

**Die Mikro-Computertomographie zur Evaluierung des
fetoplazentaren Gefäßsystems bei Diabetes mellitus und
intrauteriner Wachstumsretardierung**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Sarah Vormann

aus Bielefeld

Gießen 2008

Aus der Abteilung für Diagnostische Radiologie des Universitätsklinikums Gießen
und Marburg GmbH, Standort Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. Wigbert S. Rau

1. Gutachter:

Herr Prof. Dr. A. C. Langheinrich

2. Gutachter:

Frau PD Dr. S. Grüßner

Tag der Disputation:

08.12.2008

Gewidmet meinen Eltern und meiner Schwester

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Plazentaentwicklung	3
1.2	Fetoplazentare Durchblutung	6
1.3	Plazentaveränderungen bei Diabetes mellitus	7
1.4	Plazentaveränderungen bei intrauteriner Wachstumsretardierung (IUWR)	8
1.5	Gefäßdarstellung	11
1.6	Fragestellung der Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Herkunft der Proben, Einschluss- und Ausschlusskriterien	13
2.2	Probengewinnung und Präparation	14
2.3	Mikro-Computertomographie	16
2.3.1	Technische Grundlagen der Mikro-CT-Technologie	16
2.3.2	Bildakquisition	21
2.3.3	Bildberechnung	23
2.3.4	Bildanalyse	24
2.4	Histologie	24
2.5	Statistik	24

3	Ergebnisse	25
3.1	Charakteristik der Gruppen	25
3.2	Gefäßanalytik in der Mikro-CT	26
3.3	Statistische Auswertung	28
3.4	Histologische Untersuchungen	33
4	Diskussion	34
5	Zusammenfassung	39
6	Abstract	40
7	Publikationen	41
8	Literaturverzeichnis	42
9	Lebenslauf	47
10	Danksagung	49

1 Einleitung

1.1 Plazentaentwicklung

Die Entwicklung der Plazenta, die während der Schwangerschaft neben ihren endokrinen Funktionen vor allem dem Transport von Nährstoffen, Stoffwechselabbauprodukten und dem Austausch von Sauerstoff und CO₂ zwischen dem mütterlichen und fetalen Organismus dient, beginnt mit der Einnistung der Blastozyste, etwa am 7. Tag nach der Befruchtung der Eizelle. Aus der äußeren Zellschicht, der Blastozyste, entwickelt sich der Trophoblast, der später zur Plazenta wird und aus der inneren Zellmasse, dem Embryoblast, bilden sich die Ausgangszellen zur Entwicklung und Differenzierung des Embryos. Bei der Implantation verschmilzt der Trophoblast unter Auflösung der trennenden Zellschichten mit den Endometriumepithelzellen des Uterus zum primären Synzytiotrophoblast. Dort entstehen etwa am 8. Tag nach der Befruchtung Einschmelzungsherde; sogenannte Lakunen, die Vorläufer der späteren intervillösen Räume, bilden sich aus. Um den 12. Tag erfolgt durch die fortschreitende Invasion des Synzytiotrophoblasten in das Endometrium eine Arrosion mütterlicher Gefäße, so dass Blut in die Lakunen austritt. Dies ist die Grundvoraussetzung für die spätere Entwicklung einer hämochoriodalen Plazenta. Die verbleibenden Trennwände zwischen den Lakunen werden als Trabekel bezeichnet. Aus diesen Trabekeln schieben sich zwischen dem 13. und 15. Tag synzytiale Sprossen mit einem inneren „Kern“ aus Zytotrophoblastzellen in die Lakunen vor und bilden auf diese Weise die Primärzotten. Zwischen dem 15. und 18. Tag p.c. dringen aus der Chorionplatte Zellen des extraembryonalen Mesoderms in die Primärzotten vor, wodurch außer in den basalen Anteilen der Stammzotten die sog. Sekundärzotten entstehen.

Wenn sich am Ende der 3. Gestationswoche im Zottenkern die ersten Kapillaren differenzieren, sind auch die Tertiärzotten etabliert und das Zottenkapillarsystem gewinnt bald Anschluss an die im extraembryonalen Mesoderm entstehenden Kapillaren[1]. Im Laufe der 4. Gestationswoche treten diese Gefäße in Verbindung mit dem intraembryonalen Gefäßsystem und stellen damit die existentielle Gefäßverbindung zwischen Plazenta und Embryo her. Während im Bereich des Chorion laeve mit zunehmender Ausdehnung der Amnionhöhle zunächst der Synzytio-, dann der Zytotrophoblast degenerieren, entwickelt sich basal im Bereich des Chorion frondosum durch Wachstum und Reifung die endgültige Plazenta. Im Vordergrund der weiteren Entwicklung der Tertiärzotten steht eine Ausdehnung der Zottenbäume durch dichotome Verzweigungen und Zottenproliferation.

Am Beginn des 3. Trimenons entwickeln sich nach Kaufmann[2] aus den Tertiärzotten nicht mehr wie zuvor unreife Intermediärzotten und später Stammzotten, sondern sie werden in reife Intermediärzotten umgewandelt und tragen dann die sogenannten Endzotten.

Die Anatomie der reifen Plazenta und ihr Bezug zur Uterusschleimhaut ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

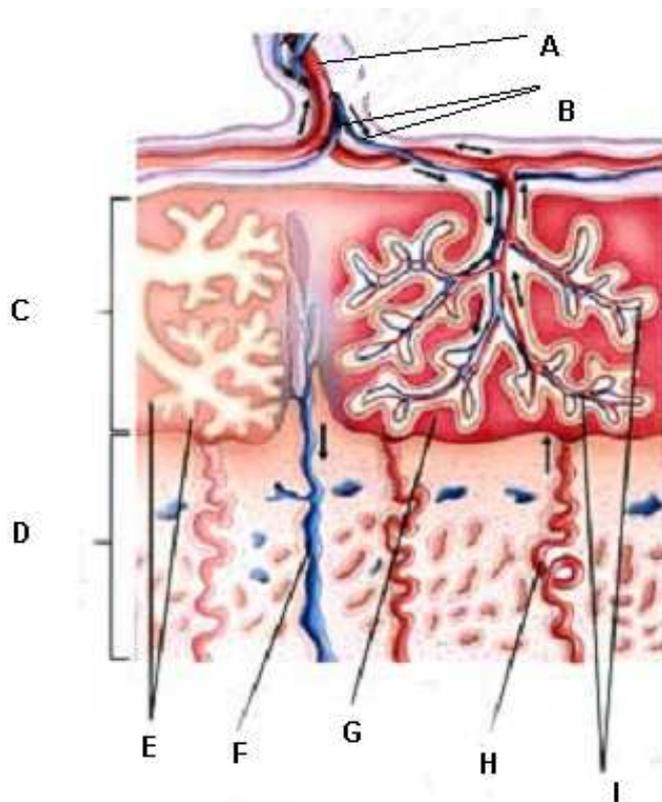


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Plazenta und der Uterusschleimhaut . A: Umbilikalvene, B: Umbilikalarterien, C: Plazenta, D: Uterus, E: Endzotten des fetalen Zottenbaumes, F: venöser Abfluss des mütterlichen Blutes, G: Lakunen im intervillösen Raum der Plazenta gefüllt mit arteriellem mütterlichen Blut, H: Spiralarterien in der Dezidua des mütterlichen Uterus, I: Sinusoidale Kapillaren in den Endzotten.

Die sogenannten Endzotten, die eine innere Oberflächenvergrößerung darstellen, entstehen nicht durch eine aktive Aussprossung des Trophoblasten, sondern als Vorwölbung an den reifen Intermediärzotten infolge eines übermäßigen Längenwachstums der Gefäße (Abbildung 2). Diese Gefäße besitzen relativ weite sinusoidale Kapillaren (Sinusoide), die mit ihren sogenannten Epithelplatten für große Diffusionsflächen mit kurzen Diffusionsstrecken sorgen.

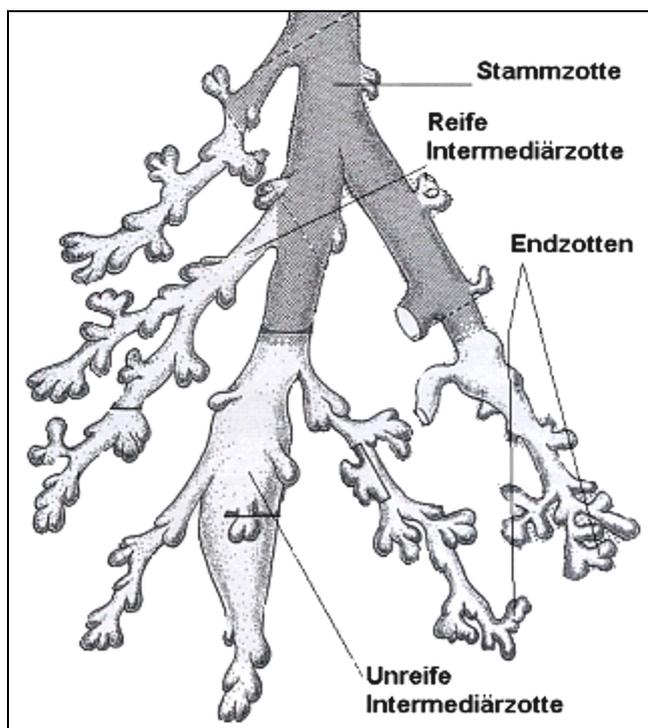


Abbildung 2: Darstellung der unterschiedlichen Differenzierung der Zotten innerhalb der Plazenta.

1.2 Fetoplazentare Durchblutung

Die fetalen Gefäße der Plazenta gliedern sich entsprechend der morphologischen Strukturen. Die Nabelschnurarterien anastomosieren nach Erreichen der Plazenta und teilen sich dann in mehrere Segmentarterien. Diese ziehen geschlängelt auf der fetalen Plazentafläche entlang und verzweigen sich in Sekundär- und Tertiärarterien, die in den Stammzotten verlaufen und als Stammzottengefäße 1. Ordnung bezeichnet werden. Jene teilen sich am Hilus eines Plazentaläppchens (Lobulus) in die Stammzottengefäße 2. Ordnung (Ramusgefäße) und weiter in Stammzottengefäße 3. Ordnung (Ramulusgefäße). Arterielle und venöse Schenkel der Zottengefäße sind durch ein paravaskuläres, dichtes Kapillarnetz und die sinusoidalen Kapillaren (Abbildung 3) der Zottenperipherie verbunden.

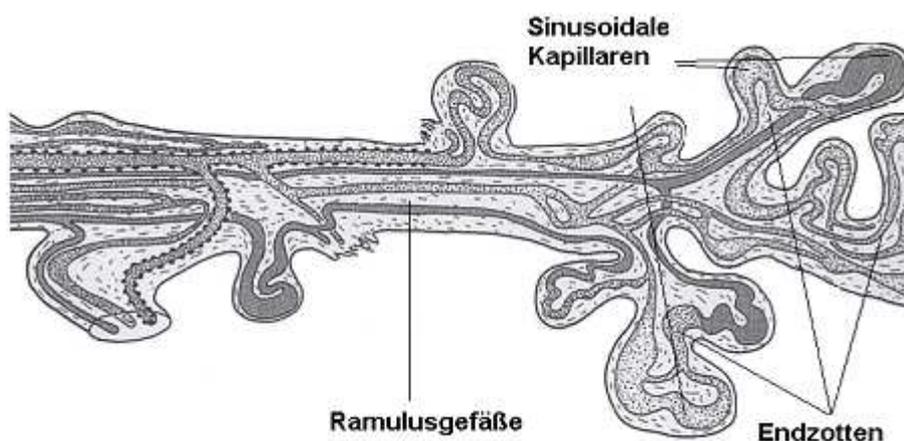


Abbildung 3: Darstellung der fetoplazentaren Gefäße im distalen Bereich des Zottenbaumes.

1.3 Plazentaveränderungen bei Diabetes mellitus

Dem Symptom „Hyperglykämie“ liegen unterschiedliche Erkrankungen mit relativem oder absolutem Insulinmangel zugrunde. Stadium des jeweiligen Diabetestyps, mütterliche Folgeschäden und der Erfolg der Therapie beeinflussen das materno-fetale Wechselspiel besonders auf der Ebene der Plazenta.

Im makromorphologischen Bereich lässt sich eine gute Korrelation zwischen Geburtsgewicht und Plazentagröße und -gewicht erkennen. Bei leichteren Formen und nur kurzer Dauer des Diabetes ist die Plazenta in der Regel vergrößert und das Gewicht ist erhöht. Am stärksten ausgeprägt ist die Relation von Plazentagewicht zum Kindsgewicht bei Gestationsdiabetes. Bei sehr schweren Fällen des Diabetes Typ 1 mit mütterlicher Angiopathie sind die Plazenten verglichen mit normalen Schwangerschaften dagegen oft erheblich leichter[3]. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass ein fetaler reaktiver Hyperinsulinismus das Plazentawachstum stimuliert.

Im mikroskopischen Bereich sind die morphologischen Veränderungen nicht einheitlich, zeichnen sich aber hauptsächlich durch eine relative Unreife der histologisch erfassbaren Strukturen aus. Mehr als 60% der diabetischen Plazenten sind für das Schwangerschaftsalter unzureichend ausdifferenziert.

Unspezifische Veränderungen werden in Form von fibrinoiden Zottennekrosen Stromaödemem, Stromaneukrosen, Stromafibrosen und Zunahme des Kollagengehalts im Stroma beobachtet. Bei einem Viertel der diabetischen Plazenten tritt eine proliferative Endarteriitis der fetalen Zottenstammarterien auf.

Auffällige Unterschiede bestehen bei der Zottengröße und Zottenvaskularisation[4]. Histologische und vor allem quantitativ histometrische Untersuchungen an Terminalzotten diabetischer Plazenten zeigten, dass der Grad der Unreife mit dem Schweregrad des Diabetes mellitus zunächst von Gruppe A nach White bis zur Gruppe B zunimmt, dass die Reifungsstörungen von Plazenten der Gruppe D dann allerdings weniger ausgeprägt sind als bei der Gruppe A[5]. Diese letzte Beobachtung mag damit zusammenhängen, dass bei Schwangeren der Diabetesgruppe D infolge des längeren Bestehens der Erkrankung bereits Gefäßveränderungen an den uteroplazentaren Gefäßen vorliegen, die gleichsam die Reifungsverzögerung kompensieren[6]. Eine Einengung der uteroplazentaren Gefäße bewirkt eine O₂-Minderversorgung der Plazenta, was reaktiv zu einer Akzeleration der Zottenreifung führen kann. Selbst bei Gestationsdiabetes lässt sich schon eine Retardierung in der Zottenvaskularisation nachweisen[7-9].

