

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Köln

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. P. Mallmann

Biomarker zur Prognose von Frühgeburten
Ein biomedizintechnischer Ansatz

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Würde eines doktor rerum medicinalium
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Nicole Föckler
aus Mönchengladbach

promoviert am 24. Februar 2016

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. P. Mallmann

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. rer. nat. A. Klatt

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Nicole Föckler

Köln, 23.06.2015

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Prof. Dr. Dr. A. (Temiz) Artmann, Prof. Dr. rer. nat. habil. G. M. Artmann und Dr. med. M. Valter von mir selbst ausgeführt worden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von P. Linder, E. Wiemer, S. Kuckelkorn, H. Olfaz, H. Rahn, T. Dambrowski und M. Grauwinkel durchgeführt worden.

Danksagung

Als erstes möchte ich Frau Prof. Dr. Dr. Aysegül (Temiz) Artmann danken, die mir die Möglichkeit für diese Arbeit gegeben hat. Ich bedanke mich sowohl für die fachlichen Austausch von ihr und Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. G.M. Artmann als auch für die persönlichen Gespräche und die Unterstützung.

Als nächstes möchte ich mich bei Prof. Dr. med. P. Mallmann und Dr. med. M. Valter, meinem Doktorvater und Betreuer von der Universität zu Köln, für die Hilfe danken. Außerdem danke ich den Schwestern der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe für die Bereitstellung der Fruchtblasen.

Ich danke Herrn Prof. Pfützner für die enge Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Benutzung von Laboratorien und Instrumente der Firma IKFE GmbH.

Der Fachhochschule Aachen möchte ich an verschiedenen Stellen danken. Ich bedanke mich besonders bei der FH Aachen für die Unterstützung durch ein Promotionsstipendium, das es mir möglich gemacht hat, die Arbeit durchzuführen. Dem Labor von Prof. Dr. G. Elbers und Prof. Dr. T. Selmer möchte ich für die unkomplizierte fachbereichsübergreifende Hilfe danken. Ein besonders großer Dank geht an das gesamte Team des Labors für Medizinische und Molekulare Biologie, des Labors für Zellbiophysik, des Labors für Zell- und Mikrobiologie sowie des Instituts für Bioengineering der FH Aachen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern sowie meinen Schwiegereltern danken, die mir immer den Rücken frei gehalten haben. Ich danke meiner kleinen Familie, Marcel und Jona, dass sie immer für mich da sind. Sie haben mich motiviert und dafür gesorgt, dass ich meine Ziele nicht aus den Augen verliere und mir gezeigt, dass man auch als Frau und Mutter Familie und Karriere miteinander vereinbaren kann.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung	3
3	Medizinisch-Biologischer Hintergrund	5
3.1	Schwangerschaft	5
3.2	Die fetale Eihaut	5
3.2.1	Entstehung der fetalen Eihaut	8
3.2.2	Die extrazelluläre Matrix der fetalen Eihäute	9
3.2.2.1	Kollagen	10
3.2.2.2	Glykosaminoglykane	13
3.2.2.3	Fibronektin	15
3.2.2.4	Laminin	15
3.2.2.5	MMPs und TIMPs	16
3.2.3	Der Blasensprung	18
3.2.4	Biomechanische Aspekte fetaler Eihäute	18
3.3	Frühgeburt und (früher) vorzeitiger Blasensprung	20
3.3.1	Ursachen und Risikofaktoren der Frühgeburt und des (frühen) vorzeitigen Blasensprungs	21
3.3.2	Folgen der Frühgeburt und des (frühen) vorzeitigen Blasensprungs	23
3.3.3	Diagnose des frühen vorzeitigen Blasensprungs	25
3.3.4	Management des frühen vorzeitigen Blasensprungs	27
3.4	Biomarker	33
3.4.1	Auswahl und Anforderungen an einen Biomarker	34
3.4.2	Biomarker für den frühen vorzeitigen Blasensprung in der Literatur	35
4	Methodisch-Technischer Hintergrund	41
4.1	Bestimmung des Kollagengehaltes	41
4.1.1	Kollagenextraktion	41
4.1.2	Kollagengehaltbestimmung mit Hydroxyprolin	42
4.1.3	Kollagengehaltbestimmung durch Anfärben	43
4.2	Nachweis der Glykosaminoglykane	44
4.2.1	Extraktion der Glykosaminoglykane	44
4.2.2	Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt - Orcin-Test	45
4.2.3	Nachweis sulfierter Glykosaminoglykane	46

4.2.4	Bestimmung des Hyaluronsäuregehaltes	47
4.2.4.1	Extraktion	48
4.2.4.2	Enzymatische Spaltung der HA-Ketten in Disaccharideinheiten und Derivatisierung	49
4.2.4.3	Methodische Adaption und Optimierung	50
4.2.4.4	Ergebnisse der Optimierung und Anpassung der PAGE-FS	51
4.2.4.4.1	Trennung von Glukose und Δ DiHA	51
4.2.4.4.2	Δ DiHA-Standards	52
4.3	Device for the Investigation of the Mechanical Properties of Amniotic Sac Tissue	55
4.3.1	Funktionsweise des DIMPAST	56
4.3.2	Weiterentwicklung und Messungen mit DIMPAST	57
4.4	Optische Kohärenztomographie	58
5	Material und Methoden	61
5.1	Chemikalien	61
5.2	Geräte	65
5.3	Probenahme, -bearbeitung und Wassergehaltsbestimmung	66
5.4	Bestimmung des Kollagengehaltes	67
5.4.1	Extraktion	67
5.4.2	Bestimmung mit Hydroxyprolin	67
5.4.3	Bestimmung durch Anfärben	68
5.5	Nachweis der Glykosaminoglykane	69
5.5.1	Extraktion	69
5.5.2	Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt - Orcin-Test	69
5.5.3	Nachweis sulfierter Glykosaminoglykane	69
5.5.4	Bestimmung des Hyaluronsäuregehaltes	70
5.5.4.1	Extraktion	70
5.5.4.2	Enzymatische Spaltung der HA-Ketten in Disaccharideinheiten und Derivatisierung	71
5.5.4.3	Elektrophorese der derivatisierten Produkte	71
5.5.4.4	Analyse und Auswertung der aufgetrennten Proben	72
5.6	Statistische Analyse	73
6	Ergebnisse	74
6.1	Kollagengehaltbestimmung mit Hydroxyprolin	74
6.2	Kollagengehaltbestimmung durch Anfärben	75

6.3	Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt - Orcin-Test	76
6.4	Sulfierte Glykosaminoglykane	77
6.5	Bestimmung des Hyaluronsäuregehaltes	78
6.6	Wassergehalt	79
6.7	Korrelationen	80
6.7.1	TSC-Gehalt und Hydroxyprolin	80
6.7.2	TSC-Gehalt und maximaler Reissdruck	80
6.7.3	Wassergehalt und maximaler Reissdruck	82
6.7.4	Wassergehalt und Dicke	83
6.7.5	Wassergehalt und Hyaluronsäure	83
6.7.6	Hyaluronsäure und maximaler Reissdruck	84
6.7.7	Hyaluronsäure und Dicke	85
6.7.8	Hyaluronsäure und TSC-Gehalt	85
6.7.9	Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt und Dicke	86
6.7.10	Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt und maximaler Reissdruck	87
6.7.11	Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt und TSC-Gehalt	87
6.7.12	Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt und Wassergehalt	88
6.7.13	Sulfierte Glykosaminoglykane und Dicke	89
6.7.14	Sulfierte Glykosaminoglykane und maximaler Reissdruck	89
6.7.15	Sulfierte Glykosaminoglykane und TSC-Gehalt	90
6.7.16	Sulfierte Glykosaminoglykane und Wassergehalt	91
7	<i>Diskussion</i>	92
8	<i>Zusammenfassung</i>	100
9	<i>Literaturverzeichnis</i>	102
10	<i>Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen</i>	112
11	<i>Anhang</i>	115
11.1	Abbildungsverzeichnis	115
11.2	Tabellenverzeichnis	116
12	<i>Lebenslauf</i>	117

1 Abkürzungsverzeichnis

AF	amniotic fluid = Fruchtwasser
AIS	Amnioninfektionssyndrom
APP	Akute-Phase-Protein
AMAC	2-Aminoacridon
APSC	acid pepsin soluble collagen = säure- und pepsinlösliches Kollagen
ASC	acid soluble collagen = säurelösliches Kollagen
BP	max. bursting pressure = maximaler Reissdruck
BS	Blasensprung
CRP	C-reaktives Protein
CSF	colony stimulating factors = Kolonie-stimulierende Faktoren
ΔDiHA	2-acetamido-2-deoxy-3-O-(4-deoxy-α-L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid)-D-glucose, Gehalt wird angegeben in mg ΔDiHA pro g Eihaut [mg/g], repräsentiert den Hyaluronsäure-Gehalt
DIMPAST	Device for the Investigation of the Mechanical Properties of Amniotic Sac Tissue
DMMB	1,9-dimethylmethylenblau
EDS	Ehlers-Danlos-Syndrom
ELBW	extremely low birth weight
FACE	fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis
FN	Fibronectin
fVBS	früher vorzeitiger Blasensprung, engl.: PPRM, Geburt vor der 37. SSW mit einem Blasensprung vor Einsetzen der Wehen
GAG	Glykosaminoglykan
gGAG	gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt (siehe auch Uronsäure), Gehalt angegeben in mg Uronsäure pro g Eihaut [mg/g] (siehe auch Uronsäure)
HA	Hyaluronic Acid = Hyaluronsäure / Hyaluronan
hyp	Hydroxyprolin, Gehalt wird angegeben in mg Hydroxyprolin pro g Eihaut [mg/g], repräsentiert den gesamt Kollagen-Gehalt
IL	Interleukin
LBW	low birth weight
max. BP	max. bursting pressure = maximaler Reissdruck [kPa]

Abkürzungsverzeichnis

min	Minute
NIH	National Institute of Health
NSC	neutral salt soluble collagen = neutrales salzlösliches Kollagen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAGE-FS	polyacrylamid gelelectrophoresis of fluorophore labeled saccharides
p. c.	post conceptio
p. m.	post menstruationem
ROM	rupture of membranes = Öffnung der Fruchtblase wird als Blasensprung bezeichnet
Preterm	Geburt vor der 37. SSW mit zeitlich regelgerechten Blasensprung (Frühgeburt)
RDS	respiratory distress syndrome = Atemnotsyndrom
PPROM	preterm premature rupture of membranes = früher vorzeitiger Blasensprung, Geburt vor der 37. SSW mit einem Blasensprung vor Einsetzen der Wehen (fVBS)
PROM	premature rupture of membranes = vorzeitiger Blasensprung (VBS), Geburt nach der 37. SSW mit einem Blasensprung vor Einsetzen der Wehen
PSC	pepsin soluble collagen = pepsinlösliches Kollagen
RT	Raumtemperatur
sGAG	sulfurierte Glykosaminoglykane, Gehalt angegeben in mg sulfurierte Glykosaminoglykane pro g Gewebe [mg/g]
SROM	spontaneous rupture of membranes, rechtzeitig Blasensprung; Wehen, d. h. muttermundswirksame Uterus-Kontraktionen haben eingesetzt und der Muttermund ist vollständig geöffnet
SSW	Schwangerschaftswoche
Term	Geburt nach der 37. SSW mit zeitlich regelgerechten Blasensprung („normale“ Geburt)
TSC	total soluble collagen = Gehalt an gesamt-löslichen Kollagen (= NSC + APSC), angegeben in mg Kollagen pro g Gewebe [mg/g]
Uronsäure	Gehalt an Uronsäure wird angegeben in mg Uronsäure pro g Eihaut [mg/g], repräsentiert den gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt (siehe auch gGAG)
VBS	vorzeitiger Blasensprung, engl.: premature rupture of membranes, Geburt nach der 37. SSW mit einem Blasensprung vor Einsetzen der Wehen
VLBW	very low birth weight
Volume	Messwert der Fluoreszenz der Δ DiHA-Banden, angegeben in Summe der Intensitäten der Pixel innerhalb der Volumenmarkierung multipliziert mit der Pixelfläche (INT \times mm ²)

2 Einleitung

Die humanen fetalen Eihäute, auch Fruchtblase genannt, sind geschichtet und bestehen aus den beiden Hauptschichten Amnion und Chorion. Sie umschließen den Fötus während der Schwangerschaft und schützen ihn vor aufsteigenden Infektionen. Die Eihaut enthält das Fruchtwasser, das dem Ungeborenen Schutz gegen mechanische Einwirkungen bietet, ein gleichmäßiges Wachstum und Bewegungen im Mutterleib erlaubt sowie das Praktizieren des Schluckvorgangs ermöglicht. Der Blasensprung, d. h. der Riss der Fruchtblase, erfolgt normalerweise unter dem Einfluss muttermundwirksamer Kontraktionen (Wehen) [16, 111]. Wenn der Blasensprung vor Einsetzen der Wehen reißt, spricht man von einem vorzeitigem Blasensprung (VBS). Wenn der VBS zudem vor Erreichen der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche (SSW) geschieht, wird dies früher vorzeitiger Blasensprung (fVBS) genannt [2].

Während eine normale Schwangerschaft durchschnittlich 40 SSW dauert, wird eine Frühgeburt als Geburt vor der vollendeten 37. SSW definiert [161]. Im Jahr 2010 betrug die weltweite Frühgeburtenrate je nach Land 5 – 18 %. Frühgeburten werden als kritisch angesehen, da sie als Hauptursache aller neonatalen Sterbefälle gelten und neben der Lungenentzündung die zweit häufigste Todesursache für Kinder unter 5 Jahren darstellen [21]. Sehr kleine Frühgeborene können lebenslange Behinderungen davontragen. Hinzu kommen die psychische Belastung für Mutter und Kind sowohl während als auch nach der intensivmedizinischen Betreuung. Außerdem entsteht ein immenser Kostenaufwand für das Gesundheitssystem durch den Mehraufwand an intensivmedizinischen und physiotherapeutischen Behandlungen während und nach dem Krankenhausaufenthalt. Es gibt viele Faktoren, die zu einer Frühgeburt führen können; mit 25 % ist der fVBS allerdings die Hauptursache [123]. Könnte ein fVBS prognostiziert werden, könnten gegebenenfalls Vorkehrungen getroffen werden, um eine Frühgeburt zu verhindern und Maßnahmen wie das Legen einer Cerclage oder ein Muttermundverschluss verhindert werden. Bis heute gibt es kein medizinisches Hilfsmittel, um eine bevorstehende Frühgeburt oder einen bevorstehenden fVBS zuverlässig vorherzusagen.

Einleitung

Im Projekt „CARA“ (lat.: lieb, teuer, Gesicht; Chorio-Amniotic Rupture Anticipation) soll mit Hilfe einer Messsonde nichtinvasiv und berührungslos mechanische, optische und andere Parameter am cervikalen Pol (mechanisch am wenigsten belastbarer Teil) der Fruchtblase gemessen werden. Dadurch soll die Prognose einer Frühgeburt möglich werden.

Es wird allgemein angenommen, dass nicht nur die physikalischen Kräfte der Wehen alleine einen Blasensprung auslösen, sondern dass auch biochemische Veränderungen der extrazellulären Matrix (EZM) der Eihäute eine bedeutende Rolle spielen [74]. Im Fall des VBS und fVBS ist es wahrscheinlich, dass ein Ungleichgewicht zwischen den EZM-Komponenten herrscht, die schlussendlich einen Blasensprung auslösen, ohne dass die mechanischen Kräfte der Wehen überhaupt eingesetzt haben. Obwohl deren genaue Bedeutung bisher unbekannt ist, geht man davon aus, dass vor allem die Veränderung von Glykosaminoglykanen, insbesondere der Hyaluronsäure, und Kollagen die biochemischen Eigenschaften der Fruchtblase bestimmen [90].

Daher untersucht die vorliegende Arbeit *in vitro*, ob biochemische Parameter wie Kollagene und Glykosaminoglykane zusammen mit dem Wassergehalt im direkten Zusammenhang mit den mechanischen Eigenschaften wie Dicke und dem maximalen Reissdruck der Eihäute stehen. Die vorliegende Arbeit ist ein Teilprojekt von CARA und untersucht, welche Parameter Aufschluss über eine bevorstehende Frühgeburt geben, als Biomarker dienen könnten und mit der Messsonde ermittelt werden sollten.

