

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

**Expression von c-Met in humanen Chorionzotten
nach Chorionzottenbiopsie (CVS) und deren
Zusammenhang mit dem
Schwangerschaftsoutcome**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Katharina Hennig, geb. Troche
aus Warendorf

2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz
1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Klockenbusch
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H. G. Kehl

Tag der mündlichen Prüfung: 29.08.2013

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Direktor: Univ.-Prof. Dr. L. Kiesel
Referent: Prof. Dr. Klockenbusch
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. H.G. Kehl

ZUSAMMENFASSUNG

Expression von c-Met in humanen Chorionzotten nach Chorionzottenbiopsie (CVS) und deren Zusammenhang mit dem Schwangerschaftsoutcome

Katharina Hennig

Fragestellung: Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der c-Met-Expression in Chorionzotten nach CVS in der Frühschwangerschaft mittels immunhistochemischer Färbung und damit verbunden erstmals die Analyse und Darstellung des Zusammenhanges der Expressionsstärke mit dem Schwangerschaftsoutcome, um so der Möglichkeit, c-Met als pränataldiagnostischen Marker besonders für Frühgeburtlichkeit oder Wachstumsretardierung einsetzen zu können, nachzugehen.

Methode: Der Umfang dieser Studie umfasste 183 Chorionzottenpräparate, die immunhistochemisch mit einem c-Met-Antikörper gefärbt wurden. Nach mikroskopischer Betrachtung wurde die Färbintensität durch zwei verschiedene Analyseverfahren (konventioneller Färbescore und digitales Bildanalyseverfahren) ermittelt.

Ergebnisse: In unseren Untersuchungen ließ sich c-Met in allen Chorionzotten nachweisen. Es wird vermehrt in den Trophoblasten (v.a. Zytotrophoblasten) aber auch in den Kernen des Stromas exprimiert. Eine signifikant höhere c-Met-Expression lässt sich im Rahmen der digitalen Auswertung bei einem Entbindungsalter von <25. SSW im Vergleich zu den termingerecht Geborenen nachweisen. Im konventionellen Scoring zeigte sich ein signifikant erhöhtes c-Met-Vorkommen für die hypertrophen (>95. Perzentile) im Gegensatz zu den normotrophen Kindern. Die lebenden Schwangerschaftsausgänge bzw. Schwangerschaften mit gewollten Abbrüchen weisen in der computergestützten Auswertung eine hochsignifikant niedrigere Expressionsstärke auf, als die komplizierten Ausgänge (Totgeburten/spontane Aborte). Die Chorionzotten bei Kindern mit Chromosomenanomalien zeigen in beiden Verfahren eine zum Teil statistisch sogar hoch signifikant geringere c-Met-Expression als die Zotten eines unauffälligen Karyotyps. Weiterhin stellten sich in beiden Auswertverfahren die Zotten der über 35-Jährigen im Gegensatz zu den der jüngeren Schwangeren mit einer höheren Färbintensität dar.

Schlussfolgerung: Erstmals wiesen wir c-Met in allen Chorionzottenkompartimenten der Frühschwangerschaft nach und zeigten, dass dabei die Intensität bei den Lebendgeborenen im Gegensatz zu IUFT/spontanen Aborten geringer ist, ebenso wie die Intensität der termingerecht Geborenen zu den vor der 25. SSW Geborenen. Damit könnte man c-Met als Sensor für ungünstige Umgebungsbedingungen betrachten. Im Rahmen der Pränataldiagnostik wird die Methode der Immunhistochemie zwar nie ein Testverfahren werden, aber möglicherweise wären auf Grund dieser Ergebnisse andere prädiktive Test, beispielsweise mittels C-met-Quantifizierung im Serum der Mutter, denkbar.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.08.2013

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Expression von c-Met in humanen Chorionzotten
nach Chorionzottenbiopsie (CVS) und deren
Zusammenhang mit dem Schwangerschafts-
outcome

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde
und Geburtshilfe des Uniklinik Münster

unter Anleitung von:

Dr. med. Johannes Steinhard

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Anschrift:

Katharina Troche
Mündenes Str. 20
48145 Münster

Ort, Datum

Münster, 15. 11. 2011

Unterschrift

K. Troche

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Plazenta – Entwicklung, Aufbau und Funktion	1
1.1.1	Die Entwicklung der Plazenta	1
1.1.2	Aufbau der Plazenta	5
1.1.3	Funktion der Plazenta	6
1.2	Pränatale Diagnostik	7
1.2.1	Vorgeburtliche Ultraschalldiagnostik und maternale Serumbiochemie	8
1.2.2	Chorionzottenbiopsie	10
1.2.3	Amniozentese	14
1.2.4	Weitere invasive Methoden im Rahmen der Pränataldiagnostik	15
1.2.5	CTG, fetale MRT und Analyse fetaler Zellen	15
1.3	C-Met und sein Ligand HGF	16
1.3.1	Aufbau von c-Met	16
1.3.2	Expression von c-Met	17
1.3.3	Der Ligand Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF)	18
1.3.4	Die Aktivierung von c-Met	18
1.3.5	Funktion des c-Met/HGF-Systems	19
1.3.6	Expression von c-Met und HGF in der Plazenta	20
1.4	Fragestellung	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Patientenkollektiv	23
2.2	Daten zu Patientinnen und kindlichem Outcome	23
2.3	Aufbereitung des Chorionzottengewebes	24
2.4	Immunhistochemische Färbung der Plazentagewebeproben	25
2.4.1	C-Met-Antikörperfärbung	25
2.4.2	Kontrollfärbung	26
2.5	Mikroskopische Auswertung der Chorionzottenpräparate	26
2.6	Computergestützte Bildanalyse	28
2.7	Konventionelle Chorionzottenauswertung mittels Färbescore	31
2.8	Statistische Auswertung	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Daten zu Patientinnen und zum Schwangerschaftsoutcome	34
3.1.1	Mütterliches Alter	34

3.1.2	Gestationsalter bei CVS	34
3.1.3	Body-Mass-Index der Schwangeren	35
3.1.4	Nikotin- und Alkoholkonsum der Mütter während der Schwangerschaft.	36
3.1.5	Schwangerschaftsausgang.....	36
3.1.6	Entbindungsalter.....	38
3.1.7	Geburtsgewicht der Lebendgeborenen	39
3.2	Präsentation der immunhistochemischen c-Met-Färbung.....	41
3.2.1	C-Met-Antikörperfärbung der Chorionzotten	41
3.2.2	Vergleich von Bildanalyse und konventionellem Färbescore.....	44
3.3	Korrelation der Färbeintensität mit dem Schwangerschaftsoutcome	48
3.3.1	Gestationsalter bei CVS	51
3.3.2	Entbindungsalter.....	51
3.3.3	Geburtsgewicht.....	55
3.3.4	Geschlecht	59
3.3.5	Ausgang der Schwangerschaft	59
3.3.6	Karyotyp	65
3.3.7	Nackentransparenz.....	70
3.3.8	Länge	71
3.3.9	Sonographische und postnatale Parameter	72
3.4	Korrelation der Färbeintensität mit den Patientendaten	76
3.4.1	Alter der Patientin	76
3.4.2	Nikotinkonsum	77
3.4.3	Alkohol.....	78
4	Diskussion.....	79
4.1	Diskussion der Methoden	79
4.1.1	Patientenkollektiv und Untersuchungsmaterial.....	79
4.1.2	Daten zu Patientinnen und kindlichem Outcome.....	80
4.1.3	Fixierung des Plazentagewebes	81
4.1.4	Immunhistochemische Färbung	81
4.1.5	Auswertmethoden der Färbung.....	82
4.2	Diskussion der Ergebnisse	84
4.2.1	Plazentare c-Met-Expression.....	84
4.2.2	C-Met und Gestationsalter	86
4.2.3	C-Met und Frühgeburtlichkeit.....	87

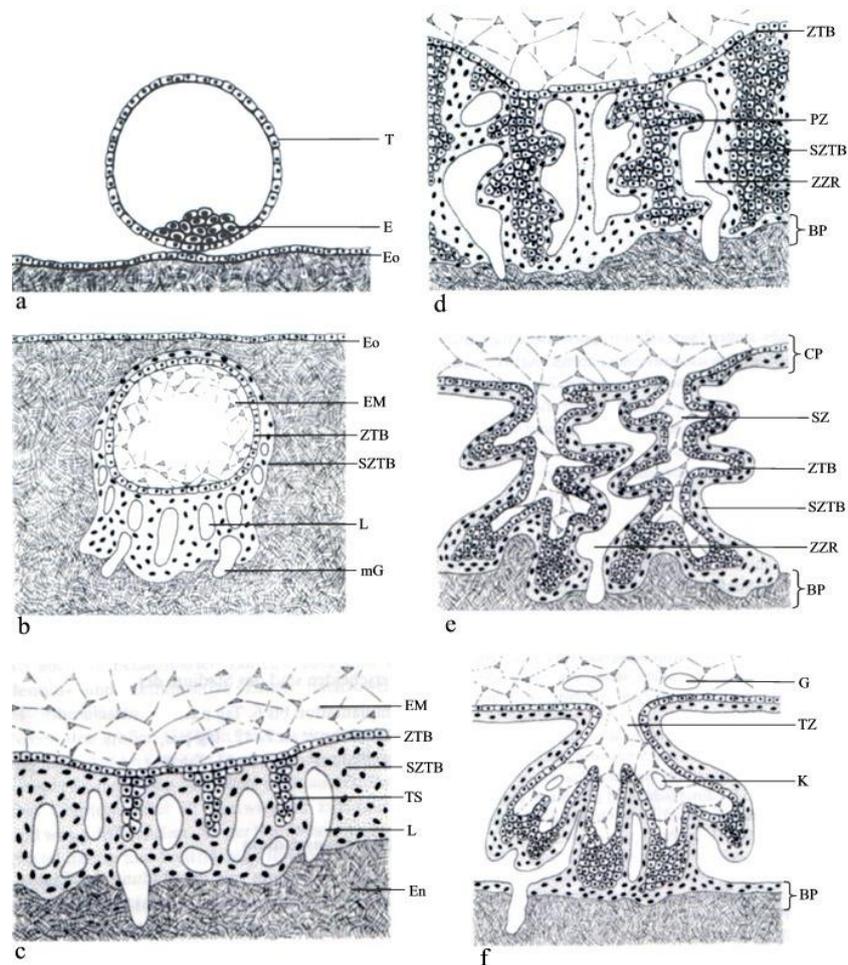
4.2.4	C-Met und Wachstumsretardierung sowie Hypertrophie	90
4.2.5	C-Met und Ausgang der Schwangerschaft.....	92
4.2.6	C-Met und chromosomale Anomalien.....	94
4.2.7	C-Met und mütterliche Einflussfaktoren	96
4.3	Zusammenfassung und Beurteilung dieser Studie	97
5	Literaturverzeichnis.....	101
6	Anhang	113
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	113
6.2	Abbildungsungsverzeichnis	114
6.3	Tabellenverzeichnis.....	117
7	Danksagung	118
8	Lebenslauf.....	119

1 Einleitung

1.1 Die Plazenta – Entwicklung, Aufbau und Funktion

1.1.1 Die Entwicklung der Plazenta

Die Entwicklung der Plazenta beginnt mit der Bildung einer Zygote sowie dem Einzell- und Mehrzellstadium und dem Stadium der freien Blastozyste (Präimplantationsstadium) und verläuft über das prelakunäre und lakunäre Stadium (Implantationsstadium). Dieser Periode folgen das Primär-, Sekundär- und zuletzt das endgültige Tertiärzottenstadium.



**Abbildung 1: Schema der Frühentwicklung der Plazenta
(Quelle: modifiziert nach Martin Vogel, 1992 [122])**

a) Bis 6.Tag p.c.: Präimplantationsstadium, b) 9.-12. Tag p.c.: Lakunäre Stadium (Trabekelstadium), c) 12.-13.Tag p.c.: spätes Trabekelstadium, d) 13.-15.Tag p.c.: Primärzottenstadium, e) 15.-21.Tag p.c.: Sekundärzottenstadium, f) ab ca. 18. Tag p.c.: Tertiärzottenstadium (E Embryoblast, T Trophoblast, EM extraembryonales Mesenchym, Eo Endometriumoberfläche, En Endometrium, L Lakune, mG mütterliches Gefäß, ZTB Zytotrophoblast, SZTB Synzytotrophoblast, TS Trophoblastsäulen, PZ Primärzotten, SZ Sekundärzotten, TZ Tertiärzotten, BP Basalplatte, ZZR Zwischenzottenraum, CP Chorionplatte, G Allantoisgefäße der Chorionplatte, K Zottenkapillaren)

Die Entwicklungsstadien der Plazenta

Nach Befruchtung der Eizelle im Eileiter (Einzellstadium, 1. Tag post conceptionem) beginnt die frühe Furchungsteilung der Zygote [11]. Aus der zweizelligen Frucht entwickelt sich die Morula, in der sich die Blastozystenöhle bildet und somit zur Blastozyste wird. Nach dem Stadium der freien Blastozyste, in dem an der Blastozyste der äußere kleinzellige Trophoblast gegenüber dem inneren Embryoblasten abzugrenzen ist [122], heftet sich ca. am 5. Tag p.c. die Blastozyste an das Endometrium [11].

Danach vollzieht sich die Implantation (prelakunäre Stadium) des Trophoblasten, wobei der implantierte Teil der Blastozystenwand größtenteils aus Synzytotrophoblasten besteht und Kontakt zum mütterlichen Gewebe hat [122]. Der noch nicht eingenistete Teil wird aus einer dünnen Schicht von Zytotrophoblasten (ZTB) gebildet [62, 11].

Im Lakunären Stadium (später 8. - 12. Tag p.c., Trabekelstadium) treten im SZTB am Einnistungspol Vakuolen auf, welche verschmelzen und das lakunäre System (späterer intervillöser Raum) formen. Um den 11. Tag ist die Implantation gewöhnlich abgeschlossen [11]. Mit der Ausdehnung des lakunären Systems verkleinert sich im Primärzottenstadium (13. – 14. Tag p.c.) der SZTB zu radikulär orientierten trophoblastischen Trabekeln (Vorläufer der Stammzotten). Nachdem der ZTB in die Trabekel eingewandert ist, entstehen „freie Primärzotten“ durch Aussprossung freier Trophoblasten in die Lakunen [11]. Die Sekundärzotten (15. – 18. Tag p.c.) entwickeln sich durch Einsprossung von Mesenchym in die Zotten [11]. Durch Neubildung von Zotten wird aus dem Lakunensystem ein intervillöser Raum und im Bereich des Implantationspoles treten im Mesenchym die ersten Kapillaren auf (Übergang in das Tertiärzottenstadium) [120, 62]. Im Zottenmesenchym entwickeln sich im frühen Tertiärzottenstadium (19. – 23. Tag p.c.) die ersten fetalen Kapillaren. Es sind große Stammzotten (120-250 µm Ø) und zahlreiche kleine (30-60 µm Ø) trophoblastische und zottige Triebe zu finden [11]. Am 23. – 29. Tag p.c. sind die zentralen (fetwärtigen) Zweidrittel der Zotten mit Mesenchym und Kapillaren ausgestattet. Das periphere (endometriumwärtige) Drittel verharrt im Primärzottenstadium und die Entwicklung von typischen Stammzotten mit

faserigem Stroma beginnt [11]. Der Trophoblastenüberzug der Zotten ist in voller Ausdehnung zweischichtig, innen zellig gegliedert (ZTB), außen synzytial (SZTB). Das Stroma ist locker mesenchymal [62]. Der Chorionplatte, bestehend aus fetalem Mesenchym, ZTB und SZTB, fehlt noch das Fibrinoid. Der Trophoblastenmantel wird in die Basalplatte umgewandelt [11].

Im späten Tertiärzottenstadium (29. – 42. Tag p.c.) beginnt die ZTB-Schicht lückenhaft zu werden. Das Zottenstroma besteht überwiegend immer noch aus mesenchymalen Gewebe [62]. Am Ende dieses Stadiums zeigen die meisten mesenchymalen Zotten das erste Zeichen retikulärer Umgestaltung ihres Stromas zu unreifen intermediären Zotten [11].

3. Monat, 43. – 70. Tag p.c. (CVS): Der Chorionsack ist auf seiner gesamten Oberfläche mit Zotten überzogen, eine Plazenta noch nicht abgrenzbar. Alle Zotten sind vaskularisiert und das glatte Chorion beginnt sich zu entwickeln. Dezidua parietalis und capsularis sind noch nicht miteinander verschmolzen. Die Heterogenität des Zottendurchmessers und der Zottenstruktur nimmt zu: Überwiegender Anteil großer (\varnothing ca. 200 μm) und vieler sehr kleiner Zotten (40-80 μm \varnothing), sowie wenige Zottenstämme [62]. 80% der Zottenoberfläche sind mit ZTB überzogen [11].

Im 4. Monat p.m. (11. – 12. Woche p.c., CVS) wird die Form des Chorionsackes durch die Kompression zwischen Gebärmutterwand und Fet unregelmäßiger. Die fortdauernde Degeneration der Plazentazotten am Antiimplantationspol, sowie die Zottenproliferation am Implantationspol leiten die Differenzierung des Chorionsackes zum glatten Chorion laeve und zur Plazenta ein.

5. Monat p.m., 15. – 18. Woche p.c.: Die Plazenta ist deutlich vom Chorion laeve abgetrennt. Die Anzahl der Stammzotten und der mesenchymalen Zotten (80-100 μm \varnothing) nehmen zu. Die restlichen unreifen Zwischenzotten verlieren leicht im Durchmesser [11]. Die mittlere Diffusionsstrecke sowie die Trophoblastdicke sinken stetig [62].

Während des 6. Monat p.m. (19. – 22. Woche p.c.) erfolgt die Umwandlung der meisten unreifen Zwischenzotten in große Stammzotten. Auf der Oberfläche der Zwischenzotten bilden sich die ersten gut kapillarisierten terminalen Zotten [11].

Im 7. Monat p.m. (23. – 26. Woche p.c.) bestehen quantitative Unterschiede zum vorherigen Monat durch Erhöhung der Zottendichte und Zunahme der Zotten mit schmalen Durchmesser [122]. Die Zahl von unreifen Zwischenzotten vermindert sich zugunsten der Stammzotten, der reifen (peripheren) Zwischenzotten und der terminalen Zotten. Der die Chorionplatte bedeckende SZTB beginnt zu degenerieren [11]. Der ZTB nimmt weiter ab und das retikuläre Stroma, sowie Hofbauer-Zellen werden seltener [62].

Die steil wachsende Zahl von reifen Zwischenzotten und terminalen Zotten im 8. Monat p.m. (27. – 30. Woche p.c.) sind der Grund für die beträchtliche Vermehrung des Zottenquerschnittes pro Quadratmillimeter. Zusätzlich zu den dominierenden kleinen Zotten findet man vor allem große Stammzotten. Der ZTB nimmt weiter an prozentualen Anteil ab [11].

9. Monat p.m., 31. – 34. Woche p.c.: Histologisch wird der in den vorherigen Monaten beschriebene Entwicklungsprozess noch bedeutender: Die Gesamtzottenoberfläche steigt auf etwa 10 m^2 . Durch die Kapillargröße und der bestehenden sinusoidalen Dilatation vermindert sich die materno-fetale Diffusionsstrecke und die Trophoblastendicke sinkt auf etwa $5 \mu\text{m}$. Die meisten Zotten sind reife Zwischen- und terminale Zotten. Kleine Gruppen von unreifen Zwischenzotten vor allem im Zentrum des Zottenbaumes weisen auf das noch aktive Plazentawachstum hin [11].

Die Art und die Zahl der Zottentypen unterscheiden sich im 10. Monat p.m. (35. - 38. Woche p.c.) von den vorherigen Stufen in mehreren Aspekten: Das Volumen der terminalen Zotten steigt beträchtlich an und sie erreichen einen sehr hohen Grad an Kapillarisation. Über 20 % des Zottenvolumens sind Stammzotten. In der völlig ausgereiften Plazenta erreicht das fibröse Stroma überall den Trophoblasten oder die fibrinoide Oberfläche der Stammzotten. Der SZTB, der die Stammzotte überzieht, ist weitgehend zurückgebildet und durch Fibrinoid ersetzt. 30-40 % des Zottenvolumens übernehmen die reifen Zwischenzotten. Nur 20 % der Zottenoberfläche sind jetzt noch doppelschichtig, also mit ZTB und SZTB ausgestattet [11].

1.1.2 Aufbau der Plazenta

Die Plazenta ist ein meist ovales, scheibenförmiges Organ von 15-20 cm Durchmesser, etwa 2,5 cm Dicke, einem Gewicht von ca. 500 g sowie einem Zottenvolumen von insgesamt 12,5 m² und bildet sich nach der Einnistung der Blastozyste in der Gebärmutter. Der Implantationsort ist in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle die fundusnahe Korpusrückwand, er kann aber auch an der Vorderwand zu finden sein [62].

Die Plazenta entwickelt sich aus dem fetalen Trophoblasten und dem mütterlichen Endometrium (Gebärmutter Schleimhaut) und ist aus der dem Uterus zugewandten Basalplatte und der gegenüberliegenden Chorionplatte aufgebaut. Am Rand der Plazenta gehen sie ineinander über [62]. Zwischen der Chorionplatte und der mütterlichen Dezidua (Basalplatte) befinden sich die Chorionzotten und der intervillöse Raum, der mit mütterlichem Blut gefüllt ist. Von der Deziduaplatte, der Decidua basalis, wachsen die Plazentasepten in die Lakunen, die in ihrer Gesamtheit als intervillöser Raum bezeichnet werden. Die Deziduasepten unterteilen das Organ in 15-20 höckerige Felder (Kotyledonen), nehmen aber keine Verbindung mit der Chorionplatte auf [7].

Die Pars fetalis, die Grundlage des kindlichen Teils besteht aus der Chorionplatte und der Nabelschnur und ist von einem spiegelnd glatten Amnionepithel bedeckt.

Die Chorionplatte der reifen Plazenta besteht aus den fünf Schichten Amnionepithel, Amnionbindegewebe, Zwischenschicht, Chorionbindegewebe und Trophoblast [62]. Mit fortschreitender Entwicklung der Chorionplatte kommt es zum Untergang von Zytotrophoblastenzellen bei gleichzeitiger Zunahme des Fibrinoids. Für den Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind hat die Chorionplatte keine Bedeutung, allerdings für die Bildung und Resorption von Fruchtwasser sowie für die Hormonbildung [62].

Die Basalplatte besteht aus einem fetalen und einem mütterlichen Teil. Die fetale Seite wird vom Trophoblasten, die mütterliche Seite von der Dezidua gebildet. Beide Teile können plan aneinander liegen und durch eine Lage Nitabuch-Fibrinoid getrennt sein. Auch die Basalplatte besteht ebenfalls aus mehreren Schichten. Zum intervillösen Raum hin ist der SZTB gerichtet, darunter liegen

einzelne ZTB. Es folgen eine Bindegewebsschicht, Rohr-Fibrinoid sowie basophile ZTB, sogenannte X-Zellen. Den Abschluss bilden der Nitabuch-Fibrinoidstreifen, die Dezidua und eine Lösungszone. Die drei ersten Schichten und die X-Zellen können aber auch zu Rohr-Fibrinoid degeneriert sein [62].

Das Chorion laeve ist der zottenfreie Anteil des Chorionsackes. Zusammen mit dem Amnion wird es auch die Paraplazenta genannt.

Die Plazentaschranke bildet eine passive Filtermembran, die mütterliches und kindliches Blut voneinander trennt und den Übertritt von verschiedenen im Blut gelösten Substanzen verhindert oder ermöglicht. Sie setzt sich zusammen aus dem Synzytotrophoblast, Zytotrophoblast, Bindegewebe der Zotten und aus dem Kapillarendothel der fetalen Kapillaren. Dieser Aufbau ändert sich nach der 20. Schwangerschaftswoche: das Bindegewebe bildet sich zurück, die Kapillaren beginnen sich zu vergrößern und die Zytotrophoblastenschicht wird lückenhaft.

1.1.3 Funktion der Plazenta

Während der Schwangerschaft hat die Plazenta als Verbindungsorgan zwischen Mutter und Kind viele lebenswichtige Funktionen zu erfüllen.

Um diese Aufgabe bewältigen zu können, muss die Plazenta über diverse Transportfunktionen verfügen. Zu diesen Transportprozessen zählen die Diffusion (O_2 , CO_2), erleichterte Diffusion (Glucose und Milchsäure), der aktive Transport (Aminosäuren, Elektrolyte) und die Transzytose (IgG-Antikörper).

Die fetalen Funktionen werden teilweise oder ganz von der Plazenta übernommen, wie zum Beispiel der Gastransport, exkretorische Funktionen, der Wasserhaushalt, die pH-Regulierung, katabolische und resorptive Funktionen, sowie synthetisierende und sekretorische Funktionen der meisten endokrinen Drüsen. Zudem kommen noch die zahlreichen metabolischen und sekretorischen Funktionen der Leber, die Hämatopoese des Knochenmarkes im frühen Stadium der Schwangerschaft, der Wärmetransport über die Haut und immunologischen Funktionen [11].

Damit ist dieses Organ für die Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung von Nährstoffen (Ernährung) für die Entsorgung von Stoffwechselprodukten

(Entgiftung) und für die endokrine Regulation von fetalen Stoffwechselprozessen (Steuerung) zuständig [66].

1.2 Pränatale Diagnostik

Die Pränataldiagnostik als wesentlicher Bestandteil der pränatalen Medizin beinhaltet in Anlehnung an die Definition der „European Study Group on Prenatal Diagnosis“ [39] alle diagnostischen Maßnahmen, durch die morphologische, strukturelle, funktionelle, chromosomale und molekulare Störungen vor der Geburt erkannt oder ausgeschlossen werden können. Durch die pränatalen Untersuchungen ist es möglich die perinatale Morbidität und Mortalität zu senken und das Risiko für spezifisch genetisch bedingte Erkrankungen im Einzelfall abzuklären.

Zu den Untersuchungsmethoden gehören sowohl die bildgebenden Methoden Sonografie (Ultraschall) und Dopplersonografie, als auch invasive Verfahren wie die Fruchtwasseruntersuchung (Amniozentese), die Chorionzottenbiopsie, Chordozentese, die Punktion fetaler Organe und Fetoskopie, sowie die Serum-Screening-Methoden.

Diese pränatalen Eingriffe können dann einerseits zur Karyotypisierung, Abklärung von Infekten und Stoffwechselstörungen und andererseits zur direkten Therapie des Fetus eingesetzt werden [38].

Die pränatale Diagnostik hat ihre Wurzeln in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts, als 1952 Bevis die Amniozentesen zur pränatalen Beurteilung der Hämolyse bei Feten mit alloimmunhämolytischen Anämien durchführte [10]. Steele und Breg beschrieben 1966 die Karyotypisierung an kultivierten Amnionzellen [112]. Die Chromosomenanalyse aus Material der Chorionzotten wurde dagegen 1968 von Mohr und Hahnemann eingeführt [55]. Daffos et al. beschrieben schließlich 1983 die Gewinnung von fetalem Blut durch transabdominale Punktion der Nabelschnurgefäße unter Ultraschallsicht, also die heutige Chordozentese [33].

Als nichtinvasive Pränataldiagnostik wandten Donald et al. bereits 1958 die Ultraschalltechnik an, doch erst 20 Jahre später erlaubte die verbesserte Bildauflösung eine detaillierte Untersuchung [36].

Durch den Einsatz neuer molekularbiologischer Techniken wie die Polymerase-Chain-Reaktion (PCR) und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in den letzten Jahren hat die pränatale Diagnostik einen großen Fortschritt im Hinblick auf die Diagnose monogener Erbkrankheiten und Aneuploidien an Zellen erzielt [38].

1.2.1 Vorgeburtliche Ultraschalldiagnostik und maternale Serumbiochemie

Unter nichtinvasiver pränataler Diagnostik werden alle vorgeburtlichen Untersuchungen verstanden, die Informationen über den Gesundheitszustand des Kindes vermitteln aber ohne Risiko für die Schwangerschaft durchgeführt werden können.

Hierzu zählt zunächst die Basisultraschalluntersuchung (Fetometrie), die routinemäßig circa in der 10., 20. und 30. Schwangerschaftswoche durchgeführt wird und bei Auffälligkeiten zur weiteren Abklärung führen kann. Weitergehende Ultraschalluntersuchungen („Feindiagnostik“, d.h. die gezielte Untersuchung nach fetalen Fehlbildungen) und die vorgeburtliche Risikoabklärung (Nackentransparenzmessung, Nasenbeinmessung in der 12-14. SSW und das Serum-Screening) gelten seit dem neuen Gendiagnostikgesetz vom 01.02.2010 als genetische Untersuchungen [19]. Für jede dieser Untersuchungen, bis auf die Basisultraschalluntersuchung, ist eine ausdrückliche und schriftliche Einwilligung erforderlich. Zudem sind sie an eine genetische Beratung gebunden und dürfen nur von qualifizierten Fachärzten durchgeführt werden.

Die Nackentransparenzmessung kann Hinweise auf Chromosomenanomalien, Herzfehler oder strukturelle Anomalien [101, 9, 86] und die Nasenbeinlänge besonders auf die Trisomie 21 (Erkennungsrate 69,0% mit Falschpositivrate von 1,4%) geben. Bei beiden Untersuchungen ist das optimale Gestationsalter die 11+0 bis zur 13+6 Gestationswoche. Für die Nackentransparenzmessung

sollte die Scheitelsteißlänge im Minimum bei 45mm und im Maximum bei 84mm liegen [86, 28, 115].

Die serologische Diagnostik, auch Serum-Marker-Untersuchung genannt, zählt im Allgemeinen zu den nichtinvasiven Methoden. Da kein Risiko für die Schwangerschaft besteht, bedarf es aber dennoch einer Blutentnahme der Schwangeren und ist somit strenggenommen ein invasiver Eingriff.

Das zunehmend etablierte Ersttrimester-Screening ist eine Screening-Untersuchung im ersten Drittel der Schwangerschaft (11+0 bis 13+6 SSW), bei dem die maternalen biochemischen Serumwerte von PAPP-A (Pregnancy associated Plasma Protein A) und dem freien β -HCG analysiert sowie die Nackentransparenzdichte im Ultraschall gemessen werden. Durch diese Messungen ist eine Erkennungsrate einer fetalen Trisomie 21 von ca. 87% (Falschpositivrate von 5%) möglich. Ebenfalls können mittels dieser Methode mehr als 90% der Feten mit einer Trisomie 18 und 13, einem Turner-Syndrom oder einer Triploidie identifiziert werden, was eine Falsch-positivrate von 1% darstellt [86]. Im Rahmen dieses Tests werden neben der Nackentransparenzmessung biometrische Daten des Feten ermittelt, so dass eine zusätzliche Kontrolle des Gestationsalters die Fehleranfälligkeit im Gegensatz zum folgenden genannten Test verringert [129].

Mittels des in der Vergangenheit durchgeführten Triple-Testes (zw. 15 – 20. SSW) wird das Alpha-Fetoprotein (AFP), unkonjugiertes Estriol und beta-Choriongonadotropin (β -HCG) aus dem Serum der Mutter bestimmt. Das AFP wird im Dottersack und in der fetalen Leber, das Estriol und β -HCG werden von der Plazenta produziert. Erniedrigtes AFP und Estriol im zweiten Schwangerschaftsdrittel sowie erhöhtes β -HCG können ein Hinweis auf die Trisomie 21 sein (Erkennungsrate für Trisomie 21: 50-70%, 5% Falschpositivrate) [114].

Im Rahmen des Quadruple-Tests in der SSW 14+0 - 19+6 (zweites Trimester) wird zusätzlich das Inhibin A untersucht und man erhält eine Erkennungsrate von 81% für die Trisomie 21 bei einer Falschpositivrate von 7% [123, 24].

Die Kombination aus biochemischen Markern im 1. und 2. Trimenon wird als integrierter Test (integrated test) bezeichnet.

Die Dopplersonographie der A. umbilicalis (Untersuchung der Blutversorgung zwischen Mutter und Ungeborenem) als Screeningmethode für die Präeklampsie, als auch der 3D- und 4D-Ultraschall (Live 3D-Ultraschall) zählen zu weiteren möglichen pränataldiagnostischen Methoden.

1.2.2 Chorionzottenbiopsie

Die Chorionzottenbiopsie (Chorionic villi sampling, CVS) ist die transzervikale oder transabdominale Biopsie des Chorion frondosum der Plazenta in der Regel zwischen der 10.-14. Schwangerschaftswoche durch Verwendung spezieller Katheter unter sonographischer Sicht und dient zur Gewinnung von Trophoblastenzellen im Rahmen einer Pränataldiagnostik.

1.2.2.1 Entwicklung der Methode

Die Chorionzottenbiopsie wurde erstmals von Hahnemann und Mohr im Jahre 1968 beschrieben [55, 77]. Sie nutzten ein im Durchmesser 6 mm großes Instrument, welches transzervikal eingeführt wurde. Diese Methode führte schnell zu Blutungen und die Sicht auf die Plazenta wurde erschwert. Aus diesen Gründen, aber auch anlässlich der geringen Erfolgsraten wurde diese Methode zugunsten der Amniozentese kurzzeitig verlassen. Doch der Wunsch nach einer früheren pränatalen Diagnostik führte zum Wiederaufleben der CVS. So berichtete 1975 eine chinesische Arbeitsgruppe über eine transzervikale Blindaspiration von Chorionzottengewebe mit einer Metallkanüle. Die Biopsien waren zur Ermittlung des fetalen Geschlechts durchgeführt worden [118].

Eine weitere Entwicklung erbrachten nun Kazy et al. in den 80er Jahren, als sie erstmals unter Ultraschallsicht die Chorionzottenentnahmen in der 6.-12.SSW durchführten [65].

Eine erfolgsversprechende Methode demonstrierten schließlich Smidt-Jensen und Hahnemann im Jahre 1984 [102], nämlich die transabdominale Feinnadelbiopsie der Chorionzotten im ersten Trimester.

1.2.2.2 Indikation

Die CVS ist die Goldstandardmethode der Pränataldiagnostik im ersten Trimester [15], wenn eine zyto- oder molekulargenetische Untersuchung des Feten oder eine Enzymdiagnostik erforderlich ist.

Die früheste Anwendung der CVS war zur fetalen Geschlechtsbestimmung und zur pränatalen Diagnostik von Hämoglobinopathien per DNA-Analyse.

Derzeit sind die Hauptindikationen zur Durchführung einer Chorionzottenbiopsie ein erhöhtes mütterliches Alter, ein auffälliger Ultraschallbefund und abnorme Veränderungen der biochemischen Marker im mütterlichen Blutbild während des Ersttrimesterscreenings. Aber auch bei elterliche chromosomale Anomalien sowie vorangegangene Schwangerschaft mit Chromosomenaberration oder multiplen Fehlbildungen kann eine Chorionzottenbiopsie indiziert sein [79].

Desweiteren kann die CVS Bestandteil einer Infektionsdiagnostik (Zytomegalie, Toxoplasmose, Parvovirus B19), Diagnostik von Stoffwechselerkrankungen (Mukoviszidose, Phenylketonurie) oder Diagnostik monogener Erbkrankheiten (Muskeldystrophie Duchenne, Fragiles-X-Syndrom) sein.

Da die CVS, wie auch die Amniozentese und Fetalblutentnahme mit einer invasiven Maßnahme einhergeht, ist auch nach dem neuen Gendiagnostikgesetz (seit 01.02.2010 in Kraft) eine rechtswirksame Einwilligung sowie eine ausführliche Aufklärung und genetische Beratung vor und nach der Untersuchung durch einen Arzt nötig [19].

1.2.2.3 Methodik

Bei der transzervikalen Chorionzottenbiopsie werden die Zellen mittels eines flexiblen Kunststoffkatheters vom Chorion frondosum entnommen. Die CVS mit diesem Zugangsweg ist bei retroflektiertem Uterus und tiefsitzender Hinterwandplazenta die Methode der Wahl.

Die transabdominale Chorionzottenbiopsie wird mittels einer Nadelpunktion unter Aufbau eines Vakuums durchgeführt. Verwendet wird meist eine 18- bis 20-Gauge-Spinalnadel, welche idealerweise unter kontinuierlicher Ultraschallsicht longitudinal zur Plazenta eingeführt wird. Die meisten CVS werden transabdominal durchgeführt, da es so für die Patientin eine geringere

Belastung bedeutet, es leichter erlernbar ist, eine höhere Erfolgsrate bei der ersten Insertion sowie weniger Kontraindikationen hat und seltener zu postoperativen vaginalen Blutungen führt [38, 103].

Das Aspirat sollte etwa 20-30 mg Zottengewebe enthalten, um gleichzeitig eine Kurzzeitkultur (zytogenetische Ergebniss nach 1 - 2 Arbeitstagen) und eine Langzeitkultur (zytogenetische Ergebniss nach 10 - 12 Arbeitstagen) anzulegen bzw. eine Analyse mittels Direktpräparation durchführen zu können [38]. Nach der Kurzzeitkultur (oder Direktpräparation) werden die mitotisch aktiven epithelialen Zellen der Zytotrophoblastenschicht untersucht, in der Langzeitkultur werden die Fibroblasten des mesodermalen Zottenkerns angezüchtet.