Die ungenügende Ausdifferenzierung der Zotten, der Zottengefäße und der Epithelplatten als Austauschmembranen, die für die Transportleitung der Plazenta verantwortlich sind (bzw. der relative Endzottenmangel), scheint im Widerspruch zur Entwicklung makrosomer Kinder bei mütterlichem Diabetes mellitus zu stehen. Spekulativ könnte die für das Wachstum ausreichende Versorgung mit Nährstoffen mit der die Unreife kompensierenden Gesamtgröße des Organs erklärt werden. Die Erfahrung spricht dafür, dass die funktionelle Beeinträchtigung sich vor allem auf den Gasaustausch und die Versorgung des Feten mit Sauerstoff auswirkt. Eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Zottenunreife und dem Risiko der Asphyxie wurde auch beschrieben[10]. Tatsächlich bleiben die Reifungsstörungen von der Qualität der mütterlichen Stoffwechseleinstellung weitestgehend unbeeinflusst, wie sich histometrisch nachweisen ließ[11].

1.4 Plazentaveränderungen bei intrauteriner Wachstumsretardierung (IUWR)

Die intrauterine Wachstumsretardierung kann eine große Anzahl unterschiedlicher Gründe haben. Häufig liegen Störungen der fetalen O₂-Versorgung während der Schwangerschaft vor, die durch maternale, plazentare oder fetale Ursachen zustande kommen (siehe Tabelle 1).

Das fetale Wachstum ist außerdem von genetischen Faktoren, vom Angebot an Nährstoffen an den Fetus sowie der Blutversorgung des Uterus einschließlich der Plazenta abhängig. Der Gasaustausch zwischen Mutter und Kind kann durch Veränderung der Membranen oder durch eine eingeschränkte Perfusion der Plazenta behindert werden [12].

Plazentaveränderungen, die häufig bei intrauteriner Wachstumsretardierung bestehen, sind persistierende unreife Intermediärzotten bis zum Geburtstermin, die keinen genügenden Sauerstoffaustausch ermöglichen, überreife Zottenbäume, die nach Verlust ihrer Wachstumsreserven durch verstärkte Bildung von Terminalzotten und Kaliberverkleinerung derselben auffallen, oder aber Plazenten mit einem Endzotten-Mangel.

Maternale Ursachen	Plazentare Ursachen
Ventilationsstörungen	Reduktion der Austauschfläche
Herzfehler	Vergrößerung der Diffusionsstrecken
Anämie	EPH-Syndrom
Störungen der uterinen Durchblutung	Wachstumsretardierung
Hypoxämie und Azidose	Infektion der Plazenta
Reduktion der O ₂ -Transportkapazität	Diabetes mellitus
Hyper- und Polysystolie	Rh-Inkompatibilität
Dauerkontraktion des Uterus	Fetale Ursachen
Vorzeitige Ablösung der Plazenta	Störungen der umbilikalen Zirkulation
Uterus bicornis	Rh-Inkompatibilität
Hypotonie	Nabelschnurkompression
Schock	Nabelschnurmissbildungen
EPH-Syndrom	Anämie

Tabelle 1: Maternale, plazentare und fetale Ursachen für Störungen der fetalen O₂-Versorgung während der Schwangerschaft nach Künzel[1](Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe Band 4, Schwangerschaft I).

Bei etwa 20% der sogenannten Mangelkinder erweist sich die Plazenta jedoch als histologisch normal aber makroskopisch zu klein[13;14]. Als Ursache kommt hier eine zu geringe plazentare Haftfläche infolge einer ungünstigen Implantationsstelle, verbunden mit mangelnder Vaskularisation, in Frage.

Daneben finden sich Fälle von intrauteriner Mangelentwicklung, bei denen die Plazenta eine normale Größe aufweist, jedoch in ihrer funktionstüchtigen Oberfläche, meist infolge verminderter uteroplazentarer Durchblutung, sekundär beeinträchtigt wird[15]. Beispiele hierfür sind die intrauterinen fetalen Wachstumsretardierungen bei der EPH-Gestose, bei starken Raucherinnen oder bei mütterlichem Diabetes mellitus.

Untersuchungen von Fox und Teasdale[12;16] an Plazenten bei der sogenannten idiopathischen intrauterinen fetalen Mangelentwicklung zeigen, dass diese Plazenten obwohl sie bei grob morphologischer Beurteilung zunächst als histologisch normal imponieren, auf ultrastruktureller Ebene Zeichen einer Reifungsverzögerung aufweisen. Diese Zeichen sind zum Beispiel mangelhafte Ausbildung von Epithelplatten, nicht zu Sinusoiden umgewandelte Kapillaren und Hyperplasie oder Persistenz des Zytotrophoblasten. Histometrische Untersuchungen an Terminalzotten solcher Plazenten konnten diese Reifungsretardierung bestätigen[17].

1.5 Gefäßdarstellung

In den letzten Jahren sind neue, zum Teil konkurrierende Methoden auf dem Gebiet der vaskulären Bildgebung entwickelt worden[18-28]. Neben der mikroskopischen Histomorphometrie auf der einen und der klinischen Angiographie auf der anderen Seite stehen sowohl dem Kliniker als auch dem Grundlagenforscher weitere Verfahren zur Analyse von Gefäßen zur Verfügung. Dies sind zum Beispiel die MRT[29;30], der intravaskuläre Ultraschall[31-33] oder die Mehrzeilen-CT.

Auf dem Gebiet der in-vitro Diagnostik und der präklinischen Forschung ist die Histologie von Gefrier- oder Paraffinschnitten der Gold-Standard zur quantitativen Bestimmung von Gefäßmorphologie und -morphometrie. Üblicherweise werden dabei histologische Schnitte mit verschiedenen Färbemethoden untersucht. Die Nachteile dieses Verfahrens liegen neben der zeit- und personalintensiven Probenpräparation vor allem in der nur zweidimensionalen Gefäßdarstellung. Die Quantifizierung von Gefäßparametern wie Gefäßwanddicke, Stenosegraden oder Anteil der Gefäße am Gesamtvolumen der Probe, erfolgt dabei an nur wenigen Serienschnitten.

Mit der Angiographie können nur bedingt Aussagen zur Gefäßmorphologie getroffen werden, und es lassen sich lediglich makromorphologische Veränderungen erkennen. Neue, ergänzende radiologische Methoden, wie die Angio-MRT[34] und Mehrzeilen-CT-Technologie[35], befinden sich bereits im klinischen Einsatz. Trotz beeindruckender Ergebnisse in der Gefäßdarstellung lassen beide Methoden mit einer Ortsauflösung im Millimeterbereich noch keine befriedigende Beurteilung der prä- und postkapillären Gefäße und der Gefäßwand zu.

Als neue Methode und potentielle Alternative zur quantitativen Histologie hat sich in den letzten Jahren die Technologie der Mikro-Computertomographie in der ex-vivo Forschung etabliert[36-38]. Zahlreiche Untersuchungen wurden in der letzten Zeit auf dem Gebiet der vaskulären Grundlagenforschung vorgenommen und es haben sich eindrucksvolle Ergebnisse in der Darstellung und Quantifizierung von Gefäßen und pathologischen Gefäßstrukturen ergeben.

1.6 Fragestellung der Arbeit

In einer früheren Studie an Plazenten von Termingeburten bei unkomplizierten Schwangerschaften[39] konnten wir bereits zeigen, dass die Mikro-CT eine neue Methode in der Evaluation des fetoplazentaren Gefäßsystems darstellt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die ex-vivo Quantifizierung des fetoplazentaren Gefäßsystems bei mütterlichem Diabetes mellitus und bei intrauteriner Wachstumsretardierung. Von besonderem Interesse ist dabei die lückenlose Evaluation des fetoplazentaren Gefäßbaumes von den Chorionplattenarterien bis zum kapillären Gefäßsystem.

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft der Proben, Einschluss- und Ausschlusskriterien

Die Gewinnung der Proben erfolgte am Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Die Kontrollgruppe (Gruppe A) stammt von unkomplizierten Schwangerschaften, bei denen das Geburtsgewicht des Kindes zwischen der 10. und 90. Perzentile, wenn möglich im Bereich der 50. Perzentile liegen sollte. Die Plazenten der Gruppe B stammten von Müttern mit Diabetes mellitus Typ 1 oder Gestationsdiabetes, bei deren Kindern während der Schwangerschaft im Ultraschall eine Makrosomie festgestellt wurde. Das Geburtsgewicht der Kinder lag oberhalb der 90. Perzentile. In der Gruppe C, mit intrauteriner Wachstumsretardierung, wurde als Maß ebenso das altersbezogene Gewicht herangezogen, welches unterhalb der 5. Perzentile lag.

Gruppe A (Kontrollgruppe, n= 24): Komplikationslose Schwangerschaften, „normale“ Kinder, Geburtsgewicht 10.– 90. Perzentile, 36.-39. SSW

Gruppe B (n= 24): Mütter mit Diabetes mellitus Typ 1 oder Gestationsdiabetes, makrosome Kinder, Geburtsgewicht > 90. Perzentile, 35.-39. SSW

Gruppe C (n= 24): Wachstumsretardierte Kinder, Geburtsgewicht < 5. Perzentile, 35 –39. SSW

Ausschlusskriterien waren zum einen Chromosomenanomalien sowie sichtbare Plazentaverletzungen, da hier eine vollständige Kontrastmittelperfusion nicht möglich war. Ebenso wurden Plazenten von Mehrlingsgraviditäten oder Hepatitis- bzw. HIV-infizierter Mütter ausgeschlossen.

2.2 Probengewinnung und Präparation

Nach vorliegender Zustimmung der Mütter, wurden die Plazenten direkt nach der Entbindung untersucht. Zunächst wurde das Gewicht und Volumen der Plazenten bestimmt. Zur Verhinderung einer Auskühlung des Gewebes und daraus folgender Gefäßkontraktion, lagerten die Plazenten während der folgenden Präparation in 37° warmer physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%). Vor der Kontrastmittelperfusion mussten die fetoplazentaren Gefäße ausgiebig gespült werden, bis kein Blut mehr in den Gefäßen vorhanden war, damit eine spätere homogene Füllung mit Kontrastmittel gewährleistet werden konnte. Dazu wurde eine Umbilikalarterie kanüliert und mit einer Mischung aus 25.000 i.E. Heparin und 20ml Xylonest auf je 500ml 0,9%iges NaCl gespült, bis eine Blutleere der Plazenten bestand und aus der Umbilikalvene nur noch NaCl ohne Blutbeimengungen zurückfloss (Abbildung 4a). Die Zugabe von Heparin und Xylonest sollte Thrombenbildung und reflektorische Gefäßkontraktionen während der Spülung verhindern.

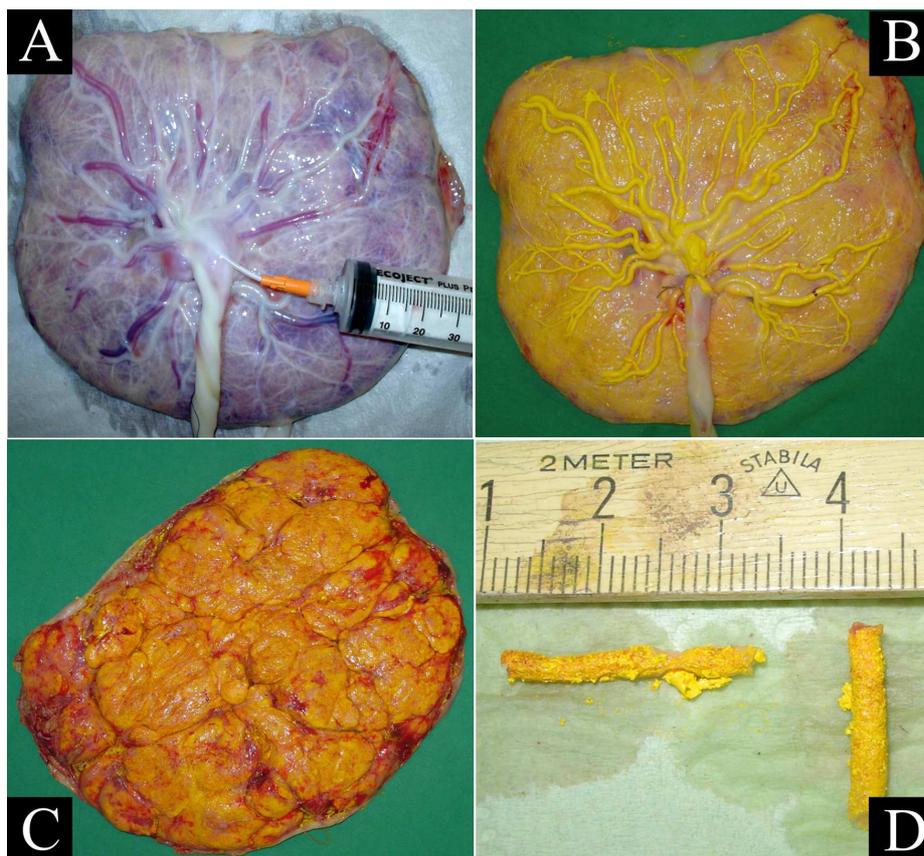


Abbildung 4: Präparation der Plazenta a: Spülung mit NaCl 0,9%, Heparin und Xylonest; b+c: mit Microfil perfundierte Plazenta von der fetalen Seite (b) und maternalen Seite (c); d: Proben aus kontrastmittelgefüllter Plazenta

Als Röntgenkontrastmittel zur Darstellung der fetoplazentaren Gefäße in der Mikro-CT wurde MICROFIL der Firma Flow Tech, Inc., Massachusetts verwendet. Vor der Perfusion mussten die verschiedenen Komponenten des Kontrastmittels (MV-Diluent, MV-Compound, Curing Agent) im Verhältnis von 5ml zu 4ml plus 5% Curing Agent gemixt werden, wonach eine Verarbeitungszeit von ca. 20min verblieb.

Unter konstantem Druck von ca. 100 cm H₂O wurden die fetoplazentaren Gefäße mit Kontrastmittel perfundiert (Abbildung 4b und 4c). Anschließend wurde die gesamte Plazenta für ca. 24 Stunden bei -20° Celsius eingefroren, um eine leichtere Probenentnahme mit einer Knochenstanze zu ermöglichen.