3 Medizinisch-Biologischer Hintergrund

3.1 Schwangerschaft

Eine normale Schwangerschaft dauert 38 Wochen, also 267 Tage. Man spricht hierbei von 267 Tagen p. c. (post conceptionem = nach Empfängnis). Da der Tag der Empfängnis allerdings nicht immer bekannt ist, hat sich eine andere Berechnung der Schwangerschaftsdauer, auch Gestationszeit genannt, etabliert. Hierbei rechnet man vom ersten Tag der letzten Regelblutung bei einem 28-Tage-Zyklus, was zu einer Schwangerschaftsdauer von 281 Tagen p. m. (post menstruationem = nach Regelblutung) führt. Man spricht hier auch von 40 Schwangerschaftswochen (SSW) [48]. Um Fehlberechnungen zu vermeiden, wird das Gestationsalter in der Fachliteratur ausschließlich in Schwangerschaftswochen p. m. angegeben. So schreibt man beispielsweise eine Schwangerschaft, die genau 40 Wochen und 0 Tage p. m. (entspricht 38 Wochen p. c.) andauert als „40 + 0 SSW“. Von allen Geburten in Deutschland werden nur 4 % der Kinder zum errechneten Termin geboren [70].

3.2 Die fetale Eihaut

Die humane fetale Eihaut, auch Fruchtblase genannt (siehe Abbildung 1), umschließt das ungeborene Baby während der Schwangerschaft und schützt es vor aufsteigenden Infektionen. Die Eihaut enthält das Fruchtwasser, das dem Ungeborenen Schutz gegen mechanische Einwirkungen und eine gleichbleibende Temperatur bietet; es erlaubt dem Baby ein gleichmäßiges Wachstum und sich im Mutterleib frei zu bewegen [16, 111].



Abbildung 1: Menschlicher Fetus gegen Ende des 1. Trimesters umgeben von der Fruchtblase [134]

Das Fruchtwasser ist eine klare Flüssigkeit mit niedriger Dichte und wird während der Schwangerschaft vom Baby getrunken und wieder ausgeschieden. Das Fruchtwasser besteht aus Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden, Natriumchlorid, Natrium, nicht-proteinogenem Stickstoff, Harnstoff, Harnsäure, Hormonen und Kreatininen. In den ersten Schwangerschaftswochen ist außerdem Bilirubin nachweisbar. Nach der 36. SSW erhöht sich die Zahl der Phospholipide. Um den Geburtszeitraum sind hohe Konzentrationen an Prostaglandin nachweisbar, das für das spontane Einsetzen der Wehen verantwortlich gemacht wird [29, 110]. Nach 40 SSW beträgt das Volumen des Fruchtwassers etwa 800 mL und besteht zu 98 – 99 % aus Wasser. Das Fruchtwasser ist eine dynamische Flüssigkeit. Die chemische Zusammensetzung ist also nicht in jeder Schwangerschaftswoche gleich, sondern ändert sich. Die Osmolarität zum Beispiel steigt mit den Schwangerschaftswochen an, da der hypertensive fetale Urin beginnt in die fetalen Eihäute einzudringen. Die Komponenten des Fruchtwassers spiegeln den Status der embryonalen Entwicklung wider. Deren Bestimmung

kann also ein nützliches Hilfsmittel sein, um den metabolischen Status der feto-plazentaren Einheit darzustellen [95].

Die fetalen Eihäute sind 100 bis 800 μm dick und bestehen aus dem Amnion und dem Chorion. Das Amnion ist die innere Schicht und steht im Kontakt mit dem Fruchtwasser. Das Chorion hingegen ist die äußere Schicht und mit der mütterlichen Dezidua, der Gebärmutterschleimhaut, verbunden. Amnion und Chorion bestehen jeweils aus zwei weiteren Schichten: Bindegewebe und Epithelschicht. Wenn sich Amnion und Chorion trennen, ist die Zwischenschicht, auch Stratum Intermedium genannt, die Amnion und Chorion verbindet, gut erkennbar (siehe Abbildung 2).

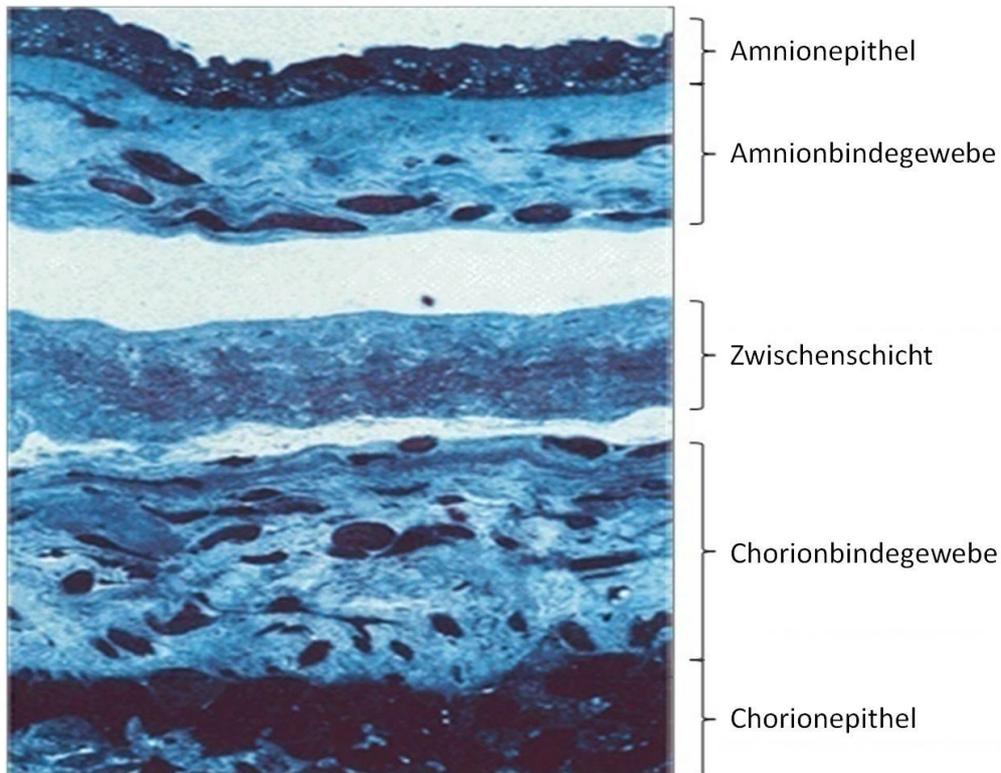


Abbildung 2: Querschnitt einer menschlichen fetalen Eihaut, Toluidinblaufärbung, 250fache Vergrößerung (modifiziert) [52]

Die Zwischenschicht setzt sich aus kollagenem Bindegewebe zusammen und weist ein hohes Wasserbindungsvermögen auf. Unter der mechanischen Belastung der Wehen neigt diese Schicht dazu sich zu verflüssigen, sodass eine Trennung von Amnion und Chorion begünstigt wird. Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Erklärung des vorzeitigen Blasensprungs [52].

Obwohl das Chorion dicker ist als das Amnion, wird die Reißfestigkeit vor allem dem Amnion zugeschrieben [111].

3.2.1 Entstehung der fetalen Eihaut

Etwa 24 Stunden nach der Befruchtung startet die befruchtete Eizelle ihre erste Zellteilung. Bis zum 4. Tag erfolgen verschiedene weitere Zellteilungen und die Blastozyste (siehe Abbildung 3) entsteht aus der Morula. Die innere Zellmasse wird Embryoblast ① und die äußere Zellschicht wird Trophoblast ③ genannt. Die fetalen Eihäute und die Placenta entstehen ausschließlich aus dem Trophoblast. Der Trophoblast umgibt die Blastozystenöhle ④, wohingegen der Embryoblast nur an einer Stelle an der Trophoblastenschicht, dem sogenannten embryonalem Pol der Blastozyste, zu finden ist.

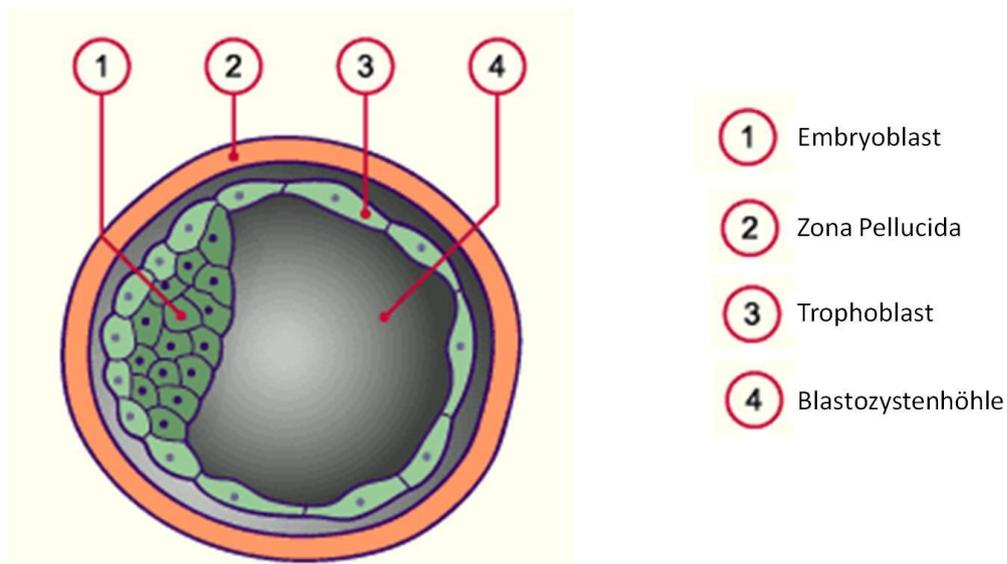


Abbildung 3: Blastozyste Schema (modifiziert) [162]

Das Verhältnis von Embryoblast zu Trophoblast beträgt etwa 1:10. Die Schutzhülle wird Zona Pellucida ② genannt und wird schlussendlich enzymatisch aufgelöst. Die Blastozyste ent schlüpft und zum Ende der ersten Schwangerschaftswoche nistet sie sich im oberen Drittel der Uterusschleimhaut (Endometrium) ein, infiltriert das Endometrium und bildet so eine äußere Schicht, das Chorion, sowie die Placenta. Der Embryoblast entwickelt sich

ebenfalls weiter und bildet die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm. Aus diesen Schichten werden alle Organe des Körpers geformt. Die inneren Schichten hingegen formen das Amnion und bilden mit dem Ektoderm die Amnionhöhle. Das Ektoderm bildet den Dottersack, der den Embryo nährt, bis die Gebärmutter vollständig ausgebildet ist. Nach vier Wochen ist der Dottersack verschwunden und das Amnion umhüllt den Embryo vollständig. Ab der fünften Woche liegen Amnion und Chorion dicht beieinander und bilden die sogenannte Eihaut oder Fruchtblase [16, 163].

3.2.2 Die extrazelluläre Matrix der fetalen Eihäute

Organe bzw. deren Gewebeverbund besteht aus Zellen und extrazellulärer Matrix (EZM). Die EZM wiederum besteht aus zwei Klassen extrazellulärer Makromoleküle: Glykosaminoglykane und Faserproteine wie Elastin, Fibronectin, Laminin und Kollagen [3]. Elastin kommt in menschlichen Eihäuten nicht vor [64]. Abbildung 4 zeigt die wichtigsten EZM-Komponenten von Amnion und Chorion, die in den nachfolgenden Abschnitten näher erklärt werden.

	Extrazelluläre Matrix	MMP oder TIMP
<u>Amnion</u>		
Epithel		MMP-1,-2,-9
Basalmembran	Kollagen Typ III,IV,V; Laminin, Fibronectin	
Zona compacta	Kollagen Typ I,III,V,VI; Fibronectin	
Fibroblastenschicht	Kollagen Typ I,III,VI; Laminin, Fibronectin	MMP-1,-9, TIMP-1
Zona spongiosa	Kollagen Typ I,III,IV; Proteoglykane	
<u>Chorion</u>		
Zona reticularis	Kollagen Typ I,III,IV,VI; Proteoglykane	
Basalmembran	Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin	
Trophoblast		MMP-9

Abbildung 4: EZM-Bestandteile von Amnion und Chorion [36]

3.2.2.1 Kollagen

Kollagen ist ein nicht dehnbares Protein mit der Zugfestigkeit von Stahl. Als Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix macht Kollagen 25 – 30 % der Gesamtproteinmasse bei Säugern aus [3, 17].

In einem typischen Kollagen-Molekül sind jeweils drei linksspiralige Polypeptidketten, sogenannte α -Ketten oder α -Helices, rechts-gerichtet umeinander gewunden. Man spricht hierbei von einer Triple-Helix [3, 17]. Bisher wurden etwa 25 verschiedene α -Ketten entdeckt. Obwohl daraus theoretisch über 10.000 verschiedene Kollagenmoleküle gebaut werden könnten, wurden bisher nur etwa 15 verschiedene Kollagen-Typen gefunden. Die α -Ketten sind reich an den Aminosäuren Prolin und Glycin. Prolin stabilisiert mit seiner Ring-Struktur die helikale Konformation des Kollagen-Moleküls. Glycin ist die kleinste existierende Aminosäure und ermöglicht es den α -Ketten dadurch, dicht gepackt die Kollagen-Superhelix zu formen [3]. Da Glycin an etwa jeder dritten Stelle (33,5 %) vorkommt, spricht man von der Aminosäure-Abfolge Gly-X-Y. X ist häufig Prolin (12 %) und Y ist hierbei häufig Hydroxyprolin (10 %). Hydroxyprolin wird erst bei der Synthese der α -Ketten aus Prolin hergestellt und ist somit spezifisch für jedes Kollagen-Molekül. Wenn diese Hydroxylierung nur ungenügend geschehen sollte, entsteht ein sehr instabiles Molekül. Jede α -Helix besteht aus 333 Aminosäuren. Somit besteht ein Kollagen-Molekül aus 3×333 , also fast 1.000 Aminosäuren [17].

Kollagenmoleküle wiederum sind in dünne Kollagen-Fibrillen (Durchmesser ca. 10-300 nm) zusammen gepackt (siehe Abbildung 5). In diesen Fibrillen sind nebeneinanderliegende Moleküle durch kovalente Quervernetzungen neben benachbarten Lysinresten miteinander verbunden. Dadurch bekommen die Fibrillen enorme Zugfestigkeit [3]. Die tripelhelikalen Abschnitte der Kollagentypen haben eine ähnliche Länge und können dadurch in die gleiche Fibrille eingebaut werden. So sind natürlich vorkommende Fibrillen meistens Mischfibrillen [80].

Medizinisch-Biologischer Hintergrund

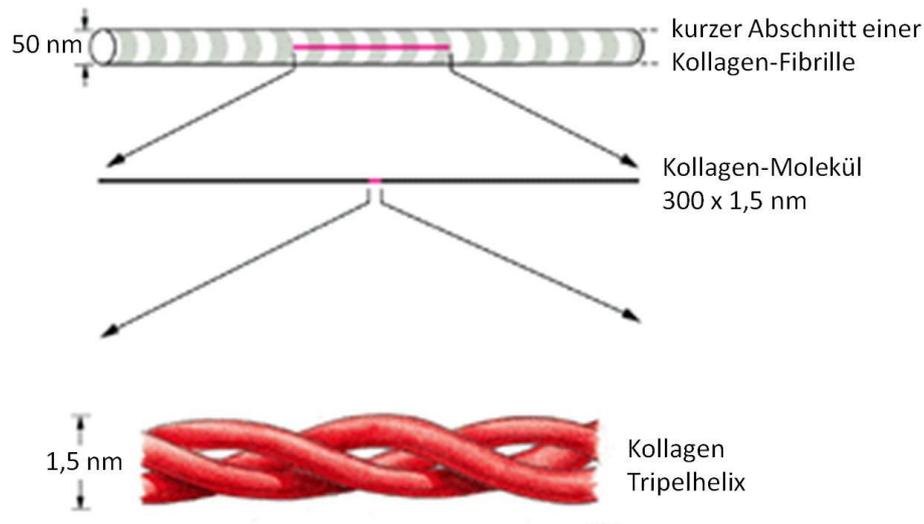


Abbildung 5: Aufbau einer Kollagen-Fibrille (modifiziert) [3]

Kollagen-Fibrillen verbinden sich oft zu längeren kabelähnlichen Bündeln, die man unter dem Lichtmikroskop als Kollagen-Faser sehen kann [3].