1.2.2.4 Risiken und Komplikationen

Verlust des Feten

Das Hauptrisiko der Chorionzottenbiopsie und auch der Amniozentese besteht in der Induktion eines Abortes [116]. In der Literatur sind zwar viele Publikationen zur CVS erschienen, aber wenige wirklich randomisierte Studien im Hinblick auf die Risiken.

Nach den kanadischen Leitlinien liegt das Risiko für eine Fehlgeburt nach einer CVS bei der transzervikalen Methode bei ca. 2-6%, bei transabdominaler Durchführung bei ca. 1-2% und nach der Amniozentese sogar ungefähr bei 0,5 – 1% [23]. Wie auch diese Studie zeigten mehrere Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede [22, 103] zwischen Amniozentese und transabdominalen CVS im Hinblick für das Auftreten eines Abortes. Jedoch zeigten Smidt-Jensen et al., dass bei der transzervikalen CVS das Vorkommen eines fetalen Verlustes um ca. 3% höher ausfällt, als bei den vorherig genannten. Auch andere Studien belegen das erhöhte Abortrisiko bei der transzervikalen Entnahme [1, 98], so dass das Abortrisiko durch eine transabdominale Biopsie verringert werden kann. Die Amniozentese im zweiten Trimenon ist nach Alfirevic [1] sicherer als die Frühamniozentese und die transzervikale CVS.

Da jedoch zu diesem Schwangerschaftszeitpunkt mit einer relativ hohen Spontanabortrate zu rechnen ist und auch die Erfahrung des Untersuchers eine wichtige Rolle spielt, bleibt eine genaue Risikoangabe schwierig.

Limb defects

In den vergangenen Jahren wurde immer wieder diskutiert, ob die Chorionzottenbiopsien zu einer erhöhten Rate an Extremitätenfehlbildungen (limb defects) führen können. Kindliche Gliedmaßendefekte wurden vermehrt in der Literatur beschrieben. Doch viele der Studien wurden mit einer geringen Kollektivzahl, zu einem frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft (vor der 10. SSW) oder durch einen Untersucher mit mangelnder Erfahrung durchgeführt. Die ersten Beschreibungen von limb defects erfolgte 1991 durch Firth et al. [41], die fünf Gliedmaßenveränderungen nach CVS-Untersuchung am 56. - 66. Gestationstag an 289 Schwangeren zählten. Seitdem wurden weitere Fälle von limb defects nach CVS veröffentlicht [20, 43].

Eine Analyse von fast 139 000 CVS, die zwischen der 9. und 12. Gestationswoche durchgeführt wurden, zeigte keine erhöhte Defektrate im Vergleich zur Prävalenz in der Gesamtpopulation [67].

Eine Metaanalyse der Universität Washington hingegen ergab einen deutlichen Zusammenhang zwischen besonders frühen Chorionzottenbiopsie und Extremitätenreduktionsdefekten [18].

Insgesamt sollte demnach von einem mäßig erhöhten Risiko für Gliedmaßendefekte durch Chorionzottenbiopsie vor der 10. SSW, jedoch nicht von einem erhöhten Risiko nach der 11. Schwangerschaftswoche ausgegangen werden.

1.2.2.5 Chorionzottenbiopsie versus Amniozentese

Die Chorionzottenbiopsie bietet gegenüber der Amniozentese den Vorteil, dass die CVS wesentlich früher (CVS 10. -12. SSW, Amniozentese 15. - 18. SSW) durchgeführt werden kann [79] und Konsequenzen daraus deutlich eher gezogen werden können.

Zum einen ist ein aus medizinischer Indikation eingeleiteter Schwangerschaftsabbruch zu einem früheren Zeitpunkt weniger risikoreich für die Schwangere [79] und zum anderen können die psychischen Folgen nach

einem Schwangerschaftsabbruch bei einer fortgeschrittenen Schwangerschaft schwerwiegender sein als in der Frühschwangerschaft [14].

Weitere Vorteile der CVS sind unter anderem eine höhere Fehlerfreiheit bei DNA- und Enzymanalysen und die Zuverlässigkeit auch bei Mehrlingsschwangerschaften. Außerdem kann im Gegensatz zur Amniozentese bei der CVS eine Probengewinnung auch bei Vorliegen eines Oligo- und Anhydramnion erfolgen.

Allerdings gibt es auch Vorteile der Fruchtwasseruntersuchung. Im Unterschied zur CVS können mittels des Fruchtwassers das Alpha-Fetoprotein und die Acetylcholinesterase zur Erkennung von Neuraltubendefekten bestimmt werden und die Methode ist für den Untersucher leichter zu erlernen [79].

Ein Nachteil der Chorionzottenbiopsie ist, dass in 0,6 % aller Fälle Mosaik (unterschiedliche Zusammensetzung des Genoms in Zellen einer Zellkultur, die von einer Ursprungszelle abstammen) gefunden werden, oder die Ergebnisse falschpositiv bzw. falschnegativ sind [38].

1.2.3 Amniozentese

Die Amniozentese ist die Entnahme von Fruchtwasser durch transabdominale Punktion der Amnionhöhle unter sonographischer Sicht zu diagnostischen Zwecken (z.B. Bestimmung der Chromosomen) und ist die am häufigsten angewendete Methode zur pränatalen Karyotypisierung.

Im Rahmen der zytogenetischen Diagnostik wird diese meist ab der 15. SSW durchgeführt. Der zytogenetische Befund liegt im Durchschnitt nach etwa 10 Tagen vor und die diagnostische Sicherheit beträgt 99,4-99,9 % [38]. Der Nachteil der Amniozentese im 2. Trimenon ist der späte Untersuchungszeitpunkt. Grundsätzlich ist auch eine Frühamniozentese ab der 10.-12. SSW möglich, doch muss man dabei im Gegensatz zur Amniozentese im 2. Trimenon mit einer längeren Bearbeitungszeit und einer höheren Rate an Kulturversagern rechnen. Wie oben bereits erwähnt weist die Frühamniozentese außerdem im Vergleich zur Chorionbiopsie und zur Standardamniozentese eine signifikant höhere Inzidenz an Aborten und Talipes equinovarus (kongenitaler Klumpfuß) auf und ist somit obsolet [85, 25, 81].

1.2.4 Weitere invasive Methoden im Rahmen der Pränataldiagnostik

Ein weiterer Eingriff, der ab der 14.-18. SSW durchgeführt werden kann, ist die Chordozentese. Darunter wird die perkutane Punktion von Nabelschnurgefäßen mit einer 20- bis 21-G-Nadel unter Ultraschallsicht verstanden. In der Regel wird die Nabelvene punktiert [38]. Das Fetalblut kann zur Karyotypisierung aus fetalen Lymphozyten, zur Bestimmung fetaler Antikörper bei Infektionen, zur Untersuchung der fetalen Hämatologie und zur Blutgasanalyse genutzt werden. Bei dem Eingriff ist aber auch eine direkte Applikation von Medikamenten oder eine intrauterine Austauschtransfusion durchführbar [111].

Eine nur noch selten durchgeführte Methode ist die Fetoskopie, wobei der Fetus über ein Endoskop betrachtet wird. Wegen der hohen Abortrate von etwa 4-6 % ist sie nur noch in Ausnahmefällen, wie beispielsweise zur Biopsie bei schweren erblichen Hautleiden (Ichthyosis congenita gravis) zur pränatalen Diagnostik indiziert.

1.2.5 CTG, fetale MRT und Analyse fetaler Zellen

Als späte diagnostische Methode ist die cardiotokographische Untersuchung (CTG) zur nichtinvasiven Pränataldiagnostik von großer Bedeutung, die vor allem in den letzten Schwangerschaftswochen genutzt wird und simultan die Herzschlagfrequenz des ungeborenen Kindes sowie die Wehentätigkeit registriert und aufzeichnet. Bei Risikoschwangerschaften werden die kindlichen Herztöne auch zu einem früheren Zeitpunkt überwacht.

Als eine neuere Methode ist die fetale Magnetresonanztomographie zu erwähnen, die vor allem bei methodisch problematischen Ultraschalluntersuchungen (wie beispielsweise Anhydramnion) genutzt wird. So stehen hier die Absicherung von Ultraschallbefunden, die Abklärung von Fehlbildungen in Hinblick auf individuelle Prognose und Vorliegen eines Syndroms mit genetisch determiniertem Hintergrund sowie die Differenzierung erworbener Störungen von Fehlbildungen und morphologische Veränderungen der Plazenta im Vordergrund [92].

Eine neue Untersuchungsmethode stellt die Extraktion von Erbgut (cf-DNA = circulating free DNA) des Fetus aus Zellen im mütterlichen Blut dar, die bereits ab der 5. SSW durchgeführt werden kann.

Dieses Verfahren hat sich laut Hahn (2011) in großen Schritten entwickelt, so dass wir uns nun auf der Schwelle zu einer neuen Generation der nichtinvasiven diagnostischen Methoden befinden. Diese neue Technik kann sogar eine detaillierte Analyse des kompletten fetalen Genoms oder eines vollständigen Karyotyps ermöglichen [53].

1.3 C-Met und sein Ligand HGF

1.3.1 Aufbau von c-Met

Das 190kDa große Protein c-Met (p190c-met) ist eine transmembranäre Tyrosinkinase und wird von dem c-Met-Protoonkogen kodiert [84]. C-Met bildet den Rezeptor für den sogenannten Hepatozyten-Wachstumsfaktor (Hepatocyte Growth Factor, HGF), auch bekannt als scatter factor (SF).

Der HGF-Rezeptor wird als glykosyliertes 170 kDa-Vorläuferprotein synthetisiert. Nach proteolytischer Spaltung resultiert ein über Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer aus zwei Untereinheiten ($\alpha+\beta$) (Abb. 2). Die kleinere α -Untereinheit (50 kDa) befindet sich extrazellulär an der Zellmembran. Die größere β -Untereinheit dagegen (145 kDa) besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranären sowie einer zytoplasmatischen Domäne. Die intrazelluläre Domäne der β -Untereinheit enthält eine Tyrosinkinaseaktivität und Regionen für die Autophosphorylierung [83, 105].

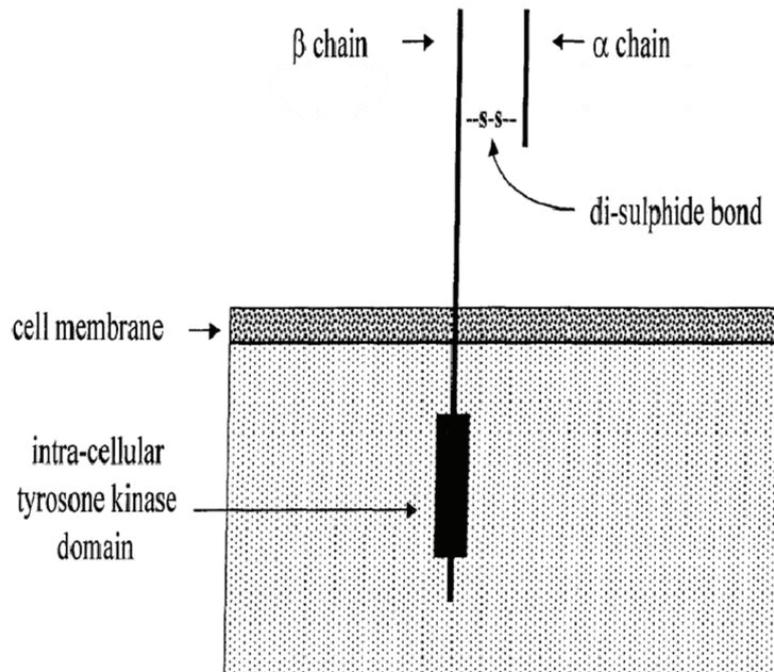


Abbildung 2: HGF-Rezeptor c-Met

C-Met ist ein transmembranäres Glykoprotein von 190 kDa, bestehend aus zwei durch eine Disulfidbrücke verbundenen Untereinheiten ($\alpha+\beta$). Die β -Kette hat 145 kDa und erstreckt sich über die Plasmamembran, wohingegen die α -Kette mit 50 kDa nur extrazellulär gelegen ist (modifiziert nach Somerset, 1998 [105]).

1.3.2 Expression von c-Met

C-Met wird vor allem in epithelialen Zellen, aber auch in endothelialen, neuronalen sowie hämatopoetischen Zellen und in Hepato- und Melanozyten exprimiert. Es ist demnach in vielen unterschiedlichen Geweben zu finden. Mit der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Expression des c-Met-Proteins in Hepatozyten, im Epithel des Magens, des Dünn- und Dickdarmes entdeckt. Ebenso konnte das Protein in Epithelzellen des Endometriums und des Ovars sowie in basalen Keratinozyten des Ösophagus und der Haut nachgewiesen werden.

Auch im Gehirn ließ sich das Protein erfassen. In Proben der Leber, des Gastrointestinaltraktes und der Niere wurde c-Met-mRNA durch Northern-Blot-Analysen aufgespürt. Zudem konnte c-Met-mRNA in der Schilddrüse, im Pankreas und der Plazenta gefunden werden. Im Pankreas und der Plazenta war das c-Met-Protein mit Immunfluoreszenz nur schwach detektierbar. In der Nebenniere, im Knochenmark und der Milz fehlte die mRNA völlig.

Mittels Antikörper deckte man die Expression vom c-Met-Protein in Lebertumoren, Kolon- und Rektumtumoren sowie in Tumoren des Magens, der Nieren, der Ovarien und der Haut auf. Die Tests auf das Protein in Karzinomen der Lunge, der Schilddrüse und des Pankreas waren ebenso positiv [91, 34].

1.3.3 Der Ligand Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF)

Sein Ligand, der Hepatozyten-Wachstumsfaktor wird als eine Vorstufe (proHGF) in Form einer Einzelkette (728 Aminosäuren) gebildet, die zwar an seinen Rezeptor bindet, dessen Tyrosinkinase aber nicht aktivieren kann. Eine proteolytische Spaltung wandelt proHGF in die heterodimere aktive Form (HGF) um [75, 84].

Der dem Plasminogen ähnliche HGF wurde als heterodimeres Polypeptid gefunden, dessen beide Untereinheiten über Disulfidbrücken verbunden sind. Es besteht aus einer größeren α -Untereinheit (69 kDa) und einer kleineren β -Untereinheit (34 kDa). Die α -Kette setzt sich aus vier Kringel-Domänen und einer Haarnadelschleife zusammen [76].

Die In-situ-Hybridisierung hat gezeigt, dass HGF ausschließlich in Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimiert wird, also im Stütz- und Bindegewebe [73, 74].

Er ist ein wirksamer mitogener Faktor für verschiedene Zelltypen [82]. Neben den mitogenen und motogenen Aktivitäten, hat HGF auch wachstumshemmende Aktivität auf bestimmte Tumorzellen und eine potente morphogenetische Funktion [100, 80].

1.3.4 Die Aktivierung von c-Met

Die Funktion des c-Met-Rezeptors spielt in der epithelialen Zellproliferation, Migration und Morphogenese eine wichtige Rolle [63].

Die Bindung von HGF an seinen Rezeptor löst die Tyrosinphosphorylierung der β -Untereinheit von c-Met an intakten Zellen aus, wobei die Hauptphosphorylierung mit Tyr1235 verknüpft ist.

Die Kinaseaktivität wird durch die Autophosphorylierung hochreguliert.

Die Negativregulation der Rezeptorkinaseaktivität erfolgt über erkennbare Signalwege, welche die Aktivierung der Proteinkinase C oder die Steigerung

der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Folge haben. Beides führt zur Serin-Phosphorylierung von einem einzigen Phosphopeptid des Rezeptors sowie zu einem Abfall der Kinaseaktivität.

Die Autophosphorylierung des Rezeptors löst ebenfalls eine Signaltransduktionskaskade in der Zielzelle aus. Der phosphorylierte Rezeptor assoziiert in vitro mit ras GAP, Phospholipase C γ und der src-bezogene Tyrosinkinase [30].

1.3.5 Funktion des c-Met/HGF-Systems

Der HGF wurde ursprünglich als Mitogen für Hepatozyten entdeckt und spielt unter anderem eine Rolle in der Regeneration der Leberzellen [3].

Nach Darstellung in mesenchymalen Geweben erschloss sich ein parakriner Effekt im angrenzenden Epithel mit hauptsächlichlicher Beeinflussung des Zellwachstums (Mitogen), der Motilität (Motogen) und der Morphogenese (Morphogen) von epithelialen Zellen.

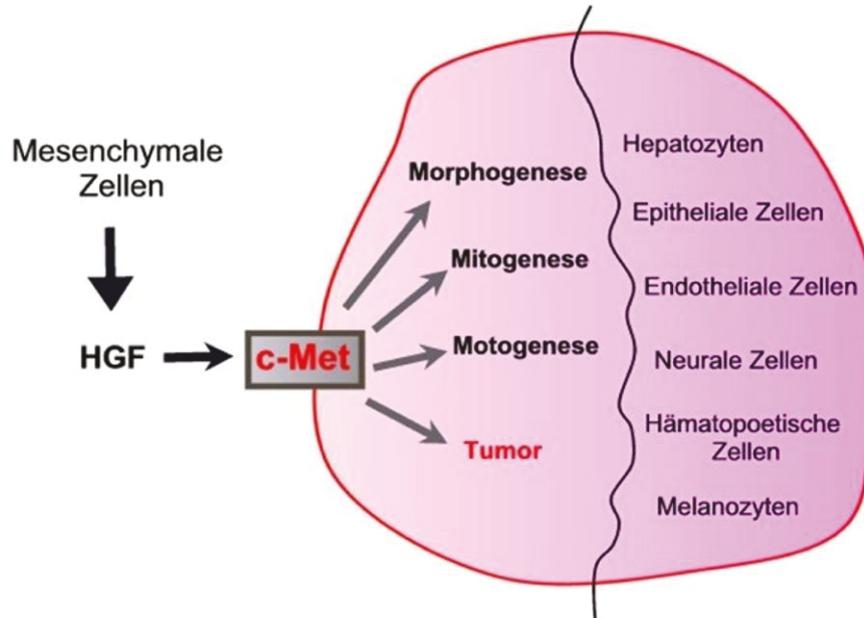


Abbildung 3: Funktionen von HGF am c-Met-Rezeptor

All diese Funktionen können durch den c-Met-Rezeptor vermittelt werden, herbeigeführt durch eine Aktivierung im anschließenden intrazellulären Signaltransduktionsweg.

Die beschriebene Aktivität des Systems ist im Wesentlichen wichtig während der Entwicklung, der Homöostase und der Geweberegeneration.

Mehrere Untersuchungen deuten darauf hin, dass der MET-Tyrosinkinase-Rezeptor ein Sensor für ungünstige Umgebungsbedingungen, wie zum Beispiel Hypoxie ist und somit die Zellinvasion und Zellabsiedlung über die transkriptionale Aktivierung von Genen, die für die Kontrolle der Blutgerinnung zuständig sind, antreibt [16].

Außerdem fanden Yoshida et al. (2004) heraus, dass die HGF-Konzentration in der Peritonealflüssigkeit bei Patientinnen mit Endometriose signifikant höher zu messen ist, als bei Patientinnen ohne diese Erkrankung. Sie zeigten auch, dass endometriale und endometrioiden Stromazellen c-Met exprimieren und durch endo- und exogenes HGF aktiviert wird. Somit bewiesen sie, dass das HGF/c-Met-System in der Endometriosepathogenese durch Förderung der Stromazellen Zellproliferation und Invasion von Endometriumzellen über autokrinen und parakrinen Wege involviert ist [130].

1.3.6 Expression von c-Met und HGF in der Plazenta

HGF und c-Met spielen eine äußerst wichtige Rolle in der Plazentaentwicklung der Maus [118]. Um zu ergründen, ob HGF eine ähnliche Rolle in der menschlichen Plazenta spielt, wurde die Sekretion und Lokalisation von c-Met und HGF im frühen zweiten Trimester und in der reifen Plazenta untersucht. Mit der Reversen-Transkriptions-PCR und speziellen Primern konnte c-Met und HGF-mRNA in plazentaren Zotten ermittelt werden. Die HGF-Produktion über 48 Stunden war in Plazentazottenexplantaten während des zweiten Trimester 2.1-fach höher als in Explantaten von reifen plazentaren Zotten. Isolierte Trophoblasten produzierten kein HGF, wohingegen in isolierten Geweben des Zottenkerns und in deren mesenchymale Zellen HGF produziert wurde. Mit der Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass HGF im Kerngebiet der Zotten

lokalisiert ist, aber nicht in Throphoblasten. Im Gegensatz dazu war c-Met hauptsächlich in Zytotrophoblasten zu finden.

Diese Kenntnisse legen nahe, dass das von den Zottenkernen produzierte HGF auf einen parakrine Weg auf den HGF-Rezeptor (c-Met) einwirken kann, um die Trophoblastenentwicklung oder ihre Funktion zu regulieren [63, 29].

Desweiteren untersuchten Uehara et al. Plazenten an selbst gezüchteten mutierten Mäusen mit gezielter Störung des HGF-Gens und fanden, dass die Embryos mit stark beeinträchtigte Plazenten eine ausgesprochen reduzierter Zahl von verschlungenen Trophoblastenzellen besitzen und noch vor der Geburt sterben [118, 35]. HGF ist somit ein essentieller Mediator für die allantoische mesenchymal-trophoblastische Epithelinteraktionen und ist damit erforderlich für die Plazentaorganogenese [118].

1.4 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression von c-Met in Chorionzotten nach Chorionzottenbiopsie in der Frühschwangerschaft mittels immunhistochemischer Färbung und damit verbunden erstmals den Zusammenhang der Expressionsstärke mit dem Schwangerschaftsoutcome zu untersuchen.

Zunächst einmal lag der Schwerpunkt unserer Arbeit darin, das Expressionsmuster von c-Met in den einzelnen Kompartimenten der Chorionzotten zu analysieren und mit den Daten in der Literatur zu vergleichen. Im zweiten Schritt wurde das Augenmerk auf die Korrelation dieses c-Met-Musters und dessen Stärke zum Schwangerschaftsoutcome gelegt, um so einer Möglichkeit nachzugehen, c-Met als pränataldiagnostischen Marker beispielsweise zur Abschätzung für eine Frühgeburtlichkeit, Wachstumsretardierung, einen ungünstigen Schwangerschaftsausgang oder für einen auffälligen Karyotyp einsetzen zu können.

Daher sollen im Rahmen dieser Studie die Schwangerschaftsdauer bei Geburt, die Perzentile des Kindes, der kindliche Ausgang der Schwangerschaft sowie die Karyotypen im Mittelpunkt stehen. Aber auch andere mütterliche sowie kindliche Faktoren stehen im Interesse dieser Arbeit, wie das Geschlecht des Kindes, pränataldiagnostisch ermittelte sonographische Parameter, sowie das Alter der Mutter bei CVS, Alkohol- und Nikotinkonsum, BMI und Gravida.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In diese Studie eingeschlossen wurden nur Patientinnen, die schriftlich ihr Einverständnis zur Studienteilnahme gaben, nachdem sie ausdrücklich über die Möglichkeit, das Einverständnis zu widerrufen und die Teilnahme zu beenden, informiert wurden.

Im Zeitraum von Oktober 2001 bis Januar 2004 erfolgte bei 196 Patientinnen in der pränataldiagnostischen Abteilung der Universitätsfrauenklinik Münster eine Chorionzottenbiopsie. Hierbei wurde bei einem bestimmten Anteil von Biopsien Material für eine zytogenetische Untersuchung zur Karyotypisierung des Feten benötigt. Da der Zottenanteil dadurch in einigen aufbereiteten Präparaten zu gering war, konnten für diese Studie nur 184 von 196 Plazentaprobe verwendet werden. Eine Zwillingschwangerschaft unter diesen Proben wurde nicht berücksichtigt, so dass 183 Präparate mit in die weiteren Untersuchungen und Berechnungen eingingen.

Ein hohes mütterliches Alter, fetale Indikationen wie eine erhöhte Nackentransparenz im Ultraschall, sowie bereits vorbeschriebene Komplikationen oder Erkrankungen eines Kindes in einer vorausgegangenen Schwangerschaft zählten zu den häufigsten Indikationen zur CVS. Zwischen der 10. und 14. Schwangerschaftswoche wurde der überwiegende Teil der Biopsien durchgeführt, nur 16 CVS fanden nach der 14. SSW statt. Die Patientinnen waren zum Zeitpunkt der CVS 19 - 43 Jahre alt (Mittelwert: 35 Jahre).

2.2 Daten zu Patientinnen und kindlichem Outcome

Die Patientendaten und die Daten des kindlichen Outcome wurden erst nach dem konventionellen Scoring sowie der computergestützten Auswertung mit den Proben der Chorionzottenbiopsie in Verbindung gebracht, um eine Verblindung dieser Studie zu gewährleisten.

Die mütterlichen Daten zu Alter, Gewicht, Entbindungstermin, Größe, Komplikationen und Ausgang der Schwangerschaft, Nikotin- und Alkoholkonsum, BMI sowie die kindlichen Daten zu Geburtsgewicht, Größe, Karyotyp und die Ultraschallmessungen wurden aus dem PIA- Fetal Database, View Point (GE Medical Systems Company) ermittelt.

Mittels des Centile Calculator des Perinatal Institutes (UK) wurden die angeglichenen Perzentile (customised centiles) errechnet. Hierbei wurden das Körpergewicht und die Körpergröße (Geburtsgewicht/Gestationsalter) verwendet und in geschlechts- und altersspezifischen Perzentilen angegeben, um ein an das mütterliche Gewicht sowie an das Gestationsalter am Entbindungstermin adaptiertes Geburtsgewicht zu erhalten und somit die Perzentilen der Kinder vergleichen zu können. Diese Software basiert auf den Prinzipien des Gestation Related Optimal Weight (GROW) Programm [44, 45] und als Grundlage dienen die Formeln für die angepassten Perzentile von Campell et al. [21] und Hadlock et al. [51, 52]. Für die Berechnungen wurde bei unserem Patientenkollektiv als ethnische Gruppe europäisch und für die Parität der Wert 0 eingegeben. Für die restlichen Parameter, wie das mütterliche Gewicht und Größe, sowie das Gestationsalter bei Entbindung, Geschlecht und Geburtsgewicht des Kindes wurden die aus dem PIA-Fetal Database ermittelten Werte verwendet. Die Daten aus dem United Kingdom (Notts) mit einer Fallzahl von 40000 dienten hierbei als Referenzkollektiv.

2.3 Aufbereitung des Chorionzottengewebes

Um das Chorionzottengewebe entsprechend aufzubereiten, wurde das mittels CVS gewonnene Material von einem Labor, welches wegen der Verblindung der Studie nicht mit in die Behandlung involviert war, zunächst für einen Tag in Formalin fixiert und danach einen Tag lang in Leitungswasser stehend aufbewahrt. Anschließend wurde das Gewebe in eine aufsteigende Alkoholreihe überführt. Zunächst wurde die CVS-Probe für einen halben Tag in 50-prozentigem Alkohol gelagert und einen weiteren Tag in 70-prozentigem Alkohol. Es folgte eine einstündige Versetzung mit 96-prozentigem Alkohol und

nachfolgend mit absolutem Alkohol. Für vier Stunden wurde das Material in Methylbenzoat belassen. Schließlich konnte das Gewebe für einen Tag in Paraffin, welches mehrfach ausgetauscht wurde, gegeben werden. Zum Abschluss wurden aus den Paraffinblöcken 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf die Objektträger fixiert.

Um für alle Präparate die gleichen Fixierungsbedingungen zu schaffen, fand die Fixierung des Materials unabhängig von Werk- oder Wochenendtagen immer in gleichen zeitlichen Abständen statt.

2.4 Immunhistochemische Färbung der Plazentagewebeproben

2.4.1 C-Met-Antikörperfärbung

Mittels einer absteigenden Alkoholreihe mit Xylol wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert und anschließend mit Aqua destillata gespült. Zur Vorbehandlung wurden die Schnitte dann in einen Citratpuffer (0,1 M; pH 6,0) überführt und für 5,5 Minuten bei 500 Watt in der Mikrowelle belassen. Nachfolgend kühlten die Schnitte für 30 Sekunden lang bei Raumtemperatur ab, um danach erneut mit Aqua destillata gespült zu werden.

Die Überführung der Gewebeschnitte in einen Tween/TBS-Waschpuffer (Tris Buffered Saline, 0.05 M mit 0,1 % Tween-20; pH 7,2 -7,6) folgte im nächsten Schritt. Danach wurde die Proteinkinase K (Dako[®] Ready-to-use Proteinkinase K, Carpinteria, USA; verdünnt in 0.05 M Tris-HCL, 15 mM Natriumazid, pH 7.5) zugeführt und bei Raumtemperatur acht Minuten inkubiert.

Im Anschluss eines erneuten Spülvorganges mit Aqua destillata und dem Tween/TBS-Waschpuffer wurde ein Peroxidase Block durchgeführt, bei dem 0,3-prozentige Peroxidase benutzt wurde. Die Peroxidase war im Verhältnis 1:10 mit TBS und 30-prozentigem Wasserstoffperoxid verdünnt und inkubiert für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Es folgte eine letzte Spülung mit Aqua destillata, Tween und TBS.

Im nächsten Schritt wurde den Schnitten der polyklonale c-Met-Antikörper „C-12“ (Rabbit - Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) zugeführt. In

einer Verdünnung des Antikörpers von 1:50 mit antibody Diluent, ChemMate™ der Firma DakoCytomation (Glostrup, Dänemark) wurden die Präparate inkubiert und über Nacht im Kühlschrank belassen.

Am nächsten Tag erfolgte zunächst eine Spülung mit TBS und Tween, anschließend wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Peroxidase labeled Polymer (Dako EnVision™ + System, HRP, Carpinteria, USA) versetzt. Nach erneutem Spülen mit dem Tween/TBS-Waschpuffer wurde für die Farbentwicklung das Chromogen DAB+ (Diaminobenzidine Solution, DAKO ChemMate™) in einer Verdünnung von 80 µl/ 4 ml mit einem Substratpuffer zugeführt und die Gewebeschnitte danach mit Aqua destillata ausgespült.

Zur besseren Differenzierung der unterschiedlichen Gewebestrukturen der Chorionzotten wurden die Schnitte zum Abschluss noch kurz mit Hämatoxylin nach Mayer gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte für eine Sekunde in Hämatoxylin eingetaucht und anschließend in fließendem Leitungswasser für zehn Minuten gebläut. Im letzten Schritt erfolgte eine Auswaschung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Eindeckung mit dem Schnelleinschlusmittel DePeX.

2.4.2 Kontrollfärbung

Zusätzlich zur Antikörperfärbung wurde von allen Proben eine negative Kontrolle angefertigt, in der während des Färbeprozesses der Primärantikörper ausgelassen wurde. Die Färbung wurde nach der gleichen Methode, wie oben beschrieben, durchgeführt.

2.5 Mikroskopische Auswertung der Chorionzottenpräparate

Mit dem Photomikroskop (Axiovert 100, Carl, Zeiss AG; Deutschland) erfolgte die Auswertung der antikörpergefärbten Zottengewebeschnitten lichtmikroskopisch.

Nach einer orientierenden Durchsicht der Präparate wurde in jedem Gewebeschnitt eine kleine (ungefähr ein Viertel des Bildausschnittes der Kamera einnehmend, 100.000 - 300.000 Pixel) und eine große (ca. über die

Hälfte des Bildausschnittes, 300.000 – 800.000 Pixel) möglichst runde Zotte ausgesucht.

Da einige Präparate ein zu geringes Zottenmaterial enthielten, konnte nicht in allen Gewebeschnitten eine Zotte mit diesen Kriterien ausgewählt werden, so dass in wenigen Fällen entweder keine, nur eine kleine oder eine große Zotte mit in die Bewertung einfließen konnte.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Lichtverhältnisse und um die unterschiedliche Färbeintensität der Präparate vergleichbar zu machen, wurden die Zotten in nur zwei Sitzung mit der gleichen Einstellung (siehe Tab. 1) abfotografiert. Um eine gleichmäßige Helligkeit zu gewährleisten wurde das Mikroskop und somit die Lichtquelle jeweils 45 Minuten vor Gebrauch der Kamera eingeschaltet sowie ein Weißabgleich durchgeführt.

Die ausgewählten, den Kriterien entsprechenden Zotten wurden mit einer am Mikroskop installierten Digitalkamera (AxioCam MRc, Zeiss, Germany) und mit Hilfe des Computerprogramms AxioVision (Version 4.3, Carl Zeiss Vision GmbH) fotografiert und als TIFF-Datei (Tagged Image File Format) zur weiteren Bildauswertung abgespeichert.

Die Computereinstellung war bei allen Fotos einheitlich. Während beider Durchgänge wurde mit einer 320fachen Vergrößerung (Objektiv: 32fache Vergrößerung, LD Achroplan 32x/0,40 Ph2; Okular: 10fache Vergrößerung; E-PI 10x/20) und weiteren folgenden Einstellungen gearbeitet:

Belichtungszeit: 25 ms		
Gewichtung der Belichtungszeit: 100 %		
Weißabgleich:		
Cyan	1.37	Rot
Magenta	1.19	Grün
Gelb	0.44	Blau
Kameramodus:		
RGB (Rot-Grün-Blau)		
1388 x 1040 Standard color		
Ausschnittgröße:		
1388x1040		
Verstärkungsfaktor: 1		
Bildausrichtung: original		
Verschlusssteuerung:		
Steuersignal: Low active		
Aufnahmeverzögerung: 20 ms		
Filteroperation: Farboptimierung aktiviert		
Weißreferenz: aktiviert		

Tabelle 1: Mikroskopeinstellungen

Die Schärfeeinstellung wurde am Mikroskop manuell für jedes Foto reguliert.

2.6 Computergestützte Bildanalyse

Nach Beendigung der beiden Fotoaufnahmesitzungen wurde mittels des Computerprogrammes ImageProPlus (Version 5.0, Media Cybernetics[®], Silver Spring, USA) die computergestützte Chorionzottenauswertung vorgenommen. Hierzu wurden zunächst mit Hilfe des Programms der Umfang und der Flächeninhalt jeder abfotografierten Zotte in Pixel gemessen. Wir legten als Spannbreite für die Größe der kleinen Zotten 100.000 - 300.000 Pixel und für die der großen Zotten 300.000 - 800.000 Pixel fest.

Zusätzlich wurde die reine Stromafläche und die Fläche des Stromas einschließlich des Zytotrophoblasten ermittelt, um den Synzytotrophoblasten und den Zytotrophoblasten gesondert berechnen zu können.

Der nächste Schritt bestand aus der Erstellung einer auf die Färbung abgestimmten Maske für die standardisierte Berechnung der unterschiedlichen Färbeintensität.

Diese Maske wurde so erstellt, dass das Programm die von der immunhistochemischen Färbung schwach gefärbten Anteile „gelb“ markierte, die mittelstark gefärbten Bereiche in einem „Orange“ und die stark angefärbten Anteile in einem „Rot“ erschienen (siehe Abb. 4). Dies wurde mit Hilfe von verschieden stark gefärbten Zotten definiert und anhand aller Zotten überprüft.



Abbildung 4: Präparat der Patientin P0103, c-Met-Antikörperfärbung, kleine Zotte, links ohne Maske, rechts mit Maske

So ließen sich die Flächen aller drei Farben mittels dieser Maske berechnen. Zunächst wurden die Flächen der schwach, mittelstark und stark gefärbten Anteile einer jeden Zotte für die gesamte Zottenfläche bestimmt, des Weiteren für das Stroma samt des Zytotrophoblasten und abschließend nur für die Fläche des Chorionzottenstromas.

Die Bestimmung der Werte umfasste nicht nur die absoluten, sondern auch die prozentualen Anteile der gefärbten Areale, so dass folgende Parameter (Tab. 2) Ergebnis der Berechnungen waren:

Gesamte Zotte	1	der absolute insgesamt gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche der Zotte
	2-4	jeweils der absolute stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche der Zotte
	5-7	jeweils der prozentuale stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil am insgesamt gefärbten Anteil
	8-10	jeweils der prozentuale stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche der Zotte
	11	der prozentuale insgesamt gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche der Zotte
Stroma	12	der absolute insgesamt gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche des Stromas
	13-15	jeweils der absolute stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil des gesamten Zottenstroma
	16-18	jeweils der prozentuale stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil des Stromas am insgesamt gefärbten Anteil
	19-21	jeweils der prozentuale stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche des Stromas
	22	der prozentuale insgesamt gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche des Stroma
Stroma + ZTB	23	der absolute insgesamt gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche des Stromas + ZTB
	24-26	jeweils der absolute stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil des gesamten Stromas + ZTB
	27-29	jeweils der prozentuale stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil des Stromas + ZTB am insgesamt gefärbten Anteil
	30-32	jeweils der prozentuale stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche des Stromas + ZTB
	33	der prozentuale insgesamt gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche des Stromas + ZTB

Tabelle 2: Durch die Bildanalyse ermittelte Parameter pro Präparat

Zusätzliche mussten folgende Werte (siehe Tab. 3) mit dem Programm Microsoft Excel 2007 ermittelt werden:

SZTB	34	der absolute insgesamt gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche des SZTB
	35-37	jeweils der absolute stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil des gesamten SZTB
	38-40	jeweils der prozentuale stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil des SZTB am insgesamt gefärbten Anteil
	41-43	jeweils der prozentuale stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche des SZTB
	44	der prozentuale insgesamt gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche des SZTB
ZTB	45	der absolute insgesamt gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche des ZTB
	46-48	jeweils der absolute stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil des gesamten ZTB
	49-51	jeweils der prozentuale stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil des ZTB am insgesamt gefärbten Anteil
	52-54	jeweils der prozentuale stark, mittelstark und schwach gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche des ZTB
	55	der prozentuale insgesamt gefärbte Flächenanteil an der Gesamtfläche des ZTB

Tabelle 3: Berechnete Parameter pro Präparat

2.7 Konventionelle Chorionzottenauswertung mittels

Färbescore

Als zweite Methode der Chorionzottenauswertung beurteilten drei Untersucher unabhängig voneinander die immunhistochemisch angefärbten Chorionzotten auf den unbearbeiteten Fotoaufnahmen.