Mit einer Schablone wurde die Plazenta in vier innere und vier äußere Quadranten eingeteilt und aus jedem Quadranten eine Gewebeprobe mit einem Durchmesser von ca. 2mm durch die gesamten Dicke der Plazenta entnommen (Abbildung 4d), so dass pro Plazenta acht Proben vorhanden waren. Diese Proben wurden bis zur Untersuchung in der Mikro-CT in kleinen Küvetten, gefüllt mit 3,7%igem Formalin, gelagert.

2.3 Mikro-Computertomographie

2.3.1 Technische Grundlagen der Mikro-CT-Technologie

Im Gegensatz zur konventionellen Projektionsradiographie, bei der ein dreidimensionaler Körper auf einer Fläche abgebildet wird, ermöglicht die Computertomographie die Erzeugung von Schnittbildern, sogenannten Tomogrammen. Die CT ist eine Weiterentwicklung des klassischen Tomographieprinzips und stellt die Schwächungswerte der durchstrahlten Schichten ortsfest und überlagerungsfrei dar. Die Methodik der CT, sowie der Mikro-CT beruht auf den Komponenten:

Akquisition

Rekonstruktion

Visualisierung und Quantifizierung

Der zunächst bedeutendste Unterschied zwischen klinischen CT- und Mikro-CT-Scannern liegt in der Ortsauflösung der Bilddaten[40]. Während mit Ganzkörper-CT-Geräten eine Ortsauflösung von ca. 360-400 μm erzielt werden kann, liegt diese bei Mikro-CT-Geräten im Bereich zwischen 1 und 50 μm . Diese Erhöhung der Ortsauflösungen um ein bis zwei Größenordnungen impliziert jedoch ein Design, welches sich in wesentlichen Punkten von klinischen CT-Scannern unterscheidet (Tabelle 2). Beispielsweise können konventionelle Röntgenröhren aufgrund ihrer zu hohen Fokusgröße für Mikro-CT-Systeme nicht verwendet werden. Stattdessen werden entweder Synchrotronstrahlungsquellen oder optimierte Fein- und Mikrofokusröhren mit Transmissions- oder Reflektionsanoden eingesetzt, wodurch eine kleinere Fokusgröße erzielt werden kann. Die Wahl der Röntgenquelle legt dann die Geometrie des Mikro-CT-Scanners fest: Parallelstrahlgeometrie für Synchrotronstrahlung oder Fächer- bzw. Kegelstrahlgeometrie für Fein- und Mikrofokusröhren.

	Ganzkörperspiral-CT	Mikro-CT
Geometrie	Fächerstrahl Detektor und Röhre rotieren	Parallel-, Fächer oder Kegelstrahl Objekt rotiert
Maximale Ortsauflösung		
In der Schicht	0,30-1,0mm	1-50 μ m
Schichtdicke	0,50-2,0mm	1-50 μ m (Synchrotronstrahlung bis 1 μ m)
Röhre	Hochleistungs CT-Röhre	Synchrotronstrahlungsquelle, Fein- oder Mikrofokusröhre
Strom	50-500mA	40-100 μ A
Spannung	80-140kV	10-150kV
Fokusgröße	0,7-1,5mm	5-30 μ m
Detektor	Zeilendetektor	Zeilen- oder Flächendetektor
Objektdurchmesser	5-50cm	<5cm (Spezialgeräte bis 8cm)
Matrixgröße	512	512-1024
Volumenscanzeit	5-20s (Thorax)	Minuten bis Stunden

Tabelle 2: Merkmale von Mikro-CT-Scannern im Vergleich zu klinischen Spiral-CT-Scannern (modifiziert nach Engelke et al. 1999).

Die maximal erreichbare Auflösung im Falle der Parallelstrahlgeometrie ist abhängig von der Auflösung des Detektors, wohingegen bei der Fächer- und Kegelstrahlgeometrie die Fokusgröße den entscheidenden Parameter darstellt. Neben der Detektorauflösung bzw. der Quellgröße (Fokus) ist auch die zur Verfügung stehende Anzahl der Röntgenquanten von entscheidender Bedeutung. Im vereinfachten Falle monochromatischer Strahlung gilt zum Beispiel: Soll die Auflösung bei konstantem Probendurchmesser und bei gleichem Bildkontrast

und Bildrauschen isotrop um den Faktor 10 erhöht werden, so wird eine um den Faktor 10000 höhere Quantenzahl benötigt[41]. Da eine Verringerung der Fokusgröße, welche zum Erzielen einer höheren Auflösung erstrebenswert scheint, jedoch mit einer Verringerung der Quantenzahl einhergeht, kommt der Ausnutzung der zur Verfügung stehenden Röntgenquanten eine besondere Bedeutung zu.

Dies hat in der Praxis zu einem Übergang von der Fächer- zur Kegelstrahlgeometrie geführt. Letztere ist technisch aufwendiger, da erstens statt eines Zeilen- ein Flächendetektor benötigt wird und zweitens der Rekonstruktionsalgorithmus wesentlich komplizierter ist. Neben der besseren Nutzung der Röntgenquanten reduziert die Kegelstrahlgeometrie aber auch, durch die gleichzeitige Erfassung aller Schichten eines zu rekonstruierenden Volumens, die Messzeit gegenüber der Fächerstrahlgeometrie.

Die Synchrotronstrahlung bietet im Röntgenbereich ein kontinuierliches Spektrum, aus dem bei mikrocomputertomographischen Untersuchungen ein monochromatischer Strahl herausgefiltert wird. Die Intensität (Anzahl der zur Verfügung stehenden Röntgenquanten) dieses monochromatischen Strahls ist um Größenordnungen höher als diejenige konventioneller Röntgenröhren[42]. Daher ist die Synchrotronstrahlung die Quelle der Wahl, wenn entweder extrem hohe Auflösungswerte ($<5\mu\text{m}$) angestrebt werden, oder, wie z.B. bei In-vivo-Untersuchungen, die mögliche Scandauer begrenzt ist. Die Nachteile sind die Ortsgebundenheit, die begrenzte Verfügbarkeit der Elektronenspeicherringe, mit denen die Synchrotronstrahlung erzeugt wird und der vergleichsweise relativ hohe experimentelle Aufwand.

Bei dem uns zur Verfügung stehenden Mikro-CT handelt es sich um ein Gerät mit Kegelstrahlgeometrie und einer Mikrofokusröntgenröhre mit einer Fokusgröße von $8\mu\text{m}$ von der Firma SkyScan (SkyScan1027_80kV, Aartselaar, Belgien). Es besteht aus dem Scanner, der in ein röntgendichtes Gehäuse eingebracht ist, sowie zwei PC-Einheiten zur Gerätesteuerung und Bildrekonstruktion.

Im Scanner ist ein Probenschlitten zwischen der Mikrofokusröntgenröhre und einem CCD (Charge-Coupled-Device)-Detektor auf einer drehbaren Achse befestigt. Dieser führt eine Rotationsbewegung in frei definierbaren Winkelschritten durch und kann entlang der Längsachse zwischen Röntgenröhre und CCD-Detektor bewegt werden. Das heißt, nicht die Gantry dreht sich um das Objekt, sondern das Objekt dreht sich in einem feststehenden Strahlengang (Abb. 5).

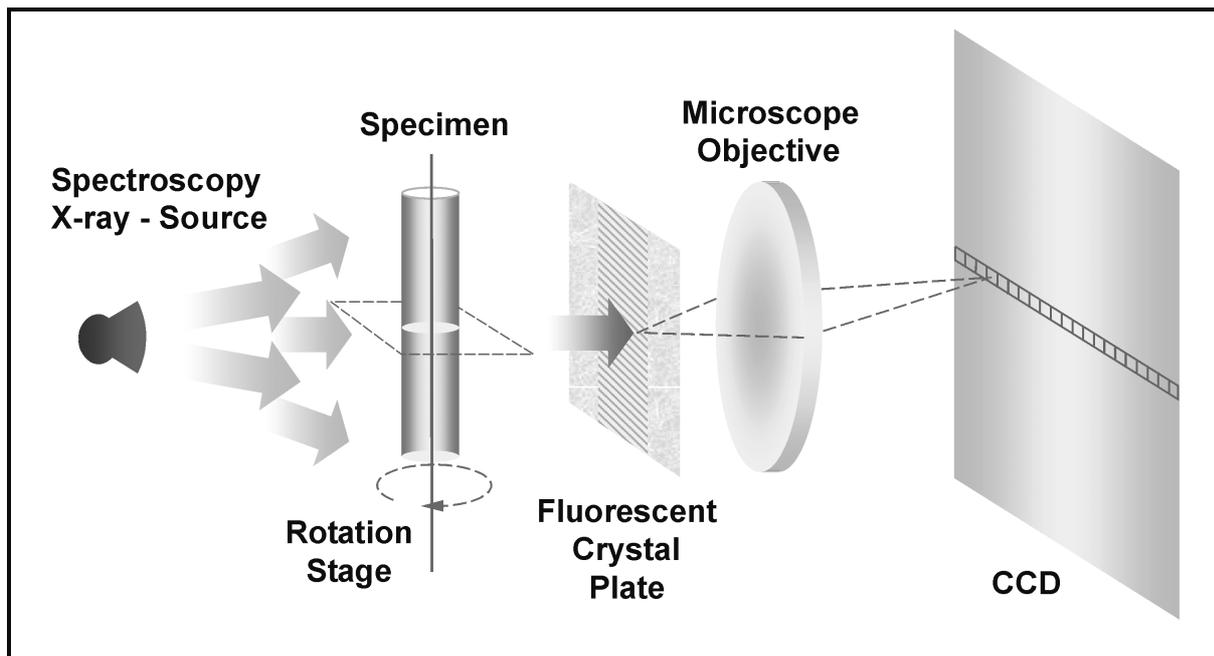


Abbildung 5: Darstellung des Aufbaus eines Mikro-CT-Scanners (mit freundlicher Genehmigung von Eric L. Ritman, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA)

Die Verschiebung entlang der Längsachse ermöglicht einen sehr variablen Vergrößerungsmaßstab, so dass Proben bis zu einem maximalen Durchmesser von 1,5cm untersucht werden können. Das Projektionsbild des Objektes auf dem CCD-Detektor darf jedoch nicht breiter sein als der Detektor selbst, da sonst Artefakte in der Bildberechnung entstehen. Die theoretische Möglichkeit, ein sehr kleines Objekt dicht an die Strahlenquelle heranzuführen, um so einen möglichst hohen Vergrößerungsfaktor zu erzielen, ist technisch durch die Brennfleckgröße begrenzt. Bei zunehmender Annäherung des Objekts an die Strahlenquelle wird das Projektionsbild des Objektes entsprechend unscharf, da auch die Mikrofokusröhre noch einen Fokus von mehreren μm (in diesem Fall $8\mu\text{m}$) hat. Die Fokusgröße bestimmt also die maximale Auflösung: Je kleiner der Fokus jedoch ist, desto geringer wird auch die Leistung der Röntgenröhre. Daraus ergeben sich für die Mikro-CT lange Messzeiten bei geringen Probengrößen.

Die luftgekühlte Mikrofokusröhre des Gerätes, kann bei Beschleunigungsspannungen von 20 bis 80kV bei einem Röhrenstrom von 0-100 μA und einer Leistung von 8W betrieben werden. Als Detektor dient eine ca. 25 μm dicke Szintillatorschicht, die auf dem Kamerafenster einer elektronisch gekühlten CCD-Kamera mit 1024*1024 Pixeln aufliegt. Er lässt einen maximalen Bildausschnitt (field of view, FOW) von 25mm zu. Eine kontinuierliche Überwachung der Probe

ist durch eine kleine optische Kamera gewährleistet. Die Spannungsquelle und die Steuerelektronik sind im Scanner untergebracht.

Für die Bilderzeugung durch die Mikrofokusröhre werden Röntgenquanten erzeugt und kegel- oder fächerförmig fokussiert. Beim Durchtritt durch das Objekt werden sie geschwächt und der CCD-Detektor misst die ankommende Röntgenstrahlung, die in ein digitales Signal umgewandelt wird. Es können so in $0,45^\circ$ oder $0,90^\circ$ Winkelschritten Absorptionsbilder des Objektes erzeugt werden. Diese werden dann mit Hilfe einer Rückprojektionstechnik, dem Feldkamp-Algorithmus[37;43], in axiale Schnittbilder umgewandelt. Es entstehen so Bilder mit einer Größe von ca. einem Megabyte (MB) aus isotropen Voxeln bei einer Akquisitionsmatrix von 1024×1024 Pixeln. Bei einer gewählten Matrix von 512×512 Pixeln beträgt die Datenmenge pro Bild 257 Kilobyte (kB).

Die Auflösung in der Mikro-CT ist also zusammengefasst von mehreren Faktoren abhängig: Die Fokusgröße der Röntgenröhre sollte so klein wie möglich sein, je kleiner diese jedoch ist, desto geringer ist auch ihre Leistung. Daraus ergeben sich somit bei diesen Geräten wesentlich längere Messzeiten als bei den klinisch eingesetzten Computertomographen, bei denen die Messzeit im Sekundenbereich liegt. Durch die Verschiebbarkeit des Probenschlittens zwischen Strahler und CCD-Detektor lässt sich der Vergrößerungsfaktor in weiten Bereichen variieren. Einschränkungen bestehen jedoch durch die Fokusgröße von $8\mu\text{m}$. Die theoretische Möglichkeit, ein sehr kleines Objekt möglichst dicht an die Strahlenquelle heranzuführen, um so eine hohe Vergrößerung zu erzielen, ist durch die geometrische Unschärfe des Projektionsbildes auf dem CCD-Detektor begrenzt, da die Strahlungsquelle nicht wirklich punktförmig ist. Eine weitere Einschränkung ist durch die maximale Probengröße gegeben: Das Projektionsbild des Objektes auf dem CCD-Detektor darf nicht breiter sein als der Detektor selbst, da sonst Artefakte bei der Bildberechnung entstehen.

Die maximale geometrische Auflösung des Projektionsbildes und der daraus errechneten Querschnittsbilder beträgt somit $1/1000$ des Objektdurchmessers. Die tatsächliche Auflösung nimmt jedoch wegen der Brennfleckgröße (in unserem Fall $8\mu\text{m}$) in dem Maße ab, in dem der Vergrößerungsfaktor durch Annäherung des Probenschlittens an die Röntgenröhre gesteigert wird.

2.3.2 Bildakquisition

Nach Entnahme der Plazentaprobe aus der Küvette, in der sie in 3,7%igem Formalin lagerten, wurden sie in Cellophanfolie gewickelt und auf der Probenhalterung mittels Formmasse zentriert fixiert. Die Cellophanumhüllung verhinderte das Austrocknen der Probe während des Scans und die Formmasse stellte sich als unkomplizierte und variabelste Fixationsmöglichkeit heraus. Jede Probe wurde in drei Scans gemessen, so dass jeweils ein Scan den oberen, einen den mittleren und einen den unteren Anteil der Probe darstellte. Dies geschah, da die Proben zu lang waren, um in einem einzigen Scan dargestellt zu werden. Außerdem konnte so bei der Auswertung zusätzlich eine Unterscheidung des Gefäßvolumenanteils chorionplattenarteriennah, in der Mitte der Plazenta und endzottennah gemacht werden (Abb. 6). Ebene A befindet sich auf der Seite der Chorionplattenarterie, Ebene B in der Mitte und Ebene C in Höhe der Endzotten.

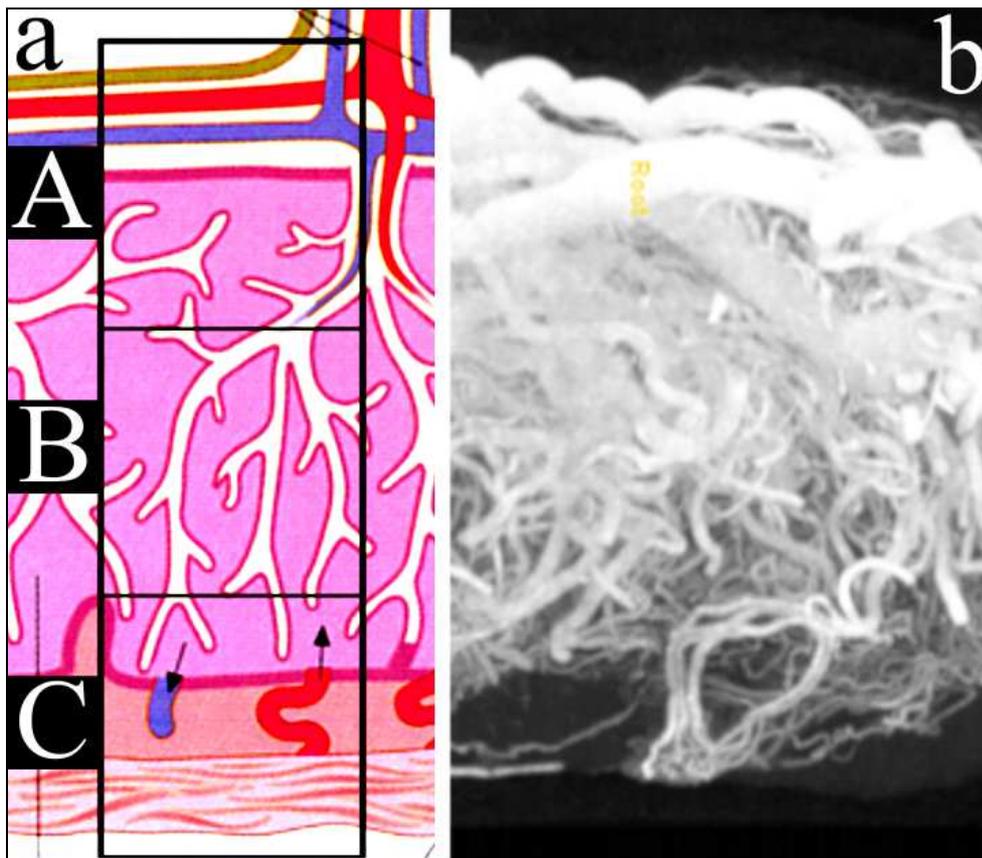


Abbildung 6: a: Schematische Darstellung der einzelnen gescannten und ausgewerteten Ebenen A (chorionplattenannah), B (mittlerer Gefäßbereich, Intermediärgefäße) und C (endzottennah, Kapillarsystem-, „terminal loops“) in jeder Plazentaprobe; b: im Mikro-CT gescanntes Bild durch die gesamte Dicke der Plazenta zur Darstellung der verschiedenen Ebenen.

Zur Messung wurde der Probenhalter in den Scanner eingesetzt und seine optimale Positionierung durch Anfertigung eines Übersichtsbildes (Scout view) des zu scannenden Anteils der Probe überprüft, (Abbildung 7).

Zeigte sich dort eine falsche oder suboptimale Einstellung der Probe, z.B. dezentrierte, zu hohe oder zu niedrige Abbildung, so konnte dies durch Manipulation des Probenzylinders und Ansteuerung der Probenhalterung beeinflusst werden. Kontrollieren ließ sich dies durch in 20° Schritten von 0°-180° aufgenommene Topogramme. Alle Proben wurden mit den gleichen Parametern untersucht.

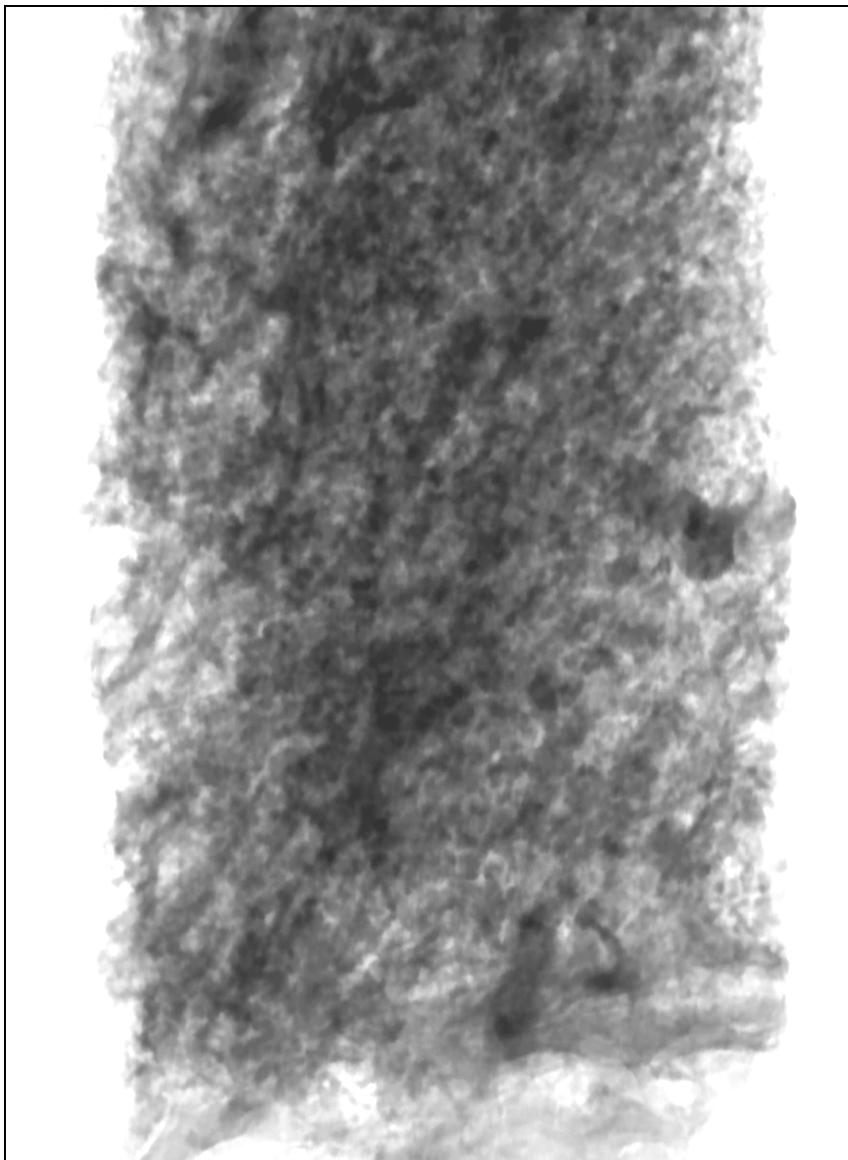


Abbildung 7: Scout view zur Überprüfung einer optimalen Positionierung der Probe im Probenhalter.

Die Messungen erfolgten bei einer Röhrenspannung von 80 kV, einem Strom von 100 μ A, ohne Vorfilterung des Röhrenspektrums und mit einer Belichtungszeit von 2,4sek pro Rotationsschritt. Die Vergrößerung war mit dem Faktor 61 immer konstant. Pro Rotationsschritt wurden 3 Bilder erzeugt, aus denen der Durchschnitt errechnet wurde (averaging by 3 frames). Die Rotationswinkelschritte betragen 0,45° bei einer Drehung um 180° und es wurden Absorptionsbilder bei einer Akquisitionsmatrix von 1024*1024 Pixel erzeugt, die mit Hilfe der Rückprojektionstechnik in isotrope, axiale Schnittbilder umgewandelt werden konnten. Die Expositionszeit wurde nach der Auswertung einer Absorptionskurve im Topogramm ermittelt, dies diente der Vermeidung von Über- und Unterbelichtungen. Bei einer durchschnittlichen Expositionszeit von 2,4 sek und ca. 412 Einzelbildern ergab sich eine reine Gesamtexpositionszeit von ca. 16,5 Minuten. Die Gesamtscannzeit war jedoch ca. dreimal länger, da zwischen jedem Einzelbild eine Abspeicherung der aufgenommenen Rohdaten in sogenannten TIF-Dateien erfolgen musste. Vor dem Entfernen des Probenzylinders aus dem Gerät ließ sich die ausreichende Bildqualität anhand der Anfertigung eines einzelnen Rekonstruktionsbildes überprüfen. Die Zeit, die für die gesamte Bildrekonstruktion unter Verwendung des Feldkamp-Algorithmus[37;43] benötigt wurde, betrug bei Verwendung eines dualen Intel®Xeon™Prozessors (2x1800MHz, 1024 MB RAM) mit dem Rekonstruktionsprogramm ca. eine Stunde.

2.3.3 Bildberechnung

Durch den primären Scanvorgang existierten zunächst nur Rohdaten, die im TIF-Format mit einer Größe von 2049kB (Matrix 1024*1024) vorlagen. Aus diesen Daten wurden axiale Schnittbilder rekonstruiert. Nach der Anfertigung einer einzelnen Rekonstruktion und der Optimierung der Grauwertdarstellung, d.h. der Festlegung des minimalen und maximalen Grauwertes, erfolgte die serielle Rekonstruktion der axialen Schnittbilder der gesamten Probe. Für die Rekonstruktion der axialen Schnittbilder war nur eine Rotation der Probe um 180° notwendig. Die weitere Rotation von 180°-360° hätte nur eine zusätzliche spiegelbildliche Information erbracht und das endgültige Schnittbildergebnis nicht beeinflusst. Außerdem wäre dadurch die erforderliche Bildakquisitionszeit (Scanzeit) verdoppelt worden. Die Darstellung erfolgte in negativem Kontrast, so dass Strukturen hoher Dichte weiß abgebildet wurden. Die erzeugten axialen Schnittbilder im Bitmap-Format besitzen eine Größe von ca. 1026kB, sie sind damit einer relativ zügigen Darstellung und Auswertung zugänglich. Erzeugt wurden ca. 960 Schnittbilder pro Probe bei einer Pixelgröße von 4 μ m.

2.3.4 Bildanalyse

Die Auswertung der in der Mikro-CT gescannten Plazentaprobe erfolgte mit dem Programm Analyze 7.0 (Mayo Foundation for Medical Education and Research, Lenexa, Kansas, USA). Mit diesem Programm mussten die vorhandenen Schnittbilder im Bitmap-Format zunächst in Volumendatensätze umgewandelt werden, um eine dreidimensionale Darstellung der Proben zu ermöglichen. Die Funktion „Volume Render“ führte eine Berechnung des Gesamtgewebavolumens und des Gefäßvolumens jeder Probe aus. Dazu musste zuvor eine quantitative Analyse sämtlicher in den Bildern vorkommender Grauwerte durchgeführt werden. Diese Analyse bezog alle Schnittbilder mit ein und wurde graphisch dargestellt. In dem angefertigten Histogramm der Grauwertverteilung konnten Häufigkeitsgipfel für Plazentagewebe und kontrastmittelgefüllte Gefäße erkannt und somit differenziert werden. Mit Hilfe der ermittelten Häufigkeitsgipfel wurden die Schwellenwerte (Thresholds) für Gewebe bei 60 und für Gefäße bei 150 festgelegt, so dass die „Volume Render“ Funktion damit Volumenangaben in mm³ für die jeweilige Plazentaprobe und ihr zugehöriges Gefäßvolumen errechnen konnte.

2.4 Histologie

Im Anschluss an die Probenpräparation und die Untersuchungen in der Mikro-CT wurden die Proben in Paraffin gebettet, histologische Schnitte angefertigt und diese dann mit Haematoxylin-Eosin gefärbt. Die histologischen Querschnittsbilder wurden mittels Mikroskop mit integrierter Kamera (Axioskop, Zeiss; Kamera: JVC, KY-F75U) digitalisiert.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des JMP-Statistikprogramms (Version JMP Release 6, JMP, A Business, Unit of SAS, SAS Campus Drive, NC 27513). Mittelwerte und Standardabweichung wurden für alle Parameter in jeder Gruppe berechnet. Die Daten wurden mit dem t-Test und der einfachen Varianzanalyse für unabhängige Stichproben ausgewertet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristik der Gruppen

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der Daten der untersuchten Plazenten. In der Kontrollgruppe variieren die Plazenten in ihrem Gewicht von 510g bis 660g und in ihrem Gestationsalter von Schwangerschaftswoche 36+6 bis 38+0. Alle neugeborenen Kinder sind altersentsprechend entwickelt und gesund. Das Geburtsgewicht liegt zwischen 2840g bis 3100g und befindet sich somit im Bereich der 50. Perzentile.

In der Gruppe der Diabetikerinnen gibt es Plazentagewichte von 540g bis 660g, das Gestationsalter liegt zwischen der 36+5 und 39+0 Schwangerschaftswoche und das Geburtsgewicht der Kinder variiert zwischen 3580g und 4280g, so dass alle Kinder über der 90. Perzentile liegen.

Bei den intrauterinen Wachstumsretardierungen liegen die Plazentagewichte zwischen 270g und 500g, das Gestationsalter zwischen der Woche 35+0 und 39+0, die Geburtsgewichte der Kinder zwischen 1830g und 2660g und alle Kinder befinden sich im Gewicht unterhalb der 5. Perzentile.

Das Gestationsalter der einzelnen Gruppen zeigt keine signifikanten Unterschiede. Vergleicht man die Plazentagewichte, so ist zu erkennen, dass zwischen der Kontrollgruppe und den Diabetikerinnen auch hier kein signifikanter Unterschied besteht.

Die Plazenten der Gruppe mit intrauteriner Wachstumsretardierung weisen jedoch erheblich geringere Gewichte gegenüber der Gruppen B und C auf ($p < 0,02$).

Das kindliche Geburtsgewicht zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen A-C (A vs B, $p < 0,01$; A vs C, $p < 0,00$; B vs C $p < 0,001$).

Kontrollgruppe						
	SSW	Plazentagewicht	Geburtsgewicht	Perzentile	Anzahl der Proben	VVF%
1	36+6	660g	2940g	50. (2860g)	n=8	21,66 ± 3,60
2	38+0	510g	3100g	50. (3160g)	n=8	20,88 ± 5,09
3	37+0	550g	2840g	50. (3090g)	n=8	19,05 ± 5,75
DB						
	SSW	Plazentagewicht	Geburtsgewicht	Perzentile	Anzahl der Proben	VVF%
1	39+0	540g	3800g	>90. (3690g)	n=8	16,29 ± 1,89
2	37+5	600g	3580g	>90. (3500g)	n=8	20,18 ± 6,71
3	36+5	660g	4280g	>90. (3550g)	n=8	13,62 ± 6,58
IUWR						
	SSW	Plazentagewicht	Geburtsgewicht	Perzentile	Anzahl der Proben	VVF%
1	38+0	270g	1830g	<5. (2500g)	n=8	5,89 ± 2,04
2	39+0	480g	2660g	<5. (2670g)	n=8	9,25 ± 3,37
3	35+0	500g	1830g	<5. (1870g)	n=8	8,37 ± 3,26

Tabelle 3: Klinische Daten und Anteil des Gefäßvolumens (VVF%) der Plazenten bei der Kontrollgruppe, den Diabetikerplazenten (DB) und bei intrauteriner Wachstumsretardierung (IUWR).

3.2 Gefäßanalytik in der Mikro-CT

Abbildung 8 zeigt eine Übersicht der Gefäßprovinzen in der Ebene B (Intermediärgefäße). Zu sehen ist eine weitgehend homogene Füllung des fetoplazentaren Gefäßbaums in allen drei Gruppen. Gleichzeitig erkennt man die Unterschiede der Gefäßbäume der Diabetiker- und IUWR-Plazenten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe (8A) zeigt einen höheren Anteil an mit Kontrastmittel perfundierten Gefäßen als die Diabetikergruppe (8B) und IUWR-Plazenten (7C).

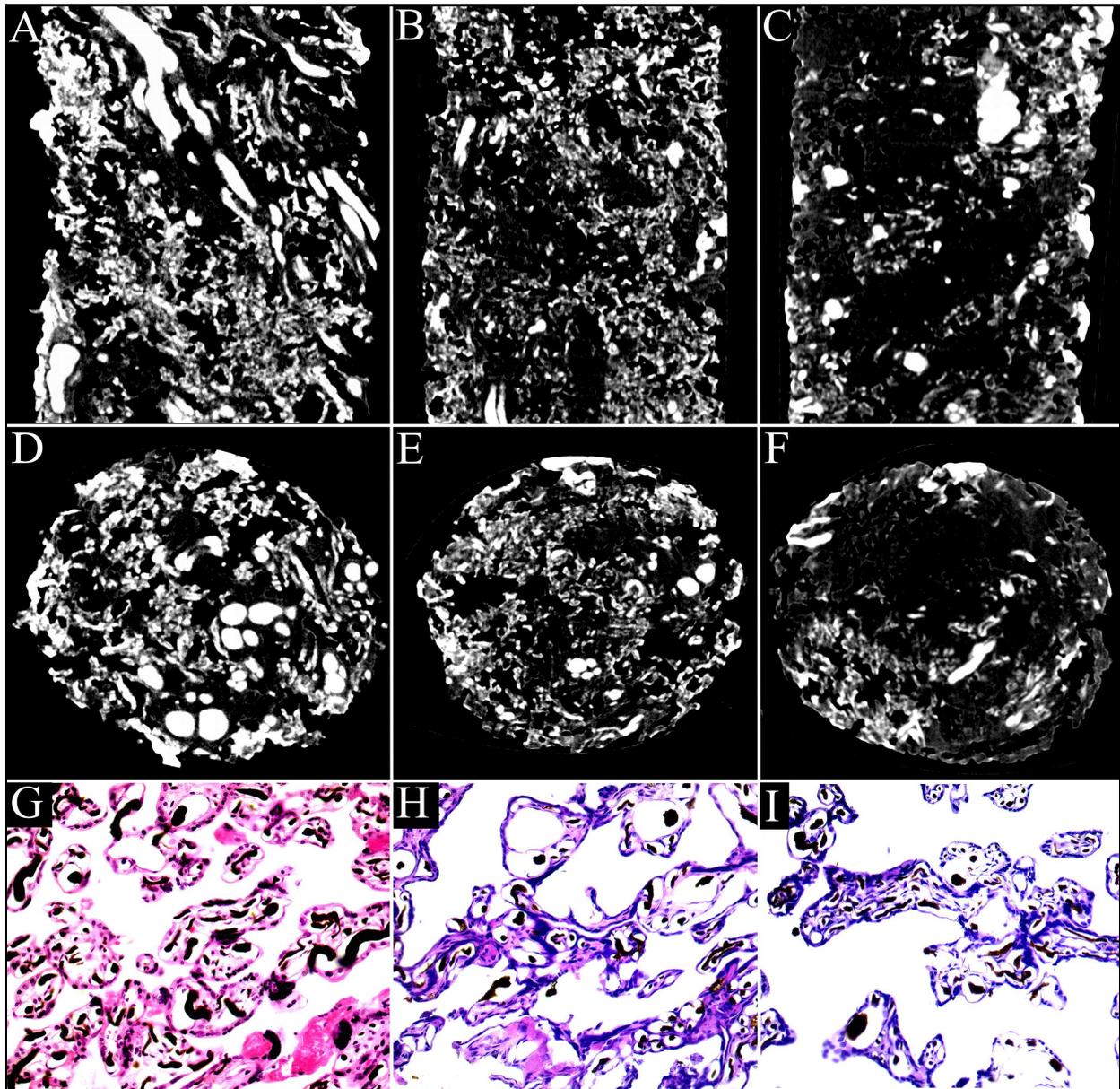


Abbildung 8: A-C: Sagittale Schnitte durch die Plazentaprobe als Maximum Intensity Projection (MIP) Darstellungen; A: Kontrollgruppe, B: Diabetes Mellitus, C: Intrauterine Wachstumsretardierung; D-F: Transversale Schnitte durch mit Mikrofil perfundierte Plazentaprobe D: Kontrollgruppe, E: Diabetes Mellitus, F: Intrauterine Wachstumsretardierung; G-I: mikroskopische Bilder histologischer Schnitte nach HE-Färbung der vorher im Mikro-CT gescannten Proben; G: Kontrollgruppe, H: Diabetes Mellitus, I: Intrauterine Wachstumsretardierung.

3.3 Statistische Auswertung

Im relativen Gefäßvolumenanteil der Gruppen zeigen sich signifikante Unterschiede. Die Kontrollgruppe besitzt einen mittleren Gefäßvolumenanteil von $20,53 \pm 1,34\%$. Bei den Diabetikerplazenten beträgt der Anteil $16,70 \pm 3,30\%$ und bei den Plazenten intrauteriner Wachstumsretardierung $7,84 \pm 1,74\%$.

Unter der Annahme, dass die drei Gruppen keine Unterschiede im Gefäßvolumenanteil zeigen, kann diese Hypothese (Nullhypothese) mit Hilfe des t-Testes geprüft werden. Die Ergebnisse des statistischen Testes sind in Abbildung 9 zusammengefasst. Bei einem α von 0,05 ergeben sich bei der Analyse der Mikro-CT-Ergebnisse des normalisierten Gefäßvolumenanteils p-Werte $< 0,01$. (Vergleich A–B: $p = 0,0072$, Vergleich A-C: $p < 0,0001$, Vergleich B-C: $p < 0,0001$). Damit kann bei dem Test mit einem $p < \alpha$ von einem signifikanten Ergebnis gesprochen und die Nullhypothese verworfen werden. Es kann so die Alternativhypothese angenommen werden, die besagt, dass die drei Gruppen signifikante Unterschiede im Gefäßvolumenanteil des fetoplazentaren Gefäßbaumes zeigen.

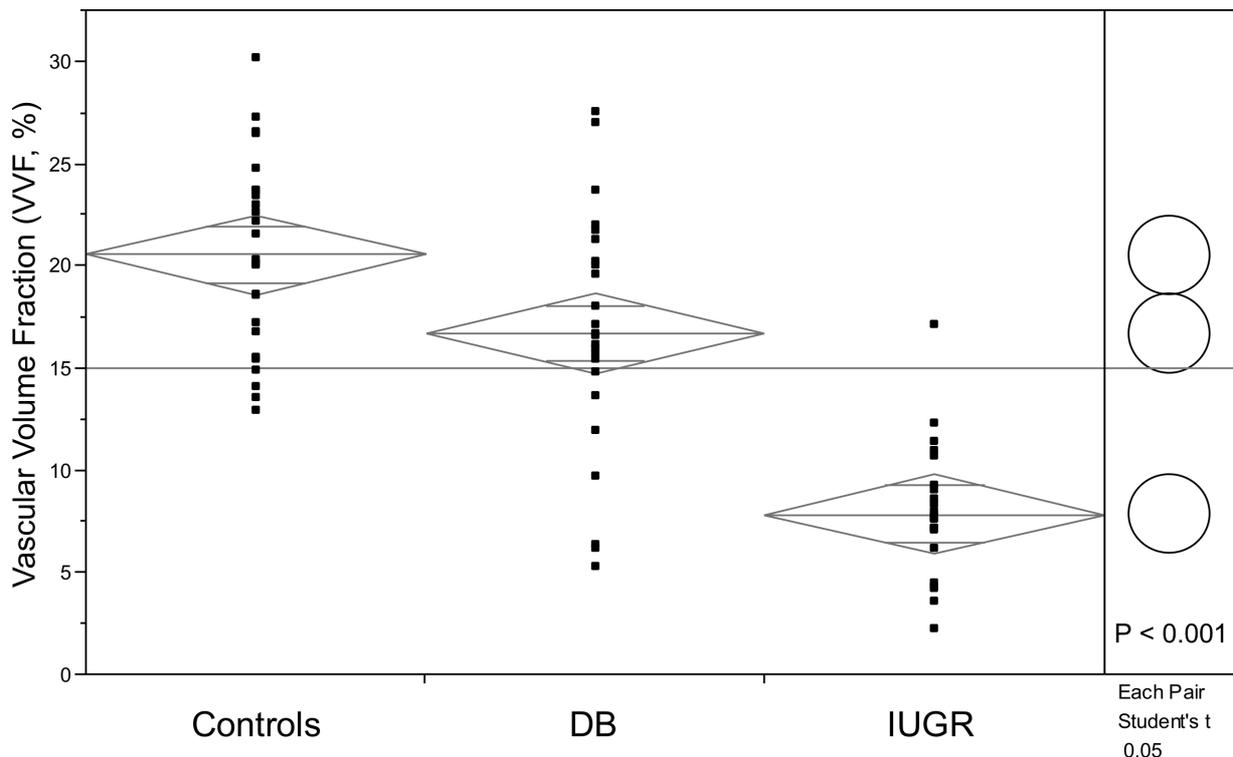


Abbildung 9: Vergleich des normalisierten Gefäßvolumenanteils der gesamten Probe bei der Kontrollgruppe (Controls), den Plazenten von Diabetikerinnen (DB) und bei intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR)

Diese Ergebnisse stellen sich nach Untersuchung der vollständigen Probe durch den Querschnitt der gesamten Plazenta von der Oberseite mit den Chorionplattenarterien bis zur Unterseite mit den Endzotten und Terminal Loops dar.

Wie in Abbildung 6 gezeigt, wird das Volumen der fetoplazentaren Gefäße zusätzlich in 3 unterschiedlichen Ebenen berechnet.

Beim Vergleich der drei Gruppen in der *Ebene A* ergeben sich folgende Unterschiede: Der Gefäßvolumenanteil der Kontrollgruppe beträgt $18,37 \pm 1,47\%$, die Diabetikerplazenten haben einen Gefäßvolumenanteil von $16,43 \pm 3,62\%$ und bei den intrauterinen Wachstumsretardierungen findet man $5,95 \pm 1,42\%$ Gefäßvolumenanteil.

Mit Hilfe des t-Testes (Abbildung 10, oben) und einem α von 0,05 ergibt sich hier bei der Analyse der normalisierten Gefäßvolumenanteilergebnisse beim Vergleich der Gruppe A und B kein $p < \alpha$ ($p = 0,2851$). Das heißt, die Nullhypothese kann hier nicht verworfen werden und es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Diabetikerplazenten. Die Unterschiede zwischen den Gruppen A und C und den Gruppen B und C haben beide einen p-Wert $< 0,0001$, so dass bei diesen von einem signifikant unterschiedlichen Gefäßvolumenanteil ausgegangen werden kann und die Alternativhypothese angenommen wird.

In der *Ebene B*, dem mittleren Anteil der Plazentaprobe, zeigt die Kontrollgruppe einen prozentualen Gefäßvolumenanteil von $21,51 \pm 2,25\%$, die Gruppe B von $17,39 \pm 2,63\%$, und Plazenten mit intrauterine Wachstumsretardierung von $8,44 \pm 2,05\%$.

Der t-Test mit einem α von 0,05 ergibt bei allen Vergleichen des normalisierten Gefäßanteils statistisch signifikante Unterschiede (A-B: $p = 0,01$, A-C: $p < 0,0001$, B-C: $p < 0,0001$).

In der *Ebene C*, dem Bereich der Endzotten im fetoplazentaren Gefäßbaum, ergibt sich für die Kontrollgruppe ein Gefäßvolumenanteil von $21,43 \pm 0,66\%$. Die Diabetikerplazenten haben einen Anteil von $14,97 \pm 4,69\%$ und die Plazenten mit intrauterinen Wachstumsretardierungen von $8,17 \pm 2,07\%$.

In der statistischen Auswertung der normalisierten Gefäßvolumenanteile in dieser Ebene ergeben sich bei einem α von 0,05 bei allen Vergleichen p-Werte $< \alpha$ (A-B: $p = 0,0002$, A-C: $p < 0,0001$, B-C: $p = 0,0001$). Somit kann bei den drei Gruppen in diesem Fall von signifikanten Unterschieden zwischen den Gefäßvolumenanteilen ausgegangen werden.

An diesen Ergebnissen fällt auf, dass sich die einzelnen Gruppen in ihren Gefäßvolumenanteilen bei Betrachtung der Proben im Ganzen signifikant unterscheiden. Werden die Proben aber nochmals in die Ebenen A,B und C unterteilt, sind sich die Kontrollgruppe und die Diabetikerplazenten auf der Ebene der Chorionplattenarterien sehr ähnlich und unterscheiden sich erst immer deutlicher, je weiter man distal in den Bereich der Endzotten gelangt.

Die Plazenten bei intrauteriner Wachstumsretardierung weisen sowohl als ganze Probe als auch bei der Unterteilung in verschiedene Ebenen immer signifikante Unterschiede im Gefäßvolumenanteil zu der Kontrollgruppe auf. Auch zu den Diabetikerplazenten zeigen sie durchgehend signifikante Unterschiede.

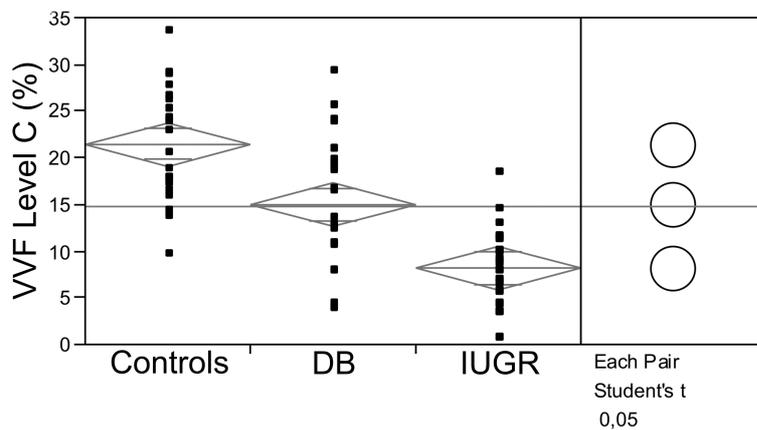
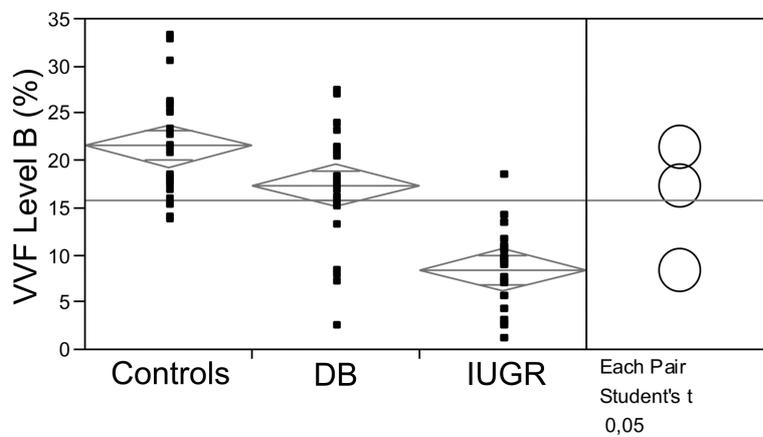
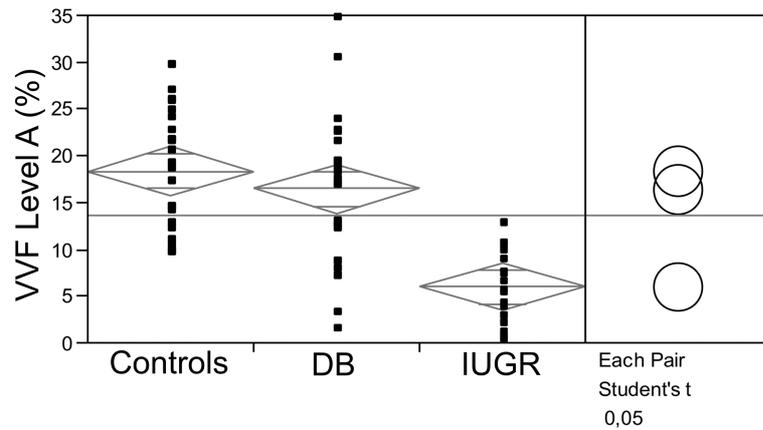


Abbildung 10: Vergleich des normalisierten Gefäßvolumenanteils der Kontrollgruppe (Controls), bei Diabetikerinnen (DB) und bei intrauteriner Wachstumsretardierung (IUGR) in den einzelnen Ebenen; Oben: Ebene A (chorionplattennah), Mitte: Ebene B (Intermediärgefäße), Unten: Ebene C (endzottennah)

Bei Betrachtung des Gefäßvolumenanteils der drei Gruppen, bezogen auf das Plazentagewicht in Abbildung 11, fällt auf, dass die Kontrollgruppe den höchsten Gefäßvolumenanteil hat bei einem im Vergleich zur Diabetikergruppe leicht geringeren bzw. gleichen Plazentagewicht. Der Gefäßvolumenanteil beträgt in der Kontrollgruppe 20,5% und das durchschnittliche Plazentagewicht 570g. Bei den Diabetikerinnen besteht ein Gefäßvolumenanteil von 16,7% und ein Plazentagewicht von durchschnittlich 600g. Die Plazenten bei intrauteriner Wachstumsretardierung weisen sowohl einen bedeutend geringeren Gefäßvolumenanteil (7,84%) als auch ein erheblich niedrigeres Plazentagewicht (durchschnittlich 420g) auf.

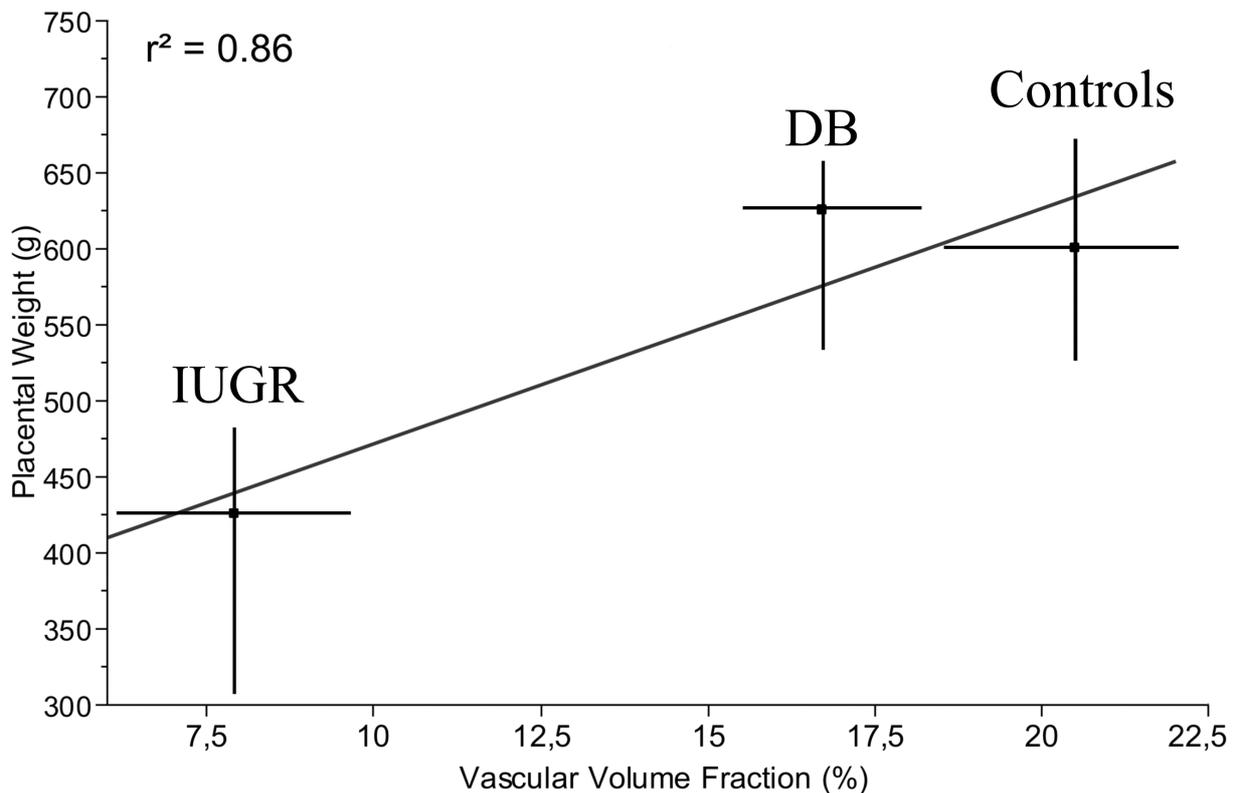


Abbildung 11: Gefäßvolumenanteil bezogen auf das Plazentagewicht bei der Kontrollgruppe (Controls), den Diabetikerinnen (DB) und den Wachstumsretardierungen (IUGR)

3.4 Histologische Untersuchungen

Die histologischen Bilder in Abbildung 8G-I zeigen, dass auch nach der Probenpräparation mit Mikrofil-Kontrastmittel und dem Scan in der Mikro-CT, es noch problemlos möglich ist von den Proben histologische Schnitte anzufertigen und diese dann nach den bekannten Methoden zu bearbeiten. Der Scan zerstört das Gewebe nicht und es gibt daher keine Einschränkungen bei späteren morphologischen oder immunhistochemischen Untersuchungen der Proben. Auch auf diesen Bildern erkennt man den höheren Gefäßanteil der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Diabetiker- und IUWR-Plazenten.

4 Diskussion

Die quantitative Analyse fetoplazentarer Gefäße nicht nur bei unkompliziert verlaufenden Schwangerschaften, sondern auch bei Diabetikerinnen mit makrosomen Neugeborenen und Kindern, die bei der Geburt an einer Wachstumsretardierung leiden, hat eine außerordentliche Bedeutung für das Verständnis der Pathophysiologie intrauterinen Wachstums. Je genauer dabei die Darstellung der Mikroarchitektur der Gefäße erfolgt, desto vielfältiger und präziser können dementsprechend auch Aussagen über physiologische und pathologische Veränderungen getroffen werden. Mit dieser Studie sollte daher ermittelt werden, ob die Unterschiede des fetoplazentaren Gefäßbaumes von einer Kontrollgruppe zu Diabetikerinnen und intrauteriner Wachstumsretardierung dargestellt werden können und wie sich diese Unterschiede in den verschiedenen Gefäßprovinzen innerhalb der Plazenta verhalten.

Seit Einführung der 3D Mikro-CT[38;44-48] gibt es zur 2D quantitativen Histomorphometrie ein weiteres Verfahren, um Strukturanalysen auf zwei- und dreidimensionaler Ebene durchzuführen. Obwohl die Histologie nach wie vor den „Gold-Standard“ in der Gefäßanalytik darstellt, lassen sich lediglich zweidimensionale Auswertungen durchführen [18;25].

Die Mikro-Computertomographie dagegen liefert einen kompletten dreidimensionalen Datensatz der untersuchten Proben. Die 3D-Mikro-CT erlaubt somit eine kontinuierliche, quantitative und qualitative Darstellung der Mikroarchitektur sowie eine komplette dreidimensionale Darstellung des Gefäßbaumes. Der zusätzliche große Vorteil der Strukturanalyse mit der Mikro-CT ist die zerstörungsfreie Untersuchung der Gefäße. Zusätzliche histologische und immunhistologische Methoden können im Anschluss an die Mikro-CT-Untersuchung durchgeführt werden.

In unserer Studie zeigen wir, dass mit der Kontrastmittelperfusion und der anschließenden Analyse in der Mikro-CT der Gefäßvolumenanteil nicht nur bei der Kontrollgruppe, sondern auch bei den Diabetiker- und IUWR-Plazenten ausgewertet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich in der Kontrollgruppe nach Perfusion mit Kontrastmittel ein Gefäßvolumenanteil von $20,53 \pm 1,34\%$. In vorliegenden Studien beschreibt Kaufmann[49] einen fetoplazentaren Gefäßanteil von 28,4% bezogen auf die terminalen Zotten bei termingerechten Plazenten normaler Schwangerschaften. Mayhew et al.[27] geben eine Kapillarovolumendichte von 23,8% im Bereich der peripheren Zotten an und Burton et al.[20] sprechen von 20,6% bei den Intermediär- und Endzotten.

Diese Daten unterscheiden sich zum Teil von den durch uns in der Mikro-CT ermittelten Daten. Bei näherer Betrachtung und unter Berücksichtigung der verschiedenen Techniken ergeben sich aber einige Erklärungsmöglichkeiten. In unserer Studie werden bei der Probenentnahme durch die gesamte Dicke der Plazenta alle Gefäßstrukturen untersucht, von den großen Chorionplattenarterien (Durchmesser von ca. 2mm) bis hin zu den sinusoidalen Kapillaren in den Endzotten (14µm) und nicht nur, wie in den anderen Studien, die Endzotten bzw. Intermediär- und Endzotten. Wie Kaufmann und Benirschke in einer anderen Studie[2] angeben, liegt der prozentuale Anteil der Zotten in termingerechten Plazenten unkomplizierter Schwangerschaften zwischen 45,6% und 62,9%. Sen et al.[50] berichten von einem fetalen Gefäßvolumenanteil von ca. 45% in den Terminalzotten, 25-30% in den Stammzotten mit ihren großen Arterien- und Venenvolumina und 20-25% in reifen Intermediärzotten. In unreifen Intermediärzotten betrage der Gefäßanteil nur um die 15%. Das bedeutet, dass je nach Studie und genauem Ort der Untersuchungen innerhalb der Plazenta sehr unterschiedliche Werte ermittelt werden. Beim Vergleich mit diesen zuletzt genannten Studien liegt der von uns gemessene Wert noch deutlicher unter den dort errechneten Anteilen.

Als potentielle Alternative zur quantitativen Histologie an Serienschmittpräparaten wurde im letzten Jahrzehnt die Technologie der Mikro-Computertomographie in der ex-vivo Forschung etabliert[38;44]. Sie erlaubt die Akquisition eines isotropen, dreidimensionalen Bilddatensatzes mit einer räumlichen Auflösung von bis zu 6 µm. Primär wurde dieses Verfahren in der Osteoporose-Forschung zur Morphometrie spongiösen Knochens eingesetzt[41]. Wegen des hohen Kontrastes zwischen Knochenbälkchen und Markräumen konnten schon mit den ersten Geräten qualitativ hochwertige dreidimensionale Bilder erzeugt werden [51;52]. Dabei hat die Mikro-CT-Technologie bereits in der morphometrischen Vergleichsanalyse zur konventionellen Histomorphometrie hochsignifikante Korrelationen bei der Analyse von Knochenstrukturen gezeigt.

Inzwischen hat sich das Anwendungsspektrum verbreitert. Neben der deskriptiven 3D-Darstellung und Vergleichsanalyse zur konventionellen Histologie konnte Ritman et al.[53] erstmals Struktur-Funktionsbeziehungen von nutritiven Gefäßen und dem physiologischen Knochenremodeling in der Mikro-CT darstellen.

Neue vaskuläre Kontrastmittel und neue Perfusionstechniken konnten mit weiterführenden methodischen Ansätzen der Mikro-CT zur Evaluierung der Gefäßarchitektur beitragen. Bereits in den 70er Jahren konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von Microfil[®]-Kontrastmittel (Microfil MV-122, Flow Tech, Carver, MA, USA) eine lückenlose und

homogene Perfusion des arteriellen Gefäßsystems in verschiedenen Organen möglich ist. Microfil Kontrastmittel besteht aus zwei Komponenten (Blei und Silikon), die in wässriger Lösung vorliegen. Nach Vermischung der Komponenten härtet dieses Kontrastmittel nach 20 Minuten vollständig aus. Ein wesentlicher Vorteil von Microfil gegenüber bariumsulfathaltigem Kontrastmittel besteht in der geringeren Viskosität und somit in der besseren kapillären Penetration. Des Weiteren zeigt Microfil hydrophobe Eigenschaften, die eine Penetration in den extravaskulären Raum verhindern.

Obwohl die Mikro-CT in vielen vorgestellten Studien ihre Wertigkeit bei der Quantifizierung von Gefäß- und Weichteilstrukturen demonstrieren konnte, birgt die Verwendung der Mikro-CT zwei große Nachteile. Ein Nachteil dieser Methode ist nach wie vor die Begrenzung des Messfeldes auf kleine Volumina, je nach Auflösung von einigen mm³ bis zu wenigen cm³. Derzeit ist die Auflösung durch die Zahl der Pixel der CCD-Kamera noch limitiert (1024x1024), so dass eine Auflösung von nur etwa einem Tausendstel des größten Objektdurchmessers in der Ebene senkrecht zur Drehachse der Probe erreicht werden kann. Ein weiterer Nachteil liegt in der Notwendigkeit der Kontrastmittelapplikation, um eine Kontrastverstärkung und damit eine bessere Gewebedifferenzierung zu erreichen und in den bisherigen lediglich ex-vivo Untersuchungsmöglichkeiten.

Obwohl bei unseren Analysen keine nachweisbaren Bildartefakte zu erkennen waren und es auch nicht zu Beeinträchtigungen der quantitativen Bildanalysen kam, sind mehrere Möglichkeiten von Artefakten in der Mikro-Computertomographie bekannt, wie zum Beispiel Schatten-, Ring- oder Kegelstrahlbildung. Diese Artefakte können zu einer fehlerhaften Grauwertverteilung in dem Datensatz führen, was einen negativen Effekt in der volumetrischen Auswertung mit sich bringt. Auch bei der Probenpräparation kann es zu Fehlern kommen. Bei der Injektion des Kontrastmittels kann es entweder durch zu hohen Druck oder aber durch bereits verletzte Gefäße zu Austritt von Kontrastmittel in umliegendes Gewebe kommen, so dass diese Bereiche, wenn sie weiterhin mit dem Gefäßbaum in Verbindung stehen bei der späteren Berechnung fälschlicherweise als perfundierte Gefäße erkannt werden und der prozentuale Gefäßanteil sich dementsprechend als zu hoch errechnet. Steht der fälschlicherweise perfundierte Bereich nicht mit dem Gefäßbaum in Verbindung, wird er bei der Auswertung auch nicht als Gefäßstruktur erkannt und es ergibt sich ein zu niedriger Gefäßanteil.

Bei nicht genügend langer Spülung der Gefäße mit NaCl vor der Kontrastmittelperfusion kann es zur Vermischung von Restblut mit dem Kontrastmittel kommen, was zu einer ungleichen Aushärtung führen kann und sich anschließend als lückenhafte Gefäßperfusion mit falsch-negativen Volumina errechnet.

Bei beiden Methoden, der konventionellen Histologie und der Mikro-CT mit Kontrastmittel, kann eine komplette Füllung der Gefäße nie sicher gewährleistet werden. Sowohl Restthromben als auch reaktive Konstriktionen der Gefäße führen letztlich zu einem falsch-negativen Gefäßvolumen der Probe.

Die Unterschiede der Ergebnisse zwischen der Kontrollgruppe und den Diabetikerplazenten zeigen, dass beim Vergleich durch das gesamte Volumen der Plazenta ein signifikanter Unterschied besteht ($p = 0,0072$). Betrachtet man jedoch die drei verschiedenen Ebenen einzeln, so fällt auf, dass die chorionplattennahen Gefäßprovinzen bei den Diabetikerinnen sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden ($p = 0,2851$). Erst im Bereich der Intermediärgefäße zeigen sich signifikante Unterschiede ($p = 0,01$) und diese sind besonders deutlich im unteren Bereich der Endzotten ($p = 0,0002$).

Dies zeigt, dass sich die Diabetikerplazenten besonders im Bereich der Endzotten, also dem Bereich, der sich bei der Plazentaentwicklung als letztes differenziert, besonders von der Kontrollgruppe unkomplizierter Schwangerschaften unterscheidet. Diese Beobachtung wurde auch schon in früheren Studien von Mayhew et al.[4] gemacht, die nachweisen, dass im mikroskopischen Bereich die morphologischen Veränderungen nicht einheitlich sind, sich aber hauptsächlich durch eine relative Unreife der histologisch erfassbaren Strukturen im vaskulären Endstromgebiet darstellen. Besonders ausgeprägt sei diese Unreife in den Terminalzotten. Auch Stoz et al.[5;9] konnten zeigen, dass selbst bei Gestationsdiabetes eine Retardierung in der Zottenvaskularisation zu erkennen ist. Mit unserer Studie werden somit diese Aussagen bestätigt.

Lao, Lee and Wong[3] berichten von Plazenten mit mütterlichem Diabetes Typ 1, die verglichen mit normalen Schwangerschaften, erheblich leichter sind. Die von uns untersuchten Plazenten bei mütterlichem Diabetes zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe ähnliche bzw. höhere Gewichte. Dies mag auch zum Teil daran liegen, dass die Frauen aus unserer Diabetikergruppe während der Schwangerschaft langfristig betreut, sowie die Blutzuckerspiegel engmaschig kontrolliert und gut therapeutisch eingestellt waren. Bei leichteren Formen und nur kurzer Dauer des Diabetes sprechen auch Lao et al. von vergrößerten und im Gewicht erhöhten Plazenten, wie es in unserer Stichprobe der Fall ist.

Auffällig beim Vergleich der Kontrollgruppe mit den Plazenten bei intrauteriner Wachstumsretardierung ist, dass sowohl bei Betrachtung der gesamten Plazentaprobe als auch bei Betrachtung der unterschiedlichen Ebenen der Plazenten durchgehend signifikante Unterschiede bestehen.

Die Ergebnisse unserer Studie lassen sich mit früheren Untersuchungen an Corrosion Casts vergleichen. So haben Studien von Fox und Teasdale[12;16] ergeben, dass sich an Plazenten bei intrauteriner Wachstumsretardierung bestimmte Mangelentwicklungen zeigen. Zeichen dafür sind neben einigen anderen Veränderungen auch nicht zu Sinusoiden umgewandelte Kapillaren und Reifungsretardierungen an den Endzotten. Die niedrigen Gefäßvolumenanteile in unserer Studie können dies bestätigen.

Durch die dreidimensionale Erfassung des gesamten Gefäßverlaufs innerhalb der Plazenta lassen sich erstmals quantitative Unterschiede mittels Mikro-CT in der Analytik des fetoplazentaren Gefäßbaumes aufzeigen.

Beim Vergleich der einzelnen Ebenen A, B und C fällt auf, dass bei allen Gruppen in Ebene A der Gefäßanteil am niedrigsten ist (KG: 18,37%; DB: 16,43%; IUWR 5,95%), er in der mittleren Ebene ansteigt (KG: 21,51%; DB: 17,39%; IUWR 8,44%) und dann in der untersten Ebene entweder gleich bleibt oder etwas zurück geht (KG: 21,43%; DB: 14,97%; IUWR 8,17%). Bei den Diabetikerplazenten sinkt der Gefäßvolumenanteil in der Ebene C sogar noch unter den aus Ebene A (14,97% zu 16,43%).

Mayhew et al.[4] konnte bereits zeigen, dass die relative Unreife bei Diabetikerplazenten im Bereich der Endzotten besonders ausgeprägt ist. Die Tatsache, dass bei unseren Ergebnissen die Gefäßanteile auf Höhe der Chorionplattenarterien und der Stammzotten geringer sind als in mittlerer Höhe, was bei Sen et al. anders beschrieben wird (Stammzotten: 25-30%, reife Intermediärzotten: 20-25%, unreife Intermediärzotten: 15%), mag daran liegen, dass wir nicht die einzelnen Zottenarten unterschieden haben, sondern nur die Ebenen innerhalb der Plazenta. So sind in der mittleren Ebene nicht nur Intermediärzotten, sondern auch eine große Anzahl an Endzotten zu finden, welche den Gefäßvolumenanteil höher werden lassen.

5 Zusammenfassung

Das derzeitige Verständnis der mikrovaskulären Gefäßarchitektur und Morphometrie der Plazenta beruht auf verschiedenen zeitintensiven morphometrischen Analysen. Dazu zählen die konventionelle Histologie, die Elektronenmikroskopie von Ausgusspräparaten und die dreidimensionale Rekonstruktion von Gewebeschnitten. Mit Hilfe dieser Methoden wurden bereits Unterschiede in der Gefäßstruktur zwischen Plazenten bei unkomplizierten termingerechten Schwangerschaften, Diabetikerplazenten bei makrosomen Kindern und Plazenten bei wachstumsretardierten Neugeborenen untersucht.

In der vorliegenden Studie demonstrieren wir diese Unterschiede mit der Mikro-CT als einer neuen, zerstörungsfreien und schnellen Methode zur Bildgebung und zur quantitativen Analyse fetoplazentarer Gefäße und können vorliegende Werte bestätigen. Plazenten der unterschiedlichen Gruppen wurden nach vorher festgelegten Kriterien ausgewählt, vorbereitet und die fetoplazentaren Gefäße mit Röntgenkontrastmittel perfundiert. Die entnommenen Proben wurden im Mikro-CT gescannt und mit Hilfe eines Analyseprogramms die Gefäßvolumenanteile einmal für die gesamte Probe und für drei unterschiedliche Ebenen innerhalb einer Probe berechnet. Im Anschluss wurden die Proben in Paraffin gebettet, geschnitten und gefärbt, um zu zeigen, dass histologische Untersuchungen auch nach Bearbeitung im Mikro-CT noch möglich sind. Von diesen Ergebnissen wurden unterschiedliche Abbildungen hergestellt, die bereits Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennen ließen.

In der statistischen Analyse stellten sich für alle drei Gruppen signifikante Unterschiede in den Gefäßvolumenanteilen heraus, welche innerhalb der verschiedenen Ebenen noch genauer untersucht wurden. Nur in der obersten Ebene auf Höhe der Chorionplattenarterien gab es zwischen der Kontrollgruppe und den Diabetikerplazenten keine signifikanten Unterschiede, alle anderen Ebenen waren signifikant unterschiedlich.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Diabetiker- und IUWR-Plazenten im Vergleich zu Plazenten von unkomplizierten Schwangerschaften, besonders im Bereich der Endzotten eine deutliche Mangelentwicklung der Gefäßstrukturen aufweisen.

6 Abstract

Objective: The quantitative changes in the fetoplacental vascular volume in placentas from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction (IUGR) and diabetes mellitus (DB) are not well defined. The purpose of this study was to increase understanding of the substantial variation in the fetoplacental vascular volume in IUGR and DB assessed by 3D micro-computed tomography (micro-CT).

Methods and Results: Samples from IUGR (n = 24), diabetic (n = 24), and healthy control placentas (n = 24) were infused with Microfil contrast agent and scanned by micro-CT. Using those 3D images, we quantitated the complete fetoplacental vascular volume fraction (VVF). A subanalysis was performed at three different levels, reaching from the corion plate artery (level A), to intermediate arteries (level B) and capillary system (level C). Results were complemented by histology. The significance of differences in vascular volume measurements was tested with analysis of variance [ANOVA].

Results: Microfil perfused placentas showed a total vascular volume fraction of 20.5 ± 0.9 % in healthy controls. In contrast, the VVF decreased to 16.7 ± 0.9 ($p < 0.001$) and 7.9 ± 0.9 ($p < 0.001$) in DB and IUGR placentas, respectively. Heterogeneity in the decrease in the vascular volume fraction in diabetic placentas was found to be present in intermediate arteries (Level B) and the capillary system (Level C) but not in the corion plate artery (Level A). In IUGR placentas the heterogeneity was found to be present in all levels.

Conclusion: Micro-CT imaging is feasible for quantitative analysis of the fetoplacental vascular tree in healthy controls and pregnancies complicated by IUGR and DB.

7 Publikationen

Originalarbeiten:

1. Langheinrich AC, Wienhard J, **Vormann S**, Hau B, Bohle RM, Zygmunt M, “Analysis of the fetal placental vascular tree by X-ray micro-computed tomography”, *Placenta* 2004;25(1), 95-101.
2. Langheinrich AC, **Vormann S**, Seidenstücker J, Kampschulte M, Bohle RM, Wienhard J, Zygmunt M, „Quantitative 3D Mikro-CT Imaging of the Fetoplacental Vasculature in Intrauterine Growth Restriction“, *Placenta*. 2008 Nov;29(11):937-41. Epub 2008 Oct 11.

Abstracts:

1. Langheinrich AC, Wienhard J, **Vormann S**, Hau B, Zygmunt M, Rau WS. Analysis of the fetoplacental vascular tree by X-Ray micro-CT. Deutscher Röntgenkongress Wiesbaden 2004. (**Posterpreis: Magna Cum Laude**)
2. Langheinrich AC, **Vormann S**, Seidenstücker J, Kampschulte M, Bohle RM, Zygmunt M. Quantitative 3D Mikro-CT Imaging of the Fetoplacental Vasculature in Intrauterine Growth Restriction and Diabetes. RÖFO. Deutscher Röntgenkongress Berlin 2008.

8 Literaturverzeichnis

- (1) Künzel W, Stoz F, Schuhmann R. Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Band 4. 4[4th ed.]. 2000. München, Jena, Urban und Fischer. Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe. Künzel W.
Ref Type: Generic
- (2) Benirschke K, Kaufmann P: Pathology of the human placenta; New York, Springer Verlag, 2000.
- (3) Lao TT, Lee CP, Wong WM: Placental weight to birthweight ratio is increased in mild gestational glucose intolerance. *Placenta* 1997; 18(2-3):227-230.
- (4) Mayhew TM, Sorensen FB, Klebe JG, Jackson MR: Growth and maturation of villi in placentae from well-controlled diabetic women. *Placenta* 1994; 15(1):57-65.
- (5) Stoz F, Schuhmann RA, Schmid A: Morphometric investigations of terminal villi of diabetic placentas in relation to the White classification of diabetes mellitus. *J Perinat Med* 1987; 15(2):193-198.
- (6) Jirkowska M, Bendl J, Smidova J: Die Zottenvaskularisation der diabetischen Plazenta in Beziehung zu dem klinischen Verlauf der Schwangerschaft. *Diabetes Stoffwechsel* 1997; 6:17-25.
- (7) Semmler K, Emmrich P, Fuhrmann K, Godel E: [Placental maturation disorders in relation to the quality of metabolic control during pregnancy in insulin-dependent and gestational diabetes]. *Zentralbl Gynakol* 1982; 104(23):1494-1502.
- (8) Semmler K, Emmrich P: [Morphology of the placenta in relation to glycemia status in pregnancy in diabetes mellitus]. *Z Geburtshilfe Perinatol* 1989; 193(3):124-128.
- (9) Stoz F, Schuhmann RA, Haas B: Morphohistometric investigations in placentas of gestational diabetes. *J Perinat Med* 1988; 16(3):205-209.
- (10) Esterman A, Greco MA, Mitani Y, Finlay TH, Ismail-Beigi F, Dancis J: The effect of hypoxia on human trophoblast in culture: morphology, glucose transport and metabolism. *Placenta* 1997; 18(2-3):129-136.

-
- (11) Stoz F, Schuhmann RA, Schultz R: Morphohistometric investigations of placentas of diabetic patients in correlation to the metabolic adjustment of the disease. *J Perinat Med* 1988; 16(3):211-216.
 - (12) Fox H: Pathology of the placenta. *Clin Obstet Gynaecol* 1986; 13(3):501-519.
 - (13) Prinz W, Schuhmann RA, Kalbfleisch W: [Morphologic findings in the placenta in intrauterine fetal growth retardation]. *Zentralbl Gynakol* 1983; 105(5):279-286.
 - (14) Woods DL, Malan AF, Heese HD: Placental size of small-for-gestational-age infants at term. *Early Hum Dev* 1982; 7(1):11-15.
 - (15) van der Veen F, Fox H: The human placenta in idiopathic intrauterine growth retardation: a light and electron microscopic study. *Placenta* 1983; 4(1):65-77.
 - (16) Teasdale F: Idiopathic intrauterine growth retardation: histomorphometry of the human placenta. *Placenta* 1984; 5(1):83-92.
 - (17) Stoz F, Schuhmann RA, Noack EJ: [Morphometric studies on placentas of mature, small for gestational age infants]. *Z Geburtshilfe Perinatol* 1983; 187(3):142-145.
 - (18) Aharinejad S, MacDonald IC, MacKay CE, Mason-Savas A: New aspects of microvascular corrosion casting: a scanning, transmission electron, and high-resolution intravital video microscopic study. *Microsc Res Tech* 1993; 26(6):473-488.
 - (19) Baur R: Morphometry of the placental exchange area. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1977; 53(1):3-5.
 - (20) Burton GJ, Reshetnikova OS, Milovanov AP, Teleshova OV: Stereological evaluation of vascular adaptations in human placental villi to differing forms of hypoxic stress. *Placenta* 1996; 17(1):49-55.
 - (21) Jackson MR, Walsh AJ, Morrow RJ, Mullen JB, Lye SJ, Ritchie JW: Reduced placental villous tree elaboration in small-for-gestational-age pregnancies: relationship with umbilical artery Doppler waveforms. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172(2 Pt 1):518-525.
 - (22) Kaufmann P, Bruns U, Leiser R, Luckhardt M, Winterhager E: The fetal vascularisation of term human placental villi. II. Intermediate and terminal villi. *Anat Embryol (Berl)* 1985; 173(2):203-214.

-
- (23) Krebs C, Macara LM, Leiser R, Bowman AW, Greer IA, Kingdom JC: Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175(6):1534-1542.
- (24) Leiser R, Luckhardt M, Kaufmann P, Winterhager E, Bruns U: The fetal vascularisation of term human placental villi. I. Peripheral stem villi. *Anat Embryol (Berl)* 1985; 173(1):71-80.
- (25) Mayhew TM, Burton GJ: Methodological problems in placental morphometry: apologia for the use of stereology based on sound sampling practice. *Placenta* 1988; 9(6):565-581.
- (26) Mayhew TM: Fetoplacental angiogenesis during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodelling of vascular endothelial cells. *Placenta* 2002; 23(10):742-750.
- (27) Mayhew TM, Ohadike C, Baker PN, Crocker IP, Mitchell C, Ong SS: Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. *Placenta* 2003; 24(2-3):219-226.
- (28) Sala MA, Matheus M, Valeri V: Estimation of the average diameter of human placental villi by a stereologic method. *Microsc Acta* 1980; 82(4):339-342.
- (29) Benveniste H, Blackband S: MR microscopy and high resolution small animal MRI: applications in neuroscience research. *Prog Neurobiol* 2002; 67(5):393-420.
- (30) Wehrli FW, Hwang SN, Song HK: New architectural parameters derived from micro-MRI for the prediction of trabecular bone strength. *Technol Health Care* 1998; 6(5-6):307-320.
- (31) Lupotti FA, Mastik F, Carlier SG, de Korte CL, van der Giessen WJ, Serruys PW, van der Steen AF: Quantitative IVUS blood flow: validation in vitro, in animals and in patients. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29(4):507-515.
- (32) Nadkarni SK, Austin H, Mills G, Boughner D, Fenster A: A pulsating coronary vessel phantom for two- and three-dimensional intravascular ultrasound studies. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29(4):621-628.
- (33) von BC: Quantitative assessment of mild-to-moderate coronary atherosclerosis by computerized border detection in 3D IVUS. *Int J Cardiovasc Imaging* 2003; 19(2):105-106.

-
- (34) Goyen M, Herborn CU, Kroger K, Lauenstein TC, Debatin JF, Ruehm SG: Detection of atherosclerosis: systemic imaging for systemic disease with whole-body three-dimensional MR angiography--initial experience. *Radiology* 2003; 227(1):277-282.
- (35) Achenbach S: [Clinical Use of Multi-Slice CT Coronary Angiography]. *Herz* 2003; 28(2):119-125.
- (36) Bentley MD, Ortiz MC, Ritman EL, Romero JC: The use of microcomputed tomography to study microvasculature in small rodents. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282(5):R1267-R1279.
- (37) Johnson RH, Hu H, Haworth ST, Cho PS, Dawson CA, Linehan JH: Feldkamp and circle-and-line cone-beam reconstruction for 3D micro-CT of vascular networks. *Phys Med Biol* 1998; 43(4):929-940.
- (38) Jorgensen SM, Demirkaya O, Ritman EL: Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT. *Am J Physiol* 1998; 275(3 Pt 2):H1103-H1114.
- (39) Langheinrich AC, Wienhard J, Vormann S, Hau B, Bohle RM, Zygmunt M: Analysis of the fetal placental vascular tree by X-ray micro-computed tomography. *Placenta* 2004; 25(1):95-00.
- (40) Nägele E. Mikrocomputertomographische Analyse der trabekulären Architektur des menschlichen Femurs. 2005. Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- (41) Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W: [Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure]. *Radiologe* 1999; 39(3):203-212.
- (42) Bonse U, Busch F: X-ray computed microtomography (microCT) using synchrotron radiation (SR). *Prog Biophys Mol Biol* 1996; 65(1-2):133-169.
- (43) Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jasion G, Kleerekoper M: The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 1989; 4(1):3-1.
- (44) Lerman A, Ritman EL: Evaluation of microvascular anatomy by micro-CT. *Herz* 1999; 24(7):531-533.
- (45) Kantor B, Jorgensen SM, Lund PE, Chmelik MS, Reyes DA, Ritman EL: Cryostatic micro-computed tomography imaging of arterial wall perfusion. *Scanning* 2002; 24(4):186-190.

- (46) Garcia-Sanz A, Rodriguez-Barbero A, Bentley MD, Ritman EL, Romero JC: Three-dimensional microcomputed tomography of renal vasculature in rats. *Hypertension* 1998; 31(1 Pt 2):440-444.
- (47) Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, McKenna C, Holmes DR, Schwartz RS, Lerman A: Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1998; 101(8):1551-1556.
- (48) Ortiz MC, Garcia-Sanz A, Bentley MD, Fortepiani LA, Garcia-Estan J, Ritman EL, Romero JC, Juncos LA: Microcomputed tomography of kidneys following chronic bile duct ligation. *Kidney Int* 2000; 58(4):1632-1640.
- (49) Kaufmann P: Development and differentiation of the human placental villous tree. *Bibl Anat* 1982;(22):29-39.
- (50) Sen DK, Kaufmann P, Schweikhart G: Classification of human placental villi. II. Morphometry. *Cell Tissue Res* 1979; 200(3):425-434.
- (51) Kapadia RD, Stroup GB, Badger AM et al: Applications of micro-CT and MR microscopy to study pre-clinical models of osteoporosis and osteoarthritis. *Technol Health Care* 1998; 6(5-6):361-372.
- (52) Shibata T, Nagano T: Applying very high resolution microfocus X-ray CT and 3-D reconstruction to the human auditory apparatus. *Nat Med* 1996; 2(8):933-935.
- (53) Ritman EL, Bolander ME, Fitzpatrick LA, Turner RT: Micro-CT imaging of structure-to-function relationship of bone microstructure and associated vascular involvement. *Technol Health Care* 1998; 6(5-6):403-412.

9 Lebenslauf

Sarah Vormann

Persönliche Daten

geboren am	31.08.1976 in Bielefeld
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch
Eltern	Friedrich Vormann, Lehrer (geb. 02.08.1950) Inge Vormann, geb. Kuhlmann, Diplompflegewirtin (geb. 16.09.1955)
Geschwister	Anne Vormann, Diplomsportwissenschaftlerin (geb. 27.10.1980)

Schulbildung

Grundschule	1983-1986 Stiftsschule in Bielefeld 1986-1987 Pläßschule in Bielefeld
Gymnasium	1987-1993 Cecilien-Gymnasium in Bielefeld 1993-1996 Friedrich-v.-Bodel-Schwingh-Schulen Kollegschule Bethel Abschluss: Abitur
Leistungskurse	Biologie, Englisch
Sprachkenntnisse	Englisch, Latein, Finnisch (Grundkenntnisse)

Ausbildung und Studium

Oktober 1996 – Dezember 1996	Praktikum in einer Tierklinik in Bielefeld
Februar 1997 – Februar 1998	Ausbildung zur Pferdewirtin mit Schwerpunkt „Reiten“ in Radolfzell am Bodensee
März 1998 – Oktober 1998	Pflegehilfskraft im Alten-und Pflegeheim „Perthes-Haus“ in Bielefeld
Oktober 1998 – Oktober 1999	Studium der „Klinischen Linguistik“ an der Universität Bielefeld
Oktober 1999 – Mai 2006	Studium der Medizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
September 2001	Ärztliche Vorprüfung
August 2002	1. Ärztliche Prüfung
März 2005	2. Ärztliche Prüfung
Mai 2006	3. Ärztliche Prüfung

Auslandsaufenthalte

Januar – Mai 2004	ERASMUS Semester an der Medizinischen Fakultät der Helsingin Yliopisto in Helsinki, Finnland (Unterrichtssprache Englisch)
August – November 2005	PJ Chirurgie-Tertial im St.George General Hospital, University of the West Indies, Grenada, West Indies
Dezember 2005 – März 2006	PJ Anästhesie-Tertial im Royal Perth Hospital, University of Western Australia, Perth, Western Australia

Beruflicher Werdegang

Seit Dezember 2006	Tätigkeit als Ärztin in der Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Evangelischen Amalie Sieveking-Krankenhaus Hamburg, Leiter Dr. H.-R. Paschen
--------------------	--

10 Danksagung

Die Anfertigung dieser Doktorarbeit wäre ohne die Unterstützung zahlreicher Personen, sowohl im fachlichen als auch im privaten Bereich, nicht möglich gewesen. Folgenden Personen möchte ich hiermit im Besonderen danken:

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Alexander C. Langheinrich für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die stetige Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit und die Anleitung zum selbstständigen Arbeiten mit wissenschaftlichen Techniken, vor allem in der Mikro-CT. Seine zahlreichen kritischen Anregungen bei der Entstehung dieses Manuskripts und seine hilfreichen Korrekturen waren sehr wertvoll.

Prof. Dr. med Marek Zygmunt, ebenfalls für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung und Hilfestellung vor allem bei der Gewinnung der Plazenten und der späteren histologischen Bearbeitung.

Frau Dr. med. Julia Wienhard für ihre Unterstützung bei allen Angelegenheiten in der Frauenklinik.

Frau Gunhild Martels für die Durchführung der Mikro-CT-Scans.

Prof. Dr. med. Wigbert S. Rau, dem Leiter des Zentrums für Radiologie und Prof. Dr. Dr. h.c. H.-R. Tinneberg, dem Leiter des Zentrums für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der JLU Gießen, möchte ich danken, dass diese Arbeit an ihren Kliniken durchgeführt werden konnte.

Meinem Freund Dominic Adenuga danke ich ganz besonders, da er mir immer wieder neue Kraft gegeben hat bei der Erstellung dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern für ihre stetige Unterstützung während meines kompletten Studiums bedanken.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.