Wie wichtig Kollagen für die Stabilität der menschlichen Eihäute ist, wird bei Patientinnen, die an dem Ehlers-Danlos-Syndrom (EDS) leiden, ersichtlich. Das EDS ist eine heterogene Gruppe von genetischen Bindegewebsstörungen, von denen bisher 11 Untertypen bekannt sind, die unter anderem durch die Fragilität des Gewebes charakterisiert ist. Die meisten EDS-Typen sind durch Mutationen in Genen bedingt, die für diverse Kollagenketten oder Enzyme im Kollagenstoffwechsel kodieren. Bei dieser Krankheit ist die Rate von Fehl- und Frühgeburten erhöht. Außerdem ist auch das Auftreten eines frühen vorzeitigen Blasensprungs bei Frauen mit EDS gehäuft [83]. Patientinnen mit EDS können ein erhöhtes Risiko für Frühgeburten aufgrund von Zervixinsuffizienz oder frühem vorzeitigem Blasensprung haben [148]. Es wird sogar vermutet, dass einige Fälle von frühem vorzeitigem Blasensprung durch systemische Bindegewebserkrankungen hervorgerufen werden, die durch einen bisher unbekanntem EDS-Typ ausgelöst wurde [57].

In menschlichen Eihäuten kommen ausschließlich Kollagen Typ I, III, IV, V und VI vor [36].

Kollagen Typ I

Kollagen Typ I macht ca. 80 % allen Kollagens aus [17], gehört zu den fibrillären Kollagenen [79] und ist ein langes (300 nm) und dünnes (1,5 nm Durchmesser) Protein. Es besteht aus zwei verschiedenen α -Ketten ($\alpha_1(I)$ und $\alpha_2(I)$), wobei sich die Tripelhelix aus zwei α_1 und einer α_2 Kette zusammensetzt (kurz geschrieben: $[\alpha_1(I)]_2[\alpha_2(I)]$). Jede dieser Ketten besteht aus genau 1050 Aminosäuren. $\alpha_1(I)$ hat dabei ein Molekulargewicht von 127 kDa und $\alpha_2(I)$ ein Molekulargewicht von 116 kDa [79][105]. Das Gen von $\alpha_1(I)$ bezeichnet man als COL1A1 (Chromosomposition: 17q21.3-q22) und das Gen von $\alpha_2(I)$ als COL1A2 (Chromosomposition: 7q21.3-q22) [99].

Kollagen Typ III

Kollagen Typ III gehört ebenfalls zu den fibrillären Kollagenen [79], besteht im Gegensatz zu Kollagen Typ I jedoch aus lediglich einem Monomer: $\alpha_1(III)$. Diese Kette hat ein Molekulargewicht von 97 kDa. Zudem sind die Fasern von Kollagen Typ III mit 30-50 nm Durchmesser dünner als die des Kollagen Typ I [78][17]. Das Gen des Kollagen Typ III Monomers wird als COL3A1 bezeichnet und befindet sich auf dem menschlichen Chromosom 2 auf Position 2q24.3-q31 [79].

Kollagen Typ IV

Kollagen Typ IV, auch Basalmembran-Kollagen genannt, gehört zur Gruppe der flächig netzbildenden Kollagene [79][80]. Dieses Kollagen ist länger als die fibrillären Kollagene und enthält einige Unterbrechungen in der Gly-X-Y-Sequenz [42]. Durch diese wenige Aminosäuren langen Unterbrechungen ist das Kollagen flexibler als die fibrillären Kollagene [80]. Kollagen Typ IV hat sechs verschiedene Kollagen IV α Ketten, woraus sich drei verschiedene Typen von Heterotrimeren ergeben: $[\alpha_1(IV)]_2\alpha_2(IV)$, $\alpha_3(IV)\alpha_4(IV)\alpha_5(IV)$ und $[\alpha_5(IV)]_2\alpha_6(IV)$ [42].

Kollagen Typ V

Kollagen Typ V gehört wie Typ I und Typ III zu den fibrillären Kollagenen [79]. Zumeist ist Kollagen Typ V in den Kern der Kollagen Typ I Fibrillen eingelagert und hilft, das Wachstum

der Kollagen Typ I Fibrillen zu regulieren [20], und hat somit auch eine kontrollierende Funktion auf die Dicke des Kollagen Typ I [17]. Kollagen Typ V kommt als zwei verschiedene Heterotrimere vor: $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ und $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$ [3].

Kollagen Typ VI

Kollagen Typ VI wird als fibrillenassoziiertes [79] oder mikrofibrilläres Kollagen bezeichnet und ist unter dem Lichtmikroskop als 105 nm langes Stäbchen sichtbar [47]. Dieses Kollagen geht über Quervernetzungen häufig Bindungen mit Kollagen Typ I ein [17]. Die Kollagen-Moleküle bestehen aus 3 verschiedenen α -Ketten: $\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$ [47]. Kollagen Typ VI gilt als besonders resistent gegen enzymatischen Abbau, da das Kollagen einen hohen Anteil an Disulfidbrücken aufweist. Diese Disulfidbrücken spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung der Mikrofilamente und der Stabilität der Tripelhelix [71].

3.2.2.2 Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane (GAGs) sind lange, unverzweigte, negativ geladene Polysaccharidketten, die aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten aufgebaut sind. Glykosaminoglykane, die kovalent an ein Kernprotein gebunden sind, nennt man Proteoglykane. Die Disaccharide bestehen jeweils aus zwei Zuckern: einem Aminozucker (N-acetylglucosamin oder N-acetylgalactosamin) und meistens einer Uronsäure (Glukuronsäure oder Iduronsäure). Aufgrund ihrer negativen Ladung sind GAGs von osmotisch aktiven Kationenwolken (vor allem Na^+) umgeben, die dazu führen, dass eine große Menge Wasser in die Matrix gesaugt wird. Durch den so erzeugten Quelldruck ist die Matrix in der Lage, Druckkräften entgegenzuwirken (im Gegensatz zu Kollagen-Fibrillen, die Dehnungskräften entgegenwirken). In Bindegeweben, zu denen auch die fetalen Eihäute zählen, machen GAGs zwar nur 10 % des Gewichts aller Faserproteine aus, sie füllen aufgrund ihrer porös hydratisierten Geleigenschaften jedoch den meisten extrazellulären Raum aus. Aus diesem Grund ist eine mögliche Funktion der GAGs das Wirken als selektives Sieb, das den Transport von Molekülen und Zellen aufgrund ihrer Größe, Ladung oder beides reguliert. Außerdem können Proteoglykane die Aktivität von sekretierten Proteinen in verschiedener Weise regulieren, wobei Zelloberflächenproteoglykane als Co-Rezeptoren fungieren können [3].

Folgende Glykosaminoglykane kommen im menschlichen Bindegewebe vor [17]:

Hyaluronsäure

Hyaluronsäure, auch Hyaluronan genannt, besteht aus langen Ketten, die etwa 250 bis 50.000 sich wiederholende Disaccharide beinhalten. Jede Disaccharideinheit besteht aus D-Glukuronsäure, die glykosidisch $\beta(1\rightarrow3)$ an N-Acetyl-D-glucosamin gebunden ist. Die Disaccharide wiederum sind glykosidisch $\beta(1\rightarrow4)$ aneinander gebunden (siehe Abbildung 6) [44].

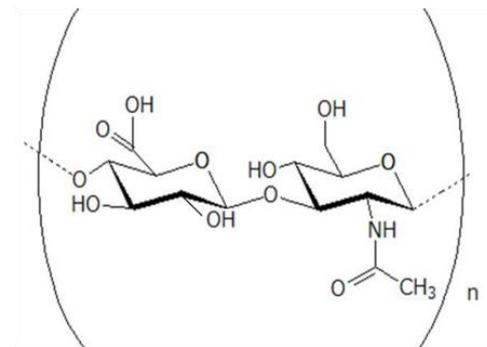


Abbildung 6: Ausschnitt eines Hyaluronsäure-Moleküls (modifiziert) [133]

Hyaluronsäure besitzt als einziges GAG kein Kernprotein und braucht ein Linkprotein, um sich an ein Protein heften zu können und damit Bestandteil eines Proteoglykan-Aggregats zu werden. Zudem ist Hyaluronsäure das einzige GAG, das nicht sulfuriert ist. Da Hyaluronsäure stark negativ geladen ist, hat sie eine sehr große Affinität zu Wasser [17]. Dabei kann 1 g Hyaluronsäure bis zu 6 L Wasser binden [137].

Chondroitinsulfat (CS) / Dermatansulfat (DS)

Die D-Glukuronsäure bei diesen GAGs ist teilweise in L-Iduronsäure umgewandelt. Der Grad dieser Umwandlung entscheidet darüber, ob es sich um Chondroitinsulfat oder Dermatansulfat handelt [45]. Chondroitin-4-Sulfat und Chondroitin-6-Sulfat sind die meist verbreiteten GAGs und häufig an Hyaluronsäure oder an die Zellmembran gebunden. Dermatansulfat tritt häufig in Kombination mit Chondroitinsulfat auf, geht aber keine

Verbindung mit Hyaluronsäure ein. Dermatansulfat-Proteoglykane spielen eine kontrollierende Rolle bei der Reifung von Kollagen-Fibrillen [17].

Heparin / Heparansulfat (HS)

Heparin ist ein gerinnungshemmendes GAG und besteht aus dem Aminozucker D-Glukosamin, das glykosidisch $\alpha(1\rightarrow4)$ an die Uronsäure L-Iduronsäure oder D-Glukuronsäure gebunden ist. L-Iduronsäure ist ebenfalls $\alpha(1\rightarrow4)$ und D-Glukuronsäure $\beta(1\rightarrow4)$ an den nächsten Rest gebunden. Heparansulfat unterscheidet sich strukturell nicht von Heparin. Die beiden GAGs sind lediglich in ihrem Sulfatanteil verschieden [45].

Keratansulfat (KS)

Keratansulfat ist das einzige GAG, das keine Uronsäure besitzt [45]. Keratansulfat geht häufig Verbindungen mit Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure ein und kontrolliert die räumliche Ausrichtung von Kollagen-Fibrillen und –Fasern [17].

3.2.2.3 Fibronectin

Fibronectin ist ein großes Glykoprotein (als Monomer 220 – 240 kDa), das Zellen helfen kann, an die extrazelluläre Matrix zu binden. Es wirkt mit bei der Organisation der Matrix und ist für die Zellmigration in Wirbeltierembryos wichtig. Fibronectin ist aus zwei großen Untereinheiten (Polypeptidketten) aufgebaut, die durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Jede dieser Untereinheiten besteht wiederum aus drei Modulen (Typ I, II und III). Je nach Häufigkeit der Modultypen entstehen verschiedene Fibronektine. Typ I bindet an Fibrin, Typ II an Kollagene und Typ III an Integrine und Zellmembranen [55].

3.2.2.4 Laminin

Laminin ist ein kreuzförmig gestaltetes, dimeres Glykoprotein, das nur in der Basalmembran, also der Schicht zwischen Bindegewebe und Epithelium, vorkommt. Jedes Laminin-Molekül ist ein Heterotrimer, das aus einer Alpha-, einer Beta- und einer Gamma-Kette besteht. Bisher wurden 15 Laminin-Trimere identifiziert, von denen das Laminin-1 die klassische

Version darstellt. Laminin ist unter anderem an Zelladhäsion, -wanderung und -differenzierung beteiligt und hat wachstumsfaktorähnliche Funktionen [3, 55].

3.2.2.5 MMPs und TIMPs

Der regulierte Turnover der EZM-Makromoleküle ist entscheidend für eine Vielzahl von wichtigen biologischen Prozessen. Einer dieser Turnover ist der zeitgerechte Abbau der EZM-Moleküle. Der Abbau kann enzymatisch oder nicht enzymatisch vonstattengehen. Im ersteren Fall erfolgt der Abbau mittels einer Protease, die zu einer der zwei Gruppen gehören: Serinproteasen oder Matrixmetalloproteinasen (MMPs). MMPs stellen den größeren Teil der Proteasen dar und sind notwendig, um embryonale Entwicklung, Morphogenese, Reproduktion und Geweberesorption und -umbau zu ermöglichen [3, 39, 100].

Bisher sind bei Säugetieren mindestens 28 MMPs bekannt (siehe Abbildung 7). MMPs sind aus drei Domänen aufgebaut: dem Propeptid (ca. 80 Aminosäuren), der katalytischen Domäne (ca. 170 Aminosäuren) und der C-terminalen Hämapexin-ähnlichen Domäne (ca. 210 Aminosäuren). MMPs werden als Zymogene sezerniert und durch die Abspaltung der Propeptid-Domäne aktiviert. Diese Propeptide, die Teil des "Cystein-Switch" sind, beinhalten einen konservierten Cystein-Rest, der das katalytische Zink bindet, um die Latenzzeit der pro-MMPs aufrechtzuerhalten. MMPs gehören somit zur Gruppe der Zink-Enzyme und repräsentieren einen wichtigen Teil dieser Enzymgruppe. Die katalytische Domäne beinhaltet ein Zink bindendes Motiv und ein konserviertes Methionin. Außerdem besitzt diese Domäne ein zusätzliches strukturelles Zinkion sowie 2 - 3 Kalziumionen, die für die Stabilität und die Expression der enzymatischen Aktivität benötigt werden. Die Hämapexin-ähnliche C-terminale Domäne ist essentiell für Kollagenasen, um interstitiell Triple-Helices zu schneiden [4, 15, 22, 23, 30, 101, 139, 150, 153].

MMP number	Collagenases
MMP-1	Collagenase 1
MMP-2	Gelatinase A
MMP-3	Stromelysin 1
MMP-7	Matrilysin
MMP-8	Collagenase 2
MMP-9	Gelatinase B
MMP-10	Stromelysin 2
MMP-11	Stromelysin 3
MMP-12	Macrophage elastase
MMP-13	Collagenase 3
MMP-14	MT-1-MMP
MMP-15	MT-2-MMP
MMP-16	MT-3-MMP
MMP-17	MT-4-MMP
MMP-18	Collagenase 4
MMP-19	no trivial name
MMP-20	Enamelysin
MMP-21	XMMP (Xenopus)
MMP-22	CMMP (chicken)
MMP-23	no trivial name
MMP-24	MT-5-MMP
MMP-25	MT-6-MMP
MMP-26	Matrilysin-2, Endometase
MMP-27	human homologue of CMMP (MMP-22)
MMP-28	Epilysin

Abbildung 7: Liste der bisher entdeckten Säugetier-MMPs (modifiziert) [107, 153]

Die wichtigsten Inhibitoren der MMPs sind die sogenannten "tissue inhibitors of matrix metalloproteinases" (TIMPs). Bisher sind 4 TIMPs (TIMP-1 bis TIMP-4) bekannt, von denen auch alle in den fetalen Eihäuten vorkommen. Als Inhibitoren der MMPs spielen TIMPs eine Schlüsselrolle bei der Erhaltung des Gleichgewichts zwischen den EZM-Komponenten, indem sie in verschiedenen physiologischen Prozessen mitwirken [41, 50]. Ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs, d. h. eine erhöhte MMP- oder erniedrigte TIMP-Konzentration kann zur Degradierung der EZM führen.

3.2.3 Der Blasensprung

Die Öffnung der Fruchtblase wird als Blasensprung (engl. ROM = rupture of membranes) bezeichnet. Man spricht von einem rechtzeitigen spontanen Blasensprung (engl. SROM = spontaneous rupture of membranes), wenn Wehen, d. h. muttermundswirksame Uterus-Kontraktionen, eingesetzt haben und der Muttermund sich öffnet. Dies kommt bei etwa 2/3 aller Geburten vor. Als vorzeitigen Blasensprung (VBS; engl. PROM = premature rupture of membranes) bezeichnet man den Sprung der Fruchtblase vor Beginn der Eröffnungsperiode, d. h. vor dem Beginn der muttermundswirksamen Wehen. Weiterhin wird ein VBS vor vollendeter 37. SSW als früher vorzeitiger Blasensprung (fVBS, engl. PPROM = preterm premature rupture of membranes) bezeichnet [2, 48, 111]. Es wird allgemein angenommen, dass nicht nur die physikalischen Kräfte der Wehen alleine einen Blasensprung auslösen. Biochemische Veränderungen der EZM begünstigen zusätzlich eine Ruptur der Eihaut und spielen somit eine wichtige Rolle [74]. Im Falle des VBS und fVBS ist es wahrscheinlich, dass ein Ungleichgewicht der EZM-Komponenten auftritt, das zu einem verfrühten Blasensprung ohne die mechanischen Kräfte der Wehen führt.