Dazu wurden die Digitalfotos mit dem 320fach vergrößerten Zottengewebe im Fotolabor der Universitätsklinik Münster ohne weitere Bearbeitung auf die Fotogröße von 10,2 cm x 13,6 cm entwickelt.

Die Untersucher bewerteten die gesamte Chorionzotte sowie die einzelnen Kompartimente wie die Mikrovilli, den Synzytotrophoblasten, den Zytotrophoblasten und das Stroma.

Beurteilt werden sollte die Färbeintensität der immunhistochemischen c-Met-Färbung insgesamt und in den einzelnen Strukturen, wobei die folgenden vier Kategorien den folgenden vier Zahlen entsprechen sollten:

„nicht gefärbt“ = 0

„schwach gefärbt“ = 1

„mittelstark gefärbt“ = 2

„stark gefärbt“ = 3

Anschließend wurden die Bewertungen miteinander verglichen und bei völliger Übereinstimmung blieben die Bilder in der entsprechenden Kategorie.

Bei Uneinigkeit der Kategorienvergabe, blieb das Foto in der Kategorie, in der es von zweien der drei Untersucher einsortiert worden war.

Im Falle einer Uneinigkeit aller drei Beurteiler, welches bei acht Fotos der Fall war, stimmten sich erneut zwei der Untersucher ab und sortierten es in eine geeignete Kategorie ein.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung des Datenmaterials erfolgte mit dem Programm SPSS (SPSS für Windows, Version 16.0.1, 2007, Chicago, USA). Mit diesem Statistikprogramm wurde die deskriptive Auswertung einschließlich der zugehörigen grafischen Darstellungen durchgeführt.

Zum Vergleich der Stichproben wurden nichtparametrische Tests verwendet, da von nicht normalverteilten Stichproben auszugehen war.

Als Test wurden der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben in Verbindung mit der Kontingenztafel (Kreuztabelle = Häufigkeitstabelle, die Kombinationen von unterschiedlichen Merkmalsausprägungen enthalten) und der Chi-Quadrat-Test (Untersuchung von Verteilungseigenschaften einer statistischen Grundgesamtheit) verwandt, sowie der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test für unverbundene Stichproben. Als Signifikanzniveau wurde $p = 0,05$ ausgewählt.

Die Abhängigkeit von zwei stetigen Variablen wurde mittels des Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet. Ab einem Wert von 0,7

wurde die Korrelation als hoch eingestuft und es bestand somit ein signifikantes Ergebnis. Eine mittlere Korrelation wurde ab dem Wert 0,5 festgesetzt, die Werte zwischen 0,2 und 0,3 galten als geringe Korrelation.

Die ROC-Analysen (*Receiver Operating Characteristic*), Berechnungen von Sensitivität, Spezifität, positiven und negativen Likelihood-Quotienten, als Maß für die Güte eines diagnostischen Tests, sowie univariate parametrische Diskriminanzanalysen und die Ermittlungen des relativen Risikos wurden mit dem Programm BiAS für Windows, Biometrische Analyse von Stichproben (Version 9.09 – 01/2011, epsilon-Verlag, Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Daten zu Patientinnen und zum Schwangerschaftsoutcome

3.1.1 Mütterliches Alter

Die insgesamt 183 Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Chorionzottenbiopsie im Durchschnitt 34,95 Jahre alt (Standartabweichung $\sigma = 4,83$). Die Alterspanne reichte von 19 bis 43 Jahren.

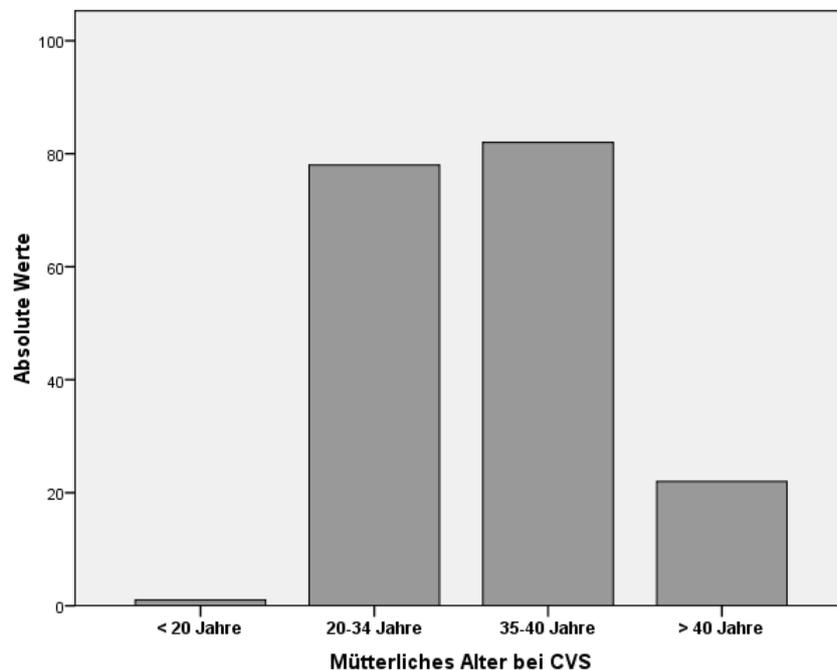


Abbildung 5: Alter der Patientin bei Chorionzottenbiopsie

3.1.2 Gestationsalter bei CVS

Die Chorionzottenbiopsien wurden zwischen der 10. und 29. Schwangerschaftswoche durchgeführt. Im Mittel betrug das Gestationsalter zum Zeitpunkt der CVS 12,52 Wochen (Standartabweichung $\sigma = 2,53$). 91,3 % der CVS wurden bis zur 14. Schwangerschaftswoche durchgeführt und nur 8,7 % der Biopsien fanden nach der 14. SSW statt. Davon wurden 7 Untersuchungen nach der 19. SSW veranlasst.

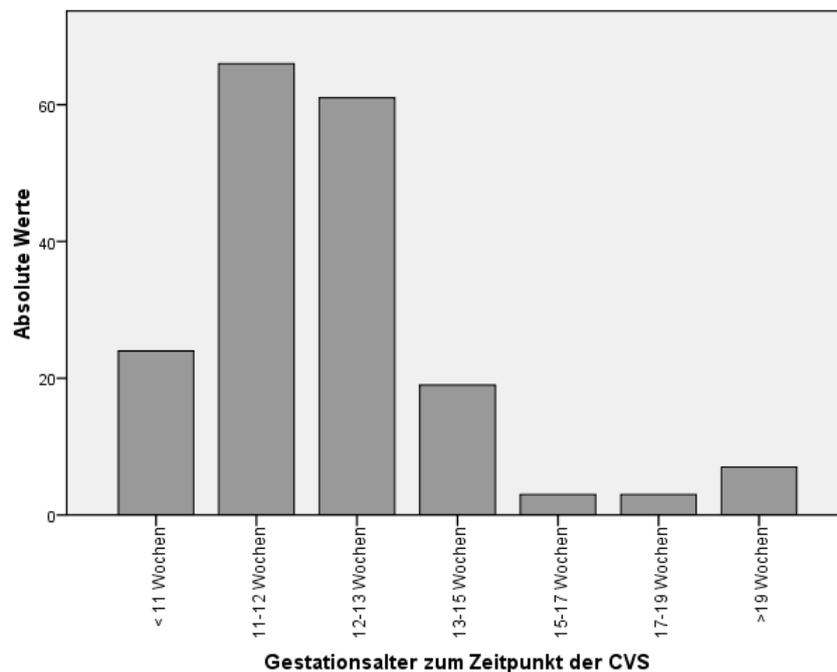


Abbildung 6: Gestationsalter bei CVS

3.1.3 Body-Mass-Index der Schwangeren

Der mittlere Body-Mass-Index (BMI) der Mütter zum Zeitpunkt der CVS betrug 24,32, wobei die Spanne zwischen einem Minimum von 17,4 und einem Maximum von 38,2 lag. Die Standardabweichung beträgt $\sigma = 3,85$.

71,7 % (124) der Patientinnen hatten einen BMI zwischen 19 und 26. Unterhalb lagen 4 % (7 Mütter) und 24,3 % (42 Mütter) erhielten einen BMI von über 26.

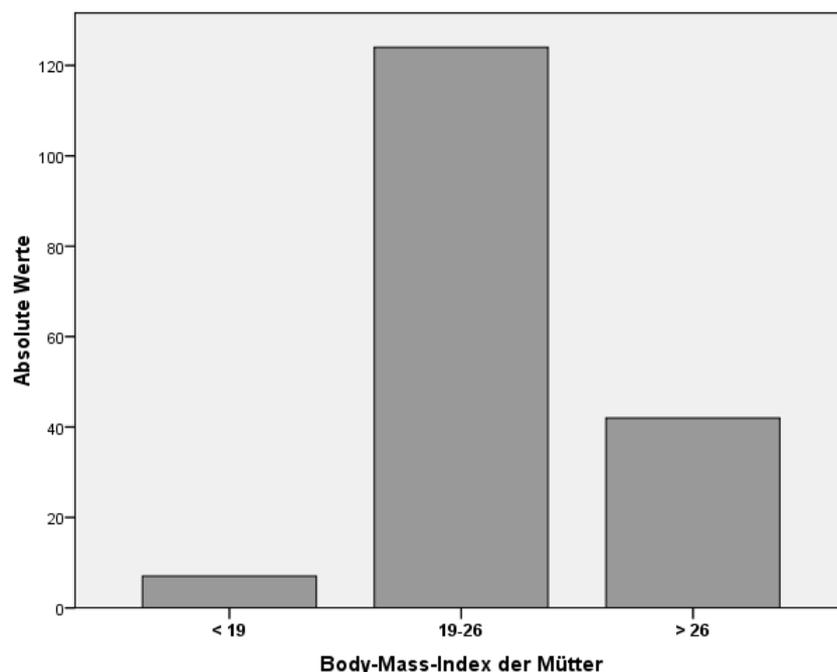


Abbildung 7: Body-Mass-Index der Patientinnen

3.1.4 Nikotin- und Alkoholkonsum der Mütter während der Schwangerschaft

18,5 % (33 Frauen) der insgesamt 183 Schwangeren gaben an zu rauchen und 145 Frauen konsumierten kein Nikotin. Daten zu den restlichen 5 Patientinnen fehlen im System. 19 Patientinnen berichteten mehr als 5 Zigaretten pro Tag zu rauchen.

Einen regelmäßigen Alkoholkonsum bestätigten sechs Schwangere. 173 Patientinnen gaben an, keinen Alkohol während der Schwangerschaft zu konsumieren und vier Schwangere machten keine Angaben zum Alkoholkonsum.

3.1.5 Schwangerschaftsausgang

Von den insgesamt 183 Schwangerschaften waren 163 Schwangerschaften karyotypisch unauffällig und 19 wiesen eine chromosomale Anomalie auf (bei einer Schwangerschaft fehlen Daten zum Karyotyp). Das Geschlecht ist mit 95 weiblichen und 88 männlichen Kindern annähernd gleich verteilt.

Insgesamt traten unter den Schwangerschaften mit einem normalen Karyotyp (von den 163 karyotypisch unauffälligen Schwangerschaften gehen nur 129 in

die Berechnung mit ein, weil bei 34 Probanden Daten zum Schwangerschaftsausgang fehlen) sechs Spontanaborte und fünf intrauterine Fruchttode (IUFT) auf. Zwischen IUFT und Spontanabort wurde als Grenze die 24. SSW festgesetzt. Bei den chromosomal unauffälligen Kindern wurden acht Schwangerschaftsabbrüche durchgeführt und 110 Kinder kamen lebend zur Welt.

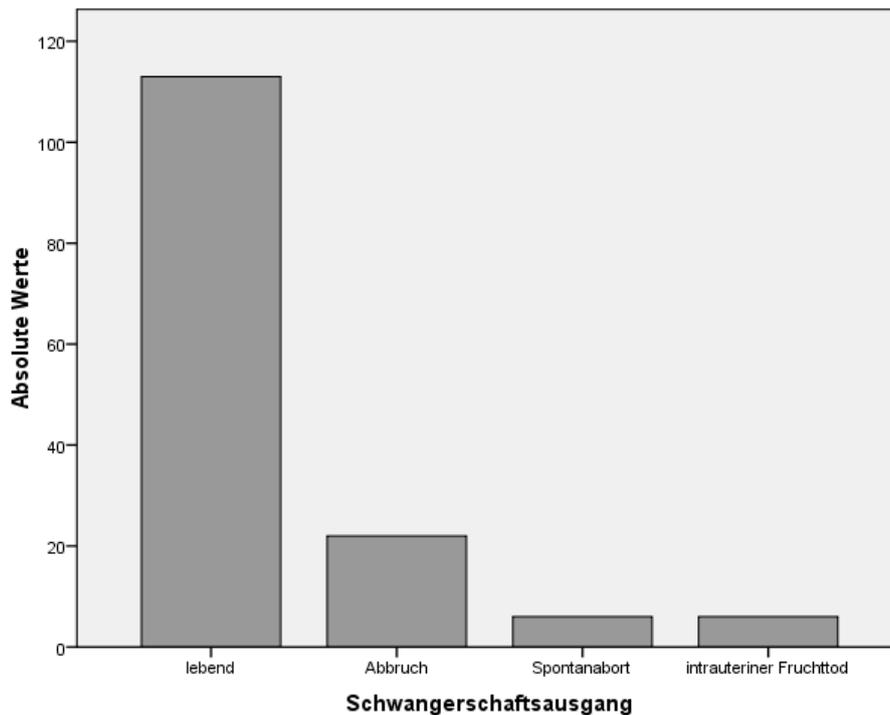


Abbildung 8: Schwangerschaftsausgang mit absoluten Werten bei unauffälligem und auffälligem Karyotyp

Wie in der folgenden Tabelle 4 zu sehen ist, setzen sich die 19 chromosomalen Anomalien aus 14 Trisomien (achtmal Trisomie 21, fünfmal Trisomie 18, einmal Trisomie 13), zwei Plazentamosaik und zwei Kindern mit einem Markerchromosom, sowie einem Feten mit einer balancierten Translokation zusammen.

	Häufigkeit	Prozent	Anzahl Lebendgeburten	Anzahl Schwangerschaftsabbrüche	Anzahl Aborte /IUFT	Fehlende Daten zum Ausgang
unauffälliger Karyotyp	163	89,56	110	8	11	34
auffälliger Karyotyp	19	10,44	3	14	1	1
balancierte Translokation	1	0,55	1	0	0	
Markerchromosom	2	1,09	1	1	0	
Mosaik	2	1,09	1	0	0	
Trisomie 13	1	0,55	0	0	1	
Trisomie 18	4	2,19	0	4	0	
Trisomie 21	8	4,37	0	8	0	
V. a. Trisomie 18, SGA	1	0,55	0	1	0	
Im System fehlend	1					
Gesamt	183	100	113	22	12	35

Tabelle 4: Chromosomale Verteilung der Feten mit Schwangerschaftsausgang

Es wurden die Schwangerschaften sowohl mit einer Trisomie 21 als auch mit einer Trisomie 18 abgebrochen. Die Schwangerschaft mit der Trisomie 13 endete mit einem intrauterinen Fruchttod. In den Fällen, bei denen ein Mosaik (Trisomie 15) und die balancierte Translokation auftraten, wurden die Kinder lebend geboren. Von den beiden Schwangerschaften mit Markerchromosom wurde die eine frühzeitig beendet und die andere ging mit einer Lebendgeburt aus.

3.1.6 Entbindungsalter

Das Gestationsalter aller 110 lebendgeborenen Kinder (insgesamt 183 Schwangerschaften, es fehlen aber in unseren Daten bei 36 Schwangerschaften Angaben zum Ausgang; von den 112 Lebendgeburten fehlen bei zweien Daten zum Gestationsalter; 23 Abbrüche, 6 Spontanaborte, 6 IUFT) bei Entbindung lag zwischen der 28,9. und 42,3. SSW. Der Mittelwert beträgt 39,1 (Standartabweichung $\sigma = 2,1$). Mit eingeschlossen in diese Auswertung sind nun auch die chromosomal auffälligen Kinder. In der 37.- 40. SSW wurden 52,2 % (59 Geburten) der Kinder geboren und 36,3 % (41 Kinder) nach der 40. SSW. Nur 8,8 % (10 Fälle) der Kinder kamen in der Zeit zwischen der 25. und 37. SSW zur Welt.

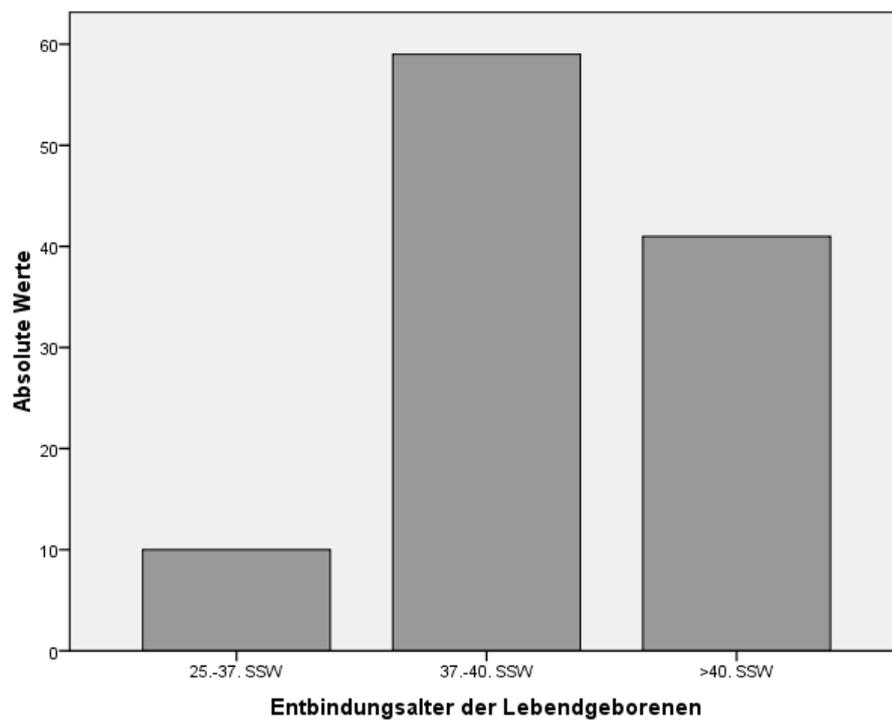


Abbildung 9: Entbindungsalter aller lebendgeborenen Kinder (chromosomal auffällig und unauffällig)

3.1.7 Geburtsgewicht der Lebendgeborenen

Das Geburtsgewicht der lebendgeborenen Kinder lag zwischen 1200 g und 4610 g (siehe Abb. 10). Im Mittel waren die Kinder 3369 g schwer (Standartabweichung $\sigma = 629$).

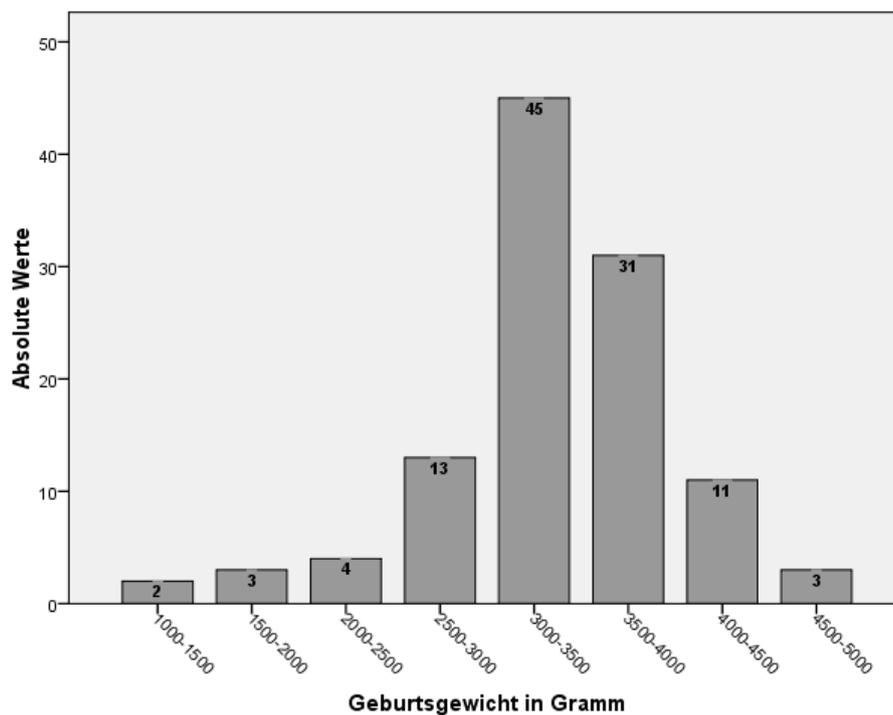


Abbildung 10: Geburtsgewicht der Lebendgeborenen

Mittels des Centile Calculator des Perinatal Institutes (UK) wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Geburtsgewichte der insgesamt 112 Lebendgeborenen dieser Studie untereinander die normierten Perzentile (customised centiles) (siehe auch in Abb. 11) errechnet. Bei sechs Neugeborenen fehlen Daten zur Errechnung der angeglichenen Perzentile, so dass nur 107 Kinder in die weiteren Berechnungen mit eingehen können.

Es ergab sich ein Mittelwert aller normierten Perzentile von 51,4 mit einer Standardabweichung von $\sigma = 31,54$. Wie in der folgenden Abbildung 11 deutlich wird, sind die angeglichenen Perzentile nicht normal verteilt. Es zeigt sich sogar, dass etliche Kinder auch in die niedrigen und sehr hohen Perzentilen eingeteilt sind.

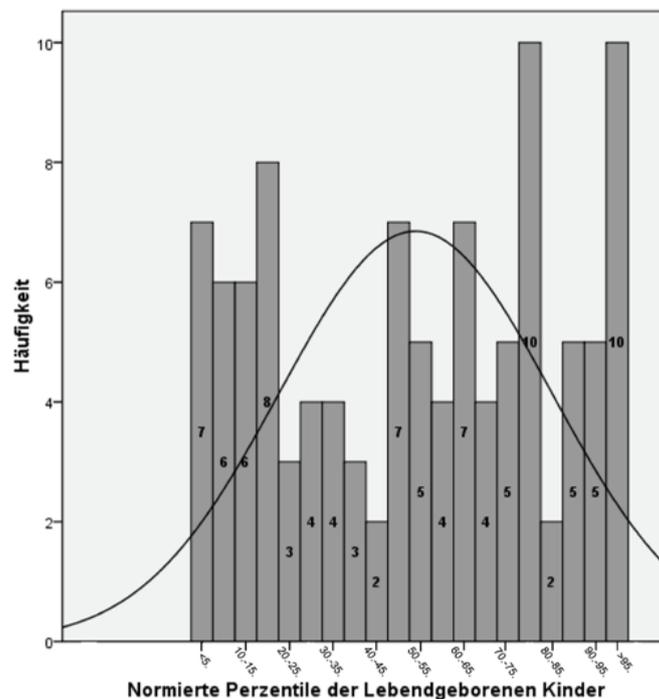


Abbildung 11: Normierte Perzentile der lebendgeborenen Kinder mit Gaußscher Normalverteilungskurve

Unterhalb der fünften Perzentile liegen sieben der Neugeborenen (6,2 %). Unter der 10. normierten Perzentile befinden sich insgesamt 13 Kinder, so dass, wenn man als Grenze für die Wachstumsretardierung die 10. Perzentile wählt, 12,1 % der Neugeborenen des Kollektivs als hypotroph bezeichnet werden müssen. Legt man für die Grenze zur Hypertrophie die 90. Perzentile fest, so müssen 15 Kinder, also 14 % in diese Kategorie einsortiert werden. Oberhalb der 95. Perzentile liegen 10 (9,3 %) der Lebendgeborenen.

3.2 Präsentation der immunhistochemischen c-Met-Färbung

3.2.1 C-Met-Antikörperfärbung der Chorionzotten

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mittels eines c-Met-Primärantikörpers. Ausnahmslos nahmen alle Gewebeproben die bräunliche Färbung an, welche allerdings unterschiedlich stark ausgeprägt war. Einige Präparate enthielten eine starke immunhistochemische Reaktion, bei anderen Gewebeschnitten war der bräunliche Farbton so schwach, dass er nur in der computergestützten Auswertung zu erkennen war.

In den Negativ-Kontrollen, die zu jedem Präparat angefertigt wurden, zeigten sich keine immunhistochemischen Reaktionen.

Auffällig ist eine stärkere Reaktion vor allem in der Trophoblastenschicht, wobei sich der Zytotrophoblast in einigen Proben durch seine intensive Färbung absetzt. In wenigen anderen Präparaten prägt sich die Reaktion vermehrt im Synzytotrophoblasten aus.

Im Stroma ist die Braunfärbung in den Zellkernen stärker sichtbar, als in der Interzellularsubstanz. Allerdings stellt sich die Ausprägung im gesamten Stromaanteil deutlich geringer als im Trophoblasten dar.

Im Folgenden werden repräsentative Chorionzotten unterschiedlicher Färbeintensität gezeigt und erläutert. Als Beispiel wurden hier die großen ausgewählten Zotten (siehe Abb. 12-15) verwendet.

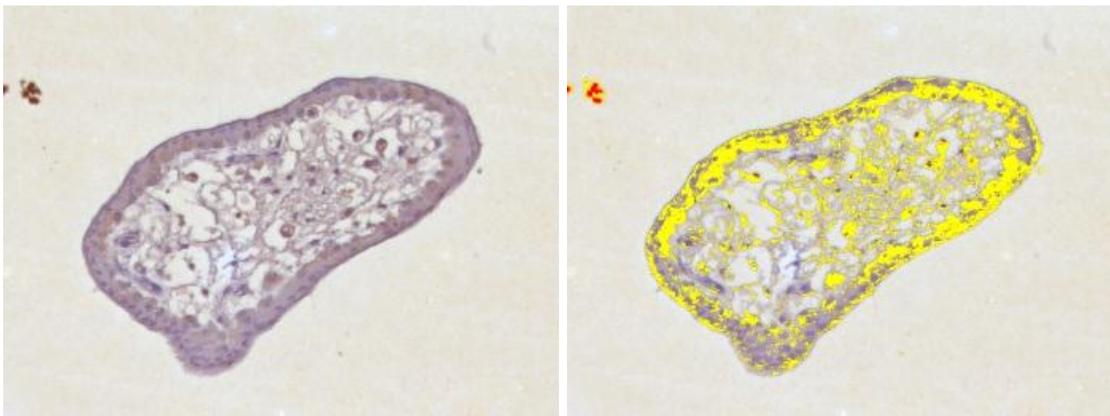


Abbildung 12: Präparat Nr. B0602gr, c-Met, links ohne Maske, rechts mit Maske

Das Präparat Nr. B0602gr präsentiert eine insgesamt sehr geringe immunhistochemische Reaktion auf den c-Met-Antikörper. Mit der bläulich violetten Färbung wird die Hämatoxylinfärbung sichtbar.

Der Zytotrophoblast und das Zellplasma des SZTB sind zu einem höheren Anteil schwach gefärbt, als die Kerne des Synzytotrophoblasten, die nur ganz vereinzelt eine schwache Anfärbung aufweisen.

In der Bildanalyse zeigte sich, dass sich die gesamte Zotte zu 26,31 %, der ZTB zu 58,83 % und der SZTB zu 38,00 % durch den Farbstoff markieren lässt. Als schwach erkannt wurden 37,80 % vom SZTB und 58,74 % vom ZTB.



Abbildung 13: Präparat Nr. 04.04gr, c-Met, links ohne Maske, rechts mit Maske

Das Präparat Nr.04.04gr (Abb. 13) weist eine schwache bis mittelstarke Anfärbbarkeit auf.

Bei dem konventionellen Score wurden diese Gewebeschnitt aufgrund der höheren Farbintensität in die Kategorie 2 (mittelstark gefärbt) einsortiert.

Im Bildanalyse-Score wurden 77,59 % des Zottenanschnittes als gefärbter Anteil ermittelt. Davon waren 66,20 % schwach und 33,79 % mittelstark gefärbt. Vorzugsweise wurde der ZTB mit 69,80 % als mittelstark gefärbt und der SZTB mit 95,08 % als schwach gefärbt klassifiziert.

In diesem Präparat ist die Betonung des ZTB auffällig. Teilweise werden aber auch die Zellen des Zottenstromas zu einem geringen Anteil mittelstark angefärbt.

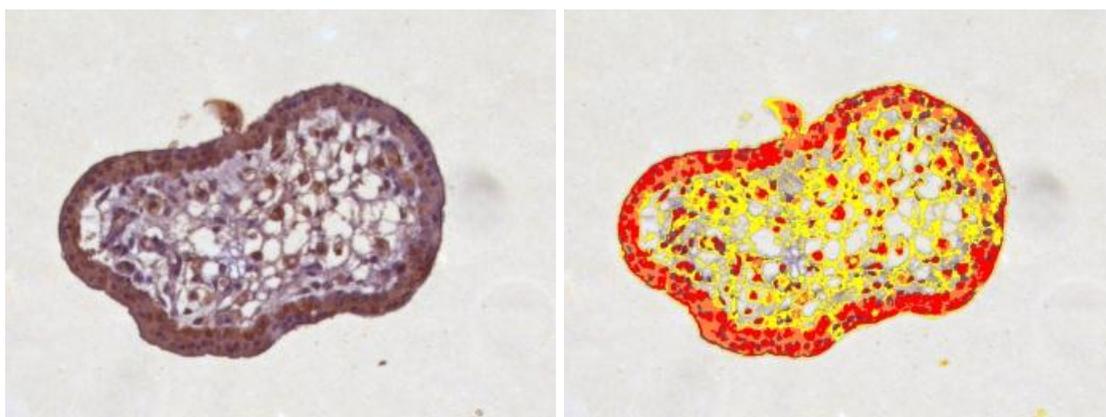


Abbildung 14: Präparat Nr. 205.01gr, c-Met, links ohne Maske, rechts mit Maske

Im Präparat Nr.205.01gr (Abb. 14) fallen die starke Intensität der Stromazellen und der Kerne des Trophoblasten auf. Daneben sind das Zellplasma des ZTB

und SZTB meist mittelstark und das des Stromas zum höheren Anteil schwach verfärbt.

Insgesamt reagieren 55,07 % des Gewebes immunhistochemisch. Der Trophoblast ist zu 46,61 % stark und zu 38,05 % mittelstark gefärbt.

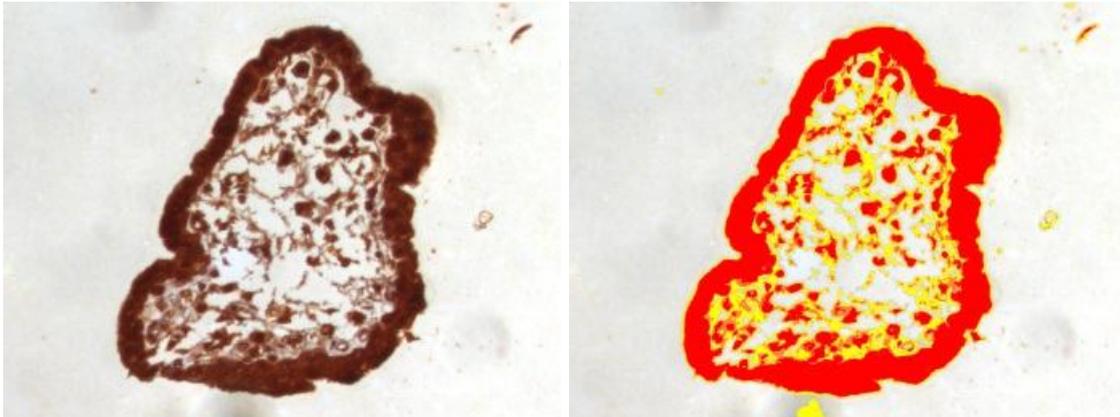


Abbildung 15: Präparat Nr. 197.02gr, c-Met, links ohne Maske, rechts mit Maske

Der gesamte Trophoblastenanteil des Präparates Nr.197.02gr (Abb. 15) präsentiert sich zu 92,39 % als stark gefärbt. Die Färbung des Stroma setzt sich aus einem 26,39 % stark, einem 29,34 % mittelstark und einem 44,27 % schwach gefärbten Anteil zusammen.

Auch im konventionellen Score findet sich eine eindeutige Sortierung in die dritte Kategorie („stark gefärbt“).

3.2.2 Vergleich von Bildanalyse und konventionellem Färbescore

In den Bildanalyse-Scores (siehe Abb. 16) zeigt sich, dass sich die großen und kleinen Zotten von der Intensität her gleichermaßen anfärben. Im Mittel erhielten die großen Zotten eine Punktwert von 96,22 und die kleinen Zotten 112,82 Punkte. Das Minimum der großen Zotten lag bei 10,95 und bei den kleinen Zotten bei 25,91. Maximal konnte eine Färbeintensität von 216,04 (großen Zotten) und 257,47 (kleine Zotten) gemessen werden (Standartabweichung $\sigma = 36,88$ (große Zotte), $\sigma = 42,49$ (kleine Zotte)). Auffallend ist die stärkere Färbung des Trophoblasten gegenüber dem Stroma. Der Synzytotrophoblast und der Zytotrophoblast zeigen eine ähnliche Farbintensität.

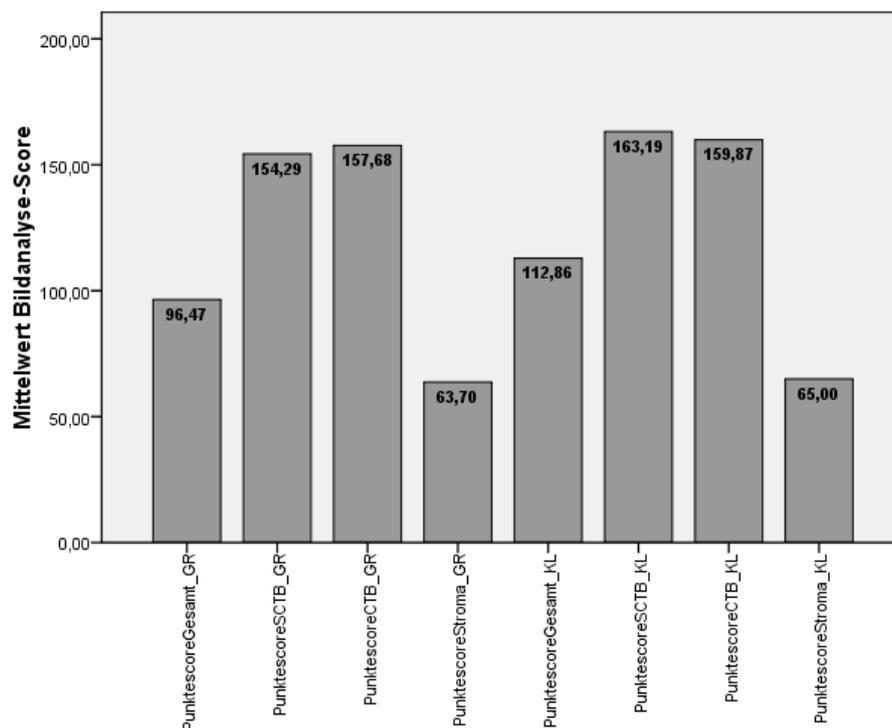


Abbildung 16: Mittelwerte des Bildanalyse-Scores für die Zottengesamtfläche und die drei unterschiedlichen Kompartimente der großen und kleinen Zotten (GR = große Zotte, KL = kleine Zotten, SCTB = Synzytotrophoblast, CTB = Zytotrophoblast)

Die folgende Abbildung 17 zeigt die Mittelwerte des konventionellen Scores für die gesamte Zotte und die einzelnen Kompartimente der großen und kleinen Zotten. Hier ist der Synzytotrophoblast schwächer eingestuft worden, als das Stroma und besonders als der Zytotrophoblast, der am stärksten c-Met zu exprimieren scheint.

Der Gesamtfärbindruck beläuft sich um den Mittelwert 1,53

(Standartabweichung: $\sigma = 0,66$) bei den großen Zotten und bei den kleinen um den Mittelwert 1,58 (Standartabweichung $\sigma = 0,70$).

Da es sich bei dem konventionellen Score um einen ordinal skalierten Score mit vier möglichen Kategorien (nicht, schwach, mittelstark und stark gefärbt) handelt, werden im Folgenden die Prozente der einzelnen Ausprägungen für die Gesamtfläche aufgeführt.

Die großen Zotten wurden in 56,4 % der Fälle als „schwach“, in 34,4 % als „mittelstark“ und in 9,3 % als „stark gefärbt“ bewertet. 54,1 % der kleinen Zotten zählten zu der Ausprägung „schwach gefärbt“, 33,5 % kamen in die Kategorie

„mittelstark gefärbt“ und 12,4 % der kleinen Zotten wurden von den Untersuchern als „stark markiert“ eingestuft.

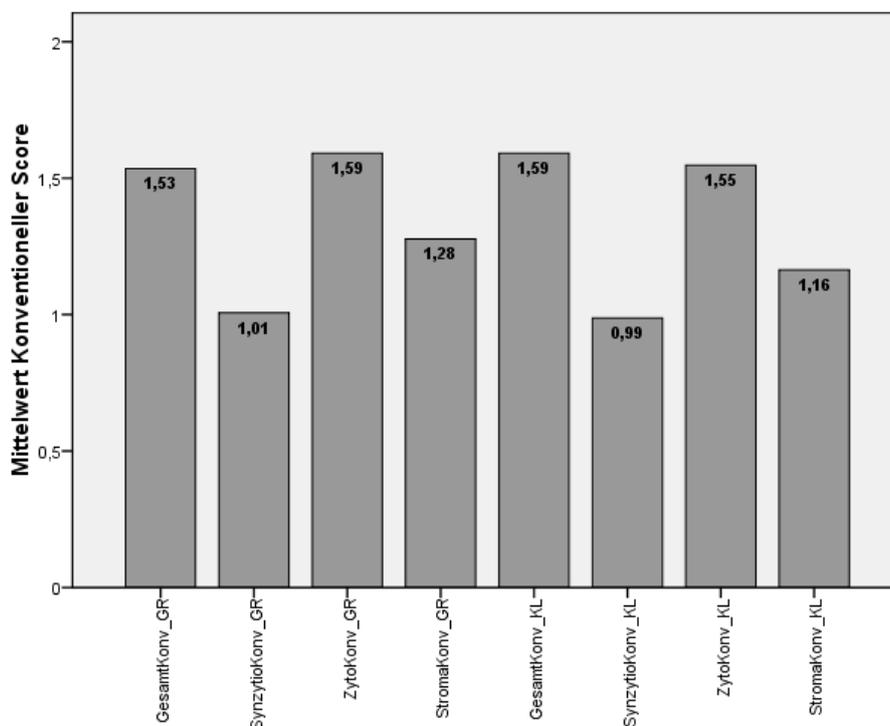


Abbildung 17: Mittelwerte des konventionellen Scores für die Zottengesamtfläche und die drei unterschiedlichen Kompartimente der großen und kleinen Zotten (GR = große Z., KL = kleine Z., GesamtKonv = Gesamte Z., SynzytioKonv = Synzytotrophoblast, ZytoKonv = Zytotrophoblast, StromakKonv = Stroma)

Aus dem konventionellen Färbescore und der computerstützte Bildanalyse konnten somit vergleichbare Ergebnisse ermittelt werden.

Um nun beurteilen zu können, ob der Bildanalyse-Score vergleichbar mit der Einteilung der Chorionzotten in die vier Kategorien ist, werden im Kruskal-Wallis-Test die vier Kategorien des konventionellen Scores den Scores der Bildanalyse gegenübergestellt. Der Test erbringt in allen Vergleichen durch einen p-Wert von 0,000 den Beweis, dass die Zuordnungen der Untersucher in die vier Kategorien einem entsprechend hohen oder niedrigen Bildanalyse-Score entsprechen.

Wie in den folgenden Abbildungen der Boxplots für die großen (Abb.18) und kleinen Zotten (Abb.19) zu sehen ist, liefern der Bildanalyse-Score und der konventionelle Score für beide Zottengrößen vergleichbare Ergebnisse. Einzelne Ausreißer sind zwar dargestellt, aber die Quartile der vier

unterschiedlichen Kategorien überschneiden sich zu keinem Zeitpunkt, so dass von einer beinahe übereinstimmenden Einteilung der Untersucher in die vier Gruppen der Färbeintensität wie im Bildanalyse-Score ausgegangen werden kann.

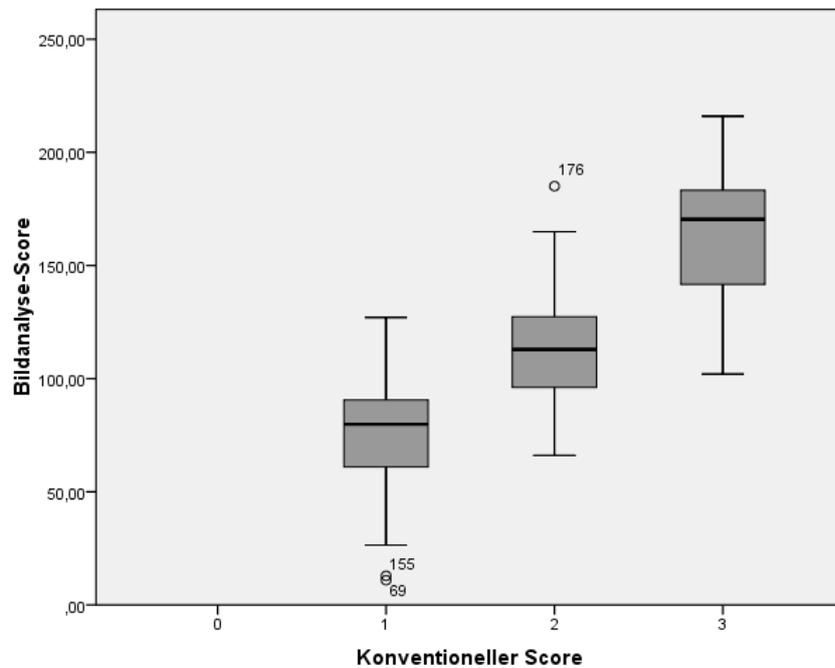


Abbildung 18: Zuordnung von Bildanalyse-Score in Bezug zu den Kategorien des konventionellen Scores der großen Zotten

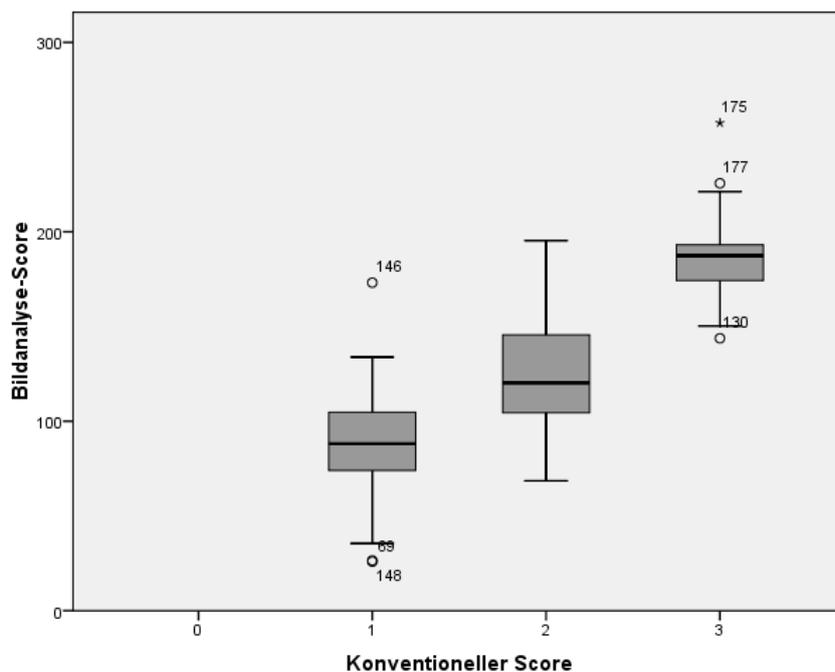


Abbildung 19: Zuordnung von Bildanalyse-Score in Bezug zu den Kategorien des konventionellen Scores der kleinen Zotten

3.3 Korrelation der Färbeintensität mit dem Schwangerschaftsoutcome

Bevor die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit den Daten von Mutter bzw. Kind korreliert werden konnten, musste eine Abhängigkeit der Färbeintensitäten vom Gestationsalter bei der CVS ausgeschlossen werden, da nicht alle Chorionzottenbiopsien zum gleichen Schwangerschaftszeitpunkt vorgenommen worden waren. Bei einer Abhängigkeit wäre eine Vergleichbarkeit nicht mehr gegeben gewesen. Weder im Bildanalyse-Score noch im konventionellen Score wurden Signifikanzen festgestellt (siehe Abb. 20 und 21), trotz der scheinbar minimal höheren c-Met-Expression in den CVS nach der 14. SSW.

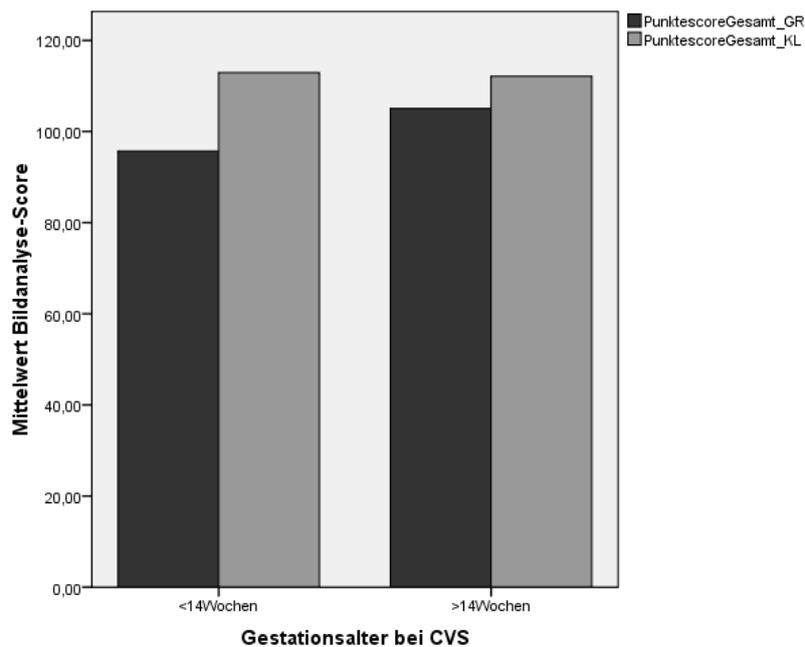


Abbildung 20: Mittelwerte des Bildanalyse-Score für das Gestationsalter zum Zeitpunkt der CVS der gesamten Zottenfläche der großen (GR) und kleinen Zotten (KL)

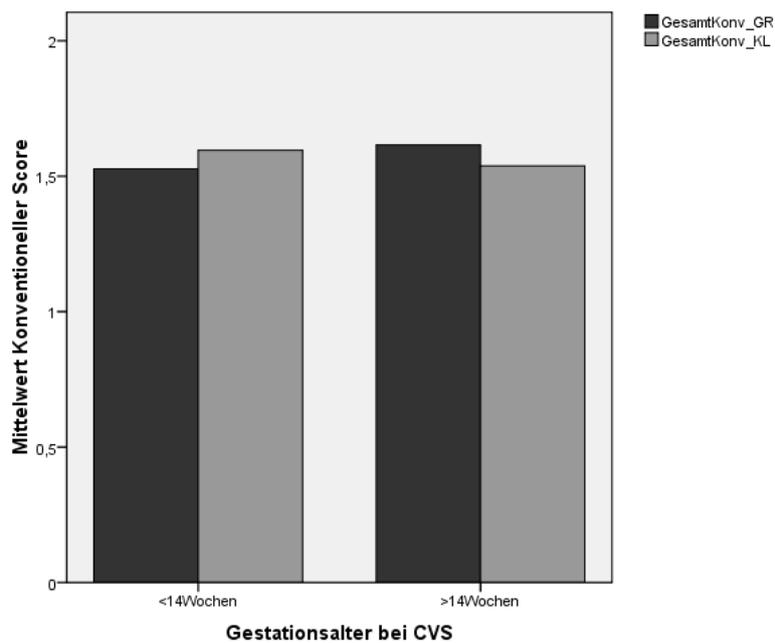


Abbildung 21: Mittelwerte des Konventionellen Scores für das Gestationsalter zum Zeitpunkt der CVS der gesamten Zottenfläche der großen (GR) und kleinen Zotten (KL)

Um eine weitere Bias (Verzerrung der Resultate) zu verhindern, wurde ebenso das Kollektiv in die beiden Geschlechter unterteilt und untersucht, ob eine Abhängigkeit besteht. Auf Grund einer signifikanten Korrelation im Bildanalysescore im Bereich des Zytotrophoblasten der kleinen Zotten und um nun eine Verzerrung der Arbeitsergebnisse durch Geschlechtsunterschiede auszuschließen, wurde im Falle signifikanter Ergebnisse der übrigen Untersuchungen die Geschlechter getrennt berechnet. Die anderen Kompartimente zeigten weder im Bildanalyse- (vergleiche Mittelwerte der gesamten Zottenfläche in Abb.22) noch im konventionellen Score (Abb. 23) geschlechtlichen Unterschiede.

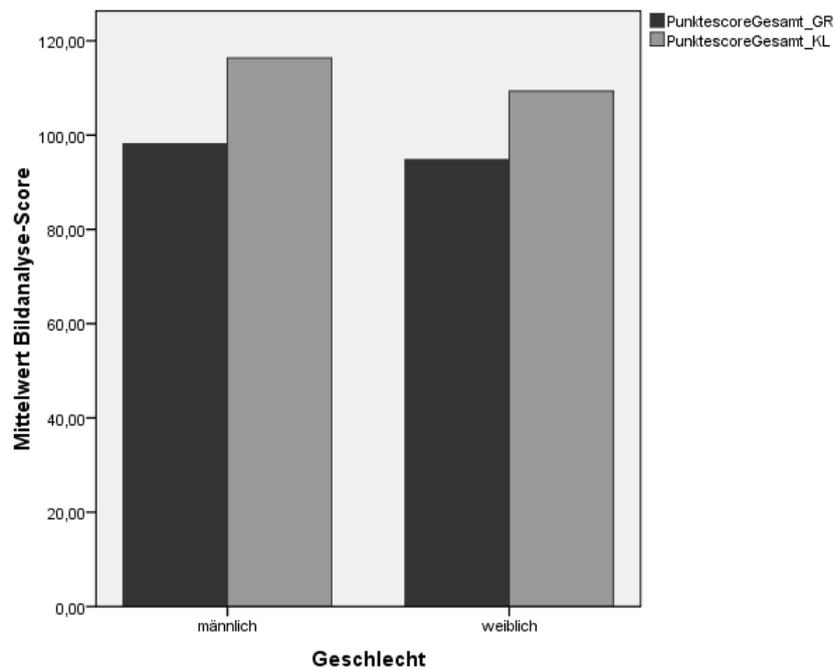


Abbildung 22: Mittelwerte des Bildanalyse-Score für das Geschlecht in der gesamten Zottenfläche der großen (GR) und kleinen Zotten (KL).

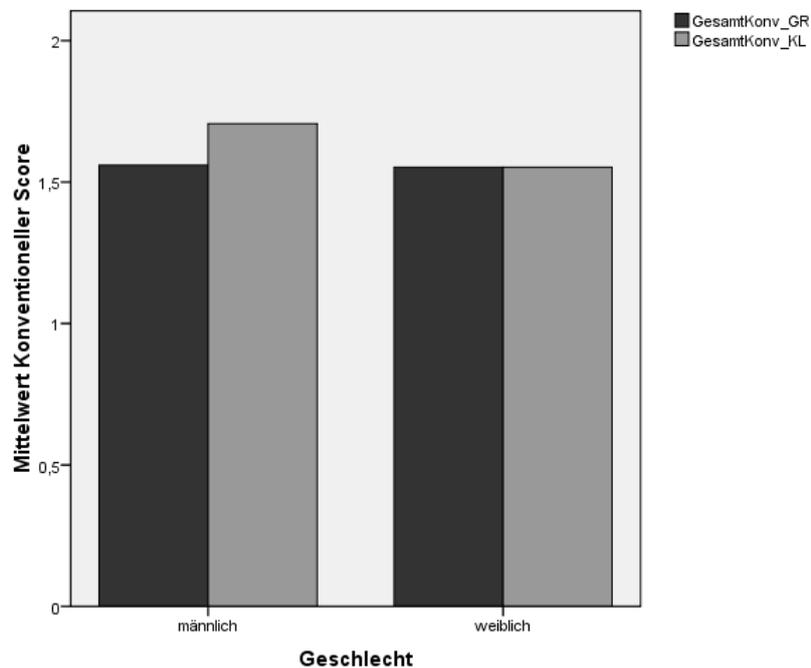


Abbildung 23: Mittelwerte des konventionellen Score für das Geschlecht in der gesamten Zottenfläche der großen (GR) und kleinen (KL) Zotten.

Desweiteren wurde die Beeinflussung der Resultate durch die vorliegenden karyotypischen Unterschiede der Feten unserer Studie untersucht. Wir fanden im Bildanalyse sowie im konventionellen Score signifikante Unterschiede im

Färbeverhalten, so dass wir für die relevanten Korrelationen nur die Schwangerschaften mit karyotypisch unauffälligen Feten in unseren Berechnungen berücksichtigten (vergleiche Kapitel 3.3.6).

3.3.1 Gestationsalter bei CVS

Um die c-Met-Expressionsstärke im Hinblick auf das Gestationsalter zum Zeitpunkt der Chorionzottenbiopsie zu prüfen, wurden die Entnahmen vor und nach der 14. SSW miteinander verglichen. Es konnten, wie bereits erwähnt, in den konventionellen sowie in den computergestützten Bildanalyse-Scores mittels des Mann-Whitney-Test keine signifikanten Unterschiede beider Zottengrößen festgestellt werden (PunktescoreGesamt_GR: $p=0,235$; PunktescoreSCTB_GR: $p=0,558$; PunktescoreCTB_GR: $p=0,804$; PunktescoreStroma_GR: $p=0,160$; PunktescoreGesamt_KL: $p=0,705$; PunktescoreSCTB_KL: $p=0,585$; PunktescoreCTB_KL: $p=0,883$; PunktescoreStroma_KL: $p=0,130$; GesamtKonv_GR: $p=0,188$; SynzytioKonv_GR: $p=0,994$; ZytoKonv_GR: $p=0,306$; StromaKonv_GR: $p=0,074$; GesamtKonv_KL: $p=1,000$; SynzytioKonv_KL: $p=0,921$; ZytoKonv_KL: $p=1,000$; StromaKonv_KL: $p=0,243$).

3.3.2 Entbindungsalter

Betrachtet man in der folgenden Abbildung (Abb. 24) die Mittelwerte der Bildanalyse-Scores der vier Gruppen des Entbindungsalters aller Schwangerschaftsausgänge (<25. SSW, 25.- 37. SSW, 37.- 40. SSW, >40. SSW), so fällt auf, dass ein frühes Entbindungsalter mit einer stärkeren Intensität korreliert.

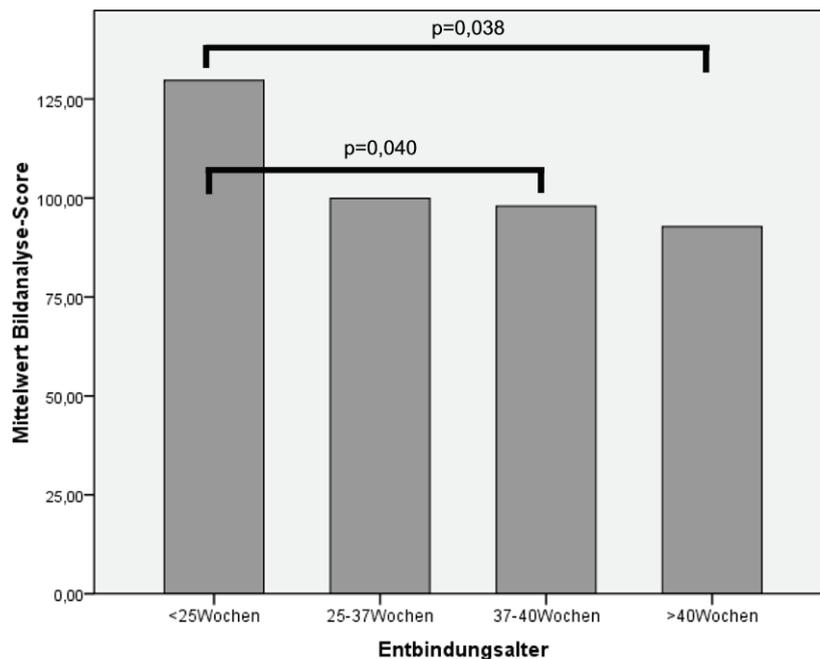


Abbildung 24: Entbindungsalter im Bildanalyse-Score für die Gesamtfläche der großen Zotten

Wie in Abbildung 24 zu sehen, zeigen sich signifikante Ergebnisse im Mann-Whitney-Test bei den Bildanalyse-Scores der großen Zotten im Vergleich der Färbeintensität der gesamten Zottenfläche bei einem Entbindungsalter unter der 25. SSW (Fallzahl: 7) und über der 40. SSW ($p = 0,038$) sowie zwischen den Gruppen < 25. SSW und 37.- 40. SSW ($p = 0,04$), jedoch nicht beim Vergleich der Gruppe < 37. SSW (Frühgeborene) und > 37. SSW (termingerecht Geborene).

Die übrigen Berechnungen der Bildanalyse-Scores sowie auch der konventionellen Scores ergaben keine Signifikanzen im Färbeverhalten zwischen den einzelnen Gruppen des Entbindungsalters.

Um beurteilen zu können, ob die Analyse der unterschiedlichen c-Met-Expression als Methode zur Ermittlung eines möglichen Risikos zur Frühgeburtlichkeit geeignet ist, wurde zur Qualifizierung als diagnostischen Test sogenannte ROC-Analysen (Receiver Operating Characteristics) durchgeführt. Anhand einer ROC-Kurve kann die AUC („area under the curve“) berechnet werden, welche ein Gütezeichen zur Beurteilung des zu untersuchenden Testverfahren darstellt. Mögliche Werte liegen dabei zwischen 0 und 1, wobei 1 dabei dem idealen Test entspricht. Verläuft die ROC-Kurve entlang der

Winkelhalbierenden, entspricht das einer AUC von 0,5 und der Test ist nicht verwertbar.

Im Rahmen des Bildanalyse-Scores der großen gesamten Zottenfläche ergeben sich folgende Ergebnisse:

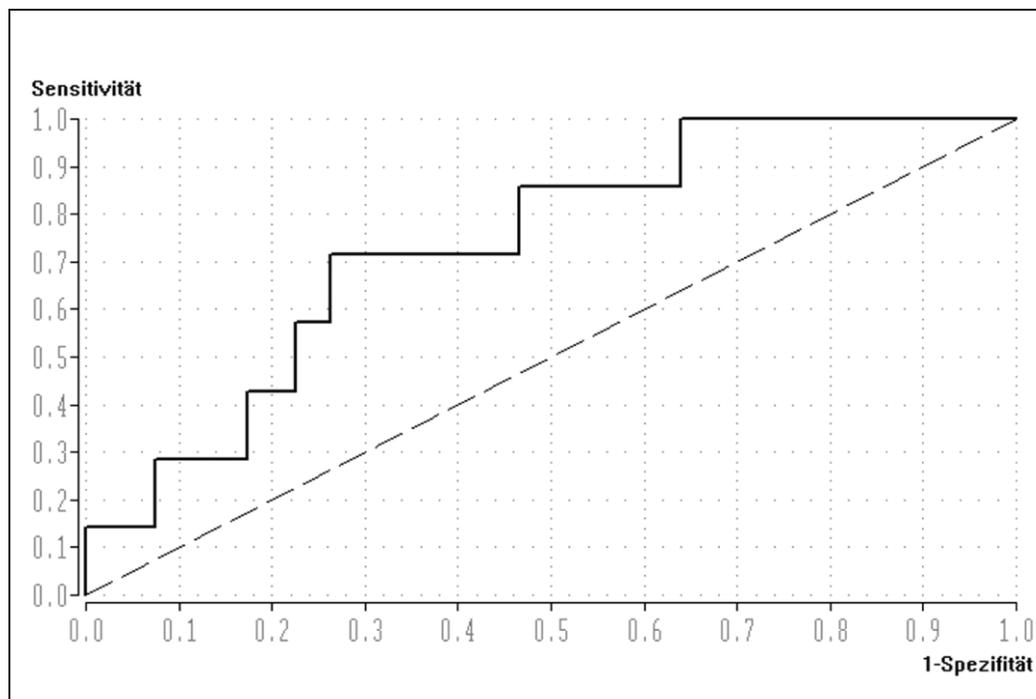


Abbildung 25: ROC-Kurve für das Entbindungsalter (<25. SSW versus >25. SSW) in Bezug auf den Bildanalyse-Score der Gesamtfläche der großen Zotten

Die AUC misst eine Größe von 0,737. Der optimale Trennpunkt (univariate Diskriminanzanalyse) wurde bei 112,85 errechnet.

Trennpunkt: 112,85		Testergebnis		Gesamt
		richtig	falsch	
<25. SSW	n	5	2	7
	%	71,43	28,57	100,0
>25. SSW	n	96	37	133
	%	72,18	27,82	100,0
Gesamt	n	101	39	140
	%	72,14	27,86	100,0

Tabelle 5: Kreuztabelle für Entbindungsalter und Bildanalyse-Score (Zuordnung zur Gruppe der <25.SSW-geborenen Kinder)

Aus der Tabelle 5 ergeben sich folgende Werte:

Spezifität: 72,18%

Sensitivität: 71,43%

Positive Likelihood Ratio: 2,57

Negative Likelihood Ratio: 0,40

Relatives Risiko: 5,83

Das bedeutet, dass ab einem Wert von über 112,85 im Bildanalyse-Score das relative Risiko für eine Frühgeburt 5,8fach erhöht ist (siehe Abb.26).

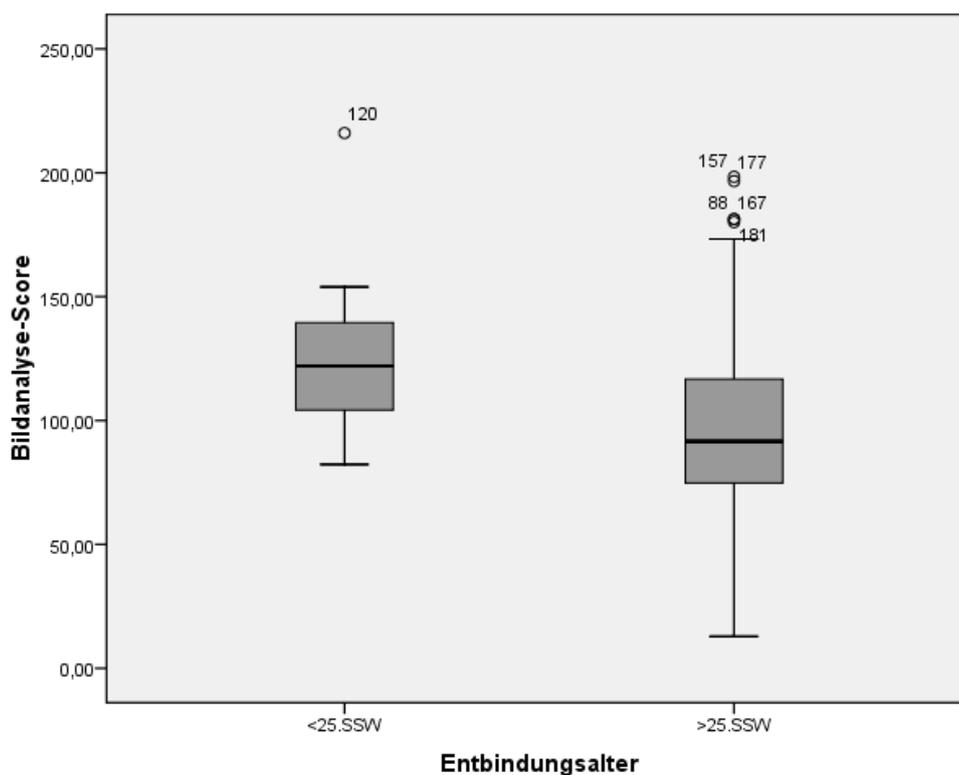


Abbildung 26: Boxplot für das Entbindungsalter der Gruppen <25. SSW und >25.SSW in Bezug auf den Bildanalyse-Score der großen Zotten (gesamte Zottenfläche) $p=0,035$

Wenn man nun das Entbindungsalter ausschließlich der lebendgeborenen Kinder betrachtet ergeben sich bei dem Vergleich der drei Gruppen 25.- 37. SSW, 37.- 40. SSW und >40. SSW in den Bildanalyse-Scores und konventionellen Scores mittels des Mann-Whitney-Test keine signifikanten Unterschiede.

3.3.3 Geburtsgewicht

Im Rahmen der Berechnungen des Geburtsgewichtes, also der Perzentile (siehe Kapitel 2.2) schlossen wir nur die Lebendgeborenen mit ein, da uns der Vergleich des Gewichtes zwischen einem Abort beziehungsweise einem totgeborenen Kind und einem lebensfähigen Kind nicht sinnvoll erschien, zumal die unterschiedlichsten Gründe für den negativen Schwangerschaftsausgang in Betracht zu ziehen sind.

In den Abbildungen 27 und 28 werden die Unterschiede der Mittelwerte des konventionellen Scores für lebendgeborene Kinder mit normwertigen Gewicht (5.- 95. angegliche Perzentile) und für hypotrophe (<5. angegliche Perzentile) sowie hypertrophe (>95. angegliche Perzentile) lebendgeborene Kinder dargestellt. Für die Berechnung wurden die Kinder mit unauffälligem Karyotyp ausgewählt.

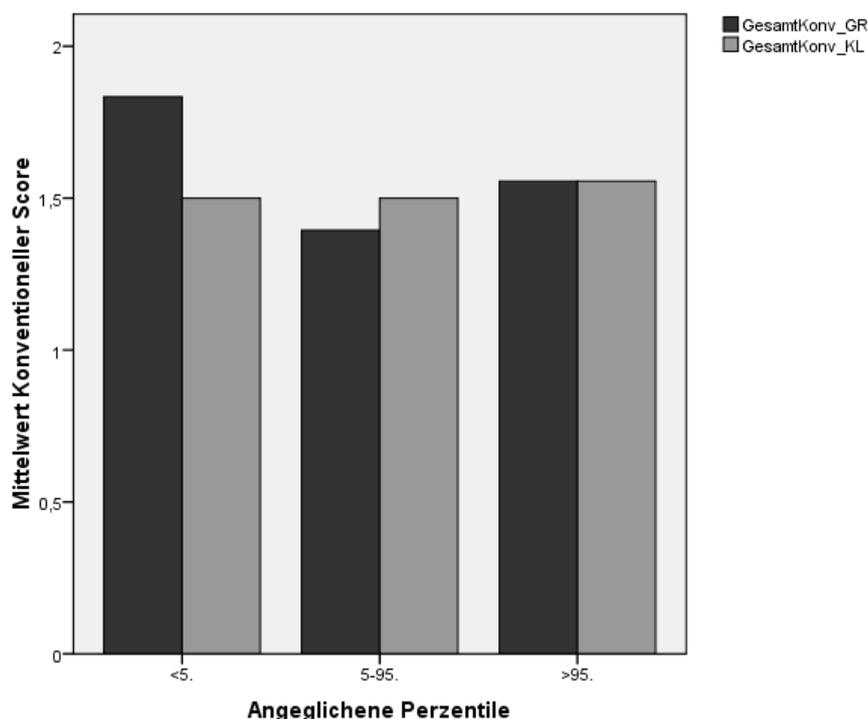


Abbildung 27: Konventioneller Score der gesamten Fläche der großen und kleinen Zotten für lebendgeborene Kinder mit angeglichenen Perzentilen

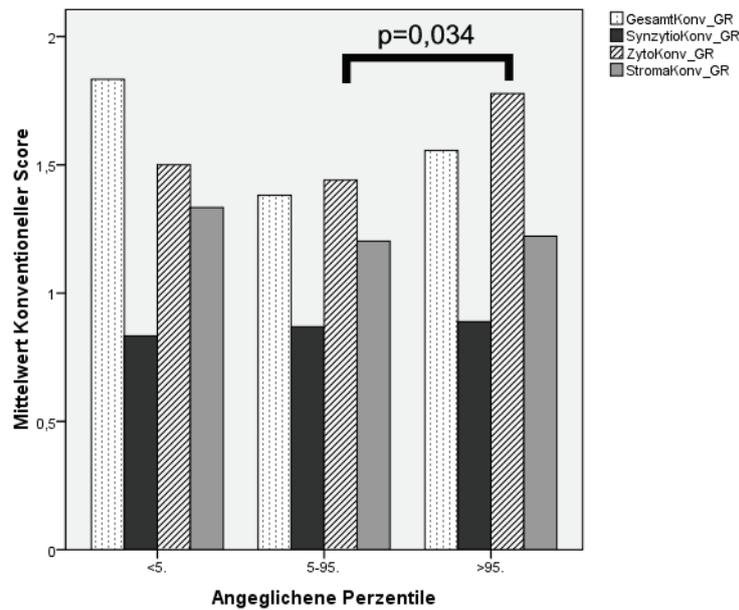


Abbildung 28: Konventioneller Score der großen Zotten mit Aufteilung in die einzelnen Kompartimente für lebendgeborene Kinder mit angeglichenen Perzentilen

Im Mann-Whitney-Test des konventionellen Scores zeigen sich signifikante Unterschiede. Hierbei wurden die großen Zotten bei Kindern unter der 5. Perzentile und über der 95. Perzentile stärker angefärbt als bei Kindern mit einem normwertigen Gewicht (5.- 95. angegliche Perzentile). Als signifikant erwies sich hierbei der Unterschied zwischen der 5.- 95. Perzentile und >95. Perzentile im Zytotrophoblasten der großen Zotten mit einem p-Wert von 0,034. Auch hier wurde eine ROC-Analyse durchgeführt (Abb. 29).

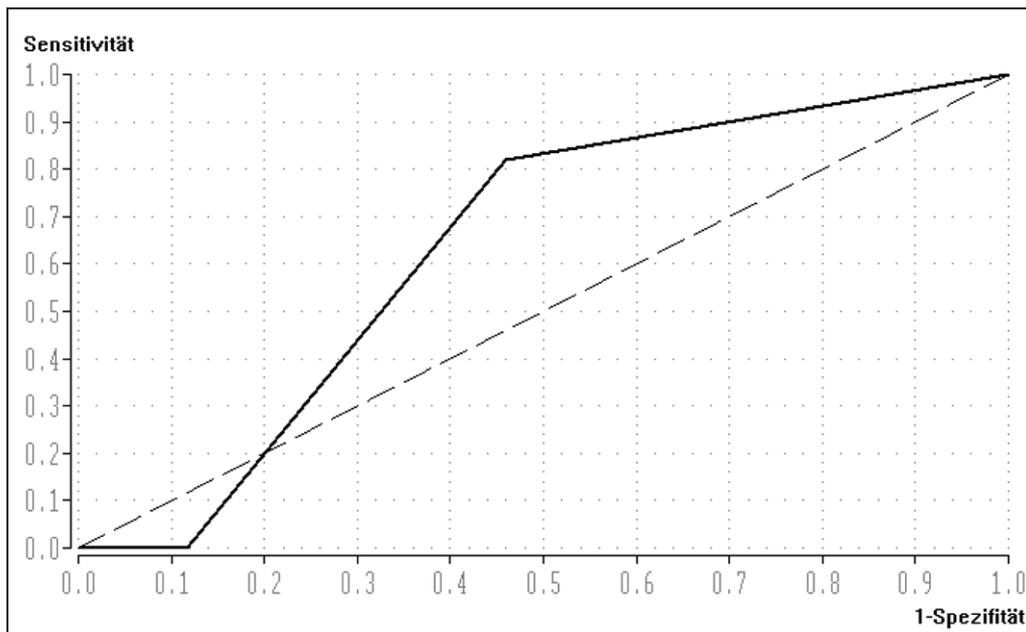


Abbildung 29: ROC-Kurve für die angeglichenen Perzentile (5.-95. versus >95. Perzentile) in Bezug auf den Konventionellen Score des CTB (gr. Zotten)

Das Integral unter der Winkelhalbierenden misst 0,631. Der Trennpunkt (univariate Diskriminanzanalyse) befindet sich bei 2,67.

Trennpunkt: 2,67		Testergebnis		Gesamt
		richtig	falsch	
5.-95.	n	13	98	111
	%	11,7	88,3	100,0
>95.	n	11	0	11
	%	100	0,0	100,0
Gesamt	n	24	98	122
	%	19,7	80,3	100,0

Tabelle 6: Kreuztabelle für die angeglichenen Perzentile und Konventionellen Score (Zuordnung zur Gruppe der Kinder >95. Perzentile) des CTB (gr. Zotten)

Aus der Tabelle 6 ergeben sich folgende Werte:

Sensitivität: 100,00%

Spezifität: 11,71 %

Positiver Likelihood-Quotient: 1,13

Negativer Likelihood-Quotient: 0,00

Relatives Risiko: 2,93

Mit diesen Ergebnissen ist das relative Risiko für eine Schwangere mit der Kategorie „stark gefärbt (Trennpunkt von 2,67) im konventionellen Score, ein hypertrophes Kind zu bekommen, fast dreifach erhöht.

In den anderen Kompartimenten wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Bei den kleinen Zotten der hypertrophen Kinder sind diese stärker markiert als bei den normotrophen und hypotrophen Kindern.

In den Bildanalyse-Scores sind keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen, obwohl sich in Abbildung 30 ebenfalls die Tendenz wie im konventionellen Score sowohl bei den großen (hypotroph/hypertroph > normotroph), als auch bei den kleinen Zotten (hypertroph > hypotroph/normotroph) abzeichnet.

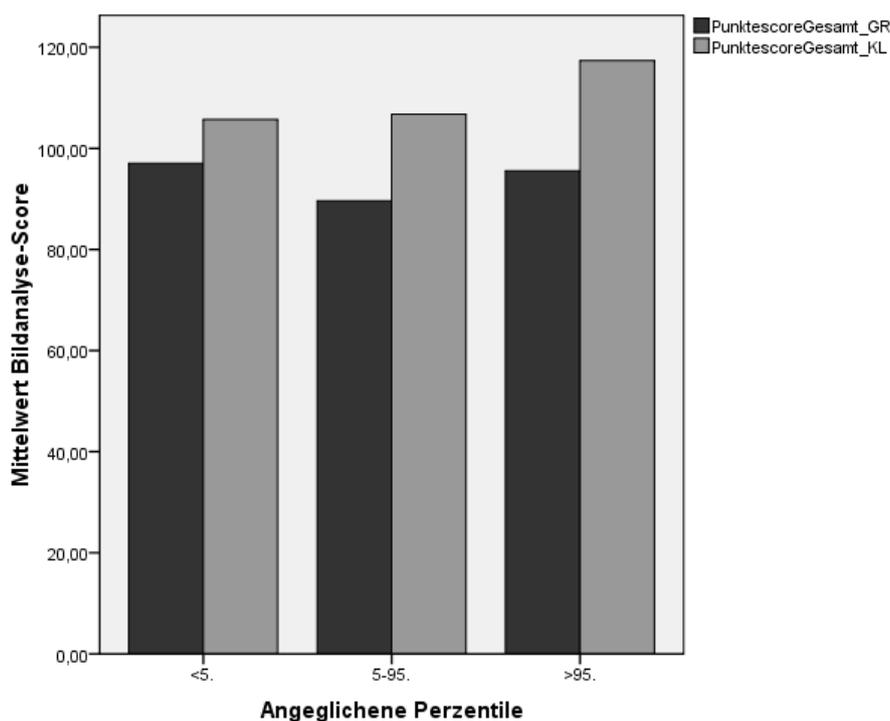


Abbildung 30: Bildanalyse-Score für lebendgeborene Kinder mit <5., 5.- 95. und >95. angeglichenen Perzentilen der gesamten Fläche der großen und kleinen Zotten.

3.3.4 Geschlecht

Im Rahmen der Untersuchung der Geschlechter im Hinblick auf die Färbeintensität fanden sich in den Bildanalyse-Scores bis auf die Unterschiede im Zytotrophoblasten der kleinen Zotten (PunktescoreCTB_KL: $p=0,025$) im Mann-Whitney-Test (mit unauffälligem Karyotyp) keine weiteren signifikanten Differenzen (PunktescoreGesamt_GR: $p=0,987$; PunktescoreSCTB_GR: $p=0,486$; PunktescoreCTB_GR: $p=0,914$; PunktescoreStroma_GR: $p=0,840$; PunktescoreGesamt_KL: $p=0,361$; PunktescoreSCTB_KL: $p=0,913$; PunktescoreStroma_KL: $p=0,199$). Auf Grund dieser Korrelation und um eine Verzerrung der Arbeitsergebnisse durch Geschlechtsunterschiede auszuschließen wurden im Falle eines signifikanten Ergebnisses der übrigen Untersuchungen die Geschlechter getrennt berechnet.

Wie im Balkendiagramm (Abb. 23) der Mittelwerte des konventionellen Scores zu sehen ist, exprimieren die kleinen Zotten der männlichen Feten geringfügig mehr c-Met, doch auch hier zeigt sich kein signifikantes Ergebnis (GesamtKonv_GR: $p=1,000$; SynzytioKonv_GR: $p=0,334$; ZytoKonv_GR: $p=0,294$; StromaKonv_GR: $p=0,230$; GesamtKonv_KL: $p=0,293$; SynzytioKonv_KL: $p=0,661$; ZytoKonv_KL: $p=0,093$; StromaKonv_KL: $p=0,274$).

3.3.5 Ausgang der Schwangerschaft

Für die Untersuchung des Schwangerschaftsausganges erschien es uns sinnvoll die Gruppe der Lebendgeborenen mit den Schwangerschaften zu vergleichen, bei denen es ungewollt zu einer vorzeitigen Beendigung der Schwangerschaft und somit zu keiner Lebendgeburt gekommen ist. Somit stellten wir den Lebendgeborenen die Gruppe der Spontanaborte und der intrauterinen Fruchttode gegenüber. Auf Grund der sehr geringen Fallzahl wurden beide letzteren zusammengefasst.

Da die Schwangerschaften, bei denen ein freiwilliger Abbruch durchgeführt wurde, eine durch äußeren Einfluss entstandene heterogene Gruppe darstellt, in der sowohl chromosomal auffällige als auch unauffällige Feten vertreten sind, soll diese hier nicht als eigene Kohorte betrachtet werden.

Im Bildanalyse-Score lässt sich für das Kollektiv mit unauffälligem Karyotyp ein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-Test bei der Testung der gesamten Zottenfläche der großen Zotten und des Stromas der großen Zotten in Bezug zum Ausgang der Schwangerschaft darstellen. Wie in der folgenden Abbildung 31 sichtbar, ist hierbei die Färbeintensität (Mittelwerte der Bildanalyse-Scores) der Gruppe der Spontanaborte und intrauteriner Fruchttode stärker als bei der Gruppe der Lebendgeborenen (PunktescoreGesamt_GR: $p=0,03$, PunktescoreStroma_GR: $p=0,01$).

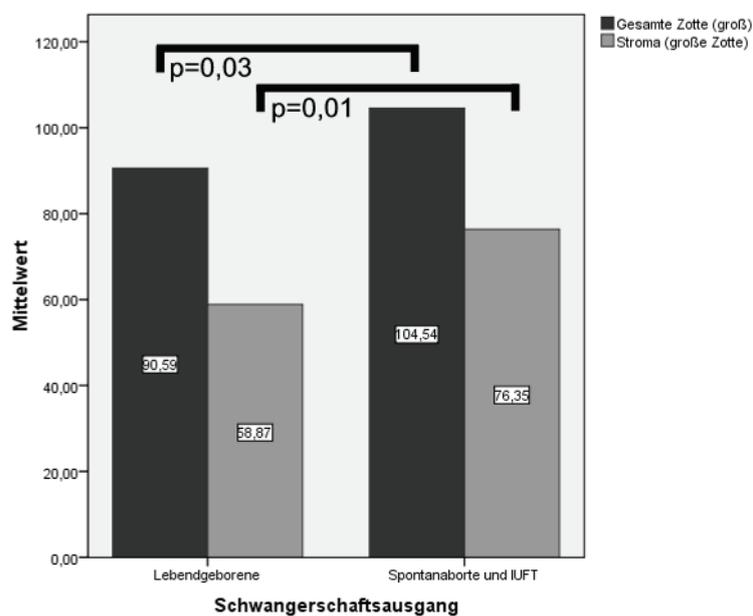


Abbildung 31: Mittelwerte der Bildanalyse-Scores der gesamten großen Zotten und des Stromas der großen Zotten von Lebendgeborenen versus Spontanaborte/Intrauterinen Fruchttode

Die gesamten Zotten (groß) wurden darauf hin genauer untersucht und es erfolgte eine ROC-Analyse.

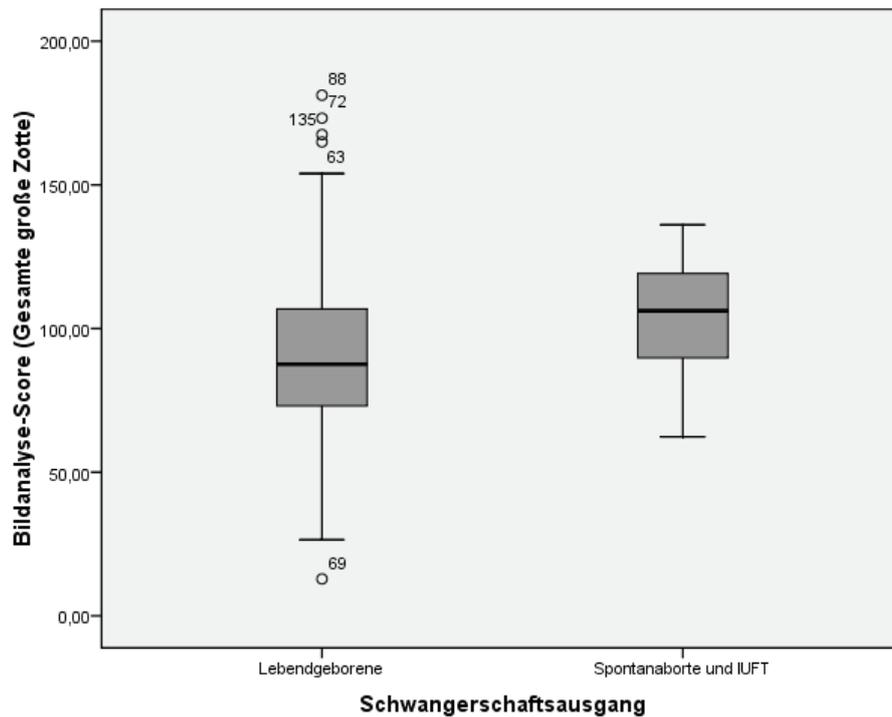


Abbildung 32: Boxplot für den Schwangerschaftsausgang in Bezug auf den Bildanalyse-Score der großen Zotten (gesamte Fläche); $p=0,030$

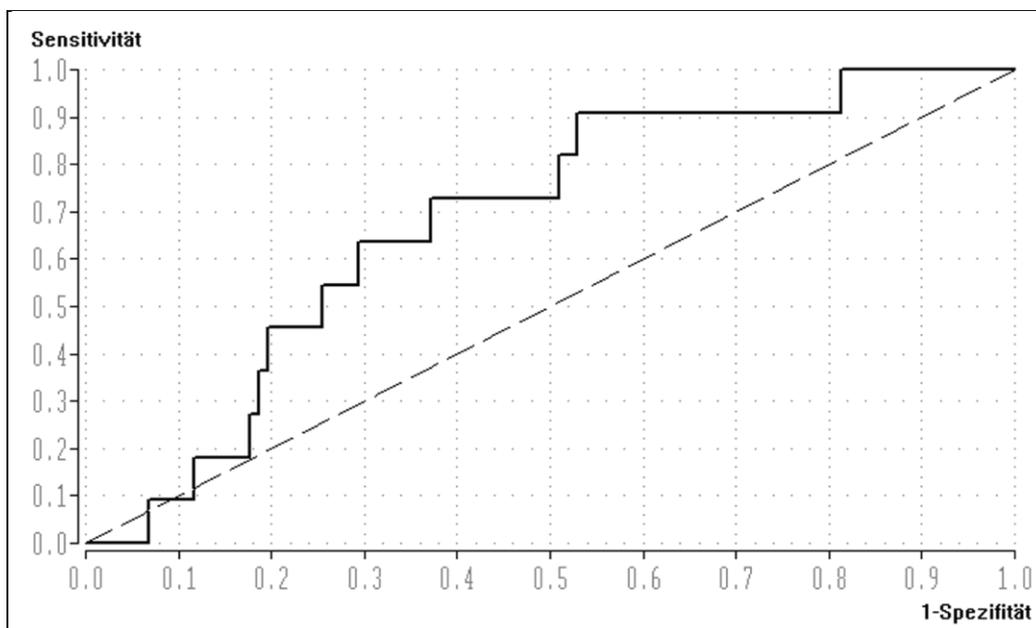


Abbildung 33: ROC-Kurve für die Schwangerschaftsausgänge (lebend versus IUFT/Abort) in Bezug auf den Bildanalyse-Score (Gesamte große Zotte)

Für das Integral unter der ROC-Kurve ergibt sich ein Wert von 0,68.

Der optimale Trennpunkt (Diskriminanzanalyse) ist auf 96,97 berechnet worden.

Trennpunkt: 96,97		Testergebnis		Gesamt
		richtig	falsch	
lebend	n	66	36	102
	%	64,71	35,29	100,0
Abort/ IUFT	n	7	4	11
	%	64,7	36,36	100,0
Gesamt	n	75	39	113
	%	64,6	35,4	100,0

Tabelle 7: Kreuztabelle für den Schwangerschaftsausgang und den Bildanalyse-Score der großen gesamten Zotten (Zuordnung zur Gruppe Abort/IUFT)

Aus der Tabelle 7 lassen sich folgende Werte berechnen:

Sensitivität: 63,64

Spezifität: 64,71

Positiver Likelihood-Quotient: 1,80

Negativer Likelihood-Quotient: 0,56

Relatives Risiko: 2,85

Das relative Risiko für einen negativen Schwangerschaftsausgang ist demnach für eine Mutter, bei der die Färbeintensität im Bildanalyse-Score der gesamten großen Zotten von über 96,97 festgestellt wird, 2,85fach erhöht.

Ebenso wurde auch für das Stroma der großen Zotten eine ROC-Kurve angelegt.

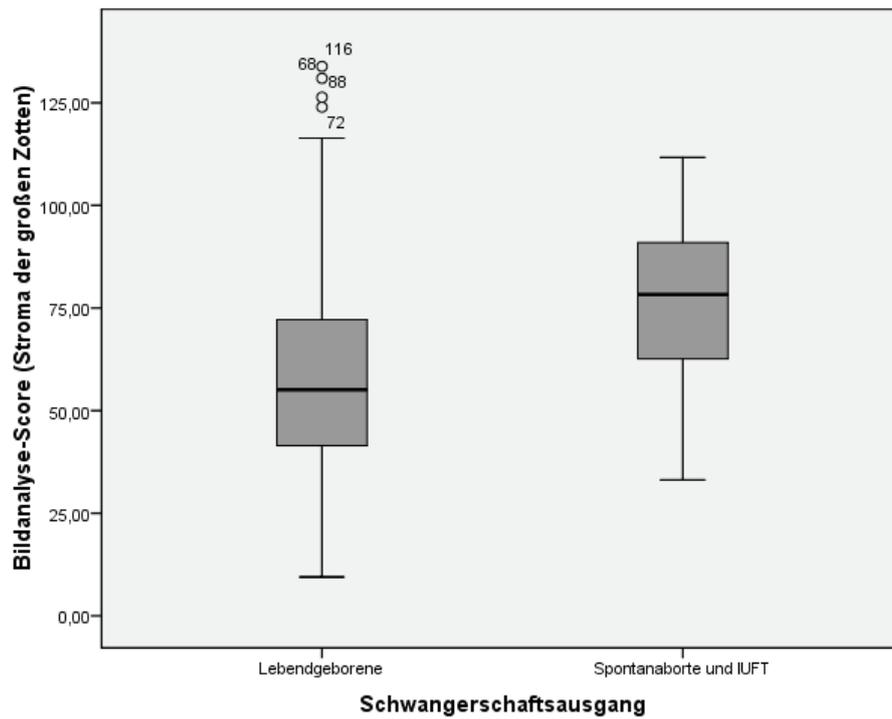


Abbildung 34: Boxplot für den Schwangerschaftsausgang in Bezug auf den Bildanalyse-Score des Stromas der großen Zotten; $p=0,010$

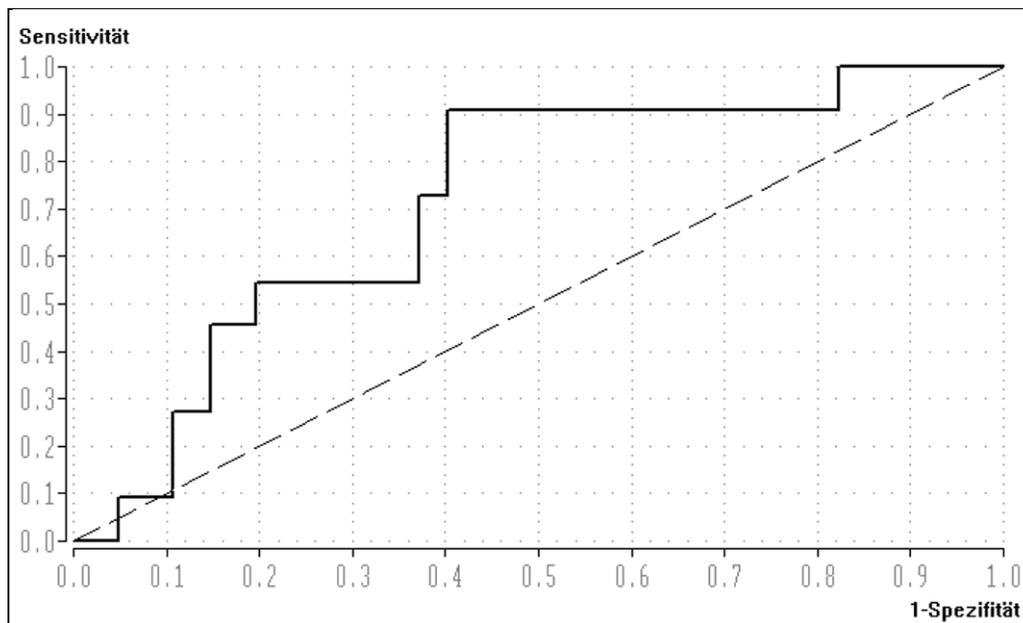


Abbildung 35: ROC-Kurve für die Schwangerschaftsausgänge (lebend versus IUFT/Abort) in Bezug auf den Bildanalyse-Score (Stroma der großen Zotte)

Der AUC beträgt 0,716 und der optimale Trennpunkt liegt bei 67,52.

Trennpunkt: 67,52		Testergebnis		Gesamt
		richtig	falsch	
lebend	n	69	33	102
	%	67,65	32,35	100,0
Abort/ IUFT	n	6	5	11
	%	54,44	45,45	100,0
Gesamt	n	75	38	114
	%	66,4	33,6	100,0

Tabelle 8: Kreuztabelle für den Schwangerschaftsausgang und den Bildanalyse-Score des Stromas der großen gesamten Zotten (Zuordnung zur Gruppe Abort/IUFT)

Wir errechneten aus der Tabelle die folgenden Werte:

Sensitivität: 67,65

Spezifität: 54,55

Positiver Likelihood-Quotient: 1,69

Negativer Likelihood-Quotient: 0,67

Relatives Risiko: 2,28

Eine Mutter mit einer c-Met-Intensität im Stroma der großen Zotte von über 67,62 im Bildanalyse-Score hätte ein 2,28fach erhöhtes relatives Risiko.

Im konventionellen Score (Mann-Whitney-Test) sind keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen, die Zotten bei Spontanabort oder IUFT als Ausgang zeigen aber eine minimal höhere Färbeintensität (siehe Tabelle 9 und Abbildung 36) (GesamtKonv_GR: $p=0,737$; SynzytioKonv_GR: $p=0,709$; ZytoKonv_GR: $p=0,330$; StromaKonv_GR: $p=0,307$; GesamtKonv_KL: $p=0,677$; SynzytioKonv_KL: $p=0,102$; ZytoKonv_KL: $p=0,607$; StromaKonv_KL: $p=0,515$).

		GesamtKonv_GR			
		schwach gefärbt	Mittelstark gefärbt	stark gefärbt	Gesamt
Ausgang Lebendgeborene	Anzahl	65	32	6	103
	% von Ausgang	63,1%	31,1%	5,8%	100,0%
Spontanaborte + IUFT	Anzahl	6	5	0	11
	% von Ausgang	54,5%	45,5%	,0%	100,0%
Gesamt	Anzahl	71	37	6	114
	% von Ausgang	62,3%	32,5%	5,3%	100,0%

Tabelle 9: Kreuztabelle des konventionellen Scores der großen Zotten (gesamte Fläche) für die Schwangerschaftsausgänge (Chi-Quadrat-Test $p=0,48$; Exakter Test nach Fischer: $p = 0,735$)

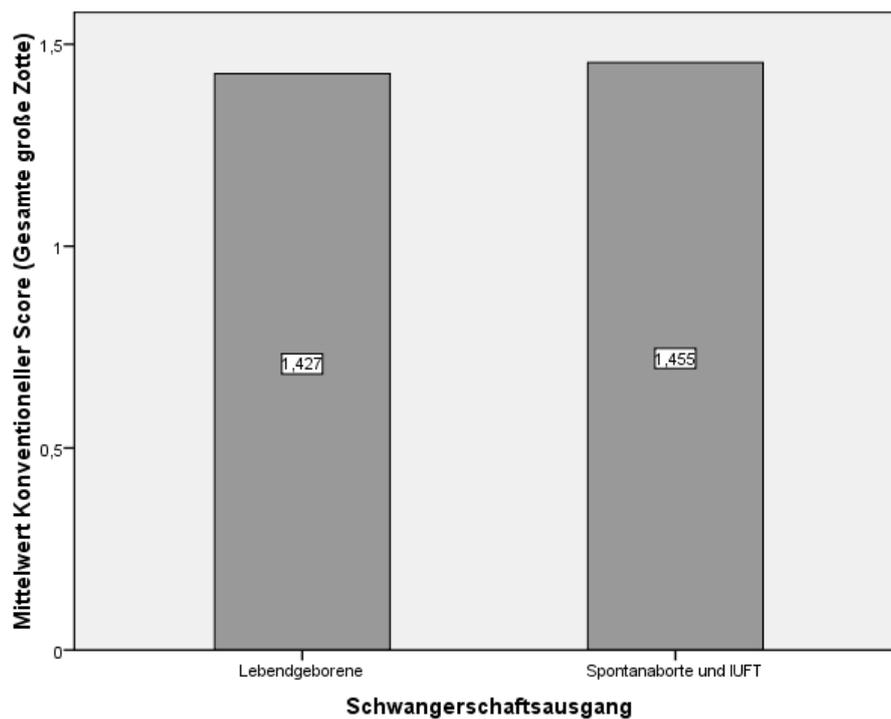


Abbildung 36: Mittelwerte des konventionellen Scores von Lebendgeborenen versus Spontanaborte/Intrauterinen Fruchttode

3.3.6 Karyotyp

Der Vergleich der durchschnittlichen Färbeintensität in den Bildanalyse-Scores zwischen unauffälligem und auffälligem Karyotyp in der folgenden Abbildung 37 soll die signifikanten Unterschiede verdeutlichen.

Hierbei stellt sich ein unauffälliger Karyotyp im Vergleich zum auffälligen Karyotyp mit einer deutlich stärkeren Färbeintensität dar.

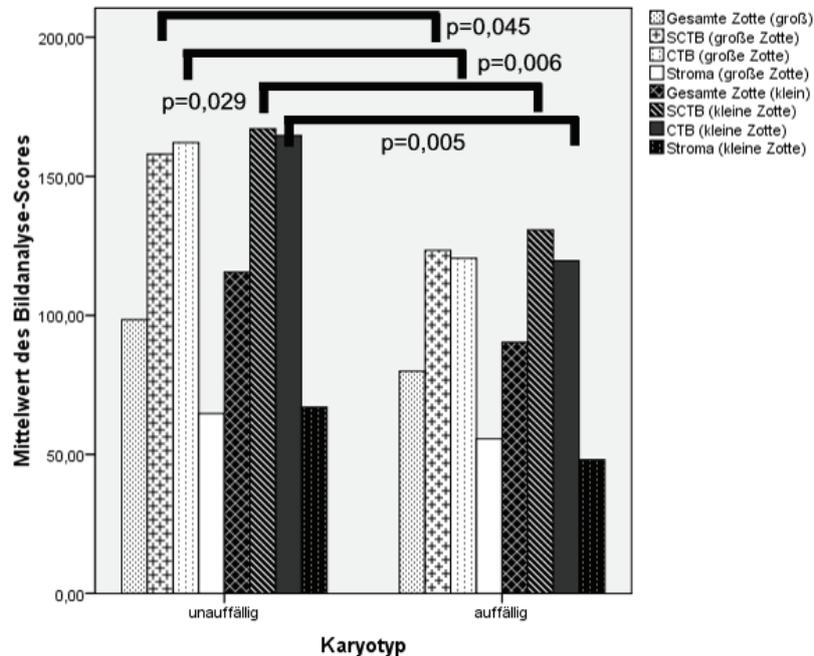


Abbildung 37: Bildanalyse-Score für den Karyotyp, es sind signifikante Unterschiede dargestellt

Im Mann-Whitney-Test wurden Signifikanzen für den Bildanalyse-Score in den verschiedenen Kompartimenten errechnet (PunktescoreSCTB_GR: $p=0,045$; PunktescoreCTB_GR: $p=0,006$; PunktescoreSCTB_KL: $p=0,029$; PunktescoreCTB_KL: $p=0,005$). Nicht signifikante Unterschiede zeigen sich jedoch ebenfalls (PunktescoreGesamt_GR: $p=0,053$; PunktescoreStroma_GR: $p=0,239$; PunktescoreGesamt_KL: $p=0,062$; PunktescoreStroma_KL: $p=0,061$). Auch hier erfolgte für den Zytotrophoblasten der großen Zotten eine ROC-Analyse.

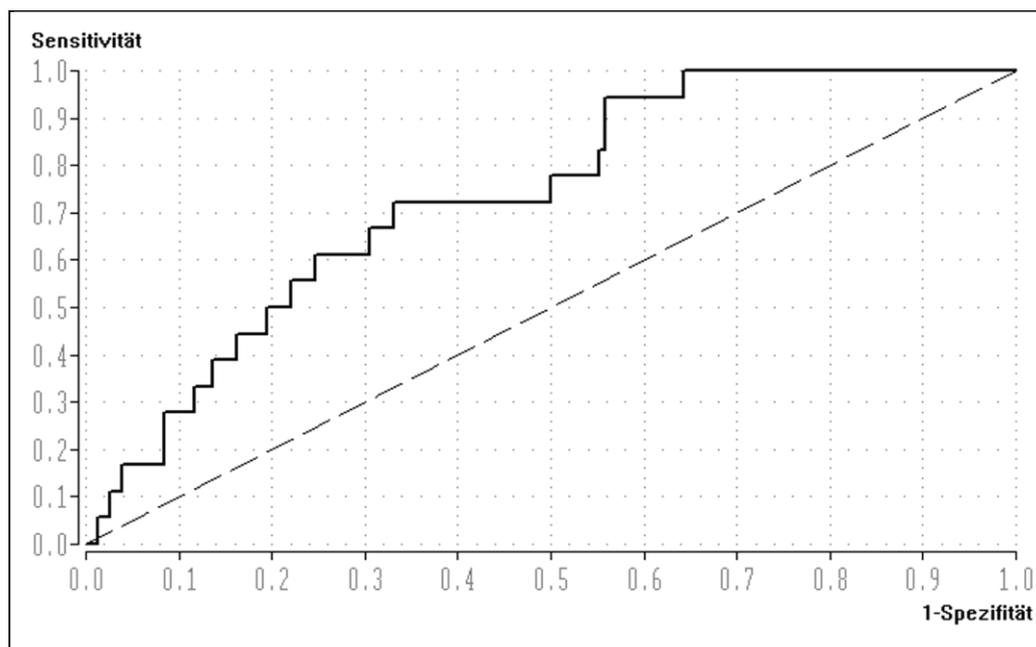


Abbildung 38: ROC-Kurve für den Karyotyp (unauffällig/auffällig) in Bezug auf den Bildanalyse-Score (CTB der großen Zotten)

Die AUC beträgt 0,735. Für den optimalen Trennpunkt wurde der Wert 131,92 ermittelt.

Trennpunkt: 131,92		Testergebnis		Gesamt
		richtig	falsch	
unauffälliger Karyotyp	n	98	56	154
	%	63,6	36,4	100,0
auffälliger Karyotyp	n	13	5	18
	%	72,2	27,8	100,0
Gesamt	n	111	61	172
	%	64,5	35,5	100,0

Tabelle 10: Kreuztabelle für den Karyotyp und Bildanalyse-Score (Zuordnung zur Gruppe der chromosomalen Aberrationen) für das Kompartiment CTB der großen Zotten

Folgende Werte ergeben sich aus dieser Tabelle (Tab.10):

Spezifität: 63,64%

Sensitivität: 72,22%

Positiver Likelihood-Quotient: 1,99

Negativer Likelihood-Quotient: 0,44

Relatives Risiko: 3,88

Das bedeutet, dass das relative Risiko 3,88fach erhöht ist, wenn bei einer Schwangeren im Bildanalyse-Score des CTB der großen Zotten eine Intensität unter 131,92 festgestellt würde. Zur Veranschaulichung erstellten wir einen Boxplot (siehe Abb. 39).

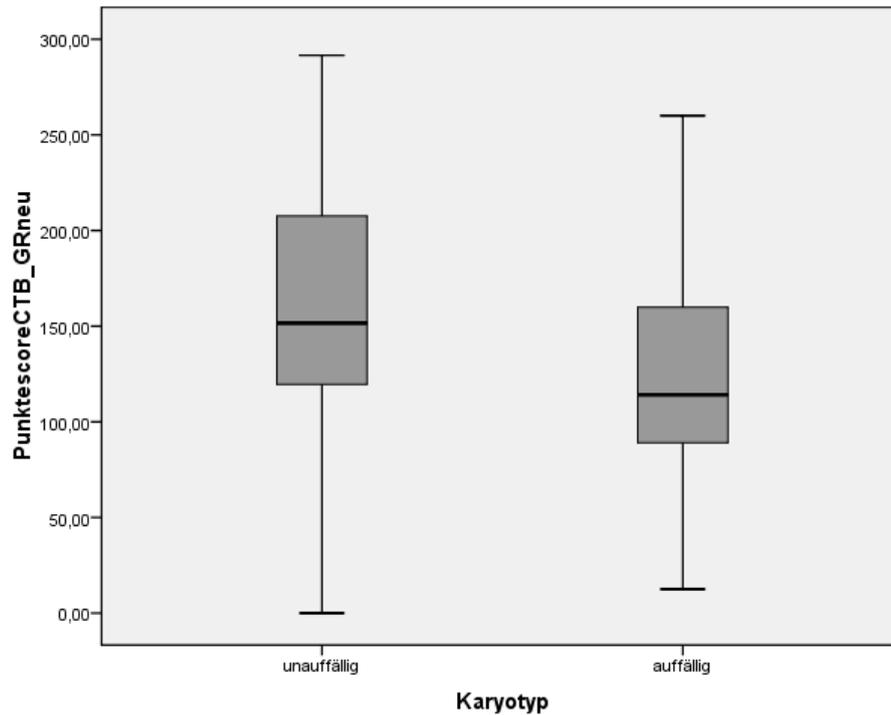


Abbildung 39: Boxplot für den Karyotyp in Bezug auf den Bildanalyse-Score der großen Zotten (CTB)

Auch im konventionellen Score ergaben sich, wie in Abbildung 40 zu sehen, besonders im Bereich des Zytotrophoblasten der großen Zotten und der gesamten Fläche der kleinen Zotten im Vergleich des unauffälligen (starke Intensität) zum auffälligen Karyotyps (schwächere Intensität) signifikante Unterschiede (ZytoKonv_GR: $p=0,039$, GesamtKonv_KL: $p=0,042$).

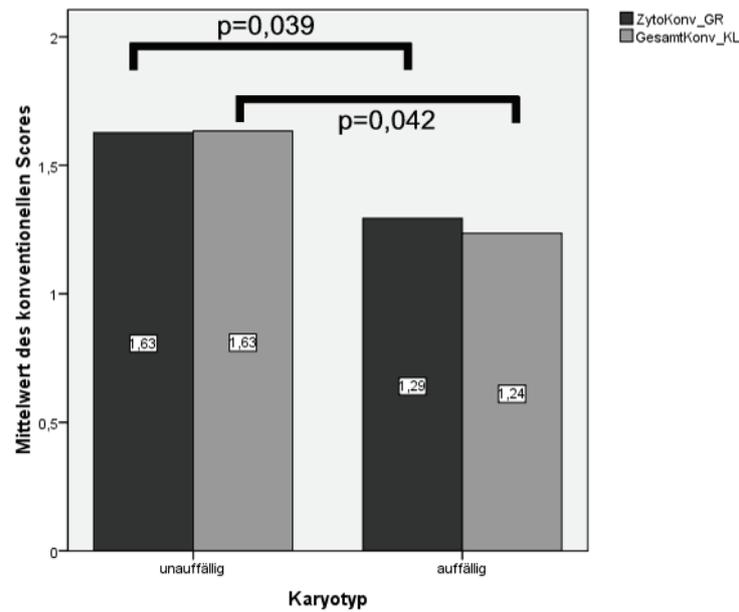


Abbildung 40: Konventioneller Score für den Karyotyp, es sind signifikante Unterschiede im Zytotrophoblasten der großen Zotten und in der gesamten Zottenfläche der kleinen Zotten dargestellt

Anschließend erstellten wir eine ROC-Kurve, wie in Abb.41 sichtbar.

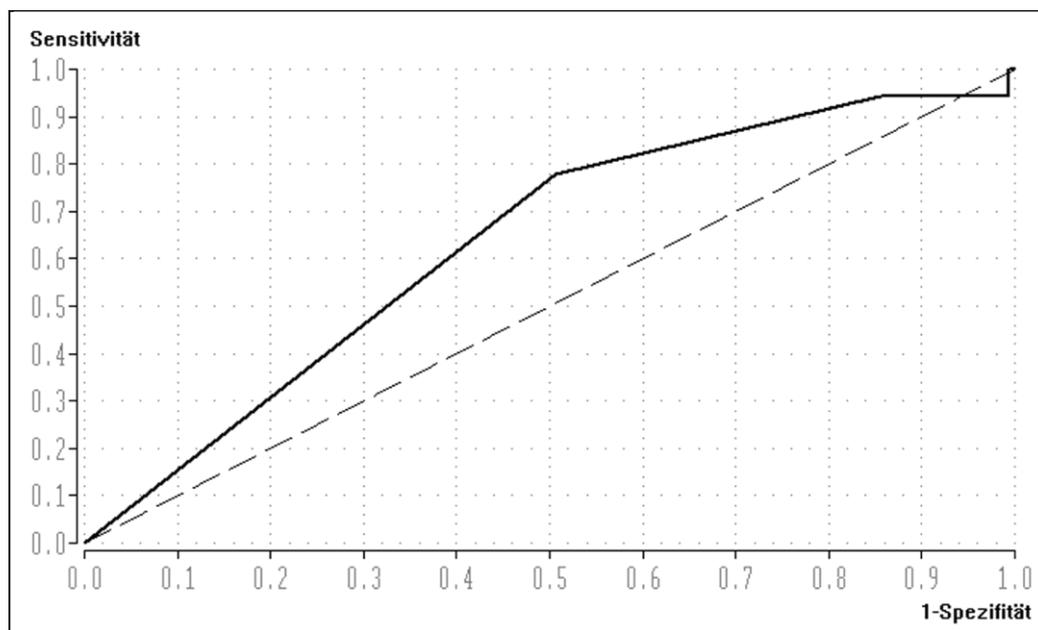


Abbildung 41: ROC-Kurve für den Karyotyp (unauffällig/auffällig) in Bezug auf den Konventionellen Score für die kleinen Zotten (gesamte Zottenfläche)

Der Wert für die Fläche unter der Kurve beträgt 0,633 und für den Trennpunkt 2,87.

Trennpunkt: 2,87		Testergebnis		Gesamt
		Richtig	falsch	
unauffälliger Karyotyp	n	130	22	152
	%	85,5	14,47	100,0
auffälliger Karyotyp	n	1	17	18
	%	5,6	94,4	100,0
Gesamt	n	88	82	170
	%	77,1	22,9	100,0

Tabelle 11: Kreuztabelle für den Karyotyp und Konventionellen Score (Zuordnung zur Gruppe der chromosomalen Aberrationen) für die gesamte Fläche der kleinen Zotten

Es ergeben sich folgenden Werte aus dieser Tabelle (Tab.11):

Spezifität: 85,53%

Sensitivität: 5,56%

Positive Likelihood Ratio: 0,38

Negative Likelihood Ratio: 1,10

Relatives Risiko: 0,38

Sobald also die kleinen Zotten in die Kategorie „mittelstark gefärbt“ einsortiert werden, bedeutet dies ein 0,38fach erhöhtes relative Risiko der Schwangeren ein Kind mit einem auffälligen Karyotyp zu haben.

3.3.7 Nackentransparenz

Untersucht man die Färbeintensität im Hinblick auf die Nackentransparenz, so erscheint es sinnvoll eine Dicke der Nackenstruktur von kleiner als 3 mm mit einer über 3 mm zu vergleichen, zumal in der Praxis eine Dicke von mehr als 3 mm im Sinne eines Nackenödems ein möglicher Hinweis für eine Chromosomenstörung (3,5-4,4 mm: Prävalenz von 21%, 4,5-5,4 mm: Prävalenz von 33,3%, 5,5-6,4 mm: Prävalenz von 50,5%, >6,5 mm: Prävalenz von 64,5%), einen Neuralrohrdefekt oder einen Herzfehler sein kann, und somit als pathologisch gewertet werden sollte [86, 115].

Für die Nackentransparenz lassen sich im Mann-Whitney-Test des Bildanalyse-Scores und des konventionellen Scores in Bezug auf die Färbeintensität keine Signifikanzen nachweisen.

Im Bildanalyse-Score wird ersichtlich, dass die Intensität bei einer niedrigeren Nackentransparenz stärker ist als bei einer Nackentransparenz über 3 mm. Im konventionellen Score zeigt sich ein gegenteiliges Bild (siehe Abb.42).

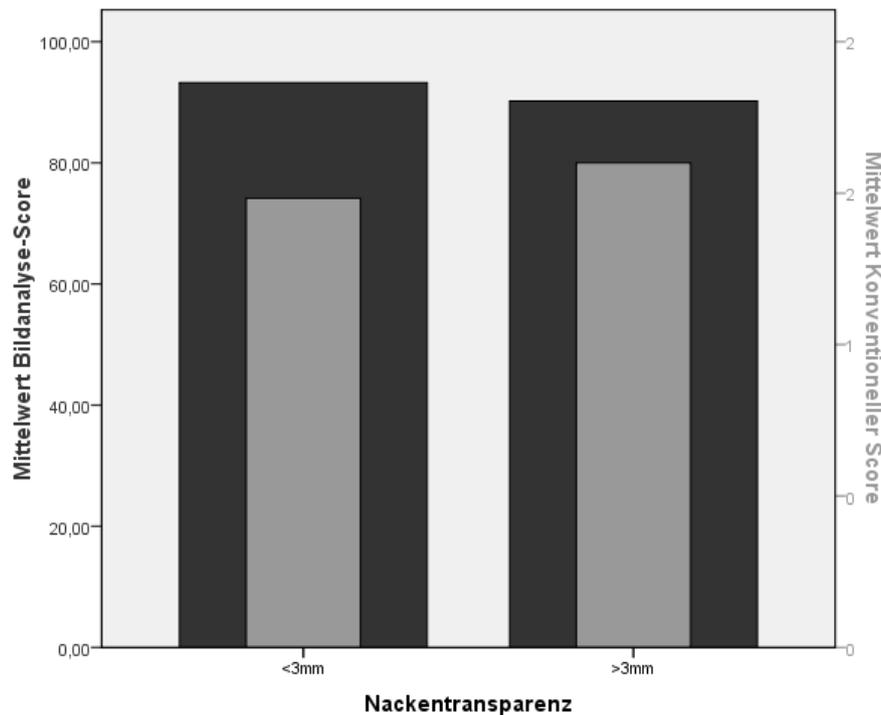


Abbildung 42: Mittelwerte des Bildanalyse-Scores und des konventionellen Scores der Gesamfläche der großen Zotten für die Nackentransparenz.

3.3.8 Länge

Zur Untersuchung der Korrelation von Kindslänge und Expressionsstärke von c-Met in den Zotten, wurden im Test nur die chromosomal Unauffälligen mit eingerechnet. In beiden Scores sind weder Tendenzen der Färbintensität noch Signifikanzen für die Länge (<50 cm versus >50 cm) der lebenden Neugeborenen zu erkennen (Bildanalysescore: PunktescoreGesamt_GR: $p=0,229$; PunktescoreSCTB_GR: $p=0,347$; PunktescoreCTB_GR: $p=0,241$; PunktescoreStroma_GR: $p=0,169$; PunktescoreGesamt_KL: $p=0,456$; PunktescoreSCTB_KL: $p=0,941$; PunktescoreCTB_KL: $p=0,854$; PunktescoreStroma_KL: $p=0,904$; Konventioneller Score: GesamtKonv_GR: $p=0,168$; SynzytioKonv_GR: $p=0,583$; ZytoKonv_GR: $p=0,163$; StromaKonv_GR: $p=0,499$; GesamtKonv_KL: $p=0,693$; SynzytioKonv_KL: $p=0,950$; ZytoKonv_KL: $p=0,649$; StromaKonv_KL: $p=0,096$).

3.3.9 Sonographische und postnatale Parameter

3.3.9.1 Biparietaler Durchmesser

Vergleicht man die Mittelwerte des Bildanalyse-Scores der Gesamtfläche der großen Zotten miteinander (Abb. 43), so steigt die Färbeintensität mit dem biparietalen Durchmesser (BPD). Ein BPD unter 16 mm korreliert im Mittel mit einem Punktwert von 91,16, ein BPD von 16 - 24 mm mit 95,55 Punkten und bei einem biparietalen Kopfdurchmesser von mehr als 24 mm kann ein Mittelwert von 98,36 verzeichnet werden.

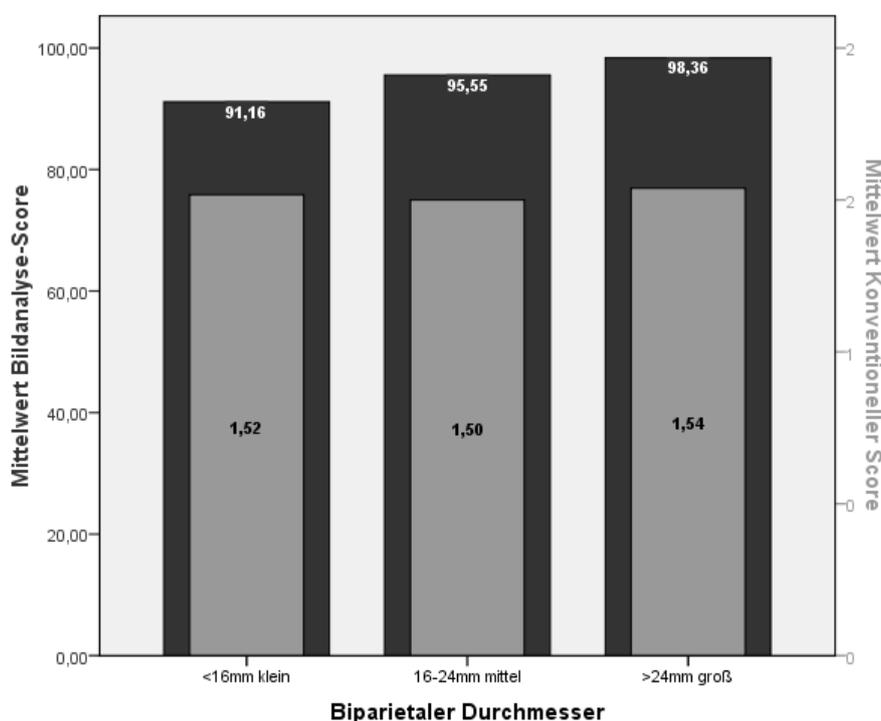


Abbildung 43: Mittelwerte beider Scores der gesamten Fläche der großen Zotten für den Biparietalen Durchmesser

Allerdings können diese in der Abbildung sichtbaren Unterschiede des Bildanalyse-Scores zwischen einem BPD von <16 mm versus >24 mm lediglich mit signifikanten Werten aus dem Mann-Whitney-Test für das Kompartiment des Stromas der großen Zotten ($p = 0,039$) bestätigt werden.

Im konventionellen Score zeigen sich nicht so deutliche Unterschiede im Vergleich der Mittelwerte des Gesamtfärbeeindrucks der großen Zotten (Abb. 43). Auch hier ist das Stroma der großen Zotte bei Kindern mit einem BPD über

24 mm deutlich stärker angefärbt, als bei Neugeborenen mit einem Durchmesser unter 16 mm ($p = 0,072$).

3.3.9.2 Femurlänge

Die Abbildung 44 lässt vermuten, dass die Femurlänge mit der Färbeintensität so korreliert, dass die Zotten eines Kindes mit einer mittleren Femurlänge von 6-13 mm stärker angefärbt werden, als bei Neugeborenen mit einer Femurlänge von unter 6 mm und über 13 mm.

Allerdings zeigen sich in den Bildanalyse-Scores sowie in den konventionellen Scores der großen Zotten keine signifikanten Unterschiede.

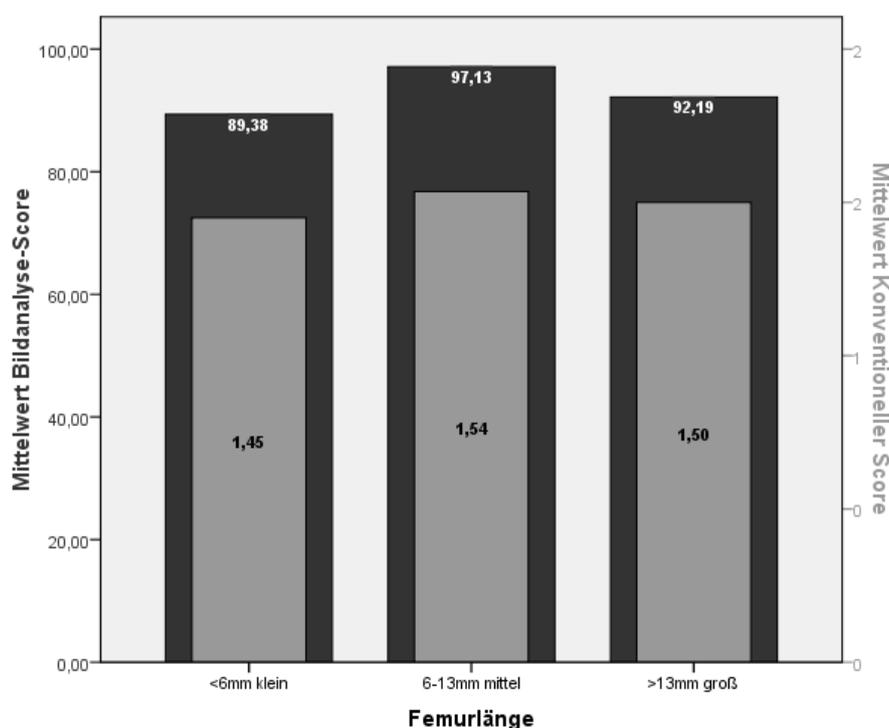


Abbildung 44: Mittelwerte des Bildanalyse-Score und des konventionellen Score der Gesamtfläche der großen Zotten für die Femurlänge

3.3.9.3 Kopfumfang

Bei der Untersuchung des Kopfumfanges im Hinblick der c-Met-Markierung sind in beiden Scores weder signifikante noch auffällige Unterschiede zu finden.

Im Rahmen des Vergleiches der Mittelwerte der Bildanalyse-Scores und der konventionellen Scores entsteht dennoch der Eindruck, dass sich bei Kindern

mit einem kleineren Kopfumfang die Chorionzotten stärker anfärben lassen (Abb. 45).

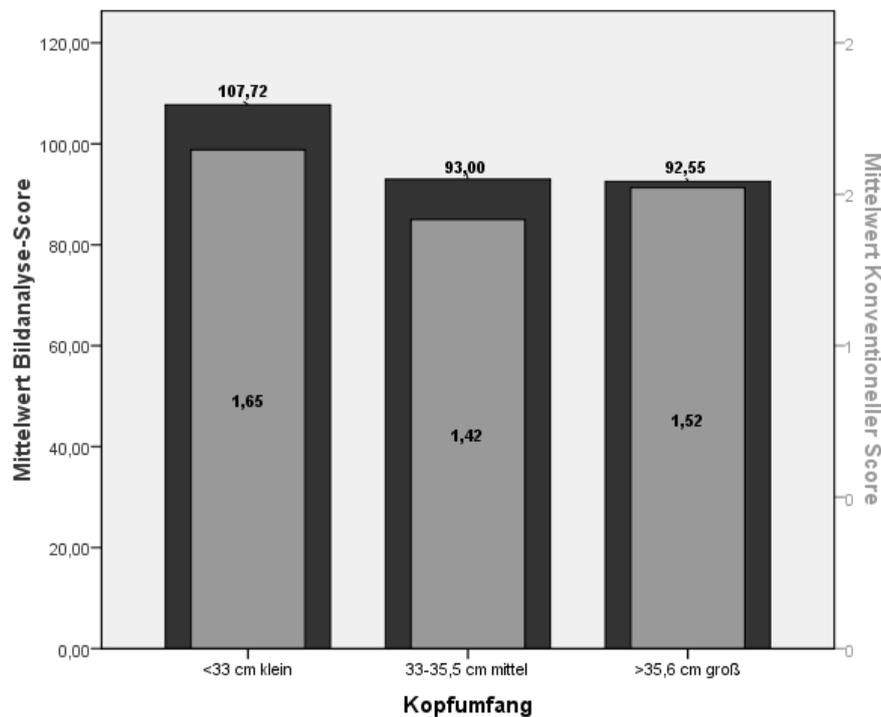


Abbildung 45: Mittelwerte des Bildanalyse-Score und des konventionellen Score der Gesamtfläche der großen Zotten für den Kopfumfang.

3.3.9.4 Scheitelsteißlänge

Es lassen sich im Bildanalyse-Score im Hinblick auf die Scheitelsteißlänge und der Färbeintensität weder Signifikanzen noch Tendenzen nachweisen, ebenso wie im konventionellen Scoring (Mann-Whitney-Test). Hierbei fällt allerdings auf, dass die mittelstark gefärbten Zotten mit einer längeren SSL korrelieren (unauffälliger Karyotyp).

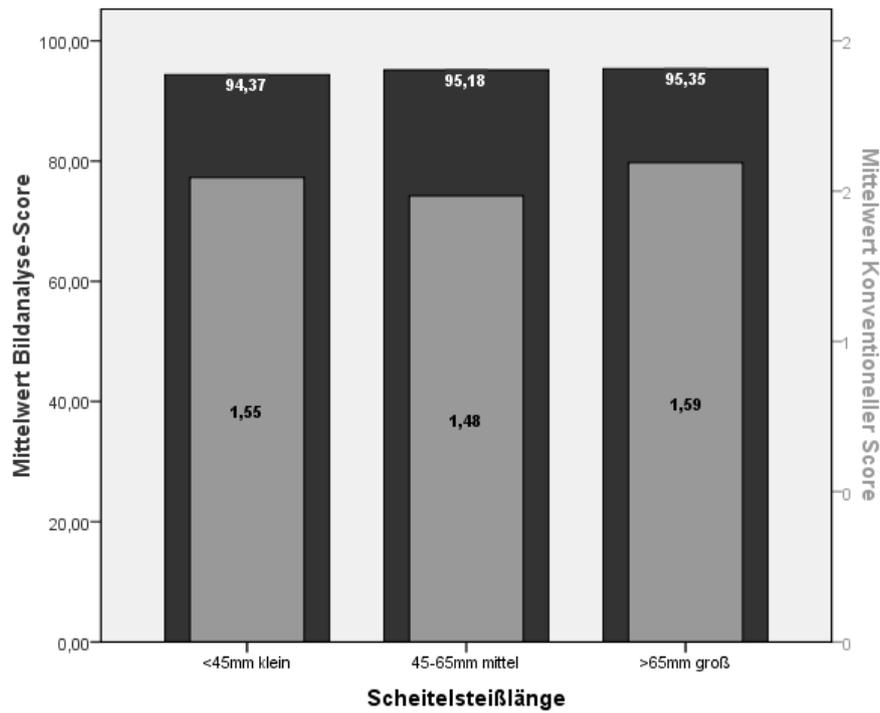


Abbildung 46: Mittelwerte des Bildanalyse-Scores und des konventionellen Scores der Gesamtfläche der großen Zotten für die Scheitelsteißlänge.

Kreuztabelle

		GesamtKonv_GR			
		schwach gefärbt	mittelstark gefärbt	stark gefärbt	Gesamt
SSL <44,99 klein	Anzahl	11	8	2	21
	% von SSL	52,4%	38,1%	9,5%	100,0%
45-65 mittel	Anzahl	53	25	8	86
	% von SSL	61,6%	29,1%	9,3%	100,0%
>65 groß	Anzahl	14	17	2	33
	% von SSL	42,4%	51,5%	6,1%	100,0%
Gesamt	Anzahl	78	50	12	140
	% von SSL	55,7%	35,7%	8,6%	100,0%

Tabelle 12: Kreuztabelle des konventionellen Scores des Färbegesamteindruckes in Verbindung mit der Scheitelsteißlänge

3.4 Korrelation der Färbeintensität mit den Patientendaten

3.4.1 Alter der Patientin

Wenn man die Schwangerschaften von Frauen, die älter als 35 Jahren sind, als Risikoschwangerschaften bewertet, lassen sich im Mann-Whitney-Test signifikante Unterschiede zwischen den unter 35-Jährigen und den über 35-Jährigen in unterschiedlichen Kompartimenten der Zotten sowohl in den Bildanalyse-Scores als auch in den konventionellen Scores aufzeigen. Signifikanzen sind nachweislich bei der Färbeintensität der Zytotrophoblasten der großen und kleinen Zotten, sowie der gesamten Zottenfläche der kleinen Zotte zu finden (PunktescoreCTB_GR: $p=0,031$; PunktescoreGesamt_KL: $p=0,020$; PunktescoreCTB_KL: $p=0,027$; GesamtKonv_KL: $p=0,040$; ZytoKonv_KL: $p=0,018$).

In den anderen Kompartimenten sind keine Unterschiede aufzuzeigen (PunktescoreGesamt_GR: $p=0,486$; PunktescoreSCTB_GR: $p=0,541$; PunktescoreStroma_GR: $p=0,692$; PunktescoreSCTB_KL: $p=0,070$; PunktescoreStroma_KL: $p=0,094$; GesamtKonv_GR: $p=0,830$; SynzytioKonv_GR: $p=0,360$; ZytoKonv_GR: $p=0,053$; StromaKonv_GR: $p=0,641$; SynzytioKonv_KL: $p=0,236$; StromaKonv_KL: $p=0,646$).

Betrachtet man in der folgenden Abbildung (Abb. 47) die Mittelwerte der Bildanalyse-Scores für die Risikoschwangerschaften (>35 Jahren) und der Frauen, die zur Zeit der Schwangerschaft unter 35 Jahren alt waren, so wird deutlich, dass die Risikoschwangerschaften mit einer höheren Färbeintensität korrelieren.

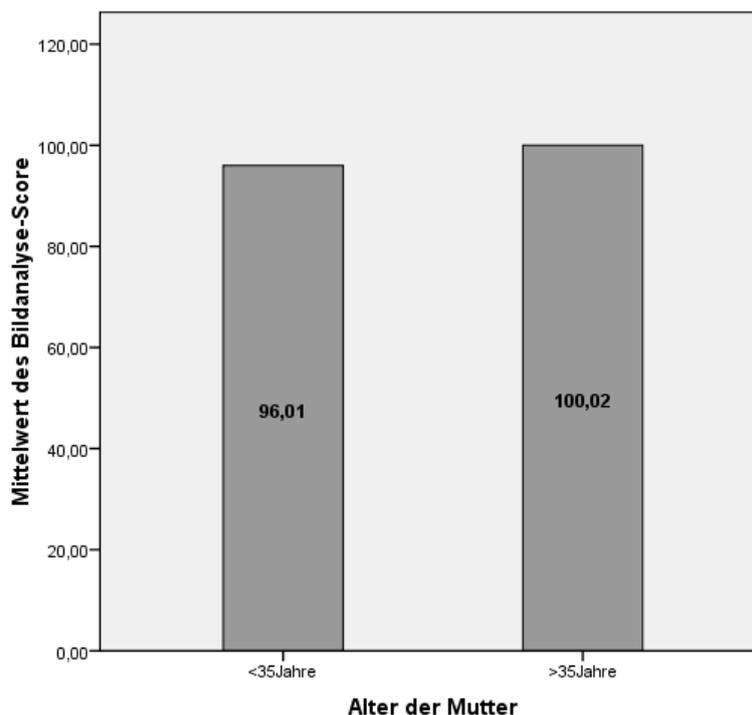


Abbildung 47: Mittelwerte der Bildanalyse-Scores der großen Zotten von Patientinnen unter 35 Jahren und über 35 Jahren (Risikoschwangerschaft)

3.4.2 Nikotinkonsum

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke und dem Nikotinkonsum in der Schwangerschaft zu prüfen, wurden im Mann-Whitney-Test die Raucherinnen den Nichtraucherinnen gegenübergestellt. Es wurden nur die Fälle mit einem unauffälligen Karyotyp ausgewählt.

Da sich keine Signifikanzen zeigen (PunktescoreGesamt_GR: $p=0,893$; PunktescoreSCTB_GR: $p=0,380$; PunktescoreCTB_GR: $p=0,547$; PunktescoreStroma_GR: $p=0,438$; PunktescoreGesamt_KL: $p=0,320$; PunktescoreSCTB_KL: $p=0,458$; PunktescoreCTB_KL: $p=0,345$; PunktescoreStroma_KL: $p=0,512$), ist ein Zusammenhang zwischen der Färbeintensität und dem Konsumverhalten nicht zu vermuten. Wenn man jedoch die folgende Abbildung (Abb. 48) mit den Mittelwerten der Bildanalyse-Scores und der konventionellen Scores betrachtet, so zeigt sich bei den großen Zotten eine geringfügig höhere durchschnittliche Färbeintensität der Präparate der Raucherinnen als bei den Nichtraucherinnen (Fallzahl: 28 Raucher, 120 Nichtraucher).

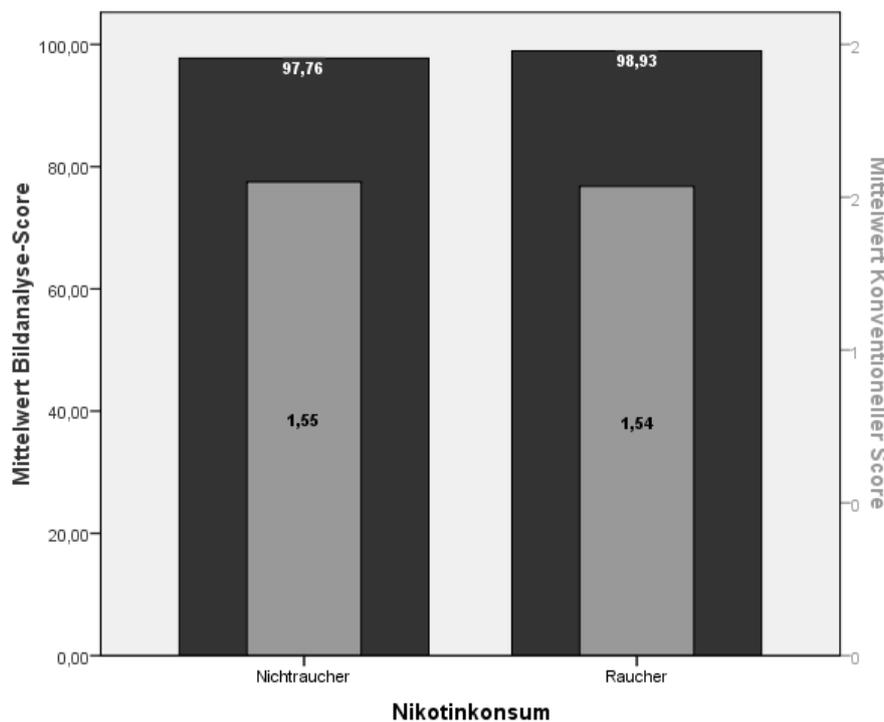


Abbildung 48: Mittelwerte der Bildanalyse-Scores der großen Zotten von Raucherinnen und Nichtraucherinnen

3.4.3 Alkohol

Stellt man die Frauen, die in der Schwangerschaft Alkohol konsumiert haben, den Frauen gegenüber, die abstinent waren, so lassen sich durch den Mann-Whitney-Test der Bildanalyse-Scores sowie der konventionellen Scores keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Färbintensität darstellen (PunktescoreGesamt_GR: $p=0,774$; PunktescoreSCTB_GR: $p=0,929$; PunktescoreCTB_GR: $p=0,981$; PunktescoreStroma_GR: $p=0,610$; PunktescoreGesamt_KL: $p=0,390$; PunktescoreSCTB_KL: $p=0,078$; PunktescoreCTB_KL: $p=0,285$; PunktescoreStroma_KL: $p=0,462$). Auch hier beruhen die Berechnungen auf den Daten der Kinder mit unauffälligem Karyotyp. Die Fallzahl der Alkohol konsumierenden Frauen ist allerdings sehr gering (>5).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Patientenkollektiv und Untersuchungsmaterial

Die Daten dieser Studie stammen aus einem Patientenkollektiv, welches durch die Frauenklinik der Uniklinik Münster nach einer bestimmten Indikationsstellung zur Chorionzottenbiopsie ausgewählt wurde. Da es sich bei diesen Indikationen unter anderem um Auffälligkeiten im Ultraschall, ein hohes mütterliches Alter oder um Komplikationen einer vorausgegangen Schwangerschaft handelt, kann dieses Kollektiv nicht als repräsentativ für die Grundgesamtheit aller Frauen gelten.

Man kann bei den ausgewählten Patientinnen also von einem Risikokollektiv sprechen, so dass dadurch eine höhere Anzahl von Chromosomenaberrationen, induzierte Aborte, Schwangerschaftskomplikationen und ein höheres Durchschnittsalter erklärbar sind. Ethisch wäre es nicht vertretbar, bei gesunden jungen Müttern mit vermutlich gesunden Kindern eine Chorionzottenbiopsie durchzuführen, um im Rahmen einer Studie repräsentative Daten für die Grundgesamtheit aller Frauen zu erhalten.

Da das Zottengewebe zunächst für die eigentliche Untersuchung (Karyotypisierung) und bereits für andere Studienzwecke (COX-1-/COX-2-Expression und VEGF-, PlGF-, Flt-1- und Flk-1- Expression, Syndecan-1-Expression) verwendet wurde, sind in wenigen Proben nur eine sehr geringe Anzahl von gut angeschnittenen Zotten und teilweise auch unbrauchbares Material vorzufinden.

Bei der mikroskopischen Betrachtung fiel auf, dass einige Zottenpräparate in aufeinander folgenden Objektträgern insgesamt leicht intensiver angefärbt erschienen als andere, möglicherweise verursacht durch die Fixierung, die H.E.-Färbung oder die Antikörperfärbung (siehe Kapitel 4.1.3-4).

Die Doppelverblindung dieser Studie war zu jeder Zeit gegeben, da weder während der Vorbereitung der Chorionzottenpräparate noch während der

Auswertung den beteiligten Personen Daten der Schwangeren, deren Schwangerschaft und zum Outcome des Kindes bekannt waren.

4.1.2 Daten zu Patientinnen und kindlichem Outcome

Für die statistische Auswertung wurden Daten zu den Patientinnen und ihrem Schwangerschaftsoutcome aus der PIA-Fetal Database, einer Datenbank der pränataldiagnostischen Abteilung der Universitätsfrauenklinik Münster, verwendet.

Durch direkte Befragung oder über einen Fragebogen erhielt man weitere Daten zum späteren Schwangerschaftsverlauf, kindlichen Outcome, Entbindungstermin, Gestationsalter bei Entbindung, Schwangerschaftsausgang, Geburtsgewicht und Geburtslänge bei Entbindung, sowie zum Nikotin- und Alkoholkonsum während der Schwangerschaft.

Unter Risikokollektiv versteht man eine Gruppe von Patientinnen, die sich aus einer speziellen Indikation heraus der Chorionzottenbiopsie unterziehen. In diesem Kollektiv kann es somit häufiger zu Komplikationen kommen.

In unserer Studie war auffällig, dass nur eine sehr geringe Anzahl von Komplikationen während der Schwangerschaft, wie beispielsweise Blutungen (1 Fall, Prävalenz: 0,55 %), Gestationsdiabetes (1 Fall, Prävalenz: 0,55 %), Präeklampsie (0 Fälle) oder Infektionen (1 Fall, Prävalenz: 0,55 %), vorzeitige Wehen (3 Fälle, Prävalenz: 1,96 %), vorzeitiger Blasensprung (3 Fälle; Prävalenz: 1,96 %) die unter anderen auch zu Aborten oder IUFT führen können, aufgelistet wurden. Die Prävalenz beispielsweise für die Präeklampsie liegt aber zwischen 2 – 8% und für den Gestationsdiabetes zwischen 3,2% - 4,8% [37, 40].

Zu erklären ist die niedrigere Prävalenz in unseren Untersuchungen trotz des Risikokollektivs durch fehlende Angaben über das Auftreten maternaler Schwangerschaftskomplikationen, wohingegen die Informationen über das Outcome der Kinder in den meisten Fällen direkt durch den Gynäkologen oder die Entbindungsklinik übermittelt wurde.

Angaben über diese Schwangerschaftskomplikationen wären wünschenswert gewesen, um auch Aussagen bezüglich dieser wichtigen Einflussfaktoren und der c-Met-Expression treffen zu können.

4.1.3 Fixierung des Plazentagewebes

Die Fixierung des entnommenen Gewebes ist nötig, um die Chorionzotten vor einer physikalisch-chemische Beeinträchtigung zu schützen und damit soweit wie möglich in ihrem naturgetreuem Zustand, in dem es entnommen wurde, zu erhalten und dessen Zerfall und Autolyse zu verhindern [69]. Desweiteren dient die Fixierung durch Materialhärtung zur besseren Schneidbarkeit und um eine weitere Behandlung, wie einer Antikörperfärbung zu ermöglichen. Vorhandene Bakterien oder andere Krankheitserreger im Untersuchungsgut werden durch die Fixierung abgetötet.

Durch die Fixierungsmittel wie beispielsweise Alkohol, Pikrinsäure, Sublimat etc., die erhebliche Eiweißfällner und Eiweißvernetzer sind, kann es zu Zellveränderungen und so zum Umbau der natürlichen Struktur der lebenden Zelle kommen, welches sich in einem sogenannten Äquivalenzbild mit konstanten Charakteristika äußert [127].

Zudem sind durch schlechte Fixierung, alte Farblösungen und andere Einflüsse rein technisch bedingte Veränderungen in den histologischen Präparaten möglich, die Artefakte genannt werden und bei der Beurteilung berücksichtigt werden müssen [127].

In unserer Studie wurden alle Präparate dem gleichen standardisierten Verfahren unterzogen, so dass eine optimale Voraussetzung zur Vergleichbarkeit der Proben geschaffen werden konnte.

4.1.4 Immunhistochemische Färbung

Seitdem 1941 Coons und Kollegen die Identifikation von Gewebsantigenen durch Verwendung der direkten Immunfluoreszenstechnik revolutionierten, wird die Immunhistochemie (ICH) als eine wichtige Methode in der diagnostischen Histopathologie, aber auch in der Forschung verwendet [31].

Mit Hilfe der Immunhistochemie können spezifische chemische Verbindungen, wie zum Beispiel Peptide und Proteine mit einer Antigen-Antikörper-Reaktion

nachgewiesen werden. Hierfür wird das Gewebe mit einer Lösung inkubiert, die den spezifischen Antikörper gegen das gesuchte Antigen enthält. Der Antikörper bindet sich an die Stelle in Zellen oder im extrazellulären Raum, an denen das Antigen vorkommt, und weist es somit in loco nach [128].

Verwendet wurde hier der polyklonale c-Met-Antikörper „C-12“ (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA), gewonnen aus einem Kaninchen als Wirt, der bisher in einigen anderen Studien Verwendung fand [124; 27; 72] und somit als gängiger Antikörper für c-Met zu bewerten ist.

Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass polyklonale Antikörper oft nicht chromatographisch aufgereinigt sind und es so durch andere tierische Serumproteine zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung kommen kann. Außerdem können durch verschiedene Chargen Konzentrationsunterschiede zustande kommen und ferner sind falsch-positive Befunde durch unerwünschte Kreuzreaktionen mit anderen Antigenstrukturen möglich, die sich in dieser Studie allerdings durch die unmarkierten Kontrollpräparate ausschließen lassen [87].

4.1.5 Auswertmethoden der Färbung

Die Interpretation der Gewebefärbung war zu ihren Anfängen zunächst größtenteils noch qualitativer Natur, doch im späteren Verlauf wurde die Quantifizierung der Färbung immer bedeutender [107, 117, 126, 50], besonders die Verwendung mehrerer Analyseverfahren und vor allem digitale Analyseverfahren [57].

Um auch in dieser Studie die Färbeintensität der Chorionzottenpräparate zu quantifizieren, wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewandt. Zum einen wurde die konventionelle Auswertung mittels Färbescore eingesetzt, indem drei Untersucher unabhängig voneinander die Bilder der kleinen und großen Chorionzotten in vier unterschiedliche Kategorien („nicht gefärbt“, „schwach gefärbt“, „mittelstark“ und „stark gefärbt“) für die gesamte Zotte und die drei Kompartimente Zytotrophoblast, Synzytotrophoblast und Stroma einsortierte. In den meisten Fällen waren sich alle Betrachter einig und sortierten die Zotte in die gleiche Kategorie. Wenn sich nur zwei einig waren,

wurde diese Kategorie der beiden Übereinstimmungen gewählt und in den acht Fällen, in den sich alle uneinig waren, bildeten zwei Betrachter einen Konsens. Eine Unterscheidung zwischen „nicht gefärbt“ und „schwach gefärbt“ war auf Grund der vorliegenden Hämatoxylinfärbung der Präparate bei nur wenigen Zotten erschwert.

Die visuelle Auswertmethode von immunhistochemischen Präparaten findet sich in vielen wissenschaftlichen Berichten der Pathologie und Zytologie wieder und kann als etabliertes Verfahren bewertet werden [99].

Dennoch lassen sich abweichende Beurteilungen durch unterschiedliche Beobachter nicht vermeiden.

Zum anderen wurde ein digitales computergestütztes Bildanalyseverfahren verwandt. Computerassistierte Bildanalyzesysteme werden zunehmend für die Quantifizierung von Ergebnissen in einem weiten Spektrum biologischer Experimente genutzt, da sie vor allem als schnell und präzise bewertet werden [56, 61].

Aber auch diese Auswertmethode weist Probleme auf. Um hier die Färbeintensität in Stufen einzuteilen (0, 1, 2, 3), musste durch das verwendete Bildanalyseprogramm Image-Pro© Plus eine Maske erstellt werden, welches durch zwei Betrachter gemeinsam durchgeführt wurde. Dabei stellte sich die Frage, ab welcher Färbeintensität das Gewebe als positiv für den zu bestimmenden Marker gelten soll und wo die Grenze zwischen „schwach“, „mittelstark“ und „stark gefärbt“ zu ziehen ist. Somit ist auch hier die Bewertung per Bildanalyse durch subjektive Einflüsse gezeichnet.

In mehreren Studien wurde die Überlegenheit der digitalen Bildanalyse gegenüber traditionellen Quantifizierungsmethoden aufgrund weitesgehender Objektivität und aufgrund der vergleichsweise geringen Arbeits- und Zeitaufwand manueller Zähl- und Schätzmethode belegt [8, 59].

In dieser Arbeit zeigten sich für beide Analyseverfahren häufig gleiche Tendenzen, aber dennoch konnten nicht immer für beide Verfahren parallel Signifikanzen errechnet werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Plazentare c-Met-Expression

In dieser Studie wurden erstmals im Rahmen der Auswertung der c-Met-Expression die kleinen (ein viertel Bildausschnitt bzw. 100.000 - 300.000 Pixel) von den großen Zotten ($> \frac{1}{2}$ des Bildausschnittes bzw. 300.000 - 800.000 Pixel) unterschieden, es stellte sich allerdings in beiden Scores kein signifikanter Intensitätsunterschied zwischen beiden Gruppen dar (siehe Abb.49 und 50).

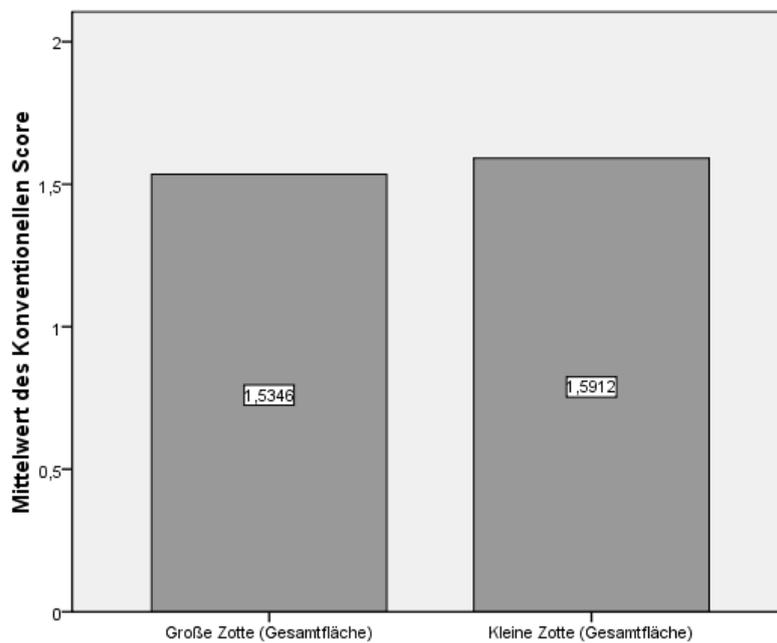


Abbildung 49: Vergleich der Mittelwerte des Konventionellen Scores der Intensität zwischen der gesamten Zottenfläche der großen und kleinen Zotten

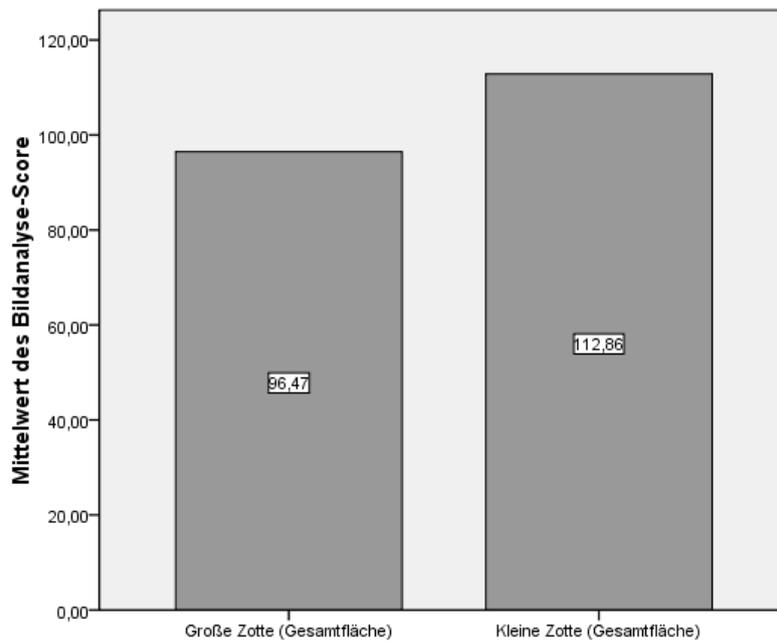


Abbildung 50: Vergleich der Mittelwerte des Konventionellen Scores der Intensität zwischen der gesamten Zottenfläche der großen und kleinen Zotten

Dennoch wurden für alle Berechnungen die beiden Gruppen getrennt voneinander untersucht, da aufgrund von geringem Materialgehalt (siehe 4.1.1) nicht aus jeder Probe eine geeignete kleine und große Zotte verwendet werden konnte.

In unseren Analysen stellten wir fest, dass die hauptsächliche c-Met - Expression in der Trophoblastenschicht zu finden ist, wobei auch in einigen Zellkernen des Zottenstromas c-Met nachweisbar ist.

Dies bestätigt zum Teil die Ergebnisse von Somerset et al., die c-Met-mRNA begrenzt auf den perivillösen Trophoblasten ermittelten und innerhalb des ersten Trimenon ein nur schwaches Signal aus dem Zottenstroma beobachteten [105].

Clark et al. detektierte durch in-situ-Hybridisierung c-Met in den villösen Zytotrophoblasten, aber nicht in den Trophoblasten außerhalb der Zotte. HGF ist während der gesamten Schwangerschaft begrenzt auf das Zotteninnere nachweisbar, der Trophoblast ist durchweg HGF-negativ [29].

Wir konnten in unseren Untersuchungen zeigen, dass der Nachweis von c-Met im Synzytotrophoblasten nicht vernachlässigbar gering ist, sondern im

Gegenteil teilweise auch relativ starke Expressionen ähnlich des Zytotrophoblasten liefert.

Im Bildanalysescore zeigte sich eine nahezu identische Färbung der Synzytotrophoblasten und Zytotrophoblasten und eine vergleichsweise geringe Expression im Zottenstroma, wohingegen im konventionellen Score der Synzytotrophoblast der großen und kleinen Zotten als am schwächsten gefärbt eingeordnet wurde. Dennoch wird auch in diesem Auswertverfahren der Zytotrophoblast als der Ort, der höchsten c-Met-Expression ermittelt.

Da der c-Met-Ligand HGF vor allem in den Zottenkernen zu finden ist, muss wie Kauma und Clark et al. [63, 29] bereits vermuteten, das HGF auf parakrinen Weg auf c-Met einwirken, um die Trophoblastenentwicklung oder ihre Funktion zu regulieren.

Wir konnten erstmals demonstrieren, dass c-Met nicht in unbedeutenden Mengen im Stroma exprimiert wird. Welche Bedeutung jedoch der c-Met-Gehalt im Stroma spielt, ist noch unklar, jedoch wäre auch eine Regulation der Funktion und Entwicklung der Stromazellen über HGF, welches immerhin seinen Hauptanteil im Stroma hat, denkbar.

Ein anderer Grund für die in dieser Studie vermehrte Expression im Stroma als in anderen Untersuchungen könnte die punktuell starke Färbung (eventuell auch auf Grund der H.E.-Färbung) der Stromakerne sein, die den Betrachter eher zu einer Einstufung in einer höhere Färbeintensitätsstufe verleiten lässt, obwohl im Verhältnis zur Gesamtfläche die Intensität geringer ist.

4.2.2 C-Met und Gestationsalter

Bisher ist in der Literatur nur sehr wenig über den Zusammenhang zwischen dem Schwangerschaftszeitpunkt und der Expression des Rezeptors für HGF c-Met beschrieben worden, vor allem fehlen Daten hierzu in der Frühschwangerschaft.

Kauma et al. (1999) zeigten in einer Studie, dass im ersten Trimenon c-Met-mRNA (RT-PCR) und das Protein c-Met (Western-Blot) in der Plazenta zu finden sind und dass sie zusammen mit dem Liganden HGF eine wichtige Rolle für die Invasion des Trophoblasten spielen [64].

Dass die Expression von c-Met-mRNA und HGF vom ersten zum zweiten Trimenon ansteigt, dort einen Höhepunkt erreicht, um dann zum dritten Trimenon wieder abzufallen, konnten Somerset et al. (1998) beweisen [105]. Bei Geburt hingegen konnte durch Färbung mit einem c-Met-Antikörper auch eine starke Anfärbbarkeit des Zytotrophoblasten gemessen werden [29]. In unserer Studie wurde die Abhängigkeit der c-Met-Expression vom Gestationsalter untersucht, indem die CVS vor der 14. SSW mit der nach dieser gegenübergestellt wurden. Im konventionellen Auswertverfahren sowie im Bildanalyseverfahren konnten keine Signifikanzen gefunden werden. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde für die weiteren Berechnungen die c-Met-Expression als unabhängig vom Gestationsalter betrachtet.

4.2.3 C-Met und Frühgeburtlichkeit

Von Frühgeburtlichkeit spricht man bei einer Entbindung unter der 37. vollendeten Schwangerschaftswoche oder unter 259 Gestationstagen und ist ein Hauptfaktor der neonatalen Mortalität (mit 27% die führende Hauptursache der weltweit vier Millionen neonatalen Tode) und Morbidität und hat langfristige negative Auswirkungen auf die Gesundheit [6, 46, 70]. Die Schätzungen zur Frühgeburtlichkeitsrate bewegen sich zwischen 5% in den Industrieländern und 25% in den Entwicklungsländern (insgesamt 13 Mio./Jahr weltweit), wobei in den letzten Jahren die Rate in den Industrienationen zwischen 5-10% relativ stabil geblieben ist [113, 70]. Hauptsächlich sind Afrika und Asien betroffen, wo 85% aller Frühgeburten auftreten. In Europa und Nordamerika finden sich dagegen nur 7,4% solcher Geburten [6]. Zu unterscheiden sind die Ursachen der spontanen Frühgeburten (75-80%) von denen der iatrogenen (15-20%), also induzierten Frühgeburten [6, 113]. Als Ursachen der spontanen Frühgeburten steht an erster Stelle der vorzeitige Blasensprung, vor allem in Verbindung mit Infektionen. Aber auch idiopathische Kontraktionen, Mehrlingsschwangerschaften, zervikale Dysfunktion oder antepartale Blutungen können ursächlich sein. Als Gründe der vorzeitigen Geburtseinleitung oder einer Sectio caesaria werden Hypertonie, Präeklampsie, Diabetes oder IUGR in der Literatur genannt. In den Industrieländern sind

iatrogene Entbindungen für die Hälfte der Geburten zwischen der 25. und 38. SSW verantwortlich [113, 49, 48].

Die Frühgeburtslichkeit hat also eine multifaktorielle Ätiologie, die auch mit dem Gestationsalter korreliert: durch Infektionen bedingte Entzündungen (22-32. Woche); deziduale Blutungen, verursacht durch uteroplazentare Thrombosen (frühe oder späte Frühgeburt); uterine Überdehnung durch Mehrlinge (32-36. SSW). Zervixinsuffizienz, Nikotinkonsum und systemische Infektionen zählen zu weiteren möglichen Ursachen [49].

Risikofaktoren für eine spontane Frühgeburt sind die schwarze Rasse, Parodontalerkrankungen, ein niedriger maternaler BMI, eine kurze Zervixlänge und eine erhöhte Fibronectinkonzentration im fetalen Zervix- oder Vaginalsekret, aber auch vor allem in Industriestaaten das ansteigende Alter der Mütter sowie Mehrlingsschwangerschaften [48, 6].

Noch unreife Kinder können sich postnatal durch gehäuftes Auftreten von respiratorischen Insuffizienzen, Temperaturregulationsschwierigkeiten, Hypoglykämien, Apnoen, Krampfanfälle, intrakranielle Blutungen, nekrotisierende Enterokolitis, Fütterstörungen und Rehospitalisierung auszeichnen [96, 94, 125]. Vermehrt kommen auch Lernbehinderungen, infantile Zerebralpareesen oder sensorische Defizite vor [6].

Die mit der Frühgeburt assoziierte Morbidität, die sich häufig auf das spätere Leben ausdehnt, führt zu einem enormen physischen, psychologischen und ökonomischen Aufwand [6]. Daher ist das Interesse in der Vorhersage der Frühgeburtswahrscheinlichkeit groß, um so möglicherweise frühzeitig therapeutischen intervenieren zu können und die Schwangerschaft zu prolongieren.

In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ein frühes Entbindungsalter mit einer hohen Färbeintensität von c-Met in der Frühschwangerschaft einhergeht.

Eine relevante Frühgeburtslichkeit mit schlechterem Outcome wird heutzutage im klinischen Alltag bei einer Geburt unter der 34. SSW bzw. sogar teilweise unter der 32. SSW angesehen. In unseren Untersuchungen war jedoch die Fallzahl zu gering, so dass die Grenze bei der 37. SSW gezogen werden musste.

Hierzu wurde das Entbindungsalter in verschiedene Gruppen (<25. SSW, 25.-37. SSW, 37.-40. SSW, >40. SSW) eingeteilt und die c-Met-Expression unter diesen miteinander verglichen. Es zeigte sich im Rahmen der digitalen Bildauswertung signifikante Intensitätsunterschiede der Gesamtfläche der großen Zotten zwischen einem Entbindungsalter von <25. SSW (sieben Fälle) und 37.-40. SSW ($p = 0,038$) bzw. >40. SSW ($p = 0,04$).

Wir führten ROC-Analysen (Receiver Operating Characteristics) durch, um zu evaluieren, ob sich die c-Met-Färbeintensität als diagnostischen Test eignet. Ebenso errechneten wir Sensitivität, Spezifität, positive und negative Likelihood Ratio und das Relative Risiko.

Im Rahmen der Untersuchung des Entbindungsalters (<25. SSW versus >25. SSW) in Bezug auf den Bildanalyse-Score der gesamten großen Zottenfläche ermittelten wir für den AUC einen Wert von 0,737 und einen optimalen Trennpunkt bei 112,85. Die Sensitivität beträgt 71,43% bei einer Spezifität von 72,18%. Wir errechneten ein relatives Risiko von 5,83. Zusammen mit einer positiven Likelihood-Ratio von 2,57 und einer negativen Likelihood-Ratio von 0,40 spricht dies für eine mäßige Güte des Tests. Insgesamt bedeutet der Test aber, dass ab einem Wert von über 112,85 im Bildanalyse-Score das relative Risiko für eine Frühgeburt 5,8fach erhöht ist.

Denkbar für das erhöhte Vorkommen des Rezeptors c-Met bei Kindern mit einem früheren Entbindungsalter wäre eine kompensatorische Hochregulation desselbigen. Denn in mehreren Studien wurde vermutet, dass die MET-Tyrosinkinase ein Sensor für ungünstige Umgebungsbedingungen, wie zum Beispiel für Zellhypoxie ist und so positiv eingreifen kann. Und je höher der Bedarf ist, desto mehr c-Met muss vorhanden sein, um einen Idealzustand anzustreben.

Es konnten im konventionellen Scoring sowie in den übrigen Berechnungen des Bildanalysescores keine signifikanten Unterschiede festgemacht werden.

Auch im Vergleich zwischen der <37. SSW (frühgeboren) und der >37.SSW (termingerecht geboren) wurden keine Signifikanzen ermittelt.

Wir stellten eine fehlende Konkordanz zu den Werten aus der Berechnung des Biparietalen Durchmessers (BPD), also des Querdurchmesser des kindlichen

Kopfes im Mutterleib, fest. Im Bildanalyse-Score zeigt sich, dass mit steigender Intensität der BPD zunimmt (siehe Kapitel 3.3.9.1). Der Kopfumfang der geborenen Kinder jedoch scheint sich in die entgegengesetzte Richtung zu entwickeln ohne statistische Signifikanz. Und auch das mütterliche Alter zeigt Parallelen zur Frühgeburtlichkeit. Mit steigendem Alter zum Zeitpunkt der CVS nimmt auch die c-Met-Expression zu (siehe Kap. 3.4.1). Dieses Ergebnis ist also vereinbar mit der Frühgeburtlichkeit. Hier wären weitere Studien denkbar, um zu klären, welcher Mechanismus hinter der altersabhängigen Expression von c-Met steckt und welcher Zusammenhang zur Frühgeburtlichkeit besteht.

4.2.4 C-Met und Wachstumsretardierung sowie Hypertrophie

Als intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) wird eine pränatale Entwicklungsstörung verstanden, bei der der Fetus sein Wachstumspotential nicht voll ausschöpft. Die zahlreichen zugrunde liegenden Ursachen werden unterteilt in fetale, maternale und plazentare Ursachen. Zu den fetalen Ursachen zählen Chromosomenaberrationen, Infektionen, kindliche Stoffwechselerkrankungen und embryonale Fehlbildungen [97]. Maternale Erkrankungen wie chronische Hypertonie, Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen, Substanzabusus oder Autoimmunerkrankungen der Mutter können ebenfalls eine IUGR verursachen. Die häufigste Ätiologie für eine IUGR ist jedoch plazentar zu finden (Chorionangiom, Plazentainfarkt, Plazenta circumvallata, plazentare Mosaikbildung und die obliterierende Vaskulopathie des plazentaren Bettes etc.) [71].

Bestandteil des Monitorings bei plazentar bedingter IUGR sollte die Dopplerflussuntersuchung der Arteria umbilicalis, CTG, sonographische Fruchtwassermessung und die Zählung der fetalen Bewegungen sein [71].

Die Prävalenz beträgt 8% in der Allgemeinbevölkerung und es konnte gezeigt werden, dass 52% der Totgeburten mit der IUGR assoziiert sind und 10% der perinatalen Mortalität eine Konsequenz der IUGR ist [71, 95].

Die IUGR ist mit einem ansteigenden Risiko für eine Totgeburt, den neonatalen Tod, und einem niedrigen Apgar-Score assoziiert. Außerdem geht die intrauterine Wachstumsretardierung mit einer signifikant erhöhten Morbidität

einher, so dass diese Kinder im weiteren Verlauf an metabolischen (Hypoglykämie, Dislipidämie), hämatologischen (erhöhte Zellzahl von kernhaltigen roten Blutkörperchen) oder kardiovaskuläre Beschwerden (Hypotonie) leiden können.

Untersuchungen zu intrauterinen Wachstumsretardierung (IUGR) in Verbindung mit der c-Met/HGF-Expression sind bislang wenig publiziert worden, wie auch zur c-Met-Expression im Hinblick auf die Hypertrophie des Feten.

Somerset et al. (1997) entdeckten durch Untersuchungen an Knockoutmäusen, dass die Abwesenheit des HGF oder seines Rezeptors zum intrauterinen Fruchttod führt, induziert durch eine schwere IUGR mit einer defizienten Plazenta. Die Expression von HGF und c-Met beziehungsweise deren mRNA in Chorionzotten ist bei IUGR-Schwangerschaften im dritten Trimenon unter Verwendung der Immunhistochemie, aber auch des Northern Blots reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe [104, 106].

In einer weiteren Studie zur Expression des c-Met-Liganden HGF in Plazenten bei IUGR zeigten Baykal et al. (2005), dass bei 94,4% der wachstumsretardierten Feten im dritten Trimenon und nur bei 16,7% der Kontrollgruppe eine Überexpression von c-Met zu finden waren. Aus diesem signifikanten Ergebnis schlussfolgerten sie, dass eine Deregulierung der Interaktion von HGF und dem Rezeptor c-Met während der Plazentation bedingt durch die beeinträchtigte placentare Funktion eine mögliche Ursache für die Wachstumsretardierung des Fetus sein könnte [5].

Unsere Studien beinhaltet zum ersten Mal die Wachstumsabhängigkeit von c-Met im ersten Trimenon. In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die hypotrophen (<5. Perzentile, Fallzahl 17) und hypertrophen (>95. Perzentile, Fallzahl 14) Feten im Vergleich zu den normotrophen Kindern (Fallzahl 118) mit einem vermehrten placentaren Vorkommen von c-Met korrelieren.

Da HGF und c-Met eine bedeutende Rolle in der Plazentaorganogenese spielen (siehe Kapitel 1.3.6), könnte eine Über- oder Unterexpression auch eine Rolle für die Größenentwicklung des Feten spielen. Wie auch Baykal et al.

festgestellt haben, könnte dies für unsere Arbeit bedeuten, dass eine Überexpression von c-Met eine mögliche Konsequenz aus der Dysregulierung der Interaktion von HGF und c-Met sein könnte oder eine Hochregulation des Rezeptors durch ein erniedrigtes HGF. Im Falle der hypertrophen Kinder könnte ein erhöhtes c-Met bereits initial vorhanden gewesen sein und dies die Erklärung für die Hypertrophie geben.

Als signifikant erwies sich im konventionellen Auswertverfahren der Unterschied zwischen der 5.- 95. Perzentile und >95. Perzentile im Zytotrophoblasten der großen Zotten mit einem p-Wert von 0,034.

Für das Integral unter der Winkelhalbierenden lässt sich ein Wert von 0,631 ermitteln. Mit einer sehr hohen Sensitivität von 100%, jedoch einer geringen Spezifität von 11,71% sowie einem positiven und negativen Likelihood-Quotient von 1,13 und 0,00 bei einem optimalen Trennpunkt von 2,67 ist dieser Test nicht einwandfrei. An diesem Trennpunkt also mit der Kategorie „stark gefärbt“ im konventionellen Score ist das relative Risiko für eine Schwangere, ein hypertrophes Kind zu bekommen fast dreifach erhöht.

Im Bildanalysescore wiesen die kleinen Zotten der hypertrophen Kinder eine stärkere c-Met-Markierung auf als die Zotten bei normotrophen und hypotrophen Kindern. Die digitale Bildanalyse ergab in dieser Arbeit zwar keine signifikanten Ergebnisse, jedoch lag eine ähnliche Tendenz wie in der konventionellen Auswertung vor.

Zu vermuten ist also, dass Plazenten in der Frühschwangerschaft mit einem hohen c-Met-Gehalt mit dem Outcome hypertropher Kinder assoziiert sind.

Bei den hypotrophen Feten könnte die Ursache für das hohe c-Met-Vorkommen eine Art Regulationsmechanismus sein. Das Fehlen von HGF könnte die Hochregulation der Rezeptoren (c-Met) induzieren. Um diese Hypothese zu untersuchen, wäre eine Studie dieser Art jedoch mit Erweiterung um die HGF-Expression wünschenswert.

4.2.5 C-Met und Ausgang der Schwangerschaft

Die Schwangerschaftsausgänge wurden in dieser Arbeit unterteilt in die Lebendgeburten, Totgeburten (IUFT), spontane Aborte und induzierte Aborte.

Wobei die induzierten Aborte, also die Schwangerschaftsabbrüche auf Grund unklarer Indikationen nicht berücksichtigt und die Totgeburten mit den spontanen Aborten zusammen gefasst wurden. In Deutschland wurden im Jahre 2008 682.514 Lebendgeburten, 2.412 Totgeburten [108], 10.550 Spontanaborte [109] und 114.484 induzierte Aborte gezählt. Die Gründe für die induzierten Abbrüche beruhen in 97,4% auf dem Hintergrund der Beratungsregel (111.474 im Jahr 2008 in der BRD), eine kriminologische Indikation hatten 0,02% und nur 2,6% sind medizinisch indiziert gewesen [109]. Eine der wichtigsten Methoden zur Diagnosefindung des Spontanabortes ist neben der β -HCG-Bestimmung im Blut der Mutter [89, 2] der Ultraschall [88] zum Nachweis kindlicher Vitalitätszeichen.

Bislang ist es aber immer noch ein Problem, das Risiko eines spontanen Abortes in der Frühschwangerschaft oder einer Totgeburt genau zu ermitteln und zu quantifizieren. Daher war es auch in dieser Studie das Ziel nach einem Marker für ein möglicherweise erhöhtes Risiko eines Spontanabortes oder eines IUFT zu suchen.

Erstmals konnten wir durch unsere Untersuchungen den Hinweis liefern, dass die c-Met-Expression in Chorionzotten der Frühschwangerschaft bei Lebendgeborenen im Gegensatz zu IUFT oder spontanen Aborten geringer ist. Dieser Sachverhalt lässt sich ebenfalls aufgrund der Funktion von c-Met als Sensor für ungünstige Umgebungsbedingungen erklären. Vermutlich steigt die Expression des Rezeptors von c-Met bei Bedarf, also in Mangelsituationen an, um somit eine Verbesserung des Zustandes zu erzielen.

Wir erhielten sehr signifikante Werte im Rahmen der digitalen Bildanalyse der großen Zotten im Kompartiment Stroma ($p=0,01$), aber auch in der gesamten Zotte ($p=0,03$).

Das Integral unter der ROC-Kurve für das Bildanalyseverfahren der Gesamtfläche der großen Zotten ergibt ein Wert von 0,68. Bei einem optimalen Cut-off-point von 96,97 beträgt die Sensitivität 63,64% und die Spezifität 64,71%. Der positive und negative Likelihood-Quotient weisen Werte von 1,80 und 0,56 auf und das relative Risiko errechneten wir auf 2,85. Das relative

Risiko für einen negativen Schwangerschaftsausgang ist demnach für eine Mutter, bei der die Färbeintensität im Bildanalyse-Score der gesamten großen Zotten von über 96,97 festgestellt wird, 2,85fach erhöht.

Ähnliche Ergebnisse liefert der Bildanalyse-Score des Stromas der großen Zotten. Hier ergab sich ein idealer Trennpunkt bei 67,52. Mit einer Sensitivität von 67,65% und einer Spezifität von 54,55%, sowie einer positiven und negativen Likelihood-Ratio von 1,69 und 0,67 bieten diese Werte ein Testverfahren gleicher Güte, wie bei der Zottengesamtfläche. Das Integral unter der Winkelhalbierenden misst 0,716 und spricht für eine akzeptable Güte des Diagnoseverfahrens. Eine Mutter mit einer c-Met-Intensität im Stroma der großen Zotte von über 67,62 im Bildanalyse-Score hätte ein 2,28fach erhöhtes relatives Risiko.

Die relativ geringen positiven Likelihood-Ratios von 1,80 und 1,69 weisen darauf hin, dass die Qualität dieser Tests nicht optimal ist. Ein optimaler Test sollte einen Wert von über 3 haben, ein exzellenter Test einen Wert von über 10 [58].

Trotz der insgesamt relativ geringen Güte dieses Testverfahrens, ist die c-Met-Expression möglicherweise in Kombination anderer Test ein wichtiger Parameter für ein erhöhtes Risiko spontaner Aborte oder Totgeburten. Die c-Met-Expression könnte dann aber nur im Rahmen einer aus einem anderen Grund indizierten CVS bestimmt werden, da die Risiken für eine alleinige c-Met-Bestimmung mittels CVS zu hoch wären.

4.2.6 C-Met und chromosomale Anomalien

Genetische Defekte der Zygote, wie Chromosomenaberrationen sind die häufigste Ursache für eine Fehlentwicklung des Embryos und für die spontane Fehlgeburt. Chromosomale Aberrationen verursachen wahrscheinlich eine Änderung in der Plazentamorphologie und ihrer Funktion (wie zum Beispiel in Größe, Form, Vaskularisierung und Trophoblasteneinwanderung). Sie wirken möglicherweise auf den Grad der Zellproliferation oder den programmierten Zelltod (Apoptose) während der Chorionzotendifferenzierung ein [93]. Ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von c-Met in den Chorionzotten

und der chromosomalen Anomalien beziehungsweise dem Karyotyp findet bisher in der Literatur keine Erwähnung.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass die Chorionzotten auffälliger Karyotypen eine geringere c-Met-Expression aufweisen, als Feten mit einem unauffälligen Karyotyp. Wir konnten erstmals zum Teil sogar hoch signifikante Unterschiede für beide Auswertverfahren darstellen. Im Bildanalyse-Score ließen sich hoch signifikante Werte für den Zytotrophoblasten der großen und kleinen Zotten (PunktescoreCTB_GR: $p=0,006$; PunktescoreCTB_KL: $p=0,005$) errechneten. Aber auch der Synzytotrophoblast lieferte signifikante Werte (PunktescoreSCTB_GR: $p=0,045$; PunktescoreSCTB_KL: $p=0,029$).

Die Ursache für die verringerte c-Met-Expression bei Schwangerschaften mit chromosomal auffälligen Feten in den Trophoblasten können durch uns nicht sicher dargestellt werden. Als Erklärung könnte eine verminderte Genexpression von c-Met möglicherweise durch Beeinflussung auf Grund der Chromosomenstörung in Frage kommen. Das würde auch dazu passen, dass Feten mit einer Chromosomenstörung eher zu Aborten oder IUFT neigen [90, 17], hier jedoch eine Hochregulation von c-Met nicht möglich ist. Nahezu 50-60% aller Spontanaborte weisen laut Pauer et al.

Chromosomenaberrationen auf [90]. In unserer Studie wurden für die Untersuchung des Schwangerschaftsausganges schließlich nur karyotypisch unauffällige Schwangerschaften mit eingeschlossen, um eine BIAS zu verhindern, so dass hier keine ähnlichen Werte zu erwarten wären.

Allerdings erweist sich in der ROC-Analyse der Bildanalyse-Score für den Zytotrophoblasten (große Zotten) als nicht ganz optimales Testverfahren. Die Fläche unter der ROC-Kurve misst 0,735, die Sensitivität und Spezifität kommen bei einem optimalen Cut-off-Punkt von 131,92 auf Werte von 72,22% und 63,64%. Der positive und negative Likelihood-Quotient werden auf 1,99 und 0,44 errechnet und das Relative Risiko auf 3,88.

Das relative Risiko ist demnach 3,88fach erhöht, wenn bei einer Schwangeren im Bildanalyse-Score des CTB der großen Zotten eine Intensität unter 131,92 festgestellt würde.

Aus dem konventionellen Score lässt sich für den Zytotrophoblasten der großen Zotten $p=0,039$ und für die gesamte Zottenfläche der kleinen Zotten $p=0,042$ ermitteln. Für den konventionellen Score der kleinen Zottengesamtfläche im Hinblick auf den Karyotyp können in der ROC-Analyse keine vergleichbaren Werte wie im Bildanalyse-Score bestimmt werden. Der AUC beträgt in diesem Fall 0,633 und der optimale Trennpunkt liegt bei 2,87. Die Sensitivität hat sich auf 5,56% verringert, die Spezifität dagegen auf 85,53% erhöht. Der positive Likelihood-Quotient mit 0,38 und der negative Likelihood-Ratio mit einem Wert von 1,10 zeigen den Unterschied zum Bildanalyse-Score. Wenn die kleinen Zotten in die Kategorie „mittelstark gefärbt“ einsortiert werden, bedeutet dies ein 0,38fach erhöhtes relatives Risiko der Schwangeren ein Kind mit einem auffälligen Karyotyp auszutragen.

Dieser Test wäre jedoch nur aus akademischen Interesse zur Erfassung der Risikoerhöhung für chromosomale Anomalien neben der Bestimmung der Nackentransparenz und der Karyotypisierung denkbar, zumal die Karyotypisierung ohnehin schon aus dem Material der CVS durchgeführt wird. Die Nackentransparenz zeigt im Hinblick auf die Expression von c-Met leider keine signifikanten Werte, so dass man dieses Ergebnis nicht durch eine erniedrigte c-Met-Intensität bei einer erhöhten Nackentransparenz unterstützen kann.

4.2.7 C-Met und mütterliche Einflussfaktoren

Unter den mütterlichen Faktoren spielt in unserer Arbeit insbesondere das mütterliche Alter eine bedeutende Rolle. Das höhere Alter der Frau kann neben der verminderten Fruchtbarkeit einhergehen mit einer erhöhten Rate an chromosomalen Anomalien aber auch spontanen Frühaborten, Totgeburten und der perinatalen sowie maternalen Mortalität [42, 68, 121]. Das Risiko für Gestationsdiabetes, Hypertonie, Beckenendlage, Plazenta praevia und SGA sind ebenfalls erhöht [60].

Im Durchschnitt waren die Frauen zum Zeitpunkt der Chorionzottenbiopsie 34,95 Jahre alt und da ab dem 35. Lebensjahr eine Schwangerschaft als Risikoschwangerschaft gewertet wird [32, 68], haben wir in dieser Studie den

Cut-off an dieser Altersgrenze gesetzt und erhielten signifikante Ergebnisse in beiden Auswertverfahren. Die Zotten der über 35-Jährigen zeigen eine höhere Färbeintensität, als die Zotten der jüngeren Schwangeren. Charakteristische Unterschiede konnten in beiden Auswertmethoden besonders in den Zytotrophoblasten der großen und kleinen Zotten nachgewiesen werden.

In der Literatur finden sich bislang keine Daten zum Vorkommen von c-Met in Verbindung mit dem Alter der Mutter in der Frühschwangerschaft, so dass in dieser Arbeit erstmals dieser Zusammenhang untersucht wurde.

Auch hier könnte als Ursache für die erhöhte Konzentration von c-Met ein ungünstiger Umgebungszustand mit Zellhypoxie in Frage kommen, der zur Hochregulation des Rezeptors und somit zur Optimierung der Bedingungen führt.

Die Ergebnisse des mütterlichen Alters in Korrelation zur Expression von c-Met passen zu den Ergebnissen des Schwangerschaftsausganges. Denn in beiden ungünstigen Fällen (hohes Alter und Abort/IUFT) erhalten wir eine erhöhte Expression von c-Met, welches beispielsweise durch eine Hochregulation im Rahmen eines Feedbackmechanismus zu erklären ist. Wie bereits erwähnt fällt ein auffälliger Karyotyp dabei aus dem Rahmen, allerdings könnte die Minderexpression von c-Met hier genetisch bedingt und damit der Feedbackmechanismus möglicherweise eingeschränkt sein.

Die beiden anderen mütterlichen Faktoren Nikotinkonsum und Alkoholkonsum während der Schwangerschaft zeigen keinen Unterschied in der c-Met-Expression.

4.3 Zusammenfassung und Beurteilung dieser Studie

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Expression von c-Met in Chorionzotten nach Chorionzottenbiopsie in der Frühschwangerschaft mittels immunhistochemischer Färbung und damit verbunden erstmals die Analyse und Darstellung des Zusammenhanges der Expressionsstärke mit dem Outcome der Schwangerschaften, um so der Möglichkeit, c-Met als

pränataldiagnostischen Marker besonders für Frühgeburtlichkeit oder Wachstumsretardierung einsetzen zu können, nachzugehen.

Der Umfang dieser Studie umfasste 183 Chorionzottenpräparate, die immunhistochemisch mit einem c-Met-Antikörper gefärbt wurden. Nach mikroskopischer Betrachtung wurde die Färbeintensität durch zwei verschiedene Analyseverfahren (konventioneller Färbescore mittels drei unabhängiger Untersucher und digitales Bildanalyseverfahren) ermittelt. Mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS wurden die Ergebnisse mit den Daten der Probandinnen und deren Kinder korreliert.

In unseren Untersuchungen ließ sich der Rezeptor c-Met in allen Chorionzotten der Frühschwangerschaft nachweisen. Er wird vermehrt in den Trophoblasten, besonders in den Zytotrophoblasten, aber auch in den Kernen des Stromas exprimiert.

Die Tabelle 13 gibt einen orientierenden Überblick über die Ergebnisse dieser Arbeit.

	c-Met ↓	c-Met ↑
Entbindungsalter	> 25.SSW	< 25.SSW
Perzentile	5-95.	> 95. (<5.)
Karyotyp	auffällig	unauffällig
Ausgang	lebend	Aborte/IUFT
Kopfumfang	> 33cm	< 33cm
BPD	↓	↑
Femurlänge	↔	↔
SSL	↔	↔
Nackentransparenz	↔	↔
Kindslänge	↔	↔
Mütterliches Alter	↓	↑

Tabelle 13: Überblick der Ergebnisse

Eine signifikant höhere c-Met-Expression lässt sich im Rahmen der digitalen Bildauswertung für die Gesamtfläche der großen Zotten bei einem Entbindungsalter von <25. SSW im Vergleich zu den termingerecht geborenen

Kindern nachweisen. Unsere Auswertung ergab, dass ab einem Wert von über 112,85 im Bildanalyse-Score das relative Risiko für eine Frühgeburt 5,8fach erhöht ist.

Der Zytotrophoblast der großen Zotten lieferte im konventionellen Scoring signifikant erhöhte c-Met-Vorkommen für die hypertrophen Kinder (>95. Perzentile) im Gegensatz zu den normotrophen Kindern.

Das relative Risiko ist für eine Schwangere mit der Kategorie „stark gefärbt (Trennpunkt von 2,67) im konventionellen Score, ein hypertrophes Kind zu bekommen, fast dreifach erhöht.

Aufgrund mangelnder Relevanz der Hypertrophie im Gegensatz zur Hypotrophie scheint der klinische Nutzen dieses Diagnoseverfahrens jedoch eingeschränkt zu sein.

Ein weiterer statistisch sehr signifikanter Unterschied ergibt sich durch die computergestützte Auswertung der c-Met -Intensität beim Vergleich der unkomplizierten Ausgänge (Lebendgeborenen/gewollte Schwangerschaftsabbrüchen) mit den komplizierten Ausgängen (Totgeburten/spontanen Aborten). Die unkomplizierten Schwangerschaftsausgänge weisen dabei eine statistisch wesentlich geringere c-Met -Expressionsstärke auf, als die komplizierten Ausgänge. Das relative Risiko für einen negativen Schwangerschaftsausgang ist nach unseren Berechnungen für eine Mutter, bei der die Färbeintensität im Bildanalyse-Score der gesamten großen Zotten von über 96,97 festgestellt wird, 2,85fach erhöht.

Die Chorionzotten bei Kindern mit chromosomalen Anomalien zeigen in beiden Auswertverfahren eine zum Teil statistisch sogar sehr signifikant geringere c-Met -Expression als die Zotten eines unauffälligen Karyotyps.

Aus dem Bildanalyse-Score des CTB der großen Zotten beispielsweise lässt sich errechnen, dass das relative Risiko 3,88fach erhöht ist, wenn bei einer Schwangeren eine Intensität unter 131,92 festgestellt würde

Für den konventionellen Score als auch für den Bildanalysescore ergeben sich im Hinblick auf das mütterliche Alter zum Zeitpunkt der CVS statistische Signifikanzen. Die Zotten der über 35-Jährigen zeigen eine höhere Färbeintensität, als die Zotten der jüngeren Schwangeren.

Durch diese Ergebnisse könnte die immunhistochemische Bestimmung der c-Met-Expression in humanen Chorionzotten der Frühschwangerschaft im Rahmen der pränataldiagnostischen Untersuchungen in Kombination anderer Methoden in Betracht gezogen werden, um möglicherweise Ansätze als prädiktiven Aussagewert für Frühgeburtlichkeit, Schwangerschaftsausgang oder chromosomalen Anomalien zu schaffen. Da allerdings die Immunhistochemie als klinisches Testverfahren aufgrund der schwierigen Quantifizierung nicht umsetzbar ist, wäre zu prüfen, ob c-Met im Blut der Mutter bestimmt werden kann. Im positiven Falle könnte man vielleicht in Verbindung weiterer Parameter die c-Met-Bestimmung als prädiktiven Test etablieren.

5 Literaturverzeichnis

1. Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S (2003) *Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis*. Cochrane Database Syst Rev 2003; (3): CD003252
2. Al-Sebai MA, Diver M, Hipkin LJ (1996) *The role of a single free beta-human chorionic gonadotrophin measurement in the diagnosis of early pregnancy failure and the prognosis of fetal viability*. Hum Reprod. 1996 Apr;11(4):881-8.
3. Annen K, Nojima T, Hata Y, Uchino J, Tanaka S, Matsuda M, Tahara E, Nagashima K (1995) *Analysis of the hepatocyte growth factor receptor in regeneration and oncogenesis of the liver*. Gen Diagn Pathol 141: 179-186
4. Bakketeig LS (1998) *Current growth standards, definitions, diagnosis and classification of fetal growth retardation*. Eur J Clin Nutr. 1998 Jan;52 Suppl 1:S1-4.
5. Baykal C, Güler G, Al A, Tulunay G, Ozer S, Yencilek R, Bülbül D, Ayhan A (2005) *Expression of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Receptor in IUGR Fetuses' Placentas: An Immunohistochemical Analysis*. Fetal Diagn Ther. 2005 Jul-Aug;20(4):249-53.
6. Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, Rubens C, Menon R, Van Look PF (2010) *The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity*. Bull World Health Organ. 2010 Jan;88(1):31-8. Epub 2009 Sep 25.
7. Becker V, Schiebler TH, Kubli F (1981) *Die Plazenta des Menschen*. In: Diedrich K (Hrsg) Gynäkologie und Geburtshilfe, Springer. Berlin Heidelberg, 2000, S.133-137
8. Beliën J A, S Somi, J S de Jong, P J van Diest, and J P Baak (1999) *Fully automated microvessel counting and hot spot selection by image processing of whole tumour sections in invasive breast cancer*. J Clin Pathol. 1999 March; 52(3): 184–192.
9. Benacerraf BR (2010) *The history of the second-trimester sonographic markers for detecting fetal Down syndrome, and their current role in obstetric practice*. Prenatal Diagnosis, 30: 644–652.
doi: 10.1002/pd.2531

10. Bennett MJ (1972) *The technique and complications of amniocentesis*. S Afr Med J. 1972 Oct 14;46(41):1545-8.
11. Benirschke, K. and P. Kaufmann (1995) *Early Development of the Human Placenta*, in *Pathology of the human placenta*. 1995, Springer-Verlag: New York. p. 49-56.
12. Benirschke, K. and P. Kaufmann (1995) *Characterization of Developmental Stages*, in *Pathology of the Human Placenta*. 1995, Springer-Verlag: New York. p. 151-166
13. Benirschke, K. and P. Kaufmann, *Architecture of Normal Villous Trees*, in *Pathology of the Human Placenta*. 1995, Springer-Verlag: New York. p. 116-150.
14. Blumberg BD, Golbus MS, Hanson KH (1975) *The psychological sequelae of abortion performed for a genetic indication*. Am J Obstet Gynecol. 1975 Aug 1;122(7):799-808.
15. Blumenfeld YJ, Chueh J (2010) *Chorionic villus sampling: technique and training*. Curr Opin Obstet Gynecol. 2010 Apr;22(2):146-51.
16. Boccaccio C, Comoglio PM (2006) *Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells*. Nat Rev Cancer. 2006 Aug;6(8):637-45.
17. Brown S (2008) *Miscarriage and its associations*. Semin Reprod Med. 2008 Sep;26(5):391-400. Epub 2008 Sep 29.
18. Brumback BA, Cook RJ, Ryan LM (2000) *A meta-analysis of case-control and cohort studies with interval-censored exposure data: application to chorionic villus sampling*. Biostatistics. 2000 Jun;1(2):203-17.
19. Bundesministerium für Gesundheit, Gesetz über genetische Untersuchungen bei Menschen (Gendiagnostikgesetz – GenDG) vom 31.7.2009, Bundesgesetzblatt Jahrgang 2009 Teil I Nr.50, ausgegeben zu Bonn am 4. August 2009
20. Burton BK, Schulz CJ, Burd LI (1992) *Limb anomalies associated with chorionic villus sampling*. Obstet Gynecol. 1992 May;79(5 (Pt 1)):726-30.
21. Campbell S, Wilkin D (1975) *Ultrasonic measurement of fetal abdomen circumference in the estimation of fetal weight*. Br J Obstet Gynecol 1975; 82:689-697

22. Canadian Collaborative CVS-Amniocentesis Clinical Trial Group (1989) Multicentre randomised clinical trial of chorion villus sampling and amniocentesis. First report. *Lancet*. 1989 Jan 7;1(8628):1-6
23. *Canadian Guidelines for prenatal diagnosis – Techniques of prenatal diagnosis*. Prenatal diagnosis committee of the Canadian College of medical Geneticists (CCMG), Genetics Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada (SOGC) JOGC Clinical Practice Guidelines No.105, July 2001
24. Canick JA, MacRae AR (2005) *Second trimester serum markers*. *Semin Perinatol*. 2005 Aug;29(4):203-8.
25. CEMAT Group (1998): *Randomised trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis*. The Canadian Early and Mid-Trimester Amniocentesis Trial (CEMAT) Group. *Lancet* 351:242, 1998
26. Centers for Disease Control and Prevention. Olney RS, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD, Edmonds LD, Botto LD (1995) *Chorionic villus sampling and amniocentesis: recommendations for prenatal counseling*. *MMWR Recomm Rep*. 1995 Jul 21;44(RR-9):1-12.
27. Chung J, Yoon SO, Lipscomb EA, Mercurio AM. (2004) *The Met receptor and alpha 6 beta 4 integrin can function independently to promote carcinoma invasion*. *J Biol Chem*. 2004 Jul 30;279(31):32287-93. Epub 2004 May 25.
28. Cicero S, Curcio P, Papageorghiou A, Sonek J, Nicolaides K (2001) *Absence of nasal bone in fetuses with trisomy 21 at 11–14 weeks of gestation: an observational study*. *Lancet*. 2001 Nov 17;358(9294):1665-7.
29. Clark DE, Smith SK, Sharkey AM, Sowter HM, Charnock-Jones DS (1996) *Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor c-met: localisation and expression in the human placenta throughout pregnancy*. *J. of Endocrinology* 151 (3): 459-467
30. Comoglio PM (1993) *Structure, biosynthesis and biochemical properties of the HGF receptor in normal and malignant cells*. *EXS* 65: 131-165
31. Coons AH, Creech HJ, Jones RN (1941) *Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group*. *Proc Soc Exp Biol Med* 47:200-202

32. De la Rochebrochard E, Thonneau P (2002) *Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study*. Hum Reprod. 2002 Jun;17(6):1649-56.
33. Daffos F, Capella-Pavlovsky M, Forestier F (1983) *Direct collection of fetal blood from the umbilical vein under echography. First results, prospects*]. Presse Med. 1983 Apr 9;12(16):1017
34. Di Renzo MF, Narshimhan RP, Olivero M, Bretti S, Giordano S, Medico E, Gaglia P, Zara P, Comoglio PM (1991) *Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues*. Oncogen 6: 1997-2003
35. Dokras A, Gradner L, Seftor EA, Hendrix M (2001) *Regulation of Human Cytotrophoblast Morphogenesis by Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor*. Biology of Reproduction 65, 1278-1288
36. Donald I, Macvicar J, Brown TG (1985) *Investigation of abdominal masses by pulsed ultrasound*. Lancet. 1985 Jun 7;1(7032):1188-95.
37. Duley, L (2003) *Pre-eclampsia and the hypertensive disorders of pregnancy*. Br Med Bull, 2003. 67: p. 161-76.
38. Dürig P, Raio L (2006) Fehlbildung und Management. In: Schneider H, Husslein P, Schneider KTM (Hrsg) Die Geburtshilfe. Springer, Heidelberg, 3. Aufl. S 133-157
39. European Study Group on Prenatal Diagnosis (2007). *Recommendations and protocols for prenatal diagnosis*. Carrera JM; Report of the European Association of Perinatal Medicine
40. Ferrara A, Hedderon MM, Quesenberry CP, Selby JV (2002) *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):1625-30.
41. Firth HV, Boyd PA, Chamberlain P, MacKenzie IZ, Lindenbaum RH, Huson SM (1991) *Severe limb abnormalities after chorion villus sampling at 56-66 days' gestation*. Lancet. 1991 Mar 30;337(8744):762-3.
42. Franz MB, Husslein PW (2010) *Obstetrical management of the older gravida*. Womens Health (Lond Engl). 2010 May;6(3):463-8.
43. Froster UG, Jackson L (1996) *Limb defects and chorionic villus sampling: results from an international registry, 1992-94*. Lancet. 1996 Feb 24;347(9000):489-94.

44. Gardosi J, Chang A, Kalyan B, Sahota D, Symonds EM (1992) *Customised antenatal growth charts*. Lancet 1992;339:283-287.
45. Gardosi J, Mongelli M, Wilcox M, Chang A (1995) *An adjustable fetal weight standard*. Ultrasound Obstet Gynecol 1995;6:168-174.
46. Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL (1992) *A review of premature birth and subclinical infection*. Am J Obstet Gynecol. 1992 May;166(5):1515-28.
47. Giordano S, Ponzetto C, Di Renzo MF, Cooper CS, Comoglio PM (1989) *Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-Met protein*. Nature 339: 155-156
48. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R (2008) *Epidemiology and causes of preterm birth*. Lancet 5;371(9606):75-84
49. Gravett MG, Rubens CE, Nunes TM, GAPPS Review Group (2010) *Global report on preterm birth and stillbirth (2 of 7): discovery science* BMC Pregnancy and Childbirth 2010, 10(Suppl 1):S2
50. Grube D. (2004) *Constants and variables in immunohistochemistry*. Arch Histol Cytol. 2004 Jun;67(2):115-34.
51. Hadlock FP, Harrist RB, Martinez-Poyer J (1991) *In utero analysis of fetal growth: a sonographic weight standard*. Radiology, 1991. 181(1): p.129-133
52. Hadlock FP, Harris RB, Sharman RS, Deter RL, Park SK (1985) *Estimation of fetal weight with the use of head, body and femur measurements - a prospective study*. Am J Obstet Gynecol 1985; 151:333-337.
53. Hahn S, Lapaire O, Tercanli S, Kolla V, Hösli I (2011) *Determination of fetal chromosome aberrations from fetal DNA in maternal blood: has the challenge finally been met?* Expert Reviews in Molecular Medicine 2011;13:e16
54. Hahnemann N. (1974) *Early prenatal diagnosis; a study of biopsy techniques and cell culturing from extraembryonic membranes*. Clin Genet. 1974;6(4):294-306.
55. Hahnemann N., Mohr J (1968) *Genetic diagnosis in the embryo by means of biopsy from extra-embryonic membrane*. Bull Eur Soc Hum Genet 1968;2:23-9.

56. Hughes FJ, McCulloch CA (1991) *Quantification of chemotactic response of quiescent and proliferating fibroblasts in Boyden chambers by computer-assisted image analysis*. J. Histochem. Cytochem. 1991 39: 243-246
57. Idikio HA (2009) *Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains*. Int J Clin Exp Pathol. 2009 Nov 25;3(2):169-76.
58. Jaeschke R, Guyatt G and Sackett DL. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. Are the results of the study valid? JAMA 1994; 271 (5):389-391.
59. Johansson A C, E Visse, B Widegren, H O Sjögren, Siesjö P (2001) *Computerized image analysis as a tool to quantify infiltrating leukocytes: a comparison between high- and low-magnification images*. J Histochem Cytochem. 2001 September; 49(9): 1073–1079.
60. Jolly M, Sebire N, Harris J, Robinson S, Regan L (2000) *The risks associated with pregnancy in women aged 35 years or older*. Hum Reprod. 2000 Nov;15(11):2433-7.
61. Kaczmarek E, Gorna A, Majewski P. (2004) *Techniques of image analysis for quantitative immunohistochemistry*. Roczn Akad Med Białymst. 2004;49 Suppl 1:155-8.
62. 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. S13-50.
63. Kauma S, Hayes N, Weatherford S (1997) *The Differential Expression of Hepatocyte Growth Factor and Met in Human Placenta*. Journal of Clinical Endocrinology 82, 3: 949-954
64. Kauma SW, Bae-Jump V, Walsh SW (1999) *Hepatocyte growth factor stimulates trophoblast invasion: a potential mechanism for abnormal placentation in preeclampsia*. J Clin Endocrinol Metab. 1999 Nov;84(11):4092-6.
65. Kazy Z, Rozovsky IS, Bakharev VA (1982) *Chorion biopsy in early pregnancy: A method of early prenatal diagnosis for inherited disorders*. Prenat Diagn 2:39-45
66. Kosanke G (1994) *Proliferation, Wachstum und Differenzierung der Zottenbäume der menschlichen Plazenta*. Diss 1994 Aachen, Techn. Hochsch., Verlag: Shaker

67. Kuliev, A., et al. (1994) *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.
68. Kuppermann M, Goldberg JD, Nease RF Jr, Washington AE. *Who should be offered prenatal diagnosis? The 35-year-old question*. *Am J Public Health*. 1999 Feb;89(2):160-3.
69. Lang G (2006) Fixierung. In: Lang B (Hrsg) *Histotechnik - Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*. Springer, Wien New York, 1. Aufl. S 39 -65
70. Lawn JE, Gravett MG, Nunes TM, Rubens CE, Stanton C; GAPPS Review Group. (2010) *Global report on preterm birth and stillbirth (1 of 7): definitions, description of the burden and opportunities to improve data*. *Lancet* 2010;375(9731):103-15.
71. Mandruzzato G, Antsaklis A, Botet F, Chervenak FA, Figueras F, Grunebaum A, Puerto B, Skupski D, Stanojevic M; WAPM (2008) *Intrauterine restriction (IUGR)*. *J Perinat Med*. 2008;36(4):277-81.
72. Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, Tretiakova MS, Nallasura V, Fox EA, Hansen M, Schaefer E, Naoki K, Lader A, Richards W, Sugarbaker D, Husain AN, Christensen JG, Salgia R. (2005) *Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer*. *Cancer Res*. 2005 Feb 15;65(4):1479-88.
73. Matsumoto, Nakamura (1993) *Roles of HGF as a pleiotropic factor in organ regeneration*. *EXS* 65: 225-249
74. Michalopoulos, Zarnegar (1992) *Hepatocyte growth factor*. *Hepatology* 15: 149-155
75. Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura A, Kondo J, Morimoto Y, Kitamura N. (1993) *Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII*. *J Biol Chem*. 1993 May 15;268(14):10024-8.
76. Mizuno K, Nakamura T (1993) *Molecular characteristics of HGF and the gene, and its biochemical aspects*. *EXS* 65: 1-29

77. Mohr J (1968) *Foetal genetic diagnosis: Development of techniques for early sampling of foetal cells*. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica, 73: 73–77.
78. Mongelli M, Figueras F, Francis A, Gardosi J (2007) *A customised birthweight centile calculator developed for an Australian population Australian and New Zealand*. Journal of Obstetrics and Gynaecology Volume 47, Issue 2, pages 128–131, April 2007
79. Monni G, Ibba RM, Zoppi MA (2010) *Prenatal Genetic Diagnosis through Chorionic Villus Sampling*. In: Milunsky A, Milunsky JM (Hrsg) Genetic Disorders and the Fetus. Wiley-Blackwell Oxford, UK. 6. Aufl. S160-193
80. Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L (1991) *Identification of a fibroblast-derived epithelial Morphogen as hepatocyte growth factor*. Cell 66: 901-908
81. Mujezinovic F, Alfirevic Z. (2007) *Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review*. Obstet Gynecol. 2007 Sep;110(3):687-94.
82. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S (1989) *Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor*. Nature. 1989 Nov 23;342(6248):440-3.
83. Nakamura T, Kanda S, Yamamoto K, Kohno T, Maeda K, Matsuyama T, Kanetake H (2001) *Increase in Hepatocyte Growth Factor receptor tyrosine kinase activity in renal carcinoma cells is associated with increased motility partly through phosphoinositide 3-kinase activation*. Oncogene 20: 7610-7623
84. Naldini L, Vigna E, Narshimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM (1991) *Hepatocyte Growth Factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-Met*. Oncogene 6: 501-504
85. Nicolaides K, Brizot Mde L, Patel F, Snijders R (1994) *Comparison of chorionic villus sampling and amniocentesis for fetal karyotyping at 10-13 weeks' gestation*. Lancet 1994 Aug 13;344(8920):435-9 PMID: 7914564
86. Nicolaides K (2004) *Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities*. American Journal of Obstetrics & Gynecology 2004 July191(1):45-67

87. Noll S, Schaub-Kuhnen S (2000) *Polyklonale Antikörper*. In: Höfler H, Müller K.-M. (Hrsg), *Praxis der Immunhistochemie*, Urban und Fischer, München Jena, 1. Aufl., S.2-3
88. Nyberg DA, Laing FC, Filly RA (1986) *Threatened abortion: sonographic distinction of normal and abnormal gestation sacs*. *Radiology*. 1986 Feb;158(2):397-400.
89. Osmanağaoğlu MA, Erdoğan I, Eminağaoğlu S, Karahan SC, Özgün S, Can G, Bozkaya H(2010) *The diagnostic value of beta-human chorionic gonadotropin, progesterone, CA125 in the prediction of abortions*. *J Obstet Gynaecol*. 2010 Apr;30(3):288-93.
90. Pauer HU, von Beust G, Bartels I (1999) *Zytogenetische Ursachen von Aborten, Übersicht über Inzidenz und Ätiologie*, *Reproduktionsmedizin* 15:124-132, Springer-Verlag
91. Prat M, Narsimhan RP, Crepaldi T, Nicotra MR, Natali PG, Comoglio PM (1991) *The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors*. *Int J Cancer*. 1991 Sep 30;49(3):323-8.
92. Prayer D, Brugger PC, Krampfl E (2006) *Indikationen zur fetalen Magnetresonanztomographie*. *Radiologe* 2006, 46:98-104
93. Qumsiyeh MB, Kim KR, Ahmed MN, Bradford W (2000) *Cytogenetics and mechanisms of spontaneous abortions: increased apoptosis and decreased cell proliferation in chromosomally abnormal villi*. *Cytogenet Cell Genet*. 2000;88(3-4):230-5.
94. Raju TN, Higgins RD, Stark AR, Leveno KJ (2006) *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.
95. Richardus JH, Graafmans WC, Verloove-Vanhorick SP, Mackenbach JP (2003) *Differences in perinatal mortality and suboptimal care between 10 European regions: results of an international audit*. *Br J Obstet Gynaecol*. 2003;110: 97–105.
96. Rushing S., Ment LR (2004) *Preterm birth: a cost benefit analysis*. *Semin Perinatol*. 2004 Dec;28(6):444-50.
97. Schwinger E, Gembruch U (2001) *Die intrauterine Wachstumsrestriktion. Einige chromosomale, genetische und exogene Ursachen*. *Gynäkologe* 34: 793 – 800

98. Scott F, Peters H, Boogert T, Robertson R, Anderson J, McLennan A, Kesby G, Edelman D. (2002) The loss rates for invasive prenatal testing in a specialised obstetric ultrasound practice. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2002 Feb;42(1):55-8.
99. Seidal T, Balaton AJ, Battifora H (2001) *Interpretation and quantification of immunostains.* *Am J Surg Pathol*, 2001. 25(9):1204-7.
100. Shiota G, Rhoads DB, Wang TC, Nakamura T(1992) *Hepatocyte growth factor inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 373-377
101. Simpson LL, Malone FD, Bianchi DW (2007) *Nuchal translucency and the risk of congenital heart disease.* *Obstet Gynecol.* 2007 Feb;109(2 Pt 1):376-83.
102. Smidt-Jensen S, Hahnemann N (1984) *Transabdominal fine needle biopsy from chorionic villi in the first trimester.* *Prenat Diagn.*1984 May-Jun;4(3):163-9.
103. Smidt-Jensen S, Philip J. (1991) *Comparison of transabdominal and transcervical CVS and amniocentesis: sampling success and risk.* *Prenat Diagn.* 1991 Aug;11(8):529-37.
104. Somerset DA, Afford SC, Strain AJ, Kilby MD (1997) *Fetal growth restriction an hepatocyte growth factor.* *Archives of Disease in Childhood* 1997;77:F244-F248
105. Somerset D, Ahmed A, Kilby M (1998) *The role of hepatocyte growth factor and its receptor, c-met, in placental development and fetal growth restriction.* *Trophoblast Research* 11:159-176
106. Somerset DA, Li XF, Afford S, Strain AJ, Ahmed A, Sangha RK, Whittle MJ, Kilby MD. (1998) *Ontogeny of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor (c-met) in human placenta: reduced HGF expression in intrauterine growth restriction.* *Am J Pathol.* 1998 Oct;153(4):1139-47.
107. Sompuram SR, Kodela V, Zhang K, Ramanathan H, Radcliffe G, Falb P, Bogen SA (2002) *A novel quality control slide for quantitative immunohistochemistry testing.* *J Histochem Cytochem.* 2002 November; 50(11): 1425–1434.
108. Statistisches Bundesamt: Lebendgeborene, Totgeborene, Gestorbene und Saldo der Lebendgeborenen und Gestorbenen (Primärquelle: Statistisches Bundesamt, Statistik der natürlichen Bevölkerungsbewegung.) In www.gbe-bund.de. Abrufdatum: 18.08.2010.

109. Statistisches Bundesamt: Schwangerschaftsabbrüche (Anzahl) (Primärquelle: Statistik der Schwangerschaftsabbrüche, Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn.) In www.gbe-bund.de. Abrufdatum: 18.08.2010.
110. Statistisches Bundesamt: Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 (Fälle, Pfl egetage, durchschnittliche Verweildauer) (Primärquelle: Krankenhausstatistik - Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern, Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn.) In www.gbe-bund.de. Abrufdatum: 18.08.2010.
111. Stauber M, Kästner R, Schramm T, Grubert T, Staiger HF (2001) *Untersuchungen in der Schwangerschaft: Genetische Beratung und pränatale Diagnostik*. In: Stauber M, Weyerstrahl Th: Duale Reihe – Gynäkologie und Geburtshilfe, Kapitel 3.10 , 1. Aufl. S 531-537
112. Steele MW, Breg WR Jr. (1966) *Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells*. Lancet. 1966 Feb 19;1(7434):383-5.
113. Steer P. (2005) *The epidemiology of preterm labour*. BJOG. 2005 Mar;112 Suppl 1:1-3.
114. Stojilkovic-Mikic T, Rodeck CH (2003) *Screening for chromosomal anomalies: first or second trimester, biochemical or ultrasound?* Ann Acad Med Singapore. 2003 Sep;32(5):583-8; quiz 588-9.
115. Tamsel S, Ozbek S, Demirpolat G. (2007) *Ultrasound evaluation of fetal chromosome disorders*. Diagn Interv Radiol. 2007 Jun;13(2):97-100.
116. Tariverdian G, Paul M (1999) *Genetische Diagnostik in Geburtshilfe und Gynäkologie*, Leitfaden für Klinik und Praxis, Springer, Berlin, S.293-299
117. Taylor CR, Levenson RM (2006) *Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II*. Histopathology. 2006 Oct;49(4):411-24.
118. Tietung Hosp of Anshan, Department Obstet Gynecol (1975) *Fetal sex prediction by sex chromatin of chorionic villi cells during early pregnancy*. Chin Med J 1:117-126
119. Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N (1995) *Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor*. Nature. 1995;373, 702 – 705;

120. Valenti C, Schutta EJ, Kehaty T.(1968) *Prenatal diagnosis of Down's syndrome*. Lancet. 1968 Jul 27;2(7561):220.
121. Van Katwijk C, Peeters LL. *Clinical aspects of pregnancy after the age of 35 years: a review of the literature*. Hum Reprod Update. 1998 Mar-Apr;4(2):185-94.
122. Vogel M (1992) *Atlas der morphologischen Plazentadiagnostik*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1992. Abbildung: Kap: Reifung der Plazenta S.5-27
123. Wald NJ, Huttly WJ, Hackshaw AK (2003) *Antenatal screening for Down's syndrome with the quadruple test*. Lancet. 2003 Mar 8;361(9360):835-6.
124. Wallenius V, Hisaoka M, Helou K, Levan G, Mandahl N, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Jansson JO (2000) *Overexpression of the hepatocyte growth factor (HGF) receptor (Met) and presence of a truncated and activated intracellular HGF receptor fragment in locally aggressive/malignant human musculoskeletal tumors*. Am J Pathol. 2000 Mar;156(3):821-9.
125. Ward RM, Beachy JC (2003) *Neonatal complications following preterm birth*. Bjog, 2003. 110 Suppl 20: p. 8-16.
126. Walker RA. (2006) *Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I*. Histopathology. 2006 Oct;49(4):406-10. Review.
127. Welsch U, Sobotta J (2005) *Präparatherstellung*. In: Welsch U (Hrsg), Sobotta Lehrbuch Histologie (Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie) Elsevier, Urban und Fischer, München Jena, 2. Aufl., S.4-9
128. Welsch U, Sobotta J (2005) *Schnitte und Färbungen*. In: Welsch U (Hrsg), Lehrbuch Histologie (Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie) Elsevier, Urban und Fischer, München Jena, 2. Aufl., S.5-9
129. Wieacker P, Steinhard J (2011) *Pränataldiagnostik genetischer Erkrankungen*. *The Prenatal Diagnosis of Genetic Diseases* Dtsch Arztebl Int 2010; 107(48): 857-62
130. Yoshida S, Harada T, Mitsunari M, Iwabe T, Sakamoto Y, Tsukihara S, Iba Y, Horie S, Terakawa N.(2004) *Hepatocyte Growth Factor/Met System Promotes Endometrial and Endometriotic Stromal Cell Invasion via Autocrine and Paracrine Pathways*. J Clin Endocrinol Metab 2004. 89: 823–832

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
AFP	Alphafetoprotein
AUC	Area under the curve
BMI	Body-Mass-Index
BPD	Biparietaler Kopfdurchmesser
bzw.	beziehungsweise
β-HCG	Humanes Choriongonadotropin
Ca ²⁺	Calcium
cffDNA	circulating cell-free fetal DNA
c-Met	mesenchymal-epithelial transition factor, HGF-Rezeptor
CTB	Cytotrophoblast (= ZTB)
CTG	Cardiotokogramm
CVS	Chorionic villus sampling (Chorionzottenbiopsie)
DAB	Diaminobenzidine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HGF	Hepatocyte Growth Factor (Hepatozytenwachstumsfaktor)
IUGR	Intrauterine growth restriction
IUFT	intrauteriner Fruchttod
kDa	kilodalton
M	Mol
Mo.	Monat
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
p.c.	post conceptionem
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
pH	pH-Wert, pouvoir hydrogène („Wasserstoffkraft“)
PIA	Professional Image Archiving
p.m.	post menstruationem
ras GAP	Ras GTPase activating protein
ROC	Receiver Operating Characteristics
SF	scatter factor
SGA	small for gestational age
SSL	Scheitelsteiβlänge
SSW	Schwangerschaftswoche
SZTB	Synzytotrophoblast
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
TIFF	Tagged Image File Format
Tyr1235	Tyrosinkinase 1235
Wo.	Woche
ZTB	Zytotrophoblast

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schema der Frühentwicklung der Plazenta.....	1
Abbildung 2:	HGF-Rezeptor c-Met.....	17
Abbildung 3:	Funktionen von HGF am c-Met-Rezeptor	19
Abbildung 4:	Präparat der Patientin P0103, c-Met-Antikörperfärbung, kleine Zotte, links ohne Maske, rechts mit Maske	29
Abbildung 5:	Alter der Patientin bei Chorionzottenbiopsie	34
Abbildung 6:	Gestationsalter bei CVS.....	35
Abbildung 7:	Body-Mass-Index der Patientinnen	36
Abbildung 8:	Schwangerschaftsausgang mit absoluten Werten bei unauffälligem und auffälligem Karyotyp	37
Abbildung 9:	Entbindungsalter aller lebendgeborenen Kinder (chromosomal auffällig und unauffällig)	39
Abbildung 10:	Geburtsgewicht der Lebendgeborenen	40
Abbildung 11:	Normierte Perzentile der lebendgeborenen Kinder mit Gaußscher Normalverteilungskurve	41
Abbildung 12:	Präparat Nr. B0602gr, c-Met, links ohne Maske, rechts mit Maske.....	42
Abbildung 13:	Präparat Nr. 04.04gr, c-Met, links ohne Maske, rechts mit Maske.....	43
Abbildung 14:	Präparat Nr. 205.01gr, c-Met, links ohne Maske, rechts mit Maske	43
Abbildung 15:	Präparat Nr. 197.02gr, c-Met, links ohne Maske, rechts mit Maske	44
Abbildung 16:	Mittelwerte des Bildanalyse-Scores für die Zottengesamtfläche und die drei unterschiedlichen Kompartimente der großen und kleinen Zotten.....	45
Abbildung 17:	Mittelwerte des konventionellen Scores für die Zottengesamtfläche und die drei unterschiedlichen Kompartimente der großen und kleinen Zotten	46
Abbildung 18:	Zuordnung von Bildanalyse-Score in Bezug zu den Kategorien des konventionellen Scores der großen Zotten	47
Abbildung 19:	Zuordnung von Bildanalyse-Score in Bezug zu den Kategorien des konventionellen Scores der kleinen Zotten.....	47
Abbildung 20:	Mittelwerte des Bildanalyse-Score für das Gestationsalter zum Zeitpunkt der CVS der gesamten Zottenfläche der großen (GR) und kleinen Zotten (KL).....	48
Abbildung 21:	Mittelwerte des Konventionellen Scores für das Gestationsalter zum Zeitpunkt der CVS der gesamten Zottenfläche der großen (GR) und kleinen Zotten (KL)	49
Abbildung 22:	Mittelwerte des Bildanalyse-Score für das Geschlecht in der gesamten Zottenfläche der großen (GR) und kleinen Zotten (KL)	50
Abbildung 23:	Mittelwerte des konventionellen Score für das Geschlecht in der gesamten Zottenfläche der großen (GR) und kleinen (KL) Zotten.....	50

Abbildung 24: Entbindungsalter im Bildanalyse-Score für die Gesamtfläche der großen Zotten	52
Abbildung 25: ROC-Kurve für das Entbindungsalter (<25. SSW versus >25. SSW) in Bezug auf den Bildanalyse-Score der Gesamtfläche der großen Zotten	53
Abbildung 26: Boxplot für das Entbindungsalter der Gruppen <25. SSW und >25.SSW in Bezug auf den Bildanalyse-Score der großen Zotten (gesamte Zottenfläche) $p=0,035$	54
Abbildung 27: Konventioneller Score der gesamten Fläche der großen und kleinen Zotten für lebendgeborene Kinder mit angeglichenen Perzentilen	55
Abbildung 28: Konventioneller Score der großen Zotten mit Aufteilung in die einzelnen Kompartimente für lebendgeborene Kinder mit angeglichenen Perzentilen	56
Abbildung 29: ROC-Kurve für die angeglichenen Perzentile (5.-95. versus >95. Perzentile) in Bezug auf den Konventionellen Score des CTB (gr. Zotten)	57
Abbildung 30: Bildanalyse-Score für lebendgeborene Kinder mit <5., 5.- 95. und >95. angeglichenen Perzentilen der gesamten Fläche der großen und kleinen Zotten.	58
Abbildung 31: Mittelwerte der Bildanalyse-Scores der gesamten großen Zotten und des Stromas der großen Zotten von Lebendgeborenen versus Spontanaborte/Intrauterinen Fruchttode	60
Abbildung 32: Boxplot für den Schwangerschaftsausgang in Bezug auf den Bildanalyse-Score der großen Zotten (gesamte Fläche); $p=0,030$	61
Abbildung 33: ROC-Kurve für die Schwangerschaftsausgänge (lebend versus IUFT/Abort) in Bezug auf den Bildanalyse-Score (Gesamte große Zotte).....	61
Abbildung 34: Boxplot für den Schwangerschaftsausgang in Bezug auf den Bildanalyse-Score des Stromas der großen Zotten; $p=0,010$	63
Abbildung 35: ROC-Kurve für die Schwangerschaftsausgänge (lebend versus IUFT/Abort) in Bezug auf den Bildanalyse-Score (Stroma der großen Zotte).....	63
Abbildung 36: Mittelwerte des konventionellen Scores von Lebendgeborenen versus Spontanaborte/Intrauterinen Fruchttode	65
Abbildung 37: Bildanalyse-Score für den Karyotyp, es sind signifikante Unterschiede dargestellt	66
Abbildung 38: ROC-Kurve für den Karyotyp (unauffällig/auffällig) in Bezug auf den Bildanalyse-Score (CTB der großen Zotten)	67
Abbildung 39: Boxplot für den Karyotyp in Bezug auf den Bildanalyse-Score der großen Zotten (CTB).....	68
Abbildung 40: Konventioneller Score für den Karyotyp, es sind signifikante Unterschiede im Zytotrophoblasten der großen Zotten und in der gesamten Zottenfläche der kleinen Zotten dargestellt	69

Abbildung 41: ROC-Kurve für den Karyotyp (unauffällig/auffällig) in Bezug auf den Konventionellen Score für die kleinen Zotten (gesamte Zottenfläche)	69
Abbildung 42: Mittelwerte des Bildanalyse-Scores und des konventionellen Scores der Gesamtfläche der großen Zotten für die Nackentransparenz.	71
Abbildung 43: Mittelwerte beider Scores der gesamten Fläche der großen Zotten für den Biparietalen Durchmesser.....	72
Abbildung 44: Mittelwerte des Bildanalyse-Score und des konventionellen Score der Gesamtfläche der großen Zotten für die Femurlänge.	73
Abbildung 45: Mittelwerte des Bildanalyse-Score und des konventionellen Score der Gesamtfläche der großen Zotten für den Kopfumfang.....	74
Abbildung 46: Mittelwerte des Bildanalyse-Scores und des konventionellen Scores der Gesamtfläche der großen Zotten für die Scheitelsteißlänge.....	75
Abbildung 47: Mittelwerte der Bildanalyse-Scores der großen Zotten von Patientinnen unter 35 Jahren und über 35 Jahren (Risikoschwangerschaft).....	77
Abbildung 48: Mittelwerte der Bildanalyse-Scores der großen Zotten von Raucherinnen und Nichtraucherinnen.....	78
Abbildung 49: Vergleich der Mittelwerte des Konventionellen Scores der Intensität zwischen der gesamten Zottenfläche der großen und kleinen Zotten.....	84
Abbildung 50: Vergleich der Mittelwerte des Konventionellen Scores der Intensität zwischen der gesamten Zottenfläche der großen und kleinen Zotten.....	85

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mikroskopeinstellungen	28
Tabelle 2: Durch die Bildanalyse ermittelte Parameter pro Präparat.....	30
Tabelle 3: Berechnete Parameter pro Präparat.....	31
Tabelle 4: Chromosomale Verteilung der Feten mit Schwangerschaftsausgang	38
Tabelle 5: Kreuztabelle für Entbindungsalter und Bildanalyse-Score (Zuordnung zur Gruppe der <25.SSW-geborenen Kinder).....	53
Tabelle 6: Kreuztabelle für die angeglichenen Perzentile und Konventionellen Score (Zuordnung zur Gruppe der Kinder >95. Perzentile) des CTB (gr. Zotten).....	57
Tabelle 7: Kreuztabelle für den Schwangerschaftsausgang und den Bildanalyse-Score der großen gesamten Zotten (Zuordnung zur Gruppe Abort/IUFT).....	62
Tabelle 8: Kreuztabelle für den Schwangerschaftsausgang und den Bildanalyse-Score des Stromas der großen gesamten Zotten (Zuordnung zur Gruppe Abort/IUFT)	64
Tabelle 9: Kreuztabelle des konventionellen Scores der großen Zotten (gesamte Fläche) für die Schwangerschaftsausgänge (Chi- Quadrat-Test $p=0,48$; Exakter Test nach Fischer: $p = 0,735$).....	65
Tabelle 10: Kreuztabelle für den Karyotyp und Bildanalyse-Score (Zuordnung zur Gruppe der chromosomalen Aberrationen) für das Kompartiment CTB der großen Zotten.....	67
Tabelle 11: Kreuztabelle für den Karyotyp und Konventionellen Score (Zuordnung zur Gruppe der chromosomalen Aberrationen) für die gesamte Fläche der kleinen Zotten.....	70
Tabelle 12: Kreuztabelle des konventionellen Scores des Färbegesamteindrucks in Verbindung mit der Scheitelsteißlänge .	75
Tabelle 13: Überblick der Ergebnisse.....	98

7 Danksagung

Während meiner Arbeit an der vorliegenden Dissertationsschrift erhielt ich von vielen Seiten Hilfe und Unterstützung, sowohl menschlicher als auch fachlicher Natur. Daher möchte ich den Personen danken, ohne die diese Arbeit sicherlich nicht entstanden wäre.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. J. Steinhard für die freundliche Überlassung des Themas sowie die gute Unterstützung während der gesamten Arbeit bedanken.

Für die Ermöglichung der Durchführung dieser Studie bin ich Herrn Prof. Dr. med. W. Klockenbusch zu besonderem Dank verpflichtet.

Desweiteren gilt mein außerordentlicher Dank Frau Dr. Anna Schmedt für die gute, zuverlässige und persönliche Betreuung sowie die vielen hilfreichen Ratschläge und Hilfestellungen.

Danken möchte ich auch Frau Insa Steinhard, ohne die ein Gelingen der Antikörperfärbung nicht vorstellbar gewesen wäre.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. rer. nat. M. Götte für die optimale Unterstützung bei meiner Tätigkeit im Labor.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern von ganzen Herzen für die Ermöglichung des Studiums und für die unermüdliche Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Abschließend gilt ein großer Dank meinem Freund J. Hennig, der mich auf dem gesamten Weg meines Studiums uneingeschränkt unterstützt hat und vor allem danke ich ihm für die hilfreichen Anregungen beim Korrekturlesen der Arbeit sowie der technischen Umsetzung.

8 Lebenslauf