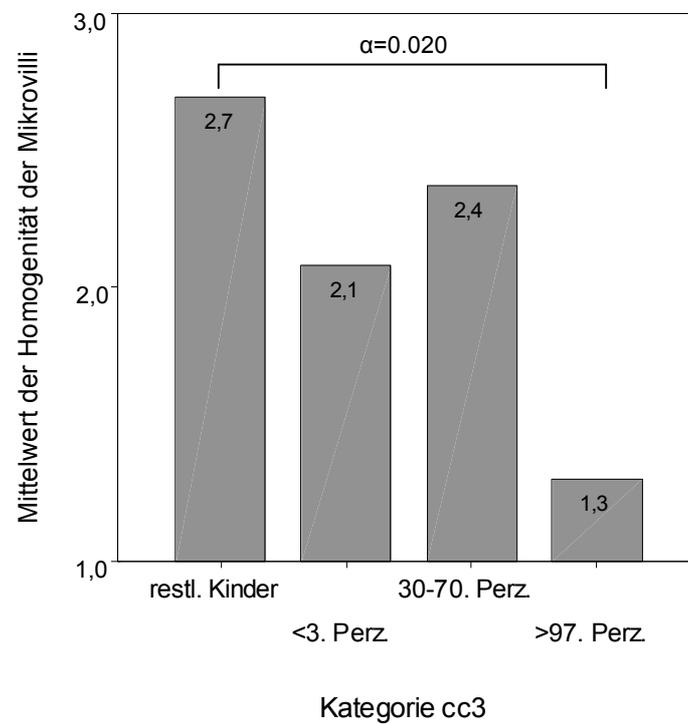


Abbildung 21: Homogenität der Mikrovilli und customised centiles

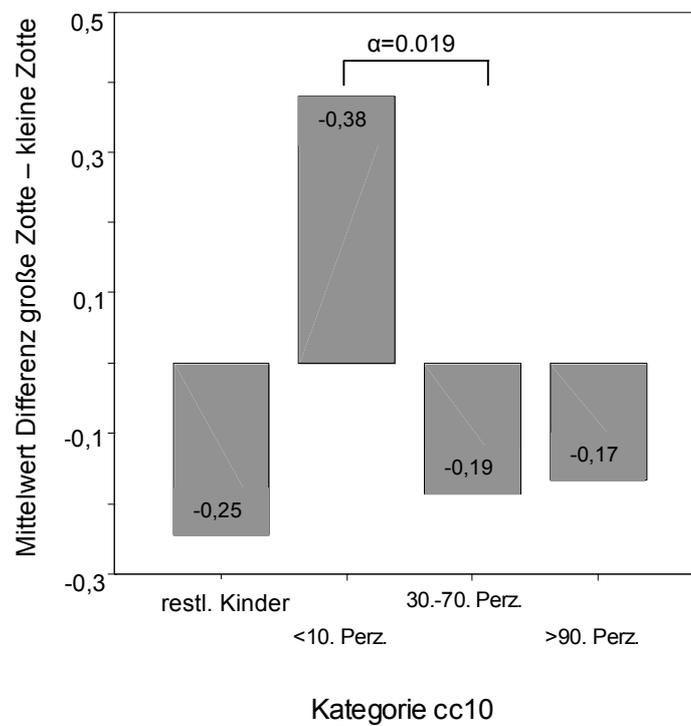


Abbildung 22: Differenzen im Synzytiotrophoblasten und customised centiles

Nur in einem Fall ergab sich für die Intensität des Synzytiotrophoblasten in der großen Zotte (Betrachtung der nur lebend geborenen Kinder) eine Signifikanz im Mann-Whitney-U Test von 0.039, die als Interpretation die Aussage zuließ, dass mehr Intensität zu höheren Perzentilen führt.

### 3.5.5 Schwangerschaftsalter

Um das Risiko einer Frühgeburtlichkeit in Bezug auf die Syndecan-1 Expression besser abschätzen zu können, haben wir auch für das erreichte Schwangerschaftsalter, neben den fortlaufenden Tagen und Wochen, Kategorien gebildet, die frühgeborene Kinder, übertragene Kinder und Kinder zusammenfasst, die zum regelrechten Termin zur Welt kamen. Des Weiteren wurde eine Gruppe gebildet, die alle Kinder beinhaltet, die im Zeitraum des *worst pregnancy outcome* geboren wurden. Diese Gruppe wurde definiert als Schwangerschaftsdauer < 25. Schwangerschaftswoche p.m.

#### 1. SSD1:

- 1 = 25. - 37. SSW p.m.
- 2 = 37. - 39. SSW p.m.
- 3 = 39. - 42. SSW p.m.
- 4 = >42. SSW p.m.
- 5 = worst pregnancy outcome <25.SSW p.m.

#### 2. SSD2:

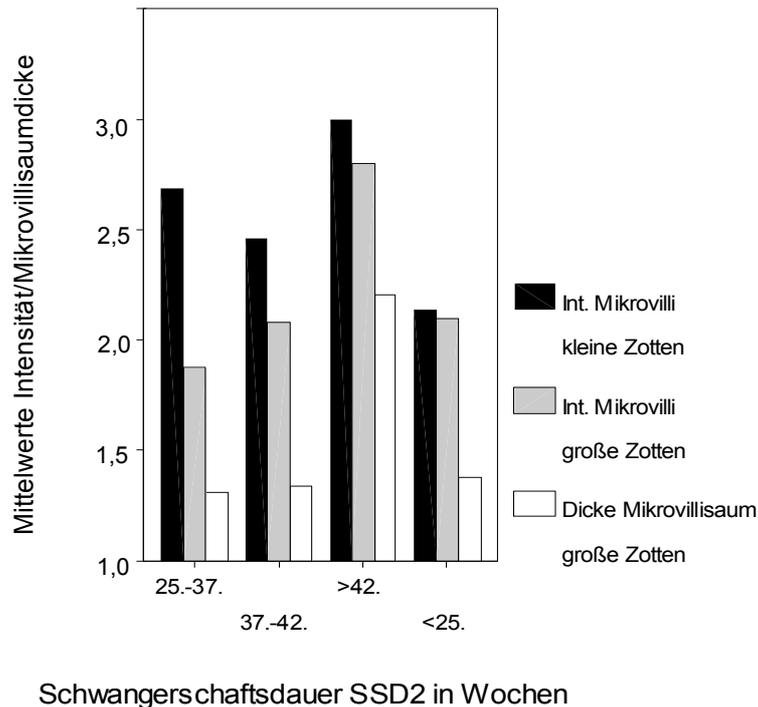
- 1 = 25. - 37. SSW p.m.
- 2 = 37. - 42. SSW p.m.
- 3 = >42. SSW p.m.
- 4 = worst pregnancy outcome <25. SSW p.m.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse muss man zu dem Schluss kommen, dass eine höhere Intensität oder Homogenität der Syndecanexpression eine längere Schwangerschaftsdauer erwarten lässt. Allerdings legen die Signifikanzen ebenfalls nahe, dass eine hohe Intensität auch in der Gruppe des *worst pregnancy outcome* gehäuft vorkommt.

Kindlicher Faktor	Ort der Expression	Verglichene Kategorien	Mann-Whitney-U Test
Schwangerschaftsdauer	Homogenität der Mikrovilli der großen Zotten	gar keine und 34-66% Homogenität	0.018
	Homogenität der Mikrovilli der großen Zotten (nur lebende Kinder)	gar keine und 34-66% Homogenität	0.007
SSD1	Intensität im Synzytiotrophoblasten der kleinen Zotte	gar nicht und mittel intensiv	0.027
		schwach und mittel intensiv	0.047
SSD2	Dicke des Mikrovillisaumes bei großer Zotte (nur lebende Kinder)	gar kein und schmaler Saum	0.030
	Intensität der Mikrovilli der großen Zotte (nur lebende Kinder)	gar nicht und stark intensiv	0.047
	Intensität der Mikrovilli der kleinen Zotte	schwach und stark intensiv	0.014
		25.-37.SSW mehr Intensität als <25.SSW	0.031

**Tabelle 10: Signifikanzen Schwangerschaftsdauer**

Die folgende Abbildung macht deutlich, dass bei zunehmender Schwangerschaftsdauer, die Intensität bzw. die Dicke des Mikrovillisaumes stetig zunimmt, betrachtet man die Kategorie SSD2. Die Angaben für die großen Zotten beziehen sich auf das Kollektiv der nur lebend geborenen Kinder. Interessant ist die auch relativ hohe Intensität bzw. Mikrovillisaumdicke der Kinder, die im Zeitraum des worst pregnancy outcome, d.h. < 25.SSW geboren wurden.



**Abbildung 23: zunehmende Intensitäten bzw. Mikrovillisaumdicken bei steigender Schwangerschaftsdauer**

Die Intensität im Synzytiotrophoblasten der kleinen Zotten zwischen den Kategorien gar keine und schwache Intensität sagt mit einer Signifikanz von 0.035 im Mann-Whitney-U Test aus, dass eine niedrigere Intensität zu einer längeren Schwangerschaftsdauer führt (Berechnung mit selektiertem Kollektiv der nur lebend geborenen Kinder). Dies findet sich auch bei der SSD1 Abstufung, bei der die Intensität im Synzytiotrophoblasten der kleinen Chorionzotten zwischen dem Schwangerschaftsalter <25. SSW p.m. stärker ist, als die in der 39.-42. SSW p.m. ( $\alpha=0.038$ ), bzw. in der 37.-39. SSW ( $\alpha=0.023$ ).

### 3.5.6 Gewicht des Neugeborenen, Geschlecht

Der Mann-Whitney-U Test und der Qui-Quadrat Test zeigten keine Korrelation zwischen der Syndecan-1 Expression und dem Gewicht des Neugeborenen bei Geburt bzw. dem Geschlecht des Kindes.

## 4 Diskussion

### 4.1 Kritische Betrachtung von Material und Methode

#### 4.1.1 Patientinnenkollektiv und Datenerhebung

Das Kollektiv der Patientinnen, welches sich für die Studie zusammensetzt, entstand aus Frauen, die aufgrund von sonographischen Auffälligkeiten während der Schwangerschaft, fortgeschrittenen Alters, familiärer genetischer Belastung oder Fehlbildungsangst, die pränataldiagnostische Abteilung der Universitätsfrauenklinik aufsuchte und nach eingehender Beratung und Untersuchung eine Chorionzottenbiopsie durchführen ließen. Einerseits zwingt dies zu der Annahme, dass es sich bei diesem Studienkollektiv um ein Risikokollektiv handelt, andererseits ergibt dies daraus die ethische Verantwortlichkeit für diese Studie. Zu Studienzwecken wurde somit nur Material von Chorionzottenbiopsien verwendet, die auch medizinisch indiziert waren. Keiner Mutter wurde das zusätzliche Risiko einer invasiven Diagnostik ohne Indikation zugemutet und darüber hinaus wurde auch kein zusätzliches Material während der Biopsien entnommen, wodurch sich das Abortrisiko eventuell erhöht hätte. Es wurden ausschließlich solche Gewebeproben untersucht, die zur diagnostischen Untersuchung als überschüssiges Material nicht benötigt wurden. Dabei stellt sich allerdings das Problem, dass einige Präparate nicht die gewünschte Qualität erreichten, wenn nur Dezidua oder keine repräsentative Menge an Chorionzotten in den Gewebeschnitten aufzufinden waren. Dieser Nachteil wurde im Rahmen dieser Studie zu Gunsten der Patientinnen in Kauf genommen.

Da die Auswertung der Studienergebnisse auf der Grundlage eines Risikokollektiv stattgefunden hat, ließ sich in unserem Falle nicht verhindern. Sicherlich ist in einem Risikokollektiv von mehr Schwangerschaftskomplikationen und kindlichen Erkrankungen auszugehen. Die grundsätzliche Analyse der Kollektivdaten ergibt aber Ergebnisse, die einer statistisch repräsentativen Gruppe entsprechen würde.

Die Daten, die zur Auswertung herangezogen wurden, erhielten wir aus der PIA-Fetal Database der Universitätsfrauenklinik Münster. Darin enthalten sind alle Angaben zur Anamnese der Patientin sowie sämtliche Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen. Außerdem erhielten die Patientinnen einen Fragebogen, worin alle weiteren Informationen zum Schwangerschaftsverlauf und zur Geburt, sowie zum kindlichen Outcome festgehalten werden sollten, sofern die Patientin die Schwangerschaftsbetreuung und Geburt nicht in der Universitätsfrauenklinik

durchführen ließ. Nachteilig zu diesem Verfahren ist, dass die Angaben in diesen Fragebögen eventuell lückenhaft waren, oder inkorrekt sein könnten.

Bei einer Kollektivgröße von 203 ausgewerteten Gewebeschnitten ist es unwahrscheinlich, dass keine der zugehörigen Patientinnen an einer Präeklampsie oder einem Gestationsdiabetes erkrankt ist. Im Durchschnitt erkrankten 7% aller Frauen während einer Schwangerschaft an einem Gestationsdiabetes und 2 - 8% an einer Präeklampsie [1] [41] [48] [109]. In einem Riskiokollektiv könnte man eher von noch höheren Zahlen ausgehen. Leider finden sich in unseren Daten keine Informationen über das eventuelle Auftreten dieser Erkrankungen. Obwohl das Outcome der Kinder in den meisten Fällen direkt über den Frauenfacharzt oder die Entbindungsklinik gemeldet wurde, fehlen die Information über maternale Schwangerschaftskomplikationen. Angaben dazu wären wünschenswert gewesen, um die Aussagen, die aus dieser Studie gezogen werden können, auch hinsichtlich des Gestationsbiabetes und der Präeklampsie zu komplettieren. Zukünftige, ähnliche Studiendesigns sollten auf die Erhebung dieser Daten Wert legen, da es derzeit noch keinen zufrieden stellenden Test zur Früherkennung dieser Erkrankungen gibt und schon vorherige Studien einen Zusammenhang zwischen Präeklampsie und der Syndecan-1 Expression aufzeigen konnten [68] [67] (siehe Einleitung).

#### **4.1.2 Probengewinnung**

Die Chorionzotten wurden, nur nach medizinischer Indikation, durch einen erfahrenen Operateur entnommen, so dass hier eine gute Entnahmetechnik und ein guter Erhalt der Chorionzotten gewährleistet waren. Bei jeder Entnahme wurde auf ein etabliertes Verfahren zurückgegriffen, entweder in transzerviakler oder transabdominaler Technik. Somit konnte für alle Zotten ein standardisiertes Entnahmeverfahren etabliert und konstante Bedingungen geschaffen werden. Darüber hinaus konnte ein bis auf wenige Stunden variierender Zeitplan eingehalten werden, der garantierte, dass alle Gewebeproben annähernd gleiche Bedingungen bei den weiteren Verarbeitungen erfuhren.

#### **4.1.3 Immunhistochemische Färbung und Auswertung**

Bei der Verarbeitung der Gewebeproben (Fixierung und immunhistochemische Färbung) konnte ebenfalls ein bis auf wenige Stunden variierender Zeitplan eingehalten werden, der für alle Chorionzotten annähernd identische Färbebedingungen garantierte.

Die verwandte Fixierung durch Formalin, aufsteigende Alkoholreihen und Einbettung in Histowachs, sowie die immunhistochemische Färbung mit dem Maus-Anti-CD138 (MCA681) aus dem Klon B-B4 von SEROTEC sind in der gängigen Literatur als standardisierte Verfahren anerkannt und reproduzierbar [67] [68].

In dieser Studie wurde angenommen, dass ein mikroskopischer Bildausschnitt repräsentativ ist für das gesamte Präparat. Die Meinungen dazu gehen in der Fachwelt aber auseinander. Kaufmann et. al. gehen davon aus, dass die Plazenta funktionell heterogen ist, wobei Zottenbäume mit Wachstumszonen parallel neben solchen mit endokrin aktiven und auf transplazentaren Transport spezialisierten Bereichen existieren. Somit würde auch das Problem der gleichzeitigen Notwendigkeit des Wachstums und Funktionsfähigkeit der Plazenta gelöst sein. Eine Homogenität, welche wir als gegeben voraussetzten, wäre damit nicht existent [69].

Obwohl die immunhistochemische Färbung weltweit verbreitet und viel genutzt wird, fehlt noch immer eine standardisierte Auswertung. Viele der unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur beruhen auf Diskrepanzen in der Fixierung des Gewebes und der Färbetechnik, vor allem aber darauf, dass keine einheitliche Methode zur Auswertung der Färbung zur Verfügung steht. Das Problem der Interpretation liegt im Besonderen darin, dass schwer zu definieren ist, wodurch sich ein Ergebnis als positiv qualifiziert. Es wird gefordert, die Auswertung sowohl auf mikroanatomische Strukturen zu beziehen, als auch Intensitäten, Anteile an positiver Färbung und „cutoff-levels“ zu bestimmen. Die visuelle Auswertung von immunhistochemischen Präparaten wird in der Fachwelt oft beschrieben und ist als auswertende Methode anerkannt. Unterschiedliche Beurteilungen durch unterschiedliche Beobachter können aber nie ganz vermieden werden [108]. In unserer Studie war nur in wenigen Fällen keine einheitliche Übereinstimmung zwischen den 3 Beobachtern gegeben, so dass von reproduzierbaren Ergebnissen ausgegangen werden kann. Zwar wird eine Definition von positiven Anteilen innerhalb der Präparate und von Intensitäten gefordert, nachteilig ist dennoch, dass keine fortlaufende Beurteilung der Präparate erfolgen kann. Sie können lediglich in grobe Kategorien wie „gar nicht“, „mittel“, „stark“ gefärbt eingeteilt werden. Auf eine computergestützte Analyse wurde in dieser Studie wegen der Inhomogenität der Färbeareale und damit verbundenen Schwierigkeiten in der Auswertung von z.B. prozentualer Expression verzichtet. Arbeiten derselben Arbeitsgruppe haben reproduzierbar gezeigt, dass die Ergebnisse beider Auswertungsverfahren auf hochsignifikantem Niveau miteinander korrelieren. [119] [120]

Die Auswertung der Studie war zu jedem Zeitpunkt geblindet, da weder bei der Färbung der Präparate noch bei der Beurteilung derselben, den beteiligten Personen

---

Angaben zu Patientin oder Schwangerschaft bekannt waren. Erst zur Korrelation der Zottenanalyse mit den Patientinnendaten wurden die Daten zusammengeführt.

## **4.2 plazentare Syndecan-1 Expression**

Bei der lichtmikroskopischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung fiel vor allem die Inhomogenität der Färbung innerhalb der Zotten, aber auch innerhalb eines Präparates auf. Eine fehlerhafte Färbung konnte durch das Auftreten der Inhomogenität in allen Gewebeproben ausgeschlossen werden. In der internationalen Literatur findet man lediglich drei Arbeiten, die die Syndecan-1 Expression in Chorionzotten deskriptiv beschreiben. Jokimaa hat eine Inhomogenität nicht beschrieben. In den dortigen Untersuchungen kam es zu einer homogenen Anfärbung [67] [68]. Crescimanno allerdings berichtet ebenfalls von einer inhomogenen Anfärbung des Synzytiotrophoblasten, die bei Störungen im Bereich des Trophoblasten wie einer Molenschwangerschaft, stärker ausgeprägt ist, als bei einer normaler Plazenta [32]. Dieser Zusammenhang konnte aufgrund fehlender Molenschwangerschaften oder Trophoblasterkrankungen in unserem Kollektiv im Rahmen dieser Studie nicht untersucht werden, stellt aber einen interessanten Aspekt dar. Die restriktive Anfärbung des apikalen Synzytiotrophoblasten, die in allen drei genannten Studien beschrieben und den Transportaufgaben und der Rezeptoraktivität des Trophoblasten zugeordnet wird, kann in unserer Studie nicht bestätigt werden. Wir beobachteten vor allem eine intensive Anfärbung der Mikrovilli der Chorionzotten mit absteigender Färbungsintensität über den Synzytiotrophoblasten, Zytotrophoblasten bis hin zum Stroma. Eine Fehlinterpretation ist im Bereich der Mikrovilli ausgeschlossen, war die Färbung dafür zu intensiv. Auch eine Fehlinterpretation der angefärbten Zytotrophoblasten ist unwahrscheinlich, war das Kompartiment in der überwiegenden Anzahl der Fälle doch klar von den angrenzenden Synzytiotrophoblasten und dem Stroma abzugrenzen und es zeigte sich eine klare positive immunhistochemische Färbung. Ob tatsächlich eine Färbung im Bereich des Stromas vorgelegen hat oder nicht, spielt im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Studie vorrangig nur eine rein deskriptive Rolle, da sich durch die statistische Auswertung in diesem Kompartiment keine Signifikanzen ergaben, so dass die Feststellung einer Syndecanexpression im Bereich des Stromas hier nicht von vorrangiger Bedeutung ist. Allerdings wurde auch schon in einer anderen Studie von einer fraglichen stromalen Syndecan-Expression im Bereich der Haarfollikel berichtet. Diese wurde als Anfärbung der Fibroblasten interpretiert, welche ebenfalls durch andere Autoren als Syndecan-1-positiv beschrieben wurden [10].

Ob der Synzytiotrophoblasten nur streng apikal Syndecan-1 exprimiert, kann durch uns nicht ausgesagt werden, da dieses morphologische Merkmal nicht in unserem

Interesse lag und somit nicht untersucht wurde. Dass sich die Syndecan Expression allerdings innerhalb der Zotte auf das Kompartiment des Synzytiotrophoblasten beschränken soll, wie bisher in der internationalen Literatur beschrieben, können wir nicht bestätigen. Eine Syndecan-1 Expression im Bereich der Mikrovilli erscheint uns gerade im Hinblick auf Transportmechanismen und Rezeptoraktivitäten plausibel, ist doch die Oberfläche der Mikrovilli um ein vielfaches größer als die des Synzytiotrophoblasten und wäre damit die Arbeitskapazität enorm gesteigert. Die Fallzahlen der aufgeführten Studien lagen zwischen 29 und 53 Plazenten, so dass wir mit 203 untersuchten Gewebeschnitten zuverlässigere Ergebnisse erwarten dürften. Erstmals wurde im Rahmen unserer Studie eine Unterscheidung zwischen großen und kleinen Zotten durchgeführt. Eine solche Differenzierung wurde bislang in der gängigen Literatur nicht vorgenommen. Die signifikant intensivere und homogenere Färbung der kleineren Chorionzotten zeigt jedoch, dass eine differenzierte Betrachtung der kleinen und großen Zotten nicht nur interessant, sondern auch zwingend notwendig ist, will man die Syndecanexpression in Zusammenhang zu anderen Faktoren setzen. Eine Vereinheitlichung aller Zotten führt nach unseren Ergebnissen in der statistischen Auswertung zu inkorrekten Korrelationen, durch einen konstanten Bias. In proliferierendem Zytotrophoblast ist Syndecan-1 von Jokimaa et al. zwar nicht nachgewiesen worden, dafür aber in sich Differenzierendem [68]. Geht man von großem Differenzierungspotential in kleinen Zotten aus, genügt diese Aussage, um den Sachverhalt zu erklären. Auch in anagenen (wachsenden) Haarfollikeln ist Syndecan-1 gefunden worden. In ruhenden und sich zurückbildenden Haarfollikeln verlor sich die Syndecan-1 Expression immer mehr. Dieses Phänomen wird auf morphologische Veränderungen und Zelldifferenzierung zurückgeführt, indem Syndecan1 durch Bindung von Wachstumsfaktoren Wachstum induzieren und unterstützen kann [10]. Dasselbe Prinzip lässt sich auch auf unsere Beobachtung im Rahmen der kleinen Chorionzotten übertragen.

### **4.3 Syndecan-1 als prädiktiver Faktor für das Schwangerschaftsoutcome**

Da Syndecan-1 nicht abhängig vom Schwangerschaftsalter exprimiert wird, wie auch schon Jokimaa et al. belegt, können die nicht alle zum gleichen Zeitpunkt entnommenen Chorionzottenbiopsien mit den verschiedenen mütterlichen und kindlichen Faktoren in Beziehung gesetzt werden. Eine Vergleichbarkeit wäre ansonsten durch einen zu starken Bias in jeder Berechnung nicht mehr gegeben gewesen. Bislang existieren in der Literatur nur wenig Aussagen über die plazentare Syndecan-1 Expression und ihren Bezug zur Schwangerschaft. Es gibt wenige Beschreibungen zu den möglichen, bislang aber im Detail ungeklärten, Funktionen des Syndecan-1 in der Plazenta und in der Schwangerschaft (siehe Einleitung). Zusammenhänge der Syndecan-1 Expression in Korrelation zu schwangerschafts-assoziierten Erkrankungen bzw. dem kindlichen Outcome wurden aber bisher nur von Jokimaa et al. hergestellt [68] [67]. In der Studie von 2000 stand vor allem die Präeklampsie im Mittelpunkt des Interesses. Daneben wurden Plazenten von spontanen Aborten und wachstumsretardierten Kindern untersucht, wobei Plazenten von präeklampsischen Patientinnen weniger Syndecan-1 aufwiesen. Die von wachstumsretardierten Kindern zeigten allerdings keine Unterschiede zu Plazenten normal großer Kinder. Die Fallzahlen mit 29 und 30 untersuchten Gewebeproben waren in beiden Studien ähnlich niedrig. Unsere Gesamtzahl von 203 Plazenten lässt dabei verlässlichere Ergebnisse erwarten. Darüber hinaus wurde in keiner der genannten Studien eine Unterscheidung zwischen großen und kleinen Zotten vorgenommen. Unsere Studie legt aber nahe, dass eine solche Differenzierung zwingend notwendig und von signifikanten Unterschieden begleitet ist.

#### **4.3.1 Syndecan und mütterliche Faktoren**

##### **Nikotin**

Der Rauch von Zigaretten enthält neben Nikotin auch noch ca. 4000 andere potentiell schädliche Substanzen, von denen vor allem das Carbomonoxid durch seine Hypoxie fördernden Eigenschaften bekannt ist [34]. Da aber das Nikotin, als einer der mutagenen und karzinogenen Hauptstoffe [75] des Zigarettenrauches in der Literatur von vorrangigem Interesse ist, beschränken wir uns hier auf diese Substanz. Auch wenn Nikotin allein nicht für die von uns beschriebenen Veränderungen der Syndecan-1 Expression verantwortlich sein muss, wird es doch einen Hauptanteil daran haben.

Nikotin ist ein lipidlösliches Molekül, das wie alle lipidlöslichen Stoffe, die die Plazentaschranke überwinden [66] [62] [34] und dadurch multiple, für eine regelrechte fetale Entwicklung notwendige Funktionen, negativ beeinflussen kann. Die genauen Mechanismen der nikotinassoziierten pränatalen Zell- und Gewebeschädigung sind noch nicht im Speziellen bekannt. Dass Nikotin aber zur kindlichen Entwicklungs- [135] und Wachstumsstörung [70] [121] [104] [23], zu einem erhöhten Risiko für eine Frühgeburt [29, 80], einem vorzeitigen Blasensprung, einer Plazenta praevia, einer erhöhten perinatalen Mortalität, dem Sudden Infant Death Syndrom [104], sowie später zur Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), geringerem IQ und in der Adoleszenz zur eigenen Abhängigkeitssymptomatik führen kann [27, 62, 75] ist allgemein bekannt. Über mögliche plazentare morphologische Korrelate, die durch Nikotinkonsum hervorgerufen werden, gibt es widersprüchliche Aussagen [22]. Mochizuki et al. und Vogt Isaksen beschreiben die Plazenten rauchender Mütter als leichter, mit atrophischen Zotten und einer reduzierten Vasuklarisierung [129] [85] [86]. Andere Autoren berichten über eine vergrößerte Plazenta, ein vermindertes Volumen der fetalen Kapillaren mit erhöhter kapillärer Fragilität und reduzierter Länge, über eine verdickte trophoblastäre Zottenmembran [22], sowie über die isolierte Zellvergrößerung einiger Zelltypen [34], einschließlich der Trophoblasten [55]. Keine dieser Aussagen wird in der Literatur jedoch von allen Autoren anerkannt. Wodurch diese Veränderungen hervorgerufen werden ist unklar, eine mögliche Erklärung ist jedoch eine Aktivierung der mütterlichen nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR), was in einer vermehrten Ausschüttung von Katecholaminen resultiert und eine Vasokonstriktion und damit einen reduzierten plazentaren Blutfluss hervorrufen kann, was letzten Endes zu einer fetalen Hypoxie führt. Durch die Möglichkeit der Penetration der Plazentaschranke kann Nikotin aber auch die fetalen nAChR aktivieren und somit direkt auf den Feten Einfluss nehmen [62]. Lips und Brüggmann beschrieben erstmals das Vorhandensein von nAChR in der Plazenta selbst, unter anderem im Zyto- und Synzytiotrophoblast. ACh übernimmt in der Plazenta multiple Funktionen wie z.B. die Kontrolle des Aminosäuretransportes zwischen Mutter und Kind [75], durch Verminderung des Austausches [34]. Die morphologischen Veränderungen können damit auf Kompensationsversuche der Plazenta oder auf Maldeformation des Gewebes durch hypoxische oder malnutritive Schädigung zurückgeführt werden. Jauniaux und Gulbis führen die erhöhten Aktivitäten der Plasmaamylase und die reduzierten fetalen Plasma-Aminosäure-Niveaus durch mütterlichen Nikotinkonsum als mögliche Erklärung der irreversiblen Schädigung plazentarer Funktionen an [66]. Darüber hinaus gilt Nikotin als proangiogenetischer Faktor durch Stimulation endothelialer Zellen. Eine strenge Regulation der Angiogenese ist aber für die korrekte

Entwicklung der Plazenta von maßgeblicher Bedeutung, so dass ein Störfaktor wie Nikotin, zu einer insuffizienten Leistung der Plazenta führen [75] und oben genannte Vaskularisierungsstörungen mitverantworten kann.

Nicht nur die Plazenta zeigt strukturelle Veränderungen durch Nikotinabusus, auch bei fetalen Lungen wurden Änderungen im Zellverband, Hyperplasien in den muskulären Membranen und vermehrte Apoptosen beschrieben [34]. Diese Aspekte, aber auch die, von Fang et al. nachgewiesene abnehmende Zellproliferation, die Inhibierung der Kollagensynthese (Ramp et. al) und die erhöhte Apoptoserate unter Nikotineinfluss [47] [83] [98], sind vor allem im Zusammenhang mit den Funktionen des Syndecan-1 von besonderem Interesse. Die Frage nach den nikotinassoziierter Proliferationsförderung oder –hemmung wird in der Literatur mit unterschiedlichen Angaben beantwortet. Fang et al. zeigten eine verminderte Proliferationsfähigkeit von Osteoblasten-ähnlichen Zellen unter Nikotineinfluss, auch die Inhibierung der Proliferation und Differenzierung von human umbilical vein endothelial cells, v.a. durch Induzierung von Apoptose, wurde beschrieben [133]. Andere Autoren berichten über nikotininduzierte Zellproliferation [36] und über eine Störung der Balance zwischen Proliferation und Differenzierung des Zytotrophoblasten. Unter Nikotinexposition exprimiert der Zytotrophoblast z.B. vermehrt das von-Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein [52].

Lain et al. zeigten, dass Zelladhäsionsmoleküle wie das Intracellular Adhesion Molecule 1 (ICAM 1), das von Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten exprimiert wird, bei rauchenden Müttern erhöhte Blutspiegel aufweisen. ICAM 1 fördert die Adhäsion von Monozyten, Lymphozyten und Neutrophilen an endotheliale Zellen. E-selectin hingegen zeigte in dieser Studie verminderte Blutspiegel, wodurch die Zellbindung von endothelialen Zellen an Thrombozyten und Leukozyten gehemmt wird [74].

In der gängigen Literatur gibt es keine Angaben zu Nikotin im Zusammenhang mit Syndecan-1. Unsere Studie legt erstmalig den Schluss nahe, dass Nikotin einen negativen Einfluss auf die Syndecan-1 Expression im Bereich des Zytotrophoblasten der großen Zotten ausübt. Hohe Signifikanzniveaus von  $\alpha=0.007$  und  $\alpha=0.003$  im Mann-Whitney-U Test belegen diese Aussage, bei durchaus verlässlichen Kollektivgrößen von 159 Nichtraucherinnen und 37 Raucherinnen. Einen Bias lässt sich bis auf die eventuell falschen Angaben zum Rauchverhalten durch die Patientin weitgehend ausschließen.

Die Ursachen für die verminderte Syndecan Expression bei rauchenden Müttern in den Zytotrophoblasten können durch uns nicht sicher dargestellt werden. Ein vermehrtes plazentares Shedding von Syndecan-1 könnte in Frage kommen. Eine Blutanalyse auf Syndecan-1 von rauchenden und nicht rauchenden Schwangeren könnte hier

Aufschluss geben. Im Rahmen der Blutspiegelbestimmung auf ICAM 1 wurde, zum Ausschluss eines plazentaren Sheddings, eine immunhistochemische Analyse der Plazenten auf ICAM 1 vorgenommen. Dort zeigten sich gleiche Expressionsraten für ICAM 1, so dass dort ein unterschiedliches plazentares Shedding ausgeschlossen werden konnte. Der genaue Ursachenmechanismus kann im Rahmen dieser Studie nicht eruiert werden, die alleinige Beobachtung der verminderten Syndecan-1 Expression unter Nikotineinfluss ist aber äußerst interessant, bedenkt man die multiplen Überschneidungen der Funktionen von Syndecan-1 und der Beeinflussung von Nikotin, wie Proliferation, Zellverbände und Angiogenese. Auch die Beschreibung von nAChR innerhalb der Plazenta, die einen direkten Einfluss von Nikotin auf den Zytotrophoblasten ermöglicht, erscheint von großer Bedeutung. Folgende Studien sollten Wert auf eine intensive Beobachtung des Zytotrophoblasten unter Nikotineinfluss legen, auch um die noch immer ungeklärten Mechanismen der nikotininduzierten Schwangerschaftskomplikationen ein Stück weiter aufzuklären.

### **Größe**

Ein Zusammenhang zwischen der menschlichen Größe und einer Syndecan-1 Expression im humanen Gewebe ist bislang in der Literatur noch nicht beschrieben. Nach unseren Berechnungen im Mann-Whitney-U Test lässt sich die mütterliche Größe allerdings mit der Syndecan-1 Expression korrelieren. Die Mikrovilli der großen Zotte, sowie der Zytotrophoblast der kleinen Zotten zeigen mehr Intensität bei größeren Müttern. Legt man die Tatsache zugrunde, dass Kinder größerer Eltern ebenfalls ein größeres Wachstumspotential innehaben, als Kinder kleiner Eltern und bedenkt man außerdem, dass die Größe des Kindes generell eher von der Größe der Mutter beeinflusst wird, als von der des Vaters [20], so könnte die vermehrte Syndecanexpression in der Plazenta schon intrauterin die besseren Wachstumsbedingungen durch Proliferationsfähigkeit und Bindung von Wachstumsfaktoren verdeutlichen [32] [13] [107] [10]. Auch die vermutliche Aufgabe von Syndecan-1 bei der fetalen Ernährung durch Internalisierung von Lipoproteinen [68] passt in dieses Konzept. Stellt diese Aussage zwar einen interessanten und bislang unbekanntem Zusammenhang zwischen der Syndecan-1 Expression in der Plazenta und der Größe der Mutter dar, so ist dieser Sachverhalt doch eher von geringem klinischem Interesse und stellt somit keinen zwingenden Bedarf zur weiteren Abklärung in späteren Studien dar.

### 4.3.2 Syndecan und kindliche Faktoren

#### pränatal sonographisch und postnatal erhobene Parameter

Vor allem die kleinen Zotten zeigen in den Kompartimenten des Mikrovillisaumes und des Zytotrophoblasten einen Zusammenhang zwischen höheren Maßzahlen all dieser Parameter und einer vermehrten Syndecanexpression. Eine längere Femurlänge, Scheitel-Steiß-Länge, ein größerer biparietaler Durchmesser, sowie Kopfumfang und postnatale Länge des Kindes gehen mit einer vermehrten Syndecan-1 Intensität einher. Bei großen Zotten zeigt sich dieser Zusammenhang durch einen dickeren Mikrovillisaum bei längerer Femurlänge etc. Hier könnte ebenfalls Syndecan-1 als Proliferations- und Ernährungsförderer eine Rolle spielen. Die Bindung von Wachstumsfaktoren durch Syndecan-1 kann hier ebenso von Bedeutung sein [32] [13] [107] [10]. Warum bei dieser Korrelation vor allem die kleinen Zotten ausschlaggebend zu sein scheinen, ist derzeit unklar. Bislang gibt es keine weitere Studie, die in diesem Zusammenhang eine Untersuchung beschreibt, so dass unsere Ergebnisse nicht vergleichbar sind. Die vermehrte Syndecanexpression bei den pränatal sonographisch erhobenen Parametern könnte ein indirekter Hinweis auf die gute Versorgung des Kindes mit Wachstumsfaktoren und Proliferationsreizen und somit ein Zeichen fehlender fetaler Wachstumsstörung sein, was sich bei den customised centiles in einer vermehrten Expression bei höheren Perzentilen widerspiegeln sollte. Nach unseren Berechnungen im Mann-Whitney-U Test sind die Perzentilen aber genau umgekehrt mit der Syndecanexpression korreliert. Ein indirekter Hinweis auf eine fehlende Wachstumsretardierung sind diese sonographischen Parameter somit eher nicht, Ausdruck einer guten Wachstumssituation können sie aber dennoch sein, der sich schließlich auch in den postnatalen Parametern, wie der Länge und dem Kopfumfang, wieder findet.

#### Nackentransparenz

Je höher die Syndecan-1 Expression im Bereich der Mikrovilli der großen Zotten und des Zytotrophoblasten der kleinen Zotten, sowie verschiedenen Summen von Intensitäten und Mikrovillisaumdicken eruiert wurde, desto signifikant höher war die sonographisch gemessene Nackentransparenz. Dabei wurden die signifikanten Unterschiede zwischen den Kategorien der 100%igen Homogenität und keiner eruierten Homogenität, sowie einer 66 - 99%igen und einer 100%igen Homogenität der großen Zotten, zwischen einer mittleren und einer fehlenden Intensität der

Zytotrophoblasten der kleinen Zotten und zwischen diversen Summen im Bereich von Synzytio- und Zytotrophoblast sowie Mikrovillisaumdicken hergestellt.

Die Nackentransparenz wird sonographisch bestimmt und stellt das Korrelat zu einer Flüssigkeitsansammlung in der Nackenregion aller Feten dar. Bis zur 13. SSW nimmt sie stetig zu und ist nach der 14. SSW mit bis zu 3 mm als normal zu betrachten [88]. Als Screeningmethode wird die Nackentransparenzmessung zwischen der 11. und 14. SSW durchgeführt und soll Kinder mit einer vergrößerten Nackentransparenz herausfiltern, die eine erhöhte Wahrscheinlichkeit auf eine chromosomale Aberration, z.B. Trisomie 21, kongenitale Herzfehlern oder andere strukturelle Deformitäten haben. Die ursächlichen Faktoren für eine vergrößerte Nackentransparenz sind nicht bekannt, verschiedene Hypothesen stehen aber im Raum: Herzversagen, Malentwicklung des lymphatischen Systems, veränderte Gewebezusammensetzung im Bereich des Nackens, venöse oder infektiöse Ursachen [25]. Da eine vergrößerte Nackentransparenz auch bei gesunden Kindern auftritt, sollte eine zweite Messung nach der ersten auffälligen Screeninguntersuchung erfolgen. Bei dieser stellt man bei gesunden Kindern in den meisten Fällen einen Rückgang der auffälligen Nackentransparenz auf Normalwerte fest, wobei kranke Feten konstante oder progrediente Werte zeigen [136].

Die durch uns festgestellte Korrelation der vergrößerten Nackentransparenz mit einer vermehrten Syndecanexpression lässt sich nicht eindeutig einordnen, geht man doch bei den meisten anderen von uns untersuchten Punkten, bei einer vermehrten Syndecan-1 Expression von einer längeren Schwangerschaft, „gesünderen“ und mehr lebend geborenen Kindern aus. Die Ergebnisse der Nackentransparenz sind dahingehend mit den anderen Ergebnisse unserer Studie unheimlich, da man bei Schwangerschaften mit kindlichen chromosomalen oder strukturellen Anomalien eher mit vermehrten Komplikationen, Frühgeburten, bzw. mit weniger lebend geborenen Kindern rechnen muss.

Unterstützt wird dieses Ergebnis aber durch die ebenfalls negativ mit der Syndecanexpression korrelierten angeglichenen Perzentilen, wenn man von tendenziell eher wachstumsretardierten Kindern bei chromosomalen oder strukturellen Anomalien ausgeht. Allerdings muss man im Rahmen unserer Studie beachten, dass die Fallzahlen bezüglich einer auffälligen Nackentransparenz mit 18 Kindern (NT > 3mm) nicht allzu groß sind. Von diesen 18 Kindern hatten wiederum nur 8 Kinder einen tatsächlich auffälligen Karyotypen, Informationen zu eventuell vorhandenen strukturellen Anomalien liegen uns leider nicht vor. Diese niedrigen Fallzahlen müssen zu der Annahme führen, dass die Ergebnisse nicht als zwingend verlässlich angesehen werden können, vor allem in Bezug zu der großen Kontrollgruppe mit einer normalen

Nackentransparenz von 142 Kindern. Fraglich erscheinen die Ergebnisse auch durch die Tatsache, dass alle Berechnungen, ob mit einem selektierten oder mit dem Gesamtkollektiv gerechnet, zu ähnlichen Signifikanzen kamen. Geht man in dem Kollektiv der nur lebend geborenen und karyotypisch gesunden Kindern doch von einem Kollektiv mit eher normalen Nackentransparenzen aus, als in den anderen Kollektiven und würde somit Unterschiede in den Berechnungen aufgrund der Differenzen in den Kollektiven erwarten. Ungleiche Kollektivgrößen oder allgemein zu kleine Fallzahlen könnten hier zu einem Bias geführt haben. Die Aussagekraft, die aus unseren Ergebnissen bezüglich der Nackentransparenzmessung gezogen werden kann, reduziert sich dadurch enorm. Die Überlappung dieses Ergebnisses mit dem der angeglichenen Perzentilen wird, durch zum Teil ebenfalls kleine Kollektivgrößen bei deren Berechnung, in Frage gestellt, stellt aber einen interessanten und durchaus plausiblen Aspekt dar.

Die dadurch aber entstehende Widersprüchlichkeit dieses Ergebnisses in Bezug zu den übrigen positiv mit der Syndecanexpression korrelierenden Faktoren kann durch die minimale Aussagekraft der Nackentransparenz in dieser Studie reduziert bis vollständig aufgeklärt werden.

#### **Ausgang, Karyotyp**

Nur kleine Zotten sind bei der Betrachtung von kindlichem Ausgang und Karyotyp von Bedeutung, wobei bei Betrachtung der lebend geborenen Kinder nur die Intensität der Mikrovilli interessant und in Bezug auf den Karyotypen die Intensität des Zytotrophoblasten ausschlaggebend war. Je höher die Intensität der Syndecanexpression ausgefallen ist, desto höher war die Wahrscheinlichkeit auf ein lebend geborenes Kind und einen normalen Karyotyp. Diese Feststellung scheint von hohem klinischem Interesse, gibt sie doch allgemein Auskunft über den positiven Verlauf der Schwangerschaft und somit darauf Antwort, was für die kindlichen Eltern von größter Wichtigkeit ist. Die Signifikanzniveaus von  $\alpha=0.048$ ,  $0.015$  und  $0.011$  für die erhöhte Wahrscheinlichkeit auf ein lebend geborenes Kind bei mehr Syndecan-1 Intensität und von  $\alpha=0.024$  für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit auf einen normalen Karyotypen deuten auf verlässliche Ergebnisse hin. Die Syndecanexpression könnte in diesem Fall in Kombination mit anderen pränataldiagnostischen Methoden, wie der fetale Nackentransparenz oder biochemischen Untersuchungen, die Treffsicherheit der getroffenen Aussagen auf ein gesundes Kind erhöhen. Die Syndecan-1 Expression wurde in diesem Zusammenhang bislang noch von keinem anderen Autor untersucht, Analysen einer anderen Arbeitsgruppe unseres Institutes gelang aber interessanterweise der Nachweis, dass der Wachstumsfaktor VEGF bei Kindern mit normalem

Karyotyp signifikant mehr exprimiert wird, als bei solchen mit auffälligem Chromosomensatz. Gegebenfalls lassen sich hier Zusammenhänge erkennen, da auch Syndecan-1 bei der Bindung von Wachstumsfaktoren innerhalb der Plazenta eine Rolle inne zu haben scheint. Zukünftige Studien sollten Wert auf eine weitere, eventuell detailliertere Beschreibung dieses Sachverhaltes legen.

#### **Angeglichene Perzentilen**

Ca. 10 % aller Kinder werden zu klein geboren, das heißt, mit einem Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile. Man unterscheidet dabei eine symmetrische von einer asymmetrischen Wachstumsretardierung. Die Symmetrische findet sich vor allem bei Kindern, die schon früh intrauterin in ihrem Wachstum gehemmt werden, wobei die Asymmetrische durch späte Wachstumsverzögerung zustande kommt. Es gibt einige Anhaltspunkte dazu, dass die asymmetrische Wachstumsretardierung, trotz des späteren Beginns, ein schlechteres Outcome haben soll [20]. Die fetale Wachstumsretardierung führt zu einer erhöhten fetalen Morbidität und Mortalität, pränatal durch ein erhöhtes Risiko einer Frühgeburt, aber auch postnatal durch ein schlechtes neurologisches Outcome mit kognitiven Defiziten. Der Großteil der wachstumsretardierten Kinder gleicht sich durch schnelles postnatales Wachstum innerhalb der ersten 2 Lebensjahre an die „normalgroßen“ Kinder an, es wurden aber auch schlechte postnatale Größenzunahmen beschrieben [134]. Das schnelle postnatale Wachstum führt nach De Blasio durch einen erhöhten Nahrungsbedarf zur Ermöglichung des Wachstums zu einer vermehrten Adipositas im Säuglingsalter. Persistiert die vermehrte Nahrungsaufnahme, kommt es zur metabolischen Langzeitentgleisung mit Adipositas und kardiovaskulären Komplikationen [38], wie der koronaren Herzkrankheit und Typ II Diabetes Mellitus. Zurzeit gibt es, außer der Sonographie, kaum Möglichkeiten eine Fetale Wachstumsstörung, vor allen in low-risk Gruppen, gut und verlässlich zu diagnostizieren bzw. vorherzusagen [20]. Ein verlässlicher Test zur Prädiktion, eventuell sogar zum Schweregrad der zu erwartenden Wachstumsstörung, könnten vor dem Hintergrund der schweren Komplikationen durch die Wachstumsretardierung, von großem Interesse für den klinisch tätigen Gynäkologen sein, der frühzeitig therapeutische Maßnahmen ergreifen könnte. Zwar sind bislang noch keine durchgehend positiv zu bewertende Therapiemöglichkeiten aufgedeckt worden [50], die eine bereits bestehende Wachstumsretardierung positiv beeinflussen könnte, ein verlässlicher Test zur Bestimmung des Schweregrades könnte aber als Entscheidungshilfe zur Notwendigkeit der Indikationsstellung zu invasiven Maßnahmen, wie der vorzeitigen Beendigung der Schwangerschaft zugunsten des Kindes, dienen.

Unsere Berechnungen ergeben, dass die customised centiles im Bereich der Mikrovilli der großen Zotten und über die Differenzen (große-kleine Zotte) im Bereich des Synzytiotrophoblasten mit der Syndecan-1 Expression korrelieren. Eine vermehrte Expression führt dabei zu niedrigen customised centiles. Bisher gibt es nur eine weitere Studie, die den Zusammenhang zwischen der plazentaren Syndecan-1 Expression und der fetalen Wachstumsretardierung beschreibt. Jokimaa kann darin keinen signifikanten Unterschied aufzeigen [68]. Die Fallzahlen unserer Studie in Bezug auf die cc3 Abstufung sind mit nur 8 lebend geborenen Kindern unterhalb der 3. Perzentile in unserem Kollektiv sehr gering, wodurch sich hier die Aussagekraft reduziert. Unterhalb der 10. Perzentile wurden 17 Kinder lebend geboren, die mit einer Kontrollgruppe von 107 lebend geborenen Kindern zwischen der 10. und 90. Perzentile verglichen wurden, wobei sich ein  $\alpha=0.011$  ergab. Die zweite errechnete Signifikanz von  $\alpha=0.019$  ergab sich durch das unselektierte Kollektiv mit allen Kindern, also auch denen, die aufgrund eines Abortes unterhalb der 10. Perzentile zur Welt kamen, so dass hier ein Bias aufgrund von Pathologien, die zum Abort führten und auch die Syndecanexpression hätten beeinflussen können, nicht ausgeschlossen werden kann. Die Kollektivgrößen lassen somit nicht zwingend verlässliche Ergebnisse erwarten. Warum sich in der Berechnung der customised centiles auch eine negative Korrelation zur Syndecanexpression zeigt, kann durch uns derzeit nicht geklärt werden.

Bei der kritischen Beurteilung dieses Zusammenhanges muss auch die durch Jokimaa nicht erhebbare Korrelation zwischen der Syndecanexpression und der fetalen Wachstumsretardierung bedacht werden. Unsere Kollektivgrößen sind zwar entsprechend größer, aber relativ inhomogen, so dass auch das Ergebnis unserer Studie mit Einschränkungen betrachtet werden muss. Geht man von einer korrekten Korrelation aus, so könnte die immunhistochemische Färbung der Chorionzotten auf Syndecan-1 in Kombination mit der Sonographie Hinweise auf eine Wachstumsretardierung geben. Ein Zusammenhang zwischen der plazentaren VEGF-Expression und der fetalen Hyper- bzw. Hypotrophie konnte auch durch eine andere Arbeitsgruppe unseres Institutes nachgewiesen werden. Dort zeigte sich eine vermehrte Expression von VEGF bei hypertrophen Kindern in Bezug zu der weniger intensiven Expression bei hypotroph geborenen Kindern. Ähnlich zur oben genannten Karyotypisierung und der Syndecan-1 bzw. VEGF- Expression könnten sich auch hier, z.B. durch Betrachtung beider Expressionsmerkmale, gegebenenfalls Auskünfte über eine fetale Wachstumsretardierung machen lassen. Ob allerdings der Schweregrad der Wachstumsstörung durch Syndecan-1 widerspiegelt werden kann, konnte durch unsere Studie nicht gezeigt werden, so dass zukünftige Studien primär Wert legen sollten auf die eindeutige Klärung eines Zusammenhanges zwischen Syndecan-1 und

der fetalen Wachstumsstörung und zweitens, falls eine solche Assoziation hergestellt werden kann, einen Zusammenhang zum Schweregrad prüfen sollten. Darüber hinaus sollte das Studiendesign die Möglichkeit zur Erhebung des mütterlichen Blutdruckes erlauben, der gerade im Zusammenhang mit der Präeklampsie und damit der fetalen Wachstumsretardierung eine Rolle spielt und weiteren Aufschluss geben könnte.

### **Frühgeburtlichkeit**

Frühgeburtlichkeit wird definiert als eine Geburt vor der vollendeten 37. SSW [51] und geschieht in 7-11% aller Schwangerschaften. Zu einer Geburt vor der 34 SSW kommt es in 3-7% [60] [61]. Histopathologisch zeigt sich oft eine akute Inflammation der freien Membranen der Fruchtblase, der Chorionplatte und der Nabelschnur sowie eine Thrombose der Chorionplatte [53]. Die ursächlichen Faktoren für das Auftreten einer Frühgeburt können in ca. 50% der Fälle nicht eruiert werden [37], was als spontane Frühgeburt bezeichnet wird. Frühzeitig geplatzte Fruchtblasen sind in 30% verantwortlich für eine Frühgeburt und weitere 20% sind auf eine frühzeitige Beendigung der Schwangerschaft, aufgrund mütterlicher oder kindlicher Indikationen, zurückzuführen [71]. Mütterliche Risikofaktoren scheinen neben der Erstschwangerschaft [114] und dem kurzen Cervixhals [12] auch Über- und Untergewicht [60], Alter >35 Jahre, Größe <156cm, Anämie, sowie ein Harnwegsinfekt zu sein. Als plazentare und kindliche Risikofaktoren kommen Abruptio placentae, Polyhydramnion, intrauterine Wachstumsretardierung und fetaler Stress hinzu [122]. Frühgeburtlichkeit ist die führende Ursache neonataler Morbidität und Mortalität [37] und ist in 75% bis 80% verantwortlich für neonatales Versterben und in 50% für neurologische Langzeitbehinderungen. Noch nicht reife Kinder zeichnen sich postnatal durch gehäuftes Auftreten von respiratorischen Insuffizienzen, Unfähigkeit der regelrechten Temperaturregulation, Hypoglykämien, Apnoen, Krampfanfälle, intrakranielle Blutungen, nekrotisierende Enterokolitis, Fütterstörungen und Rehospitalisierung aus [97] [131]. Somit besteht nicht nur ein klinisches, sondern in Bezug auf die verursachten Kosten, auch ein wirtschaftliches Interesse in der Vorhersage der Frühgeburtswahrscheinlichkeit und damit der eventuellen frühzeitigen Möglichkeit der therapeutischen Intervention mit Verlängerung der Schwangerschaft [61]. Eine Möglichkeit um diese hohen Raten an schlechten kindlichen Outcome nach einer Frühgeburt zu reduzieren, wäre die Etablierung eines Tests zur frühzeitigen Erkennung einer drohenden Frühgeburt, bzw. die Festlegung von verlässlichen Prädiktoren. Therapeutisch kann man zwar bislang nur in geringem Maße auf eine Frühgeburt Einfluss nehmen, verschiedene Therapieoptionen stehen aber zur Verfügung. Der frühzeitige Beginn mit einer Kortikosteroidtherapie hat gezeigt, die Prognose des Feten zu verbessern [71].

Ein verkürzter Cervixhals kann z.B. durch eine Cerclage stabilisiert werden, auch erste Versuche mit Indomethacin scheinen bei einem kurzen Cervixhals erfolgreich bei der Prävention von Frühgeburten <24. SSW zu sein [12]. Vor allem aber postnatal ist eine rechtzeitig greifende, umfassende intensivmedizinische Betreuung in einem Perinatalzentrum von signifikanter Bedeutung [128] und eine frühzeitige Vorbereitung auf die möglicherweise zu früh eintretende Geburt damit wünschenswert. Die sonographische Messung eines verkürzten Zervix gilt in der Literatur als anerkannte Methode zur frühen Detektion eines Risikofaktors für eine Frühgeburt. Neuere Ansätze zeigen, dass erhöhte Spiegel an fetalem Fibronektin im vaginalen Sekret zwischen der 21. und 37 SSW bei Frauen mit Anzeichen für frühzeitige Wehentätigkeit eine Frühgeburt innerhalb der nächsten 7-10 Tage wahrscheinlich macht. Damit wären nicht nur Angaben zu einem erhöhten Risiko, sondern auch zum möglichen Zeitpunkt der Frühgeburt gegeben [71].

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Syndecanexpression in der 10. bis 14. SSW im Zusammenhang mit einer späteren Frühgeburtslichkeit stehen könnte. Eine niedrige Syndecanexpression bzw. eine verminderte Homogenität oder Dicke des Mikrovillisaumes führen signifikant häufiger zu einem früheren Ende der Schwangerschaft, als hohe Intensitäten bzw. Homogenitäten und Mikrovillisaumdicken. Die Signifikanzen waren im Bereich der Mikrovilli und des Synzytiotrophoblasten feststellbar. In wie fern dieser Zusammenhang den genauen Zeitpunkt der zu erwartenden Geburt angeben kann, kann durch uns nicht beantwortet werden. Interessanterweise zeigten auch die Chorionzotten von Schwangerschaften, die vor der 25. SSW beendet wurden, eine vermehrte Intensität im Bereich des Synzytiotrophoblasten. Die Syndecanexpression scheint demnach in frühen Schwangerschaftswochen nicht nur eine lange Schwangerschaftsdauer zu implizieren, sondern, im Gegensatz dazu, auch ein Zeichen für eine extrem kurze Schwangerschaft zu sein. Die Fallzahlen für den „worst pregnancy outcome“ waren in unserem Fall aber gering. 24 Kinder, von denen nur eines lebend zur Welt kam, fielen in diese Kategorie. Das Ergebnis bezüglich der <25. SSW sollte demnach in Studien mit größeren Fallzahlen überprüft werden. Die Kategorie mit der größten Fallzahl von 136 war in unserer Studie die, die alle Kinder beinhaltete, welche zwischen der 37. und 42. SSW geboren wurden. Diese Kategorie wurde im Rahmen der Abstufung von klinischen relevanten Schwangerschaftsaltern gebildet (SSD2). Sie wurde in Zusammenhang zur 25. - 37. SSW, > 42. SSW und dem „worst pregnancy outcome“ gestellt. Diese Kategorien wiederum beinhalteten 22, 5 und 24 Kinder von denen 14, 5 und eines lebend geboren wurden. Eine eindeutige Vergleichbarkeit zwischen diesen relativ inhomogenen und kleinen Fallzahlen ist statistisch nicht zwingend gegeben. Die Fallzahlen der zweiten

klinisch relevanten Abstufung im Rahmen der SSD1 Bildung sind homogen und vor allem größer, so dass sie verlässliche Ergebnisse erwarten lassen. Darin wurden 22 Kinder zwischen der 25. - 37. SSW, 43 Kinder zwischen der 37. und 39. SSW und 93 Kinder zwischen der 39. und 42. SSW geboren. Die meisten Kinder kamen also zum natürlichen Termin zur Welt, was die Representabilität unseres Kollektivs unterstreicht. Über der 42. SSW wurden nur 5 Kinder geboren. Das „worst pregnancy outcome“ entspricht den Fallzahlen der SSD2 Abstufung. Lebend kamen 14, 43, 93 und 5 Kinder zur Welt. Diese Gruppen sind relativ homogen und damit vergleichbar. Die Ergebnisse dieser Studie legen einen Zusammenhang zwischen der Syndecanexpression und der Dauer einer Schwangerschaft nahe. Bislang gibt es in der Literatur keine Studie, die diesen Zusammenhang untersucht hätte, so dass eine Vergleichbarkeit dieser Stelle fehlt. Aufgrund der inhomogenen Gruppennzahlen in der SSD2 Abstufung können diese Ergebnisse keinen zwingenden Zusammenhang aufzeigen, sie stellen jedoch Signifikanzen in der gleichen Weise, wie die SSD1 Abstufung, dar, deren Zahlen groß genug und vergleichbar sind. Somit könnte auch die SSD2 Abstufung zumindest die Tendenz belegen. Die alleinige immunhistochemische Färbung auf Syndecan-1 kann zurzeit noch kein verlässlicher pränataldiagnostischer Test zur Früherkennung einer Frühgeburt sein. Ein Zusammenhang konnte aber durch uns gezeigt werden, so dass nach weiteren Studien, die diesen Zusammenhang untersuchen, die immunhistochemische Färbung auf Syndecan-1, mit der Feststellung einer reduzierten Expression, im Zusammenspiel mit anderen Risikofaktoren einen besseren Eindruck über die Wahrscheinlichkeit einer Frühgeburt vermitteln könnte. Gegebenfalls wäre auch ein maternaler Serumtest auf Syndecan-1 denkbar, der, im Gegensatz zur aufwendigen immunhistochemischen Färbung, einfach durchzuführen wäre. Dieser Ansatz wird derzeit noch von uns geprüft.

#### **4.4 Beurteilung dieser Studie**

Unsere Studie ermöglichte erstmals die Beurteilung der Syndecan-1 Expression im Rahmen einer groß angelegten Studie. Die Zahl von 203 untersuchten Plazenten übertrifft bei Weitem die Zahlen vorheriger Studien, wodurch die Ergebnisse unserer Studie als verlässlicher zu beurteilen sind. Aufgrund unseres Eindrucks bei der ersten mikroskopischen Begutachtung der Chorionzotten nach der immunhistochemischen Färbung, dass ein Unterschied zwischen großen und kleinen Chorionzotten bezüglich der Färbintensität besteht, führten wir eine grundsätzliche Unterscheidung zwischen großen und kleinen Zotten ein. Die Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede hinsichtlich einer stärkeren Syndecan-1 Expression in kleineren Chorionzotten. Eine solche Differenzierung wurde bislang von keinem Autor zuvor vorgenommen. Unsere Zahlen ergeben aber, dass eine solche Unterscheidung eine zwingende Notwendigkeit darstellt, will man die Chorionzotten in Korrelation zu anderen schwangerschafts-assoziierten Faktoren setzen. Eine Verallgemeinerung aller Zotten würde zu falschen Ergebnissen durch einen konstanten Bias führen und sollte von allen zukünftigen Studie vermieden werden.

Darüber hinaus konnten wir erstmalig die Mikrovilli als Ort der intensivsten Syndecan-1 Färbung identifizieren. Vorangegangene Studien beschrieben den Synzytiotrophoblasten als alleinigen Ort einer Syndecan-1 Expression. Dies scheint aufgrund unserer Beobachtungen als unwahrscheinlich, war die Färbung im Bereich der Mikrovilli für eine Fehlinterpretation zu intensiv und erscheint eine Syndecanexpression im Bereich der oberflächenstarken Mikrovilli aufgrund der Rezeptorfunktionen Syndecans sinnvoll. Die Korrelation der Syndecanexpression mit mütterlichen und kindlichen Faktoren ergab in der Literatur weltweit gänzlich neue Aspekte. Es konnte erstmals ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen Syndecan und einem mütterlichen Nikotinkonsum hergestellt werden. Außerdem ergaben sich weitere hochinteressante, in der Literatur bislang unbekannte, signifikante Korrelationen: Der kindliche Karyotyp zeigt sich assoziiert mit der Syndecan-1 Expression, ebenso wie der kindliche Ausgang, die jeweils mit einer höheren Expression bei normalem Chromosomensatz bzw. lebend geborenen Kind einhergehen.

Die Ergebnisse dieser Studie legen ebenfalls erstmalig nahe, dass Syndecan-1 auch im Rahmen der Prädiktion zur Frühgeburtlichkeit eingesetzt werden könnte, da sich auch in diesem Zusammenhang signifikante Korrelationen durch uns aufzeigen ließen. Um die Ergebnisse dieser Studie zu komplettieren, wäre die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Präeklampsie und Syndecan-1

wünschenswert gewesen. Die Erhebung der dazu notwendigen Daten war leider im Rahmen des Studiendesigns nicht möglich.

Diese Studie ermöglicht weltweit erstmalig neue Einblicke in die Natur der plazentaren Syndecan-1 Expression und in ihren prädiktiven Aussagewert im Zusammenhang mit mütterlichen und kindlichen Faktoren, die bislang in der Literatur derart noch nicht beschrieben sind. Die immunhistochemische Färbung von Chorionzotten auf Syndecan-1 zeigt sich somit als viel versprechende Möglichkeit zur Etablierung eines neuen pränataldiagnostischen Tests.

## 5 Literaturverzeichnis

1. *Gestational diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2003. **26 Suppl 1**: p. S103-5.
2. *Medical Research Council European trial of chorion villus sampling. MRC working party on the evaluation of chorion villus sampling*. Lancet, 1991. **337**(8756): p. 1491-9.
3. *Multicentre randomised clinical trial of chorion villus sampling and amniocentesis. First report. Canadian Collaborative CVS-Amniocentesis Clinical Trial Group*. Lancet, 1989. **1**(8628): p. 1-6.
4. *Prevention of venous thrombosis and pulmonary embolism. NIH Consensus Development*. Jama, 1986. **256**(6): p. 744-9.
5. Antsaklis, A., et al., *Pregnant women of 35 years of age or more: maternal serum markers or amniocentesis?* J Obstet Gynaecol, 1999. **19**(3): p. 253-6.
6. Avni, F.E., et al., *Evolution of fetal ultrasonography*. Eur Radiol, 2007. **17**(2): p. 419-31.
7. Baviera, G., et al., *Placental growth hormone in Down's syndrome screening*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2004. **16**(4): p. 241-3.
8. Bayer-Garner, I.B. and S. Korourian, *Plasma cells in chronic endometritis are easily identified when stained with syndecan-1*. Mod Pathol, 2001. **14**(9): p. 877-9.
9. Bayer-Garner, I.B., J.A. Nickell, and S. Korourian, *Routine syndecan-1 immunohistochemistry aids in the diagnosis of chronic endometritis*. Arch Pathol Lab Med, 2004. **128**(9): p. 1000-3.
10. Bayer-Garner, I.B., R.D. Sanderson, and B.R. Smoller, *Syndecan-1 is strongly expressed in the anagen hair follicle outer root sheath and in the*

- dermal papilla but expression diminishes with involution of the hair follicle.* Am J Dermatopathol, 2002. **24**(6): p. 484-9.
11. Benirschke, K., *The placenta in the context of history and modern medical practice.* Arch Pathol Lab Med, 1991. **115**(7): p. 663-7.
  12. Berghella, V., O.A. Rust, and S.M. Althuisius, *Short cervix on ultrasound: does indomethacin prevent preterm birth?* Am J Obstet Gynecol, 2006. **195**(3): p. 809-13.
  13. Bernfield, M., et al., *Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans.* Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 365-93.
  14. Boogert, A., A. Mantingh, and G.H. Visser, *The immediate effects of chorionic villus sampling on fetal movements.* Am J Obstet Gynecol, 1987. **157**(1): p. 137-9.
  15. Brambati, B., A. Oldrini, and A. Lanzani, *Transabdominal chorionic villus sampling: a freehand ultrasound-guided technique.* Am J Obstet Gynecol, 1987. **157**(1): p. 134-7.
  16. Brambati, B., et al., *Genetic diagnosis by chorionic villus sampling before 8 gestational weeks: efficiency, reliability, and risks on 317 completed pregnancies.* Prenat Diagn, 1992. **12**(10): p. 789-99.
  17. Brambati, B., L. Tului, and E. Alberti, *Prenatal diagnosis by chorionic villus sampling.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1996. **65**(1): p. 11-6.
  18. Brosens, I., W.B. Robertson, and H.G. Dixon, *The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy.* J Pathol Bacteriol, 1967. **93**(2): p. 569-79.
  19. Brosens, I.A., W.B. Robertson, and H.G. Dixon, *The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia.* Obstet Gynecol Annu, 1972. **1**: p. 177-91.
  20. Bryan, S.M. and P.C. Hindmarsh, *Normal and abnormal fetal growth.* Horm Res, 2006. **65 Suppl 3**: p. 19-27.

21. Burton, B.K., C.J. Schulz, and L.I. Burd, *Limb anomalies associated with chorionic villus sampling*. *Obstet Gynecol*, 1992. **79**(5 ( Pt 1)): p. 726-30.
22. Bush, P.G., et al., *A quantitative study on the effects of maternal smoking on placental morphology and cadmium concentration*. *Placenta*, 2000. **21**(2-3): p. 247-56.
23. Carter, S., et al., *Maternal smoking: risks related to maternal asthma and reduced birth weight in a Pacific Island birth cohort in New Zealand*. *N Z Med J*, 2006. **119**(1238): p. U2081.
24. Cetin, I., et al., *Fetal growth restriction: a workshop report*. *Placenta*, 2004. **25**(8-9): p. 753-7.
25. Cheng, C.C., et al., *Pregnancy outcomes with increased nuchal translucency after routine Down syndrome screening*. *Int J Gynaecol Obstet*, 2004. **84**(1): p. 5-9.
26. Cicero, S., et al., *Nasal bone in first-trimester screening for trisomy 21*. *Am J Obstet Gynecol*, 2006. **195**(1): p. 109-14.
27. Cohen, G., et al., *Perinatal exposure to nicotine causes deficits associated with a loss of nicotinic receptor function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(10): p. 3817-21.
28. Colbern, G.T., M.H. Chiang, and E.K. Main, *Expression of the nonclassic histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta*. *Am J Obstet Gynecol*, 1994. **170**(5 Pt 1): p. 1244-50.
29. Collet, M. and C. Beillard, *[Consequences of smoking on fetal development and risk of intra-uterine growth retardation or in utero fetal death]*. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 2005. **34 Spec No 1**: p. 3S135-45.
30. Comstock, C.H., et al., *Is there a nuchal translucency millimeter measurement above which there is no added benefit from first trimester serum screening?* *Am J Obstet Gynecol*, 2006. **195**(3): p. 843-7.

31. Couchman, J.R. and A. Woods, *Syndecans, signaling, and cell adhesion*. J Cell Biochem, 1996. **61**(4): p. 578-84.
32. Crescimanno, C., et al., *Expression pattern alterations of syndecans and glypican-1 in normal and pathological trophoblast*. J Pathol, 1999. **189**(4): p. 600-8.
33. Cutillo, D.M., et al., *Chorionic villus sampling utilization following reports of a possible association with fetal limb defects*. Prenat Diagn, 1994. **14**(5): p. 327-32.
34. Czekaj, P., et al., *Morphological changes in lungs, placenta, liver and kidneys of pregnant rats exposed to cigarette smoke*. Int Arch Occup Environ Health, 2002. **75 Suppl**: p. S27-35.
35. D'Alton, M.E. and J. Cleary-Goldman, *Additional benefits of first trimester screening*. Semin Perinatol, 2005. **29**(6): p. 405-11.
36. Dasgupta, P., et al., *Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2208-2217.
37. Dayan, J., et al., *Prenatal depression, prenatal anxiety, and spontaneous preterm birth: a prospective cohort study among women with early and regular care*. Psychosom Med, 2006. **68**(6): p. 938-46.
38. De Blasio, M.J., et al., *Placental restriction of fetal growth reduces size at birth and alters postnatal growth, feeding activity, and adiposity in the young lamb*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(2): p. R875-86.
39. Delhanty, J.D. and J.C. Harper, *Pre-implantation genetic diagnosis*. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2000. **14**(4): p. 691-708.
40. Dore, J.M., et al., *Identification and location on syndecan-1 core protein of the epitopes of B-B2 and B-B4 monoclonal antibodies*. FEBS Lett, 1998. **426**(1): p. 67-70.

41. Duley, L., *Pre-eclampsia and the hypertensive disorders of pregnancy*. Br Med Bull, 2003. **67**: p. 161-76.
42. Elenius, K., et al., *Growth factors induce 3T3 cells to express bFGF-binding syndecan*. J Biol Chem, 1992. **267**(9): p. 6435-41.
43. Elenius, K., et al., *Binding of human syndecan to extracellular matrix proteins*. J Biol Chem, 1990. **265**(29): p. 17837-43.
44. Elenius, K., et al., *Induced expression of syndecan in healing wounds*. J Cell Biol, 1991. **114**(3): p. 585-95.
45. Ellis, S.A., M.S. Palmer, and A.J. McMichael, *Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule*. J Immunol, 1990. **144**(2): p. 731-5.
46. Endo, K., et al., *Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40764-70.
47. Fang, M.A., et al., *Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells*. Bone, 1991. **12**(4): p. 283-6.
48. Ferrara, A., et al., *Prevalence of gestational diabetes mellitus detected by the national diabetes data group or the carpenter and coustan plasma glucose thresholds*. Diabetes Care, 2002. **25**(9): p. 1625-30.
49. Ferrazzi, E., et al., *Uterine Doppler velocimetry and placental hypoxic-ischemic lesion in pregnancies with fetal intrauterine growth restriction*. Placenta, 1999. **20**(5-6): p. 389-94.
50. Figueroa, R. and D. Maulik, *Prenatal therapy for fetal growth restriction*. Clin Obstet Gynecol, 2006. **49**(2): p. 308-19.
51. Gao, W., et al., *Risk factors for preterm and small-for-gestational-age babies: a cohort from the Pacific Islands Families Study*. J Paediatr Child Health, 2006. **42**(12): p. 785-92.

52. Genbacev, O., et al., *Disruption of oxygen-regulated responses underlies pathological changes in the placentas of women who smoke or who are passively exposed to smoke during pregnancy*. *Reprod Toxicol*, 2003. **17**(5): p. 509-18.
53. Goldenberg, R.L., et al., *The Alabama Preterm Birth Project: placental histology in recurrent spontaneous and indicated preterm birth*. *Am J Obstet Gynecol*, 2006. **195**(3): p. 792-6.
54. Greer, I.A., *The challenge of thrombophilia in maternal-fetal medicine*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(6): p. 424-5.
55. Hammoud, A.O., et al., *Smoking in pregnancy revisited: findings from a large population-based study*. *Am J Obstet Gynecol*, 2005. **192**(6): p. 1856-62; discussion 1862-3.
56. Harethardottir, H., *[Fetal nuchal translucency measurement at 11-13 weeks and risk assessment for fetal aneuploidy and cardiac anomalies.]*. *Laeknabladid*, 2001. **87**(5): p. 415-421.
57. Harper, J.C. and T.H. Bui, *Pre-implantation genetic diagnosis*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2002. **16**(5): p. 659-70.
58. Hitschold, T., et al., *[Pulsed Doppler sonography of the umbilical artery and fetoplacental resistance. A histometric study of gestosis placentas in comparison with a normal sample]*. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 1989. **49**(12): p. 1056-62.
59. Holzgreve, W., et al., *Safety of placental biopsy in the second and third trimesters*. *N Engl J Med*, 1987. **317**(18): p. 1159.
60. Honest, H., et al., *The accuracy of maternal anthropometry measurements as predictor for spontaneous preterm birth--a systematic review*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2005. **119**(1): p. 11-20.
61. Honest, H., et al., *The accuracy of risk scores in predicting preterm birth--a systematic review*. *J Obstet Gynaecol*, 2004. **24**(4): p. 343-59.

62. Huang, L.Z., et al., *Chronic nicotine induces growth retardation in neonatal rat pups*. Life Sci, 2006. **78**(13): p. 1483-93.
63. Huang, T., et al., *Using Down syndrome serum screening results to predict low birthweight*. Prenat Diagn, 2003. **23**(5): p. 420-6.
64. Huppertz, B. and L.L. Peeters, *Vascular biology in implantation and placentation*. Angiogenesis, 2005. **8**(2): p. 157-67.
65. Isada, N.B., et al., *Technical aspects of transcervical chorionic villus sampling*. Fetal Diagn Ther, 1994. **9**(1): p. 19-28.
66. Jauniaux, E. and B. Gulbis, *In vivo investigation of placental transfer early in human pregnancy*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2000. **92**(1): p. 45-9.
67. Jokimaa, V., et al., *Expression of syndecan-1 in human placenta and decidua*. Placenta, 1998. **19**(2-3): p. 157-63.
68. Jokimaa, V.I., et al., *Placental expression of syndecan 1 is diminished in preeclampsia*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **183**(6): p. 1495-8.
69. Kaufmann, P., ed. *Die Plazenta des Menschen*. Entwicklung der Plazenta, ed. T.H.S. V. Becker, and F. Kubli. 1981, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York. 13-50.
70. Kirchengast, S. and B. Hartmann, *Nicotine consumption before and during pregnancy affects not only newborn size but also birth modus*. J Biosoc Sci, 2003. **35**(2): p. 175-88.
71. Krupa, F.G., et al., *Predictors of preterm birth*. Int J Gynaecol Obstet, 2006. **94**(1): p. 5-11.
72. Kuliev, A., et al., *Chorionic villus sampling safety. Report of World Health Organization/EURO meeting in association with the Seventh International Conference on Early Prenatal Diagnosis of Genetic Diseases, Tel-Aviv, Israel, May 21, 1994*. Am J Obstet Gynecol, 1996. **174**(3): p. 807-11.

73. Kuliev, A.M., et al., *Risk evaluation of CVS*. Prenat Diagn, 1993. **13**(3): p. 197-209.
74. Lain, K.Y., et al., *Intracellular adhesion molecule concentrations in women who smoke during pregnancy*. Obstet Gynecol, 2006. **107**(3): p. 588-94.
75. Lips, K.S., et al., *Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta*. Placenta, 2005. **26**(10): p. 735-46.
76. Lyall, F., *The human placental bed revisited*. Placenta, 2002. **23**(8-9): p. 555-62.
77. Lyall, F., et al., *Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of PECAM-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction*. Am J Pathol, 2001. **158**(5): p. 1713-21.
78. M.W. Beckmann, P.D., P.A. Fasching, ed. *Molekulare Medizin in der Frauenheilkunde*. Diagnostik und Therapie. 2002, Steinkopf: Darmstadt.
79. Mali, M., et al., *Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans*. J Biol Chem, 1990. **265**(12): p. 6884-9.
80. Marret, S., *[Effects of maternal smoking during pregnancy on fetal brain development]*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2005. **34 Spec No 1**: p. 3S230-3.
81. Mavrou, A., et al., *Identification of nucleated red blood cells in maternal circulation: a second step in screening for fetal aneuploidies and pregnancy complications*. Prenat Diagn, 2007. **27**(2): p. 150-3.
82. McIntosh, N., et al., *Transcervical CVS sample size: correlation with placental location, cytogenetic findings, and pregnancy outcome*. Prenat Diagn, 1993. **13**(11): p. 1031-6.
83. Mehls, O., et al., *The interaction of glucocorticoids with the growth hormone-insulin-like growth factor axis and its effects on growth plate*

- chondrocytes and bone cells*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2001. **14 Suppl 6**: p. 1475-82.
84. Miny, P., et al., *Mosaicism and accuracy of prenatal cytogenetic diagnoses after chorionic villus sampling and placental biopsies*. Prenat Diagn, 1991. **11**(8): p. 581-9.
85. Mochizuki, M., T. Maruo, and K. Masuko, *Mechanism of foetal growth retardation caused by smoking during pregnancy*. Acta Physiol Hung, 1985. **65**(3): p. 295-304.
86. Mochizuki, M., et al., *Effects of smoking on fetoplacental-maternal system during pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 1984. **149**(4): p. 413-20.
87. Monni, G., et al., *Early transabdominal chorionic villus sampling in couples at high genetic risk*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **168**(1 Pt 1): p. 170-3.
88. Muller, M.A., et al., *Disappearance of enlarged nuchal translucency before 14 weeks' gestation: relationship with chromosomal abnormalities and pregnancy outcome*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2004. **24**(2): p. 169-74.
89. Nanaev, A., et al., *Physiological dilation of uteroplacental arteries in the guinea pig depends on nitric oxide synthase activity of extravillous trophoblast*. Cell Tissue Res, 1995. **282**(3): p. 407-21.
90. Nicolaides, K.H., *Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities*. Am J Obstet Gynecol, 2004. **191**(1): p. 45-67.
91. Nicolaides, K.H., et al., *Why confine chorionic villus (placental) biopsy to the first trimester?* Lancet, 1986. **1**(8480): p. 543-4.

92. Ong, C.Y., et al., *First-trimester maternal serum levels of placenta growth factor as predictor of preeclampsia and fetal growth restriction*. *Obstet Gynecol*, 2001. **98**(4): p. 608-11.
93. Ong, C.Y., et al., *First-trimester maternal serum activin A in pre-eclampsia and fetal growth restriction*. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2004. **15**(3): p. 176-80.
94. Ong, C.Y., et al., *First trimester maternal serum free beta human chorionic gonadotrophin and pregnancy associated plasma protein A as predictors of pregnancy complications*. *Bjog*, 2000. **107**(10): p. 1265-70.
95. Papp, C., et al., *Chorionic villus sampling: a 15-year experience*. *Fetal Diagn Ther*, 2002. **17**(4): p. 218-27.
96. Pergament, E., *The application of fluorescence in-situ hybridization to prenatal diagnosis*. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2000. **12**(2): p. 73-6.
97. Raju, T.N., et al., *Optimizing care and outcome for late-preterm (near-term) infants: a summary of the workshop sponsored by the National Institute of Child Health and Human Development*. *Pediatrics*, 2006. **118**(3): p. 1207-14.
98. Ramp, W.K., L.G. Lenz, and R.J. Galvin, *Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1991. **197**(1): p. 36-43.
99. Rasmussen, S. and L.M. Irgens, *The effects of smoking and hypertensive disorders on fetal growth*. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2006. **6**: p. 16.
100. Rath, H., ed. *Schwangerschaftshochdruck*. *Gynäkologie und Geburtsmedizin* ed. 2002, J. Schneider und Hans Wenzel: Stuttgart.
101. Rosendaal, F.R., *Venous thrombosis: a multicausal disease*. *Lancet*, 1999. **353**(9159): p. 1167-73.

102. Ruoslahti, E., *Proteoglycans in cell regulation*. J Biol Chem, 1989. **264**(23): p. 13369-72.
103. Salafia, C.M., et al., *Placental pathology of absent and reversed end-diastolic flow in growth-restricted fetuses*. Obstet Gynecol, 1997. **90**(5): p. 830-6.
104. Salihi, H.M., M.H. Aliyu, and R.S. Kirby, *In utero nicotine exposure and fetal growth inhibition among twins*. Am J Perinatol, 2005. **22**(8): p. 421-7.
105. Salmivirta, M., J. Heino, and M. Jalkanen, *Basic fibroblast growth factor-syndecan complex at cell surface or immobilized to matrix promotes cell growth*. J Biol Chem, 1992. **267**(25): p. 17606-10.
106. Sanderson, R.D. and M. Bernfield, *Molecular polymorphism of a cell surface proteoglycan: distinct structures on simple and stratified epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(24): p. 9562-6.
107. Saunders, S., et al., *Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan*. J Cell Biol, 1989. **108**(4): p. 1547-56.
108. Seidal, T., A.J. Balaton, and H. Battifora, *Interpretation and quantification of immunostains*. Am J Surg Pathol, 2001. **25**(9): p. 1204-7.
109. Sibai, B., G. Dekker, and M. Kupferminc, *Pre-eclampsia*. Lancet, 2005. **365**(9461): p. 785-99.
110. Sibai, B.M., *Thrombophilias and adverse outcomes of pregnancy--what should a clinician do?* N Engl J Med, 1999. **340**(1): p. 50-2.
111. Sieroszewski, P., et al., *Ultrasound diagnostic schema for the determination of increased risk for chromosomal fetal aneuploidies in the first half of pregnancy*. J Appl Genet, 2006. **47**(2): p. 177-85.
112. Smidt-Jensen, S., et al., *Transabdominal chorionic villus sampling in the second and third trimesters of pregnancy: chromosome quality, reporting time, and feto-maternal bleeding*. Prenat Diagn, 1993. **13**(10): p. 957-69.

113. Smidt-Jensen, S., et al., *Randomised comparison of amniocentesis and transabdominal and transcervical chorionic villus sampling*. Lancet, 1992. **340**(8830): p. 1237-44.
114. Smith, G.C., et al., *Maternal and biochemical predictors of spontaneous preterm birth among nulliparous women: a systematic analysis in relation to the degree of prematurity*. Int J Epidemiol, 2006. **35**(5): p. 1169-77.
115. Snijders, R. and E. Smith, *The role of fetal nuchal translucency in prenatal screening*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2002. **14**(6): p. 577-85.
116. Spencer, K., et al., *Free beta human choriongonadotropin in Down's syndrome screening: a multicentre study of its role compared with other biochemical markers*. Ann Clin Biochem, 1992. **29** ( Pt 5): p. 506-18.
117. Spencer, K., et al., *Maternal serum levels of dimeric inhibin A in pregnancies affected by trisomy 21 in the first trimester*. Prenat Diagn, 2001. **21**(6): p. 441-4.
118. Steele, C.D., et al., *Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal peripheral blood: a review*. Clin Obstet Gynecol, 1996. **39**(4): p. 801-13.
119. Steinhard J, W.R., Baez E, Wülfing P, Heinig J, Kiesel L, Korfsmeier KH, Klockenbusch, *Cox1 overexpression in human chorionic villi is associated with an increased risk of severe IUGR*. Hypertension in Pregnancy 2006. **25**: p. 106.
120. Steinhard J, W.R., Baez E, Wülfing P, Korfsmeier KH, Kiesel L, Klockenbusch W, *Die Cox 1 und Cox 2 Expression humaner Chorionzotten nach CVS steht im Zusammenhang mit der späteren Entwicklung von schwerer IUGR und Frühgeburtlichkeit*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 2006. **67**: p. 148.
121. Steyn, K., et al., *The influence of maternal cigarette smoking, snuff use and passive smoking on pregnancy outcomes: the Birth To Ten Study*. Paediatr Perinat Epidemiol, 2006. **20**(2): p. 90-9.

122. Tabussum, G., et al., *Preterm birth--its etiology and outcome*. J Pak Med Assoc, 1994. **44**(3): p. 68-70.
123. Tarim, E., et al., *Are amniotic fluid C-reactive protein and glucose levels, and white blood cell counts at the time of genetic amniocentesis related with preterm delivery?* J Perinat Med, 2005. **33**(6): p. 524-9.
124. Thomas, C., *Preimplantation genetic diagnosis: development and regulation*. Med Law, 2006. **25**(2): p. 365-78.
125. Todros, T., et al., *Umbilical Doppler waveforms and placental villous angiogenesis in pregnancies complicated by fetal growth restriction*. Obstet Gynecol, 1999. **93**(4): p. 499-503.
126. Tominaga, T. and E.W. Page, *Accommodation of the human placenta to hypoxia*. Am J Obstet Gynecol, 1966. **94**(5): p. 679-91.
127. Vercruyssen, L., et al., *Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat*. Placenta, 2006. **27**(1): p. 22-33.
128. Vieux, R., et al., *Improving perinatal regionalization by predicting neonatal intensive care requirements of preterm infants: an EPIPAGE-based cohort study*. Pediatrics, 2006. **118**(1): p. 84-90.
129. Vogt Isaksen, C., *Maternal smoking, intrauterine growth restriction, and placental apoptosis*. Pediatr Dev Pathol, 2004. **7**(5): p. 433-42.
130. Wald, N.J., et al., *Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy*. Bmj, 1988. **297**(6653): p. 883-7.
131. Ward, R.M. and J.C. Beachy, *Neonatal complications following preterm birth*. Bjog, 2003. **110 Suppl 20**: p. 8-16.
132. Yang, J.H., et al., *Prenatal diagnosis of trisomy 18: report of 30 cases*. Prenat Diagn, 2005. **25**(2): p. 119-22.

133. Yang, Y.M. and G.T. Liu, *Damaging effect of cigarette smoke extract on primary cultured human umbilical vein endothelial cells and its mechanism*. Biomed Environ Sci, 2004. **17**(2): p. 121-34.
134. Yanney, M. and N. Marlow, *Paediatric consequences of fetal growth restriction*. Semin Fetal Neonatal Med, 2004. **9**(5): p. 411-8.
135. Zhao, Z. and E.A. Reece, *Nicotine-induced embryonic malformations mediated by apoptosis from increasing intracellular calcium and oxidative stress*. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2005. **74**(5): p. 383-91.
136. Zoppi, M.A., et al., *Changes in nuchal translucency thickness in normal and abnormal karyotype fetuses*. Bjog, 2003. **110**(6): p. 584-8.
137. Zoppini, C., et al., *Acute hemodynamic effects induced by chorionic villus sampling: a preliminary investigation*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **169**(4): p. 902-7.



## **7 Danksagung**

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. med. J. Steinhard für die großzügige und freundliche Unterstützung sowie die guten Ratschläge zu jeder Zeit.

Herrn Prof. Dr. med. W. Klockenbusch möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Studie und die Bereitstellung dieser Doktorarbeit danken.

Weiter gilt mein Dank Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Korfsmeier für die Möglichkeit der Nutzung der Laboratorien im Anatomischen Institut der Westfälischen Wilhelms Universität und der freundlichen Zusammenarbeit.

Für die stets hilfreiche und arbeitsintensive Unterstützung, sowie die freundliche Atmosphäre im Labor, möchte ich Frau I. Steinhard und Frau B. Strotbaum aus dem Anatomischen Institut herzlich danken, ohne die die Durchführung dieser experimentellen Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. rer. nat. M. Götte gilt mein Dank für die Beantwortung aller Fragen hinsichtlich Syndecan-1 und die unterstützenden Ideen zur Vervollständigung dieser Dissertationsschrift.

Schließlich danke ich meinen Eltern von ganzem Herzen, die mich zu jeder Zeit und in jeder Hinsicht während meines Studiums unterstützt haben.

## 8 Anhang

### 8.1 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Alter bei CVS.....	39
Abbildung 2: Gestationsalter bei CVS .....	40
Abbildung 3: Schwangerschaftsdauer.....	41
Abbildung 4: Ausgang aller Schwangerschaften .....	42
Abbildung 5: customised centiles .....	44
Abbildung 6: Beispiel für Inhomogenität im Übersichtsbild.....	47
Abbildung 7: Homogenität 1 (1-33% des Saumes sind angefärbt).....	48
Abbildung 8: Homogenität 2 (34-66% des Saumes sind angefärbt).....	48
Abbildung 9: Homogenität 3 (67-99% des Saumes sind angefärbt).....	49
Abbildung 10: Homogenität 4 (100% des Saumes angefärbt) .....	49
Abbildung 11: Intensität 1 (schwach gefärbt) .....	50
Abbildung 12: Intensität 2 (mittelstark gefärbt).....	50
Abbildung 13: Intensität 3 (stark gefärbt) .....	51
Abbildung 14: Mikrovillisaum 1 (schmal).....	51
Abbildung 15: Mikrvillisaum 2 (mittel).....	52
Abbildung 16: Mikrovillisaum 3 (dick).....	52
Abbildung 17: kleine Zotte mit Mikrovilli- und Synzytiotrophoblast-Expression	53
Abbildung 19: Nikotin und Intensität im Zytotrophoblasten .....	55
Abbildung 20: Intensität im Zytotrophoblast der kleinen Zotten und pränatal- sonographische Parameter .....	58
Abbildung 21: Homogenität der Mikrovilli und customised centiles.....	62
Abbildung 22: Differenzen im Synzytiotrophoblasten und customised centiles	62
Abbildung 23: zunehmende Intensitäten bzw. Mikrovillisaumdicken bei steigender Schwangerschaftsdauer.....	65

### 8.2 *Tabellenverzeichnis*

Tabelle 1: Karyotyp und Schwangerschaftsausgang .....	43
Tabelle 2: sonographische Parameter .....	45

---

Tabelle 3: Nackentransparenz und Karyotyp .....	45
Tabelle 4: postnatal erhobene Parameter .....	45
Tabelle 5: Signifikanzen kleine Zotten gegen große Zotten .....	53
Tabelle 6: Signifikanzen kindliche Faktoren .....	57
Tabelle 7: Signifikanzen Nackentransparenz .....	59
Tabelle 8: Signifikanzen Ausgang und Karyotyp .....	60
Tabelle 9: Signifikanzen customised centiles .....	61
Tabelle 10: Signifikanzen Schwangerschaftsdauer .....	64