3.2.4 Biomechanische Aspekte fetaler Eihäute

Obwohl deren genaue Beteiligung bisher unklar ist, bestimmt vor allem die Veränderung sowohl der Glykosaminoglykane, im Speziellen der Hyaluronsäure, als auch der Kollagene die mechanischen Eigenschaften der fetalen Eihaut [90].

Kollagen, vor allem Kollagen Typ I, das das häufigste Kollagen in fetalen Eihäuten ist, ist von Natur aus gekräuselt und im belastungsfreien Zustand durchgehend gewellt. Klassische Modelle gehen davon aus, dass sich eine Kollagenfaser erst glättet, bevor sie in der Lage ist Last zu tragen. Wenn solch eine Faser gedehnt wird, fängt sie an sich zu glätten und trägt in diesem Zustand noch keine Last. Erst wenn die Kollagenfaser geglättet ist, wird sie belastet und als linear elastisch angesehen. Wenn man sich in Abbildung 8 als nächstes eine Gruppe von Kollagenfasern anschaut, sieht man, dass verschiedene Kollagenfasern (Faser 1-5)

verschiedene Gerade an Welligkeit haben und somit auch unterschiedlich lang sind (L_0 = ursprüngliche Länge, L = vorherrschende Länge). Mit zunehmender Dehnung (eine Messgröße der Deformation, definiert als $\lambda = L/L_0$) glätten sich die Fasern unterschiedlich schnell. Wenn man λ gegen P (Spannung = Kraft pro ursprünglichem Probenquerschnitt, ähnlich dem Druck) aufträgt, entsteht eine Spannungs-Dehnungs-Kurve. In Region I haben noch fast alle Fasern ihre ursprüngliche Länge. Faser 1 ist am wenigsten gekräuselt und glättet sich als erstes, gefolgt von den Fasern 2-4 (siehe Region II und III). Je mehr Fasern geglättet sind, desto höher wird die Traglast des Gewebes. In den Regionen I-IV hat die Spannungs-Dehnungs-Kurve einen nicht-linearen Zusammenhang. Erst wenn alle Fasern geglättet sind, hat die Spannungs-Dehnungs-Kurve einen linearen Bereich (Region IV).

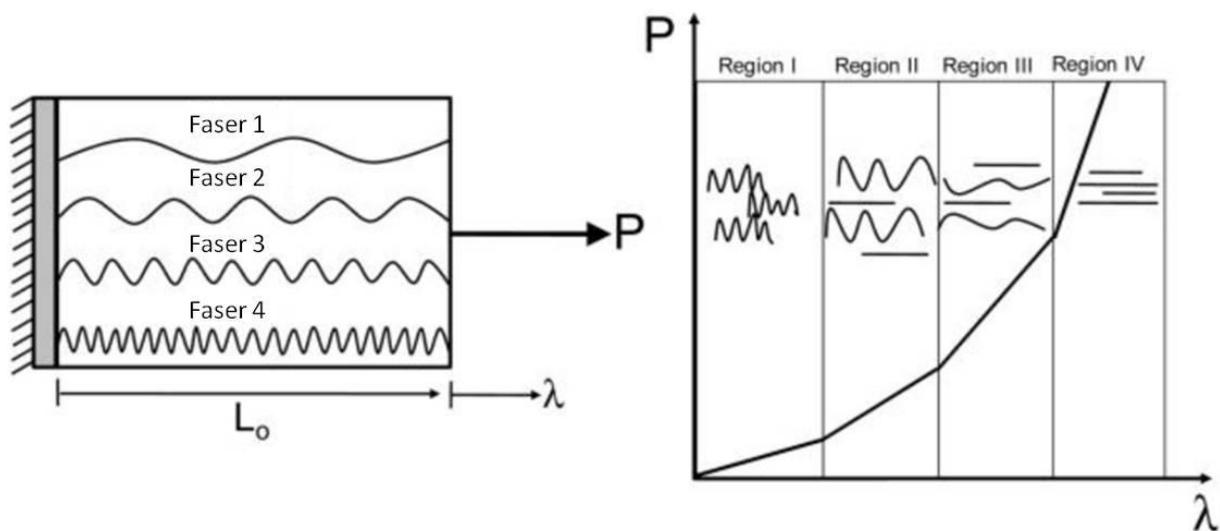


Abbildung 8: Gruppe von Kollagenfasern mit unterschiedlicher Kräuselung (modifiziert) [63]

Es gibt zahlreiche Studien, in denen die mechanische Belastbarkeit der fetalen Eihäute untersucht wurde. Bei einem Blasensprung reißen Amnion und Chorion gewöhnlich nicht gleichzeitig. In der Literatur herrscht jedoch Uneinigkeit, ob bei einem Blasensprung zuerst das Amnion oder das Chorion reißt. Man ist sich jedoch einig darüber, dass das Amnion mechanisch belastbarer ist als das Chorion [69, 109, 129], da die amniotischen Bestandteile wesentlich weniger dehnbar sind [108]. Bei in-vivo Untersuchungen reißt bei mechanischer Belastung das Chorion vor dem Amnion [104]. Schwachstellen oder Verdünnungen der

Membranstruktur werden oft als Initiator für den mechanischen Zusammenbruch der fetalen Eihaut genannt [94]. Vergleichende Studien mit Ratten zeigten eine erhöhte Apoptose-Rate im Amnion zum Ende der Schwangerschaft hin. Es wird vermutet, dass Fissuren vor allem im Bereich der Zervix auftreten, wo die stabilitätsunterstützende Funktion der Uteruswand fehlt [69]. Obwohl Schmidt und Klima [124] gegenteiliger Meinung sind, wird generell angenommen, dass eine Abnahme der Dicke im Bereich der Rissstellen auftritt [6–8].

Ein bedeutender Teil des Gewebevolumens ist extrazellulärer Raum, der mit einem komplexen Netzwerk aus Makromolekülen gefüllt ist, das die extrazelluläre Matrix bildet. Genauso wie auch in anderen Bindegeweben dominiert auch in den fetalen Eihäuten die EZM volumenmäßig gegenüber den Zellen und bestimmt somit deren physikalische Eigenschaften [3]. Aus diesem Grund sind die EZM-Komponenten von großer Bedeutung, wenn man verstehen möchte, welche Faktoren die Stabilität der fetalen Eihäute beeinflussen.

3.3 Frühgeburt und (früher) vorzeitiger Blasensprung

Wird die 37. Schwangerschaftswoche nicht vollendet (Schwangerschaft kürzer als 259 Tage), d. h. wenn 37+0 SSW nicht erreicht wird, spricht man von einer Frühgeburt (engl.: premature birth oder preterm delivery). Dabei muss das Neugeborene definitionsgemäß mindestens 500 g wiegen oder Lebenszeichen wie Atmung oder Herzschlag aufweisen. Wiegt das Neugeborene allerdings weniger als 500 g und hat es die erwähnten Lebenszeichen nicht, so spricht man von einer Fehlgeburt oder Stillgeburt (engl. stillbirth). Bei den Frühgeburten unterscheidet man weiterhin zwischen:

- „Mild Preterm Birth“ (32. bis 36. SSW),
- “Very Preterm Birth” (28. bis 31. SSW) und
- “Extremely Preterm Birth” (weniger als 28 SSW),

Mit abnehmender Schwangerschaftsdauer steigt die Sterblichkeitsrate [33, 97, 156, 157]. Die frühgeborenen Säuglinge werden des Weiteren unabhängig von ihrer Reife nach ihrem Geburtsgewicht eingeteilt [102, 156]:

- niedriges Geburtsgewicht („**Low Birth Weight**“, LBW): 1.500 bis 2.499 g
 - 5 – 15 % der Lebendgeborenen
- sehr niedriges Geburtsgewicht („**Very Low Birth Weight**“, VLBW): 1.000 bis 1.499 g
 - 0,8 – 1,5 % der Lebendgeborenen
 - bis zu 65 % der in der Neonatalperiode (1. - 28. Lebenstag) verstorbenen Kinder
- extrem niedriges Geburtsgewicht (**Extremely Low Birth Weight**, ELBW): < 1.000 g
 - 0,3 – 0,6 % der Lebendgeborenen
 - 50 % der in der Neonatalperiode Verstorbenen

Weltweit kommen jährlich 130 Millionen Babys zur Welt [157], von denen ca. 13 Millionen Frühgeburten sind [70]. Dabei variiert die Frühgeburtsrate je nach Land von 5 – 18 % [21]. In Deutschland werden jährlich ca. 800.000 Babys geboren, von denen 6 – 8 %, also ca. 50.000 bis 60.000 Frühgeburten sind. Diese Angaben schwanken regional jedoch deutlich. Von diesen Frühgeborenen wiegen 1 % sogar weniger als 1500 g. Diese Babys mit sehr niedrigem Geburtsgewicht stellen jährlich 8.000 Geburten in Deutschland dar [43, 98, 158]. Die Frühgeburtenrate liegt in Deutschland bei etwa 7 % aller Lebendgeburten [140], von denen 20 % sehr früh (very preterm birth) geboren werden [43].

3.3.1 Ursachen und Risikofaktoren der Frühgeburt und des (frühen) vorzeitigen Blasensprungs

Die Ursachen bzw. Risikofaktoren für eine Frühgeburt können in verschiedene Kategorien sortiert werden:

Medizinisch-Biologischer Hintergrund

Ursachen bzw. Risikofaktoren mütterlicherseits:

- Alter, Größe und Gewicht sowie übermäßige Gewichtszunahme während der Schwangerschaft
- Ethnische Zugehörigkeit
- Familienstand, soziale Lage und psychosoziale Faktoren wie z. B. Stress
- physische Belastung, Sport (auch z. B. Ausüben schwangerschaftsungeeigneter Sportarten)
- Genetische, familiäre Faktoren
- Ernährung
- Anzahl früherer Geburten, Schwangerschaftsintervalle
- vorherige Geburt, vorheriger Abort, Spontanabort oder Totgeburt
- frühere Unfruchtbarkeit
- Rauchen, Alkohol, Drogen, Einnahme von bestimmten Medikamenten und evt. massiver Kaffeeconsum
- Infektionen oder Krankheiten wie z. B. Diabetes oder Asthma
- Umwelttoxine wie z. B. Blei oder Pestizide
- Anzahl der Sexualpartner vor und während der Schwangerschaft

Ursachen und Risikofaktoren von Seiten des Kindes:

- Geschlecht des Kindes (bei Jungen besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit einer Frühgeburt als bei Mädchen)
- Zwillings- oder Mehrlingsgeburt

Ursachen und Risikofaktoren durch medizinische Komplikationen:

- Blutungen
- vorzeitige Wehen
- Gebärmutterhalsschwäche
- vorzeitiger Blasensprung

Dabei sind die Risikostärken für die aufgeführten Faktoren sehr unterschiedlich. Beim Vorliegen mehrere Risiken ist bisher nicht bekannt, inwieweit (z. B. additiv oder multiplikativ) sich die Wahrscheinlichkeit für eine Frühgeburt erhöht [43].

Auch wenn nicht eindeutig geklärt ist, ob sie regelhaft Auslöser eines fVBS sind, so sind ascendierende Infektionen in 40 % der Fälle von Frühgeburtlichkeit nachgewiesen [46].

3.3.2 Folgen der Frühgeburt und des (frühen) vorzeitigen Blasensprungs

Auch wenn durch immer besser werdende technisch-diagnostische Maßnahmen die perinatale Mortalität von den 50er Jahren bis 1995 von 50 % auf 5 ‰ gesenkt werden konnte, so ist die Frühgeburt mit 30 % immer noch Hauptursache der perinatalen Mortalität. Die Frühgeburt ist zudem für ca. 70 % der postnatalen Mortalität verantwortlich. Noch viel bedeutender ist allerdings die Morbiditätsentwicklung, d. h. die Morbidität der Kinder im späteren Lebensalter, ausgelöst durch eine Frühgeburt. Besonders wichtig zu nennen sind hier zunächst intrazerebrale Blutungen, die dafür sorgen, dass etwa 10 – 15 % der überlebenden sehr kleinen Frühgeborenen lebenslange Behinderungen und Mehrfachbehinderungen aufweisen. Des Weiteren treten bei Kindern von Müttern mit ascendierenden Infektionen durch Viren oder Bakterien neurologische Symptome auf [43].

Neben der erhöhten psychischen Belastungen für Mutter und Kind und den gesundheitlichen Folgen und Spätfolgen ist eine Frühgeburt auch mit immensen Kosten und Aufwand verbunden. So braucht ein sehr kleines Frühgeborenes in der Regel sowohl ärztliche als auch pflegerische 24-Stunden Betreuung. Aus diesem Grund liegen die Kosten für ein Frühgeborenes je nach Alter und Geburtsgewicht bei etwa 12.000 Euro [56]. Im Jahr 2000 ging man von Gesamtkosten von 1,6 Mrd. DM (ca. 800 Mio. Euro) durch Frühgeborene aus [43]. Mit diesen aufgeführten möglichen Kosten einer Frühgeburt endet der Mehraufwand allerdings nicht. Es wird davon ausgegangen, dass Frühgeborene auch als Kinder noch gefördert werden müssen, um eventuelle Nachteile gegenüber termingerecht Geborenen auszugleichen [56].

Wenn ein vorzeitiger Blasensprung eingetreten ist, muss bei vaginalen Untersuchungen besonders vorsichtig vorgegangen werden, um ein Amnioninfektionssyndrom (AIS) zu vermeiden. Ursache hierfür ist vermutlich das Fehlen der mechanischen Barriere von Zervix und Eihäute und das Eindringen von Keimen aus dem unteren Genitaltrakt in die Umgebung des unteren Eipols [126]. Das AIS ist eine Infektion der Eihaut, des Fruchtwassers und des Feten. Häufige Keime sind Enterokokken, *E. coli*, *S. aureus*, Streptokokken der Gruppe A und B, Ureaplasmen, *Chlamydia trachomatis* u. a. AIS ist sowohl für das Kind als auch für die Mutter gefährlich. Es kann z. B. zur Sepsis kommen, sodass bei einer AIS-Diagnose eine Antibiotikum-Therapie und ein aktives Vorgehen zur Geburtsbeendigung meist unumgänglich ist [85].

Das Risiko eines zu früh geborenen Babys liegt vor allem an den nicht fertig gereiften Organen. Das RDS (respiratory distress syndrome = Atemnotsyndrom) stellt dabei eines der größten Probleme bei Frühgeburten vor der 32. SSW dar. So kann bei einer bevorstehenden Frühgeburt bei der Schwangeren die Glukokortikoidtherapie oder Gabe von Ambroxol zur Beschleunigung der fetalen Lungenreife sowie das Thyrotropin-releasing-Hormon zur besseren Lungenentfaltung eingesetzt werden [35]. Postpartal hilft dem Kind entsprechend eine direkte Applikation von Surfactant.

MMPs und TIMPs im Zusammenhang mit der Frühgeburt und dem (f)VBS

Bisher wurden zahlreiche Studien über MMPs und TIMPs im Zusammenhang mit der Frühgeburt und dem (f)VBS durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen Schwangerschaftsdauer, (f)VBS, Kaiserschnitt und normaler Schwangerschaft wurde erforscht, wobei sich die meisten Studien auf die Untersuchung des Fruchtwassers und nicht auf die fetalen Eihäute beziehen. Althayde et al. [12] fanden heraus, dass die MMP-9 Konzentration in Fruchtwasser mit steigendem Gestationsalter nicht ansteigt. Andere Studien zeigten allerdings, dass der MMP-9 Spiegel nach vaginaler Entbindung bei Frauen mit einem VBS gegenüber Frauen mit vorzeitigem Wehen und intakten Eihäuten die zeitgerecht entbunden haben, erhöht ist. Bei Frauen mit einem Kaiserschnitt wurde kein MMP-9 gefunden [11, 12, 40, 51, 88, 149]. Aufgrund dieser Ergebnisse ist man sich in der Literatur einig, dass das Auftreten von MMP-9 einen VBS fördert. Man ist sich darüber einig, dass der Abbau der fetalen Eihäute während der Wehen und dem (f)VBS mit dem

Zusammenspiel und dem Ungleichgewicht der MMPs und der TIMPs zusammenhängt [12, 145, 149]. Wissenschaftler sind sich allerdings über die Zu- und Abnahme anderer MMP- und TIMP-Typen uneinig. Studien zeigen entweder keinen signifikanten Unterschied von MMP-1, MMP-2 und TIMP-1 bei Frauen mit und ohne VBS [51] oder einen signifikanten Anstieg der MMP-1 [87], MMP-2 und MMP-14 (= MT1-MMP) [40, 106] Konzentration sowie eine Abnahme der TIMP-1 [145, 149] und TIMP-2 [40, 89] Konzentration im Fruchtwasser von Frauen mit versus ohne VBS.

Zudem fanden Maymot et al. heraus, dass die TIMP-2 Konzentration mit steigendem Gestationsalter zunimmt. Sie fanden allerdings keinen Zusammenhang zwischen dem Gestationsalter und der MMP-2 Konzentration. Frauen mit Wehen (sowohl zeitlich regelgerecht als auch vorzeitig) hatten eine niedrigere TIMP-2 Konzentration als Frauen ohne Wehen [89].

Die vorherrschende Datenlage von Forschungsergebnissen zeigt, dass noch ein großer Bedarf bei der Aufklärung der MMPs und TIMPs im Zusammenhang mit dem (f)VBS besteht.

3.3.3 Diagnose des frühen vorzeitigen Blasensprungs

Nicht nur die Vorhersage, sondern auch die wichtige Diagnose eines vorzeitigen Blasensprungs (= fVBS) kann im Einzelfall schwierig sein. Keiner der bisher gefundenen Parameter weist 100 %ige Aussagekraft auf. Die richtige Diagnose ist aber entscheidend für das weitere Management, damit schwangere Frauen nicht fehlbehandelt werden [126]. Wenn Fruchtwasserabgang bei einer SpekulumEinstellung erkennbar ist, ist die Diagnose des Blasensprungs eindeutig. Bei einem hohen Blasensprung oder verminderter Fruchtwassermenge kann die Diagnose u. U. jedoch schwierig sein. Um einen Blasensprung zu diagnostizieren, bedient man sich neben der SpekulumEinstellung bei der klinischen Kontrolle weiteren Untersuchungen [154]:

Ultraschalluntersuchung zur Bestimmung der Fruchtwassermenge

Es wird empfohlen bei Aufnahme und dann in 7–10 tägigen Intervallen die Fruchtwassermenge zu kontrollieren [115].

pH-Methode

Der normale pH-Wert des Scheidensekrets beträgt 3,8 – 4,5. Eine Erhöhung des pH-Wertes kann auf Fruchtwasserabgang (pH-Wert Fruchtwasser > 6,5) oder auf eine bakterielle Infektion hindeuten.

Bestimmung von Zytokinen und Zytokinrezeptoren

Zytokine sind niedermolekulare extrazelluläre Signalproteine die durch Immun- und Entzündungszellen sekretiert werden. Zu den Zytokinen zählen Interleukine (= IL), koloniestimulierende Faktoren, Interferone, Tumornekrosefaktoren, Wachstumsfaktoren und Chemokine. IL-1 kann die Synthese von Kollagenasen stimulieren, die wiederum die Reißfestigkeit der Eihäute herabsetzen. IL-8 könnte eine wichtige Rolle bei der Regulation der Invasion neutrophiler Granulozyten ins zervikale Stroma mit anschließender Degranulation und Freisetzung von Proteasen spielen [32]. Bakterielle Produkte können Makrophagen aktivieren, die in der Dezidua, Plazenta und Eihäuten vorkommen. Die aktivierten Makrophagen wiederum sekretieren u. a. Zytokine, die im Scheidensekret nachgewiesen werden können und auf einen Blasensprung hindeuten [152].

Bestimmung von fetalem Fibronectin

Fetales Fibronectin wird von den fetalen Eihäuten und Trophoblasten gebildet. Fetales Fibronectin, isoliert aus Zervix oder Vagina, mit einer Konzentration > 50 ng/mL ab etwa der 22. bis 24. SSW ist ein aussagekräftiger Marker, um eine bevorstehende Frühgeburt vorherzusagen [49]. Wenn fFN im Zervix- oder Vaginalsekret nachgewiesen wird, ist das ein Hinweis auf vorzeitige Wehen oder einen vorzeitigen Blasensprung [112, 126]. Es gibt mittlerweile Schnelltests zur Bestimmung eines VBS, die als Bedside-Test durchgeführt werden können und als sehr sensitiv gelten [1]. (Vgl. auch Kapitel 3.4.2)

„Farnkraut-Test“

Der Farnkraut-Test ist ein kostengünstiger und leichtdurchzuführender, aber deutlich weniger sensitiver Test auf Fruchtwasserabgang. Dabei wird Vaginalsekret auf einem Objektträger getrocknet und unter dem Mikroskop untersucht. Wenn kristalline Farnkraut-ähnliche Strukturen zu sehen sind, ist der Test positiv [86].

Bestimmung von IGFBP-1

Das IGFBP-1 (Insulin-like growth factor binding protein 1 = Transportprotein des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors 1) ist ein Protein, das in den fetalen Leberzellen synthetisiert wird. Wenn sich die Eihäute von der Dezidua lösen, wird die phosphorylierte Form des Proteins aus Deziduazellen in das Zervixsekret freigesetzt [75]. Im Fruchtwasser ist es in höheren Konzentrationen nachweisbar als im Zervixsekret oder im Urin [31]. Dadurch kann der Abgang von Fruchtwasser nachgewiesen werden.

3.3.4 Management des frühen vorzeitigen Blasensprungs

Aufgrund der u. U. verheerenden Folgen einer Frühgeburt sind Wissenschaftler bemüht, Mittel und Wege zu finden, einen frühen vorzeitigen Blasensprung vorhersagen zu können. Sinnvoll wird eine Prognose zur Wahrscheinlichkeit eines bevorstehenden frühen vorzeitigen Blasensprungs aber nur dann, wenn auch Maßnahmen zu seiner Verhinderung oder Verzögerung getroffen werden können oder Vorkehrungen getroffen werden können, damit es bei der Geburt zu weniger Komplikationen kommt (z. B. durch Verlängerung der Schwangerschaft oder rechtzeitiger stationärer Aufnahme zur Geburt unter Rahmenbedingungen einer maximalen medizinischen Versorgung).

Obwohl es bis heute kein einheitliches Management beim frühen vorzeitigen Blasensprung gibt [147], werden in der Literatur verschiedene Ansätze beschrieben und Empfehlungen ausgesprochen. Im Folgenden werden einige Therapien und Komplikationen, die im Zusammenhang mit dem Management des fVBS stehen, erläutert:

Abwartendes Verhalten

Ein Grund, bei einem auftretenden fVBS abzuwarten, liegt in der Vermutung, dass Schwangere durch einen BS eine erhöhte Cortisolfreisetzung haben, wodurch Organsysteme wie zentrales Nervensystem, Leber, Niere und vor allem die Lunge schneller reifen. Unabhängig von der SSW nimmt die Häufigkeit des Atemnotsyndroms bei einem VBS von über 12 Stunden ab. Bei niedrigem Gestationsalter (26. bis 32. SSW) konnte dieser Effekt nach länger bestehendem BS (48 bis 72 Stunden) bereits nachgewiesen werden. Wenn bei

einem BS über 12 Stunden trotzdem beatmet werden muss, so fällt die nötige Beatmungsdauer kürzer aus [52].

Amnioninfektionssyndrom

Das Amnioninfektionssyndrom (AIS) ist eine Infektion der Eihaut, des Fruchtwassers und des Feten [85] (siehe dazu auch Kapitel 3.3.2). Folgende Zeichen sind keine Frühzeichen, sondern Parameter einer manifesten Infektion [115]:

- Temperaturerhöhung ($\geq 38^{\circ}\text{C}$)
- mütterliche Tachykardie (≥ 100 Spm)
- fetale Tachykardie (≥ 160 Spm)
- druckschmerzhafter Uterus
- zunehmende Wehentätigkeit
- übel riechendes Fruchtwasser
- Leukozytose ($\geq 15.000/\mu\text{l}$)
- CRP-Erhöhung (serieller Anstieg)

Antibiotische Therapie

Bei Frauen mit VBS reduziert eine prophylaktische Antibiotikagabe die maternale und fetale Morbidität und kann zu einer Verlängerung der Schwangerschaftsdauer führen. Die prophylaktische Gabe wird international z. B. mit Mezlocillin, Piperacillin, Clindamycin, Ampicillin oder Erythromycin bzw. Kombinationen durchgeführt. Welches Antibiotikum oder welche Antibiotika-Kombinationen am besten geeignet sind, und wie lange die Prophylaxe durchgeführt werden soll, kann zur Zeit nicht mit abschließender Sicherheit gesagt werden. Bei Nachweis von hämolysierende Streptokokken der Gruppe B (GBS) wird empfohlen: Penicillin G i. v. einmalig 5 Mio. Einheiten, anschließend 2,5 Mio. Einheiten alle 4 Stunden bis zur Geburt. Alternativ können Ampicillin oder Cefazolin zur Anwendung kommen [115].

Lungenreifeinduktion

Bei einem Blasensprung ab der 37. SSW kann angenommen werden, dass die Lunge vollständig ausgereift ist. Aufgrund des Infektionsrisikos wird eine Geburt innerhalb von 24 Stunden angestrebt. Bei einem BS vor der 37. SSW gibt es u. U. jedoch andere

Vorgehensweisen [52]. Zur Lungenreifeinduktion, also der Förderung der Lungenreife, wird eine Dosierung von 2 x 12 mg Betamethason i. m. im Abstand von 24 Stunden empfohlen. Eine früher durchgeführte routinemäßige Wiederholung ist wegen unerwünschter Nebenwirkungen heute obsolet [115].

Tokolyse

Unter einer Tokolyse versteht man die Wehenhemmung durch sogenannte Tokolytika. Das Ziel des Einsatzes beim fVBS ist vor allem, die Schwangerschaft um zumindest einige Tage zu verlängern. Gerade bei niedrigem Gestationsalter ist dies von entscheidender Bedeutung, da die schwangerschaftsverlängernde Zeit u. a. dafür genutzt werden kann, eine Lungenreifeinduktion vorzunehmen. Da die meisten verwendeten Substanzen für die Mutter allerdings gravierende Nebenwirkungen haben können, muss der Nutzen des Einsatzes der Tokolytika genau abgewogen werden [126].

Zervixinsuffizienz, Zervixlänge und Cerclage

Zervixinsuffizienz ist definiert als eine Verkürzung des Gebärmutterhalses (= Cervix uteri oder kurz Zervix), unter Umständen mit Eröffnung des Muttermundes. Sie tritt in 1 - 3 % aller Schwangerschaften auf. Um einen objektiven Messwert zu haben, misst man die Zervixlänge und -kanalweite mittels vaginalsonographischer Untersuchung. Physiologisch ist eine Zervixlänge > 3 cm und eine Zervixkanalweite < 8 mm. Außerhalb eines Graubereichs zwischen 2 cm und 3 cm wird als pathologisch eine Zervixlänge < 2 cm gewertet. Im Gegensatz zur klinischen Beurteilung kann man durch vaginalsonographische Untersuchung zudem eine Trichterbildung der Zervix (= eine Aufdehnung des inneren Muttermundes) sehen [154]. Um den Halteapparat der Zervix uteri zu stabilisieren, kann gegebenenfalls eine Cerclage gelegt werden. Dadurch kann unter bestimmten Umständen der verfrühten Öffnung des Muttermundes entgegengewirkt werden. Durch eine Cerclage können die Eihäute, vor allem der untere uterine Pol mechanisch entlastet werden. Sobald ein Blasensprung eingetreten ist, muss eine Cerclage entfernt werden.

Die Empfehlungen zum Vorgehen der DGGG (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe) bei einem fVBS hängen von der Reife des Babys bzw. dem Gestationsalter ab, die in folgende Gruppen eingeordnet sind [115]:

Gruppe I: SSW < 20 + 0

Gruppe II: SSW ≥ 20 + 0 bis < 24+0

Gruppe III: SSW ≥ 24 + 0 bis < 34+0

Gruppe IV: SSW ≥ 34 + 0

Generelle empfohlene Maßnahmen laut DGGG

Außer bei mütterlicher Gefährdung wird generell empfohlen, die Patientinnen der Gruppe II und III in ein Perinatalzentrum zu verlegen. Durch eine SpekulumEinstellung soll der Blasensprung abgeklärt werden (in ca. 90 % ist eine klinische Diagnose möglich). Außerdem sollte ein AIS ausgeschlossen werden. Sollte der Test auf AIS mit vitaler mütterlicher Gefährdung positiv ausfallen, wird die Beendigung der Schwangerschaft unter antibiotischer Therapie angestrebt. Ein nativer und mikrobiologischer Zervix- und Vaginalabstrich wird empfohlen. Ausnahme: Bei Patientinnen mit BS, die nach der 37+0 SSW mit zervixwirksamer Wehentätigkeit aufgenommen werden, kann auf einen Abstrich verzichtet werden. Tritt ein Blasensprung vor der 36+0 SSW auf und sind zu diesem Zeitpunkt hämolysierende Streptokokken der Gruppe B (GBS) nachgewiesen, sollte mit einer mütterlichen antibiotischen Prophylaxe zur Vermeidung der Neugeborenenensepsis durch GBS begonnen werden, wenn mit einer baldigen Geburt zu rechnen ist. Bei einem Blasensprung vor der 36+0 SSW und unbekanntem GBS-Status der Mutter sollte mit einer antibiotischen Prophylaxe begonnen werden, wenn eine baldige Geburt nicht auszuschließen ist. Besteht die Hoffnung, dass die Geburt verzögert werden kann, sollte im Rahmen der Aufnahmeuntersuchung ein mikrobiologischer Abstrich von Anorektum und Scheide zum Nachweis der GBS entnommen werden. Die antibiotische Prophylaxe ist dann bis zur Geburt bzw. bis zum Vorliegen eines negativen Ergebnisses des GBS-Abstriches (in der Regel 48 Stunden) fortzuführen. Bei einem Blasensprung ab 36+0 SSW ist eine antibiotische Prophylaxe bis zur Geburt indiziert, wenn der Zeitpunkt des Blasensprunges ≥ 18 Stunden zurückliegt, wenn es zu einer Temperaturerhöhung der Mutter auf ≥ 38,0 °C unter der Geburt kommt, wenn bei einer vorausgegangen Geburt eine Neugeborenenensepsis durch GBS aufgetreten ist, wenn eine GBS-Bakteriurie in dieser Schwangerschaft nachweisbar war, wenn ein präpartales GBS-Screening einen positiven Abstrichbefund auf GBS ergeben hat oder wenn Zeichen eines AIS vorliegen. Eine Lungenreifeinduktion soll entsprechend den

Empfehlungen der NIH-Konsensuskonferenz beim vorzeitigen Blasensprung zwischen 24. und 32. SSW (bzw. in Deutschland bis zur 34. SSW), außer bei einem manifesten AIS, erfolgen. Der Vorteil einer Tokolyse über zumindest 48 Stunden bis zum Abschluss der Lungenreife ist nachgewiesen. Eine Ultraschalluntersuchung zur Beurteilung der Fruchtwassermenge, des fetalen Zustandes und der Biometrie ist bei Aufnahme vorzunehmen. Eine Wiederholung im Verlauf kann sinnvoll sein. Eine digitale vaginale Untersuchung und ein transvaginaler Ultraschall bei vorzeitigem Blasensprung sind ausschließlich mit besonderer Vorsicht und sterilem Material erlaubt [115].

Bei verminderter Fruchtwassermenge und unklarem Schwangerschaftsalter kann es in seltenen Fällen hilfreich sein, eine Fruchtwasserauffüllung mit elektrolytfreier Lösung und Indigokarmin (einem wasserlöslichem blauen Farbstoff) vorzunehmen. Dadurch lässt sich ein Blasensprung durch Flüssigkeitsabgang eindeutig bestimmen und eine Diagnostik des Fetus erleichtern [154]. Bei diagnostiziertem Blasensprung führt man Ultraschalluntersuchungen zu folgenden Zwecken durch:

- Biometrie zur Bestimmung des Fetalgewichts
- Ausschluss von Organfehlbildungen, insbesondere der Nieren und des harnableitenden Systems
- Bestimmung der Rest-Fruchtwasserdepots
- Feststellung der kindlichen Bewegung einschließlich der fetalen Atembewegung
- kontinuierliche Bestimmung des Thoraxvolumens zur Prognose einer fetalen Lungenhypoplasie
- Dopplersonographische Untersuchung der fetalen Gefäße zum Ausschluss einer fetalen Minderperfusion bei Retardierung bzw. einer Mehrperfusion des Gehirns im Rahmen des sogenannten brain sparing.

Weitere Untersuchungen bei einem VBS sind die Verlaufskontrollen der Leukozytenzahl und der CRP-Konzentration als Entzündungsparameter zur Entscheidung der Schwangerschaftsbeendigung [154].

Schlussendlich muss durch die erfolgten Untersuchungen entschieden werden, ob eine Beendigung oder ein Fortführen der Schwangerschaft angestrebt wird.

Bei einem VBS wird meist zuerst ein vaginaler Abstrich gemacht, um genitale Infektionen auszuschließen. Die Untersuchung des Abstriches sollte folgende Keime abdecken: bakterielle Vaginosen, Chlamydien, Candida und Mycoplasmen/Ureaplasmen. Da die Eihaut Schutz vor Keimen bietet, wird nach einem frühen vorzeitigem Blasensprung ggf. eine antibiotische Therapie eingesetzt, um das erhöhte Risiko einer ascendierenden intrauterinen Infektion zu minimieren (siehe dazu auch Kapitel 3.3.2)[35, 154].

Gruppe I (SSW < 20 + 0)

Wenn es keinen Hinweis auf AIS gibt, wird ein abwartendes Verhalten mit 6 – 12 stündiger CRP-Kontrolle empfohlen. Zudem sollte die Fruchtwassermenge und die Vitalität des Kindes regelmäßig kontrolliert werden. Bei persistierendem Oligo-/Anhydramnion sollten die Eltern über die schlechte Prognose des Kindes (Lungenhypoplasie etc.) aufgeklärt werden [115]. Auch wenn die Schwangerschaft weiter fortgeführt werden kann, so können nach der Geburt Zeichen eines ultrafrühen Blasensprungs wie z. B. erhebliche Kontrakturen mit Fehllhaltung, Lungenhypoplasie und Wachstumsretardierung des Babys auftreten [154].

Gruppe II (SSW ≥ 20 + 0 bis < 24 + 0)

Wenn es keinen Hinweis auf AIS gibt, wird ein abwartendes Verhalten mit 6 – 12 stündiger CRP-Kontrolle und ggf. antibiotischer Therapie empfohlen. Zudem sollte die Fruchtwassermenge und die Vitalität des Kindes regelmäßig kontrolliert werden. Bei Erreichen der 24 + 0 (je nach Zentrum ggf. 23 + 0) SSW wird vorgegangen wie für Gruppe III empfohlen. Die Indikation einer antibiotischen Therapie ist nicht wissenschaftlich belegt, wird von der DGGG jedoch empfohlen. Grundsätzlich wird die Lungenreifeinduktion noch nicht offiziell empfohlen, auch wenn vereinzelte Arbeiten einen Vorteil ab der 23 + 0 SSW zeigen [115]. Die Risiken für das Baby sind die gleichen wie bei einem BS vor der 20. SSW. Die Ausprägung, vor allem die Kontrakturen, hängen wesentlich von der Dauer des Blasensprungs bis zur Entbindung ab [115].

Gruppe III (SSW ≥ 24 + 0 bis < 34 + 0)

Bis zu diesen SSW war früher das Risiko der Mortalität des Kindes durch Infektionen geringer als das Risiko einer Frühgeburt [52]. Dies ist heute nicht mehr der Fall. In Spezialzentren ist

das Outcome eines nicht infizierten extremen Frühchens z.B. in der 26. SSW deutlich besser als das eines inkektionsgeplagten Neugeborenen zwei Wochen später. Eine Schwangerschaftsverlängerung unter diesen Bedingungen ist damit nachteilig. Spätestens bei Auftreten eines AIS sollte eine zügige Entbindung unter antibiotischer Therapie angestrebt werden. Wenn es keinen Hinweis auf AIS gibt, wird ein abwartendes Verhalten mit Bettruhe unter Antibiotikagabe mit 6 – 12, im späteren Verlauf durchaus 24 stündiger CRP-Kontrolle und ggf. antibiotischer Therapie empfohlen. Außerdem sollte alle 12-24 Stunden ein CTG und regelmäßige Ultraschall-/Doppler-Untersuchung durchgeführt werden. Wird 34 + 0 SSW erreicht, so wird weiter wie in Gruppe IV vorgegangen. Außer bei Auftreten eines AIS wird eine Lungenreifeinduktion empfohlen [115].

Gruppe IV (SSW \geq 34+0)

Bei sichergestelltem AIS wird eine zügige Entbindung unter antibiotische Therapie durch Sectio caesarea angestrebt, falls keine schnelle Geburt zu erwarten ist. Wird kein AIS festgestellt, wird empfohlen die Schwangerschaft nach 12 – 24 Stunden aktiv zu beenden, wenn die Wehen nicht spontan einsetzen. In 34 + 0 SSW bis 37 + 0 wird eine antibiotische Therapie generell empfohlen [115]. Eine Lungenreifeinduktion bleibt Sonderfällen vorbehalten, eine Tokolyse ist kontraindiziert [115].

3.4 Biomarker

Laut dem National Institute of Health (NIH) ist ein Biomarker definiert als ein „Merkmal, das als Indikator für normale biologische Prozesse, pathogene Prozesse oder pharmakologische Wirksamkeit auf einen therapeutischen Eingriff objektiv gemessen und evaluiert wird“. Bei einem Biomarker zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit einer bevorstehenden Frühgeburt oder eines bevorstehenden frühen vorzeitigen Blasensprungs würde es sich demnach um einen „prognostischen Marker“ handeln, d. h. um einen „Marker, der die Wahrscheinlichkeit eines Krankheitsverlaufs vorhersagt“ [125].

3.4.1 Auswahl und Anforderungen an einen Biomarker

Bisherige Biomarker zur Vorhersage von Frühgeburten wurden von Mutter oder Fetus aus Körperflüssigkeiten wie Urin, Blut bzw. Scheidensekret der Mutter gewonnen. Die anschließende Auswertung, z. B. Vorhandensein, Abwesenheit oder Konzentration entsprechender Marker, soll Aufschluss über eine bevorstehende Frühgeburt geben. Die Biomarker sollten folgende Kriterien erfüllen, um in der Praxis angemessen angewendet werden zu können.

Im Optimalfall ist die Gewinnung von Biomarkern

- mit geringen Kosten verbunden,
- einfach in der Durchführung und
- ungefährlich für Mutter und Fetus,

wobei der höchste Anspruch der Sicherheit des Fetus und der werdenden Mutter gilt.

Der Test selbst sollte im Idealfall

- ebenfalls einfach in der Durchführung,
- mit geringen Kosten verbunden,
- unempfindlich gegenüber Störungen (Sperma, Blut, etc.),
- schnell evaluierbar und
- mit einer eindeutigen Aussage über die Wahrscheinlichkeit einer bevorstehenden Frühgeburt bzw. eines bevorstehenden fVBS assoziierbar sein.

Weiterhin ist das Timing für die Brauchbarkeit von Biomarkern wichtig. Ist ein Biomarker beispielsweise in der Lage eine kurz bevorstehende Frühgeburt vorherzusagen, also mehrere Stunden oder Tage, so darf die Zeit für den Nachweis des entsprechenden Biomarkers diese vorhersagbare Zeit natürlich nicht überschreiten. Außerdem ist es wichtig in welchem Gestationsalter sich die Schwangere befindet, denn auch ein Biomarker, der womöglich eine Frühgeburt sicher vorhersagen kann, kann dies oft nur in einem bestimmten Stadium der Schwangerschaft. Bei der Auswertung von möglichen Biomarkern muss außerdem in

Betrachtet werden, dass es tageszeitbedingte Schwankungen der zu ermittelnden Parameter geben kann, was bei der Probeentnahme beachtet werden müsste.

3.4.2 Biomarker für den frühen vorzeitigen Blasensprung in der Literatur

Beim heutigen Stand der Forschung gibt es eine Vielzahl an Biomarkern, die mit verschiedener hoher Sicherheit (Wahrscheinlichkeit) einen frühen vorzeitigen Blasensprung (fVBS) vorhersagen können. Im Folgenden werden die wichtigsten genannt.

Es gibt zahlreiche Studien, in denen ein Zusammenhang zwischen vaginalen Fremdorganismen und der Frühgeburt sowie dem fVBS festgestellt wurde. Allerdings ist weiterhin unklar, ob es sich dabei tatsächlich um einen Ursache-Wirkung-Zusammenhang handelt. So wurde für nahezu jeden vaginalen Organismus in zumindest einer Studie mit der Frühgeburt eine mögliche Assoziation gefunden [49]. Bei akut entzündlichen Prozessen kommt es zu einer unspezifischen Immunreaktion, die Akute-Phase-Reaktion genannt wird und sowohl systemisch als auch lokal wirken kann. Dabei setzen u. a. Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten im Entzündungsgebiet Botenstoffe (Mediatoren) wie z. B. bestimmte Interleukine und Tumornekrosefaktoren frei, die dann über die Blutbahn die Leber erreichen. Dort stimulieren sie in Anwesenheit von Cortisol die Leber zur vermehrten Synthese der etwa 30 verschiedenen Akute-Phase-Proteine (APP). APPs können sehr unterschiedlich sein, haben aber alle gemeinsam, dass Ihre Konzentration innerhalb von 6 - 48 Stunden nach dem Auftreten einer lokalen Entzündungsreaktion bis zur 100-fachen Konzentration zunimmt. Die Aufgabe der APPs ist es dann, die Entzündung zu lokalisieren und ihre Ausbreitung zu verhindern bzw. dem Körper zu helfen, einer sich ausbreitenden Entzündung Herr zu werden [120, 131]. Bei einer Entzündung oder Infektion, die zu einem fVBS führen könnte, könnten folgende Biomarker in erhöhter Konzentration nachweisbar sein:

Zytokine

Zytokine sind (Glyko-)Proteine, die von einer Vielzahl von Zellen gebildet werden können. Da es ständig neue Erkenntnisse über diese Proteine gibt, unterliegt das System der Zytokine einem permanenten Wandel, so dass keine einheitliche Nomenklatur existiert. Ein

wesentliches Problem bei der Einteilung ist die Tatsache, dass die meisten Zytokine nicht von einer einzigen Zellart gebildet werden. Außerdem können verschiedene Zytokine gleiche Wirkungen (= Redundanz) oder ein Zytokin je nach Zielzelle unterschiedliche Wirkungen (= Pleiotropie) haben. Zudem steht im Körper kein Zytokin für sich allein, sondern wirkt immer im Zusammenspiel mit verschiedenen anderen Zytokinen, die dann additiv, synergetisch oder antagonistisch wirken. Im Wesentlichen umfasst das System der Zytokine folgende Gruppen: Interleukine, Tumornekrosefaktor- α , Chemokine, kolonie-stimulierende Faktoren und Interferone. Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Kommunikation zwischen Abwehrzellen untereinander und mit anderen Zellen sowie bei Differenzierungs- und Wachstumsvorgängen (Wachstumsfaktoren) [60]. Ganz allgemein gilt eine Erhöhung der Konzentration inflammatorischer Zytokine im Fruchtwasser als zuverlässiger Indikator für eine intrauterine Infektion [37, 54, 59].

Einen Großteil der Zytokine bildet die Gruppe der **Interleukine**, die hauptsächlich zwischen (lat.: inter) den Weißen Blutzellen (gr. leukos = weiß) agieren. Bisher sind 26 Interleukine bekannt, die entsprechend der Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert sind: IL-1 bis IL-26. Interleukine erfüllen Aufgaben für die spezifische und die unspezifische Immunabwehr [60]. Interleukin-6 (= IL-6) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das zu den Akute-Phase-Proteinen gehört. Sein Auftreten im Fruchtwasser ist ein Hinweis auf intrauterine Infektionen. Im klinischen Alltag ist die Entnahme von Fruchtwasser allerdings nicht empfohlen [114].

Der **Tumornekrosefaktor-alpha** (TNF- α) ist ein 17 kDa großes zu den APPs zählendes proinflammatorisches Zytokin und kann als parakriner sowie endokriner Mediator wirken. Seine Bildung in Monozyten und Makrophagen wird besonders durch Lipopolysaccharid (= LPS) und andere bakterielle Produkte ausgelöst. TNF- α regelt Wachstum und Differenzierung vieler Zellen und wirkt für manche transformierte Zellen selektiv toxisch; besonders im Zusammenwirken mit Interferon- γ . TNF- α ist ein endogenes Pyrogen, es löst die Fieberbildung im Hypothalamus aus [65]. TNF- α aktiviert Interleukin-1 (= IL-1), wird aber auch per sog. Feedback durch IL-1 reguliert. TNF- α dient in niedrigen Konzentrationen der autokrinen und parakrinen Regulation von Entzündungszellen im Gewebe. Mittels der durch TNF- α initiierten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und der Aktivierung eingewanderter Leukozyten kommt es zur weiteren Zytokinausschüttung und zur

Akkumulation von Entzündungszellen am Ort der Entzündung [146]. TNF- α ist bei Schwangeren mit vorzeitigen Wehen und Amnioninfektionssyndrom erhöht, während es bei gesunden Schwangeren nicht nachweisbar ist [121]. Im Fruchtwasser wird TNF- α als bester prädiktiver Infektionsmarker angesehen [14].

TNF- α , IL-1 und IL-6 sind die wichtigsten Zytokine der frühen Abwehr und der Entzündung. Sie sorgen dafür, dass Leukozyten an den Ort der Entzündung gelockt werden und rufen in höheren Konzentrationen systemische Effekte hervor [60].

Chemokine sind 8–12 kDa große Zytokine, die vor allem für die unspezifische Immunabwehr von Bedeutung sind. Sie sind zellspezifisch lokal als Lockstoffe für Leukozyten. Chemokine sind z. B. für die Rekrutierung von Abwehrzellen an den Ort der Entzündung verantwortlich oder spielen eine Rolle für die Koordination der Rezirkulation der Lymphozyten. Die Chemokine haben unsystematische Namen erhalten und werden z. T. zu den Interleukinen (z. B. IL-8) gezählt [60, 65].

Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF, engl.: colony stimulating factors) sind Wachstumsfaktoren, die die Bildung und Freisetzung der Blutzellen im Knochenmark steuern. Eine Reihe von Interleukinen werden ebenfalls zu den CSFs gezählt [60].

Interferone sind Bestandteil der unspezifischen humoralen Abwehr und hemmen unspezifisch die virale Vermehrung. Die Hauptwirkung der Typ-I-Interferone besteht darin, die Nachbarzellen einer virusinfizierten Zelle in einen antiviralen Zustand zu versetzen, indem sie Zellen dazu stimulieren, verschiedene Proteine zu synthetisieren, die die virale Replikation hemmen oder die Abtötung infizierter Zellen unterstützen. Zu einem gewissen Anteil kommt es auch zu einer autokrinen Wirkung auf die infizierte Zelle [60].

C-reaktives Protein

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein Opsonin und das auffälligste Akute-Phase-Protein. Seinen Namen bekam es aufgrund seiner Reaktion mit dem C-Polysaccharid aus der Kapsel von Pneumokokken. Das CRP gilt aber als generelles Stimulans für Entzündungsmediatoren und verstärkt damit die unspezifische Immunabwehr. Unter dem Einfluss von vor allem IL-1 und IL-6, die z. B. aus Makrophagen bei Kontakt mit Bakterien freigesetzt werden, kommt es innerhalb von wenigen Stunden in den Leberzellen zu einer gesteigerten Synthese von CRP, das danach ins Blut abgegeben wird. Bei einer entzündlichen Erkrankung wie z. B. einer

Infektion, ist CRP daher in erhöhter Konzentration im Blut nachweisbar. Die Höhe des CRP-Spiegels verläuft parallel zum Ausmaß der Gewebeschäden. Wenige Stunden bis Tage nach dem Stimulus wird die Synthese von CRP wieder gedrosselt. Die quantitative Bestimmung erlaubt somit eine zeitnahe Objektivierung von Entzündungsgeschehen. Der Normalwert von CRP im Serum beträgt 0 – 5 mg/L [58, 131].

Ferritin

Der Normalwert von Eisen im Serum beträgt 10 – 30 $\mu\text{mol/L}$. Eisen ist ein essentieller Wachstumsfaktor für Bakterien. Um deren Wachstum zu hemmen, transportieren Gewebsmakrophagen bei einer Infektion Eisen aus der Zirkulation, was zu einem erniedrigtem Eisenspiegel im Serum führt [58]. Das Eisen wird jedoch nicht aus dem Körper ausgeschieden, sondern im Ferritin gespeichert. Ferritin ist ein Protein, das in erster Linie dazu dient, Eisen zu speichern (Depot Eisen) und dem Körper bei Bedarf zur Häm-Synthese wieder zur Verfügung zu stellen. Es besteht aus einer Proteinhülle, die einen Eisen-Hydroxy-Phosphat-Kern umschließt, der bis zu 4.000 Eisenatome aufnehmen kann. Bei gesunden Menschen kann anhand des Ferritins auf den Eisenspiegel im Blut geschlossen werden. Der Normalwert von Ferritin im Serum beträgt 15 – 300 $\mu\text{g/L}$ (abhängig von Alter und Geschlecht). Wird dem Blut allerdings durch eine Infektion Eisen entzogen, so wird die Synthese von Ferritin angekurbelt und ist daraufhin in bis zu dreifacher Konzentration des Normalwertes im Serum nachweisbar. Aufgrund dieser Reaktion zählt Ferritin auch zu den APPs. Obwohl die Ferritin-Konzentration im Serum mit der im Urin korreliert, wird der Bestimmung des Ferritinspiegels aus Urin wenig Beachtung geschenkt [155].

Defensine

Defensine sind antimikrobielle Proteine. Neben den Cathelicidinen sind Defensine die zweite antimikrobielle Peptidklasse, die in menschlichen Schleimhäuten gebildet werden [118]. Defensine werden eingeteilt in α -, β -, γ - und θ -Defensine. Bei Säugetieren kommen jedoch nur α -, β - und θ -Defensine vor. α -Defensine sind vor allem in Neutrophilen und kleinen intestinalen Paneth-Zellen zu finden, wobei β -Defensine in Leukozyten und Epithelzellen exprimiert werden [128]. β -Defensine werden von Epithelzellen der Haut oder Lunge sezerniert und zerstören als kationische Peptide Bakterienwände [131]. Erhöhte

Konzentration bestimmter Defensine in Fruchtwasser sowie vaginaler Flüssigkeit wurden in Zusammenhang mit dem frühen vorzeitigen Blasensprung gebracht [38, 81].

Zusätzlich zur indirekten Bestimmung durch die Identifikation von Infektionen und Entzündungen gibt es weitere Parameter, die als Biomarker eine Aussage über einen bevorstehenden fVBS geben könnten:

Zervixlänge

Zervixinsuffizienz ist definiert als eine Verkürzung des Gebärmutterhalses (Cervix uteri oder kurz Zervix). Sie tritt in 1 - 3 % aller Schwangerschaften auf. Um einen objektiven Messwert zu haben, misst man die Zervixlänge und -kanalweite mittels vaginalsonographischer Untersuchung. Physiologisch ist eine Zervixlänge > 3 cm und eine Zervixkanalweite < 8 mm. Mit dazwischen liegender Grauzone gilt schließlich eine Zervixlänge < 2 cm und eine Zervixkanalbreite > 8 mm als pathologisch. Im Gegensatz zur klinischen Beurteilung kann man durch vaginalsonographische Untersuchung zudem eine gegebenenfalls vorliegende Trichterbildung der Zervix (Aufdehnung des inneren Muttermundes) sehen [154]. Wenn durch transvaginale Ultrasonographie eine verkürzte Zervix (manche Studien favorisieren < 20 mm) festgestellt werden kann, bedeutet dies eine höhere Wahrscheinlichkeit eines fVBS [92].

Fetales Fibronektin

Das sogenannte fetale Fibronektin (fFN) ist 450 kDa groß. Es wird während der Schwangerschaft in der EZM hergestellt und befindet sich dann sowohl zwischen Dezidua und fetalen Eihäuten als auch in Uterus und Plazenta. Es ist u. a. dafür zuständig, Amnion und Chorion zu verkleben. Bei vorzeitiger Wehentätigkeit und beim vorzeitigen Blasensprung verschieben sich Amnion und Chorion, sodass fFN freigesetzt werden kann. Wenn fFN also im Zervix- oder Vaginalsekret nachgewiesen wird, ist das ein Hinweis auf vorzeitige Wehen oder einen vorzeitigen Blasensprung [92, 112, 126] (vgl. auch Kapitel 3.3.3). Die Bestimmung des fFN kann somit zur Prognose als auch zur Diagnose eines bevorstehenden Blasensprungs dienen.

Neben den einzelnen bisher genannten Biomarkern ist jedoch eine Kombination aus mehreren Biomarkern mit einer höheren Wahrscheinlichkeit assoziiert, einen fVBS

vorherzusagen. So fand man heraus, dass Nulliparae mit einem positiven Test auf fFN per Abstrich und einer verkürzten Zervix ein Risiko von 1:6 (16,7 %) haben, eine Frühgeburt ausgelöst durch einen fVBS zu erleiden. Multiparae bei gleichem Befund haben darüber hinaus ein 31-fach erhöhtes Risiko eines fVBS vor der 35. SSW. Bei zusätzlich vorhergegangenem fVBS bei Multiparae ist das Risiko noch weiter erhöht. Trotz der immer besser werdenden Möglichkeiten, schwangere Frauen mit diesem erhöhten Risiko zu identifizieren, wird aufgrund der teuren und unpraktischen sowie immer noch nicht ausreichend zuverlässigen Tests nur ein geringer Teil der betroffenen Patientinnen davon profitieren [91, 92].

Die bisher existierenden Biomarker zur Prognose eines bevorstehenden fVBS beziehen sich auf Parameter, die indirekt auf einen Blasensprung schließen lassen. Die Kombination mehrerer Parameter gleichzeitig erhöht eine zuverlässige Aussage über einen bevorstehenden Blasensprung ungemein.

Eine eindeutigere Aussage würde sich ergeben, wenn die Fruchtblase und deren Bestandteile (z. B. Kollagen oder Glykosaminoglykane) und die Stabilität der Eihäute direkt untersucht werden könnten. Der aktuelle Stand der Technik erlaubt das Messen dieser Parameter bei humanen Eihäuten jedoch nur bei Nachgeburten, da bei der Durchführung der benötigten Methoden die Eihäute zerstört werden.

Diese Arbeit untersucht Biomarker in vitro, die in aufbauenden Arbeiten der Arbeitsgruppe in vivo bestätigt werden sollen.

4 Methodisch-Technischer Hintergrund

4.1 Bestimmung des Kollagengehaltes

Die Konzentration der Kollagene in Eihäuten wurde mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt. Eine Qualifizierung ist mit diesen Methoden nicht möglich. Mit der Kollagenbestimmung mit Hydroxyprolin (siehe Kapitel 4.1.2 und 5.4.2) wird der gesamte Gehalt der Kollagene bestimmt. Allerdings kann hier nicht direkt die Masse Kollagen angegeben werden, sondern nur der Hydroxyprolin-Anteil. Dadurch stellt diese Methode eine indirekte Nachweismethode für Kollagen dar. Bei der Kollagengehaltbestimmung durch Anfärben (siehe Kapitel 4.1.3 und 5.4.3) wird Kollagen durch Anfärben direkt nachgewiesen. Allerdings muss hierfür das Kollagen zuvor extrahiert werden. Es verbleibt eventuell ein nicht extrahierbarer Anteil (quervernetztes) Kollagen im Gewebe. Kollagenextraktion und -bestimmung mittels Anfärben mit Sirius Red 3FB wurde bereits in früheren Arbeiten optimiert und an die vorherrschende Fragestellung angepasst [73].

4.1.1 Kollagenextraktion

Kollagenlöslichkeit beschreibt die Löslichkeit der Kollagene aufgrund verschiedener Extraktionsmittel. Es verbleibt eventuell ein Rest Kollagen von unlöslichen kovalent quervernetzten Kollagenen im Gewebe, der nicht durch die Bestimmung der Extrakte bestimmt werden kann. Es wird unterschieden zwischen neutral salzlöslichem Kollagen (NSC = neutral salt soluble collagen), säurelösliches Kollagen (ASC = acid soluble collagen) und pepsinlösliches Kollagen (PSC = pepsinlösliches Kollagen). ASC und PSC kann als APSC (acid and pepsin soluble collagen) zusammengefasst werden, wenn das Extraktionsmedium sowohl Säure als auch Pepsin enthält. Dieses Zusammenfassen macht Sinn, da das PSC-Extraktionsmedium Säure enthalten muss, da Pepsin bei einem pH-Wert von 2 aktiv ist [28].

Im Normalfall ist zu erwarten, dass die NSC-Fraktion kleiner ist als die der anderen Fraktionen, da salzlösliche Kollagene (Tropokollagenmoleküle) von der EZM innerhalb von wenigen Stunden in Kollagenfibrillen kristallisiert werden und dadurch Salz-unlöslich

werden. Da die NSC-Fraktion besonders angreifbar für Protease-Abbau ist, sollte diese Fraktion einen Proteaseinhibitor-Cocktail enthalten. Für die APSC-Fraktion wird dieser Cocktail allerdings nicht benutzt, da er das Pepsin inhibieren würde [18]. Für die APSC-Fraktion wird stattdessen Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) benutzt, das vor allem Enzyme inhibiert, indem es metallische Bestandteile bindet, die Enzyme, wie z. B. die MMPs, brauchen, um aktiv zu sein.

4.1.2 Kollagengehaltbestimmung mit Hydroxyprolin

Hydroxyprolin (hyp) stellt etwa 13,5 % der Aminosäuren eines Kollagenmoleküls dar [62] und kann somit zur indirekten Bestimmung von Kollagen benutzt werden. Als erstes wird das Kollagen-Molekül durch Säure- und Hitzeeinwirkung hydrolysiert, bis es in seine Aminosäurebestandteile zerlegt ist. Das so frei gewordene Hydroxyprolin wird mit Chloramin-T oxidiert. Im nächsten Schritt bildet das so entstandene Oxidationsprodukt mit dem zugefügten p-Dimethylaminobenzaldehyd (4-(Dimethylamino)benzaldehyd) ein gerötetes Kondensationsprodukt, das bei 540 nm (565 nm ebenfalls möglich) photometrisch nachgewiesen wird (siehe Abbildung 9).

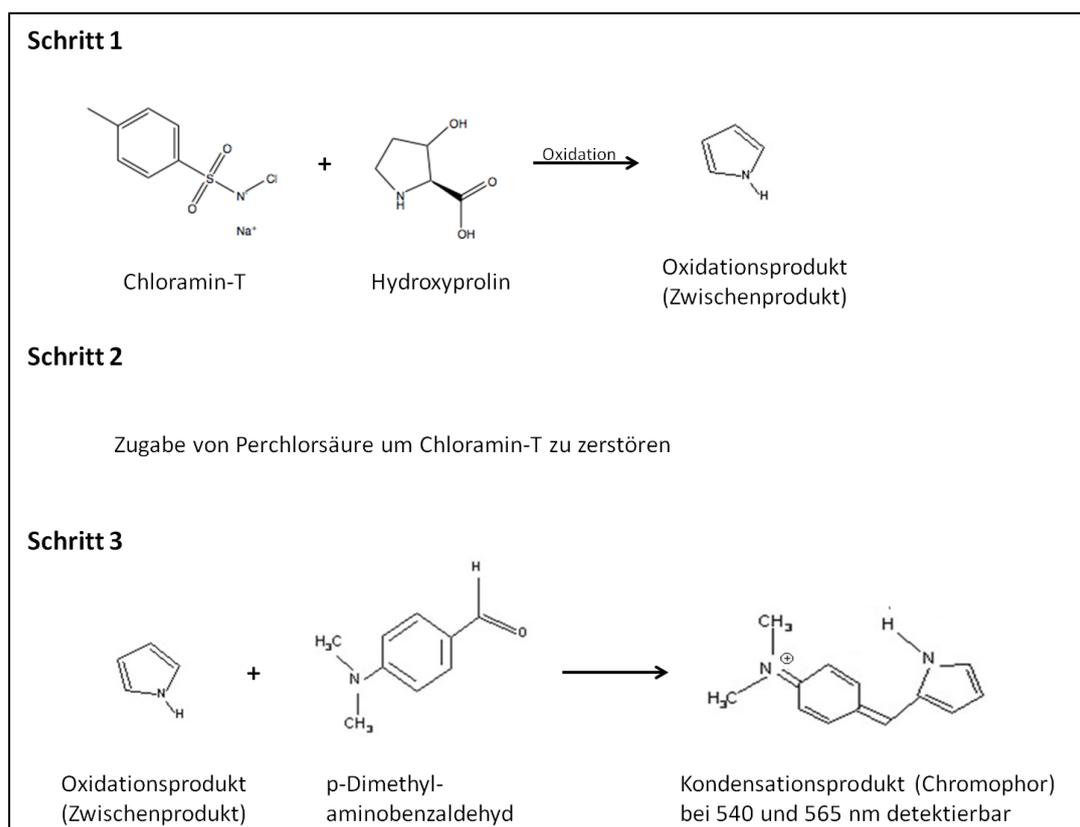


Abbildung 9: Wirkungsmechanismus der Hydroxyprolin-Bestimmung mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (modifiziert) [138, 159]

4.1.3 Kollagengehaltbestimmung durch Anfärben

Der Mechanismus der Kollagenbestimmung mittels Anfärben beruht auf der Eigenschaft der Sulfonsäure-Seitenketten des Farbstoffs (Sirius Red 3FB = Direct Red 80, siehe Abbildung 10) mit der charakteristischen Aminosäuresequenz $[\text{Gly-X-Y}]_n$ der Kollagenmoleküle. Die spezifische Affinität des Farbstoffs für Kollagen beruht auf den länglichen Farbstoffmolekülen, die sich parallel zu der langen starren Struktur des nativen Kollagenmoleküls mit intakter Tripelhelix ausrichtet. Das bedeutet, dass, anders als beim Kollagennachweis durch Hydroxyprolinbestimmung, bei der hier beschriebenen Färbemethode nur intakte Kollagenmoleküle nachgewiesen werden können, die nicht bereits degradiert sind. Eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Kollagentypen wird mit dieser Methode nicht erreicht [18].

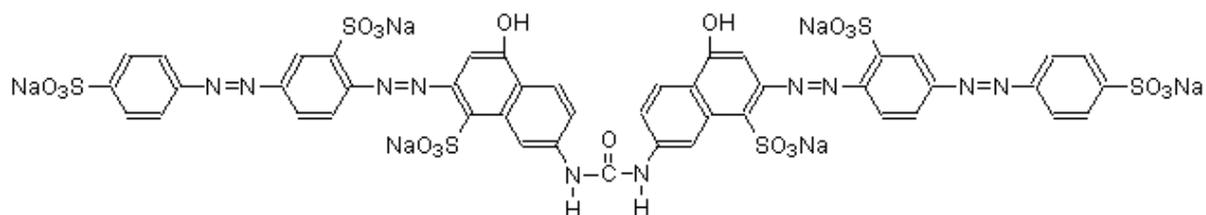


Abbildung 10: Die Struktur des Farbstoffs Sirius Red 3FB [76]

4.2 Nachweis der Glykosaminoglykane

Zum Nachweis der Glykosaminoglykane in Eihäuten werden drei verschiedene Methoden verwendet, die jeweils eine andere GAG-Fraktion bestimmt. Um den gesamten Anteil der Glykosaminoglykane (gGAG) zu bestimmen wird der Orcin-Test (siehe Kapitel 4.2.2 und 5.5.2) angewendet. Um den Anteil der sulfierten Glykosaminoglykane (sGAG), d. h. alle Glykosaminoglykane außer Hyaluronsäure, nachzuweisen, wird die GAG-Bestimmung mittels DMMB verwendet (siehe Kapitel 4.2.3 und 5.5.3). Hyaluronsäure (HA) wurde mittels FACE / PAGEFS (siehe Kapitel 4.2.4 und 5.5.4) nachgewiesen.

4.2.1 Extraktion der Glykosaminoglykane

Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass der Aufschluss mit Natriumborhydrid gegenüber anderen Aufschlüssen, u. a. Aufschluss durch Enzyme, zur Extraktion der GAG aus menschlichen Eihäuten am besten geeignet ist [117].

Zusammen mit Helena Rahn [117] wurde eine Extraktionslösung nach Iozzo [119] und Ambrosius [9] modifiziert und der vorherrschenden Fragestellung angepasst:

Durch eine Extraktionslösung werden die Proben aufgeschlossen. Zur Neutralisierung wird eine Natriumacetatlösung und Salzsäure verwendet. Die Proteine werden anschließend mittels Trichloressigsäure gefällt. Bei einer erhöhten Konzentration von TCA fallen die Peptide aus. Nach der Zentrifugation enthält das Pellet die zerstörte biologische Matrix, Blutreste und die Peptide. Im Überstand befinden sich die zu analysierenden GAGs. Die

Probe wird gegebenenfalls mit Ethanol versetzt, sodass die GAGs ausfallen und gemessen werden können.

4.2.2 Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt - Orcin-Test

Der Orcin-Test, nach seinem Entdecker Manfred Bial auch Bial-Probe genannt, wird in erster Linie angewandt um Ribose, und manchmal auch andere Pentosen, mittels Orcin (auch Orcinol oder nach IUPAC 3,5-Dihydroxytuluol genannt) zu bestimmen. In modifizierter Weise kann dieser Test aber auch zum Nachweis von Hexosen verwendet werden:

Nach Zugabe des Orcin-Reagenz, bestehend aus Eisen(III)Chlorid, Salzsäure und Orcinol, und unter Hitzeeinwirkung wandelt sich Ribose in Furfural um, das wiederum mit Orcinol zu einem Xanthen-Farbstoff umgewandelt wird, der photometrisch nachweisbar ist. Wenn die angewendete Hitzeeinwirkung allerdings länger andauert, können auch Hexosen, wie eben dem Glucuronolacton der Glykosaminoglykane, nachgewiesen werden:

Glykosaminoglykane bestehen aus einem Aminozucker und einer Uronsäure (L-Iduronsäure oder seinem Carbon-5-Epimer D-Glucuronsäure). Die Uronsäure wird durch eine Mineralsäure in ein Uronsäure-Lacton umgewandelt, das dann wiederum mit dem zugegebenen Orcin ein Xanthen-Farbstoff bildet. Beispielhaft wird hier die Orcin-Reaktion mit der Uronsäure D-Glucuronsäure dargestellt:

D-Glucuronsäure wird in Anwesenheit von Salzsäure in Glucuronolacton umgewandelt (siehe Abbildung 11).

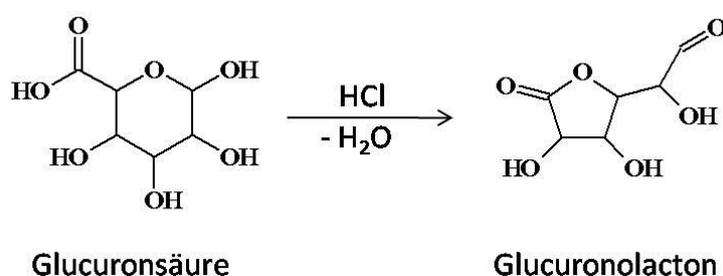


Abbildung 11: Umwandlung von D-Glucuronsäure zu Glucuronolacton (modifiziert) [68]

Die Aldehydgruppe des Glucuronolacton geht dann mit dem 2-wertigen Phenol Orcin eine Kondensationsreaktion ein (siehe Abbildung 12).

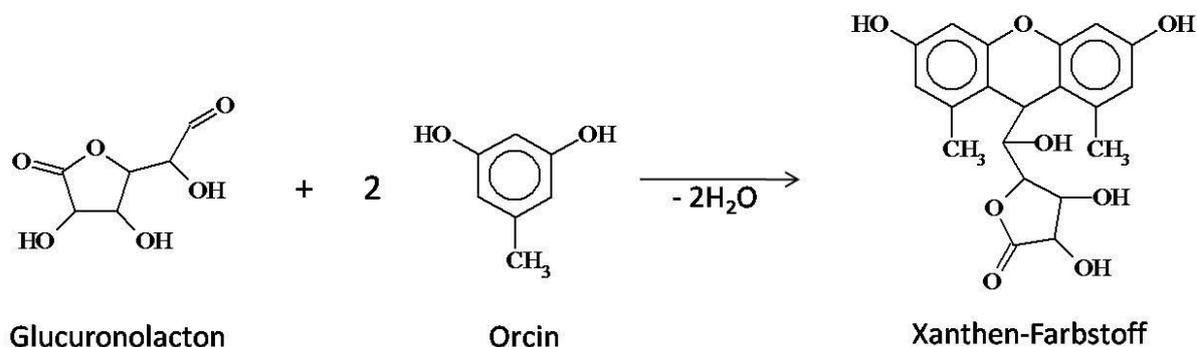


Abbildung 12: Kondensationsreaktion des Glucuronolacton mit Orcin (modifiziert) [68]

Das Produkt dieser Kondensationsreaktion ist ein sogenannter Xanthen-Farbstoff und kann bei 670 nm photometrisch gemessen werden.

Die gGAG-Bestimmung der vorliegenden Arbeit wird nach dem Protokoll von Renato und Iozzo [119] durchgeführt.

4.2.3 Nachweis sulfierter Glykosaminoglykane

Sulfurierte Glykosaminoglykane können durch einfaches Anfärben mit 1,9-Dimethylmetylenblau (DMMB, siehe Abbildung 13) und anschließenden Messen mittels Photometer bestimmt werden. Hierbei wurde die Modifikation nach Barbosa et al. [13] verwendet.

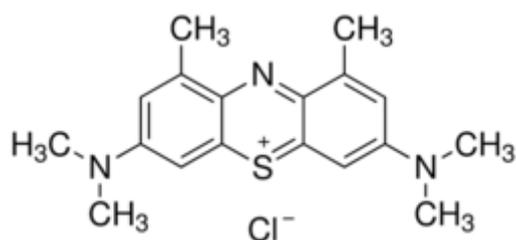


Abbildung 13: Strukturformel von 1,9-Dimethylmetylenblau (modifiziert) [135]

DMMB ist ein dunkelblauer pulverförmiger Farbstoff, der bei einer Wellenlänge von 656 nm sein Absorptionsmaximum erreicht. Das positiv geladene Schwefelatom macht DMMB für die Detektion von sulfierten Glykosaminoglykanen möglich.

Der Farbstoff lagert sich an die negativen Ladungsträger (Sulfidgruppen der Glykosaminoglykane) an und bildet mit ihnen einen Komplex. In saurem Milieu ist die positive Ladung beim Schwefelatom. Aufgrund dieses Komplexes und der einhergehenden Konformationsänderung ändert sich die Farbe zu rosa bis lila. Die aufgeschlossene Probe wird mit DMMB-Farbstoff in großem Überschuss versetzt und die sGAG reagieren mit dem Farbstoff. Farbstoff, der nicht reagiert hat, wird wieder abgenommen. Der Komplex wird wieder in Farbstoff und Glykosaminoglykane zerlegt und der Gehalt an Farbstoff photometrisch ermittelt. Bei dieser Methode bestimmt man die Menge an Sulfatgruppen, da ein DMMB-Farbstoffmolekül nur an eine negative Ladung bindet, sodass Hyaluronsäure mit dieser Methode nicht erfasst wird.

In dieser Arbeit wird für das Verfahren sulfierte Glykosaminoglykane zu bestimmen, die Anleitungen zum Blyscan Assay Kit [19] und von Isabelle Barbosa et al. [13] benutzt.

4.2.4 Bestimmung des Hyaluronsäuregehaltes

Die hier verwendete Methode Hyaluronsäure mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese zu bestimmen, wird "Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis" (FACE) oder "polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore labelled saccharides" (PAGE-FS) genannt. Diese Methode wurde erstmalig von Calabro et al. [26] beschrieben:

Mittels FACE werden die Disaccharideinheiten der Hyaluronsäure bestimmt, weswegen die Hyaluronsäure zuerst partiell verdaut werden muss. Die Disaccharide werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2-Aminoacridon (AMAC) spezifisch angefärbt und mittels PAGE aufgetrennt. Die mit AMAC angefärbten Disaccharide können im UV-Licht sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

Der Nachweis der Hyaluronsäure erfolgte nach Calabro et al. [26, 27] mit Modifizierungen von Karousou et al. [67] und dem Springer-Protokoll [119]. Die Herstellung der Gele erfolgte nach dem Protokoll von Karousou et al. [66]. Die Rezepte wurden zwecks Anpassung auf die vorherrschende Fragestellung zum Teil abgeändert (Erläuterungen siehe Kapitel „4.2.4.3 Methodische Adaption und Optimierung“).

4.2.4.1 Extraktion

Glykosaminoglykane sind an Proteine gebunden und werden im ersten Schritt mittels Proteinase K von den Proteinen getrennt. Je nachdem, welches Glykosaminoglykan zum Disaccharid verdaut werden soll, werden verschiedene Enzyme benutzt. Im Fall des Verdaus von Hyaluronsäure wird Hyaluronidase SD (*Streptococcus dysgalactiae*) verwendet. Die so erhaltenen Δ -Disaccharide (2-acetamido-2-deoxy-3-O-(4-deoxy- α -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid)-D-glucose = [Δ di-non_{HA}], kurz Δ DiHA) werden mit AMAC gefärbt: In Abbildung 14 ist zu sehen, wie sich das Disaccharid zunächst von der geschlossenen in die offene Konformation verwandelt (1). Im nächsten Schritt bindet AMAC an die offene Konformation des Disaccharids zum Imin (Schiffsche Base) (2). Beide Schritte (1) und (2) sind reversible Prozesse, sodass der AMAC-Disaccharid-Komplex stabilisiert werden muss. Die Stabilisierung erfolgt durch Reduktive Aminierung mittels Natriumcyanoborhydrid (NaBH₃CN) (3). Natriumcyanoborhydrid ermöglicht eine direkte Reduktive Aminierung von Carbonylverbindungen durch selektives Abfangen des Iminiumions, da es einerseits aufgrund der elektronenziehenden Cyanogruppe nicht in der Lage ist bei einem pH unter 5 Ketone und Aldehyde zu reduzieren aber andererseits die stärker basischen Imine noch im schwach sauren Milieu reduziert [132]. Andere Reduktionsmittel haben meist den Nachteil auch Aldehyde zu reduzieren, was zur Folge hätte, dass das AMAC nicht mehr an die offene Konformation des Disaccharids binden könnte. Das so entstandene Amin reagiert nicht mehr zum Imin zurück, sodass nach entsprechender Inkubationszeit alle Disaccharide irreversibel an AMAC gebunden sind.

Methodisch-Technischer Hintergrund

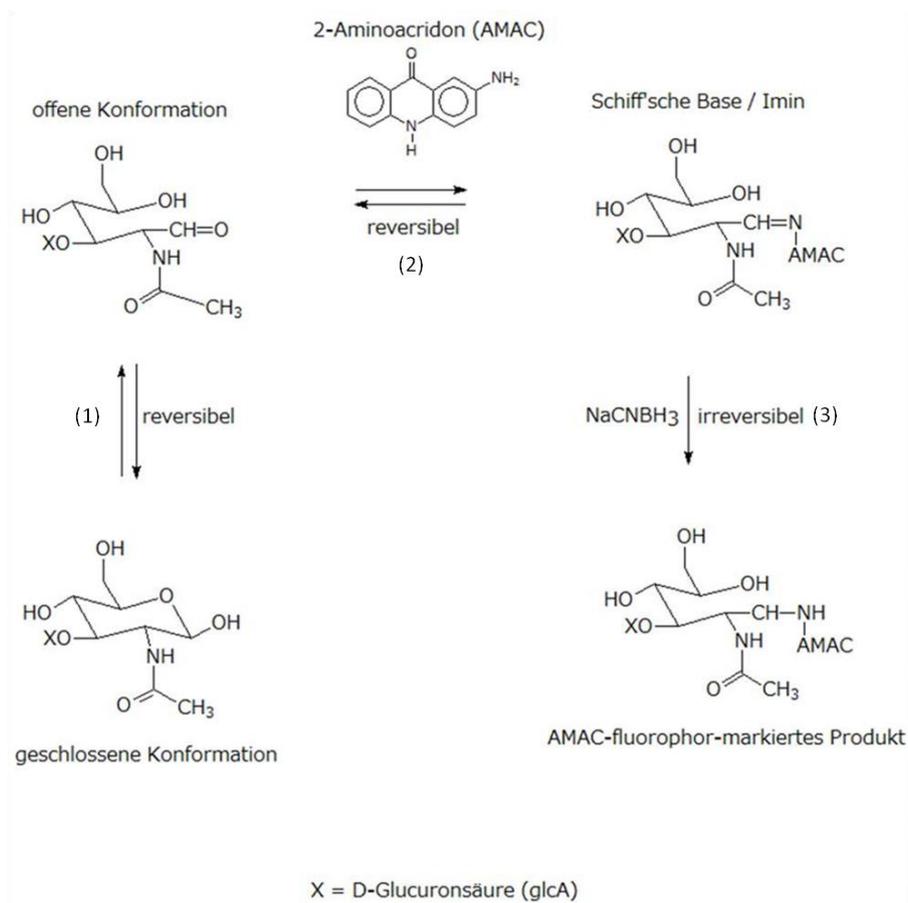


Abbildung 14: Reaktion des Disaccharids mit AMAC (modifiziert) [26]

4.2.4.2 Enzymatische Spaltung der HA-Ketten in Disaccharideinheiten und Derivatisierung

Der Fluoreszenzfarbstoff AMAC bindet an die Aldehyd-Funktion des Disaccharids während dieses in seiner offenen Konformation vorliegt. Glykosaminoglykan-Ketten sind an ihren reduzierenden Enden an Proteine zu Proteoglykanen gebunden, sodass es bei diesen Molekülen kein reduzierendes Ende gibt, an dem sich AMAC anlagern könnte. Ob Hyaluronsäure-Ketten an ihren reduzierenden Enden substituiert sind, ist bisher nicht endgültig geklärt. In jedem Fall würde die oben beschriebene Methode ohne zusätzlichen Verdau nicht funktionieren, da Hyaluronsäure gewöhnlich als Polymer mit oft mehr als 10.000 sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten vorliegt. In der Literatur ist eine Vielzahl von GAG-degradierenden Enzymen beschrieben. Das hier verwendete Enzym Hyaluronidase SD ist optimal geeignet, da es in einem Schritt die Oligosaccharide in Disaccharide (Δ DiHA) teilt, wobei jedes dieser Disaccharide genau ein reduzierendes Ende

aufweist (siehe Abbildung 14), an dem jeweils ein AMAC-Molekül binden kann. AMAC fluoresziert bei UV-Licht, wodurch eine Quantifizierung möglich wird.

4.2.4.3 Methodische Adaption und Optimierung

Elektrophoretische Trennung der Disaccharide

AMAC bindet an alle Moleküle in der Probe, die ein reduzierendes Ende aufweisen. Um Δ DiHA von den übrigen angefärbten Molekülen unterscheiden zu können, werden die Derivatisierungsprodukte elektrophoretisch aufgetrennt. Die Δ DiHA-Banden sind durch mitlaufende Δ DiHA-Standards identifizierbar und damit auch quantifizierbar.

Ein besonderes Augenmerk bei der Elektrophorese liegt bei der ebenfalls durch AMAC angefärbten Glukose, da Glukose natürlicherweise in jeder Probe vorkommt und der Δ DiHA-Bande bei der Elektrophorese am nächsten gelegen ist. Ziel ist es also die Glukose- und Δ DiHA-Banden elektrophoretisch klar voneinander zu trennen. Zwar könnte die Glucose durch Ethanol-Fällung vor dem Hyaluronsäureverdau eliminiert werden, kleinere Hyaluronsäuremoleküle könnten dadurch aber auch verloren gehen, sodass die Hyaluronsäurekonzentration geringer ausfallen würde als sie tatsächlich ist. Aus diesem Grund wird auf den Schritt der Ethanol-Fällung vor dem Hyaluronsäureverdau verzichtet.

Der Farbstoff Bromphenolblau wird aus verschiedenen Gründen zum Sammelgel gegeben:

1. Durch die Blaufärbung des Bromphenolblau kann das Sammelgel vom farblosen Elektrophoresepuffer unterschieden werden. Dadurch sind die Taschen des Gels klarer erkennbar, sodass Fehler beim Pipettieren in die Taschen minimiert werden. Das Pipettieren geht außerdem schneller vonstatten, wodurch eine Diffusion der Proben im Sammelgel verhindert wird.
2. Der ungebundene Anteil des AMAC verbleibt bei der Elektrophorese in den Taschen und läuft nicht mit. Dies sieht man mit bloßem Auge durch die neongelbe Färbung des Farbstoffes in den Taschen nach Beendigung der Elektrophorese. Um ein Überleuchten der Probe zu verhindern, wird das Sammelgel vor Aufnahme mit der Gel Doc Station entfernt. Die Konzentration an AMAC, das an die Proben bindet, ist

hingegen so gering, dass die Banden im Laufgel mit bloßem Auge nicht erkennbar sind. Damit der Fortschritt der Elektrophorese trotzdem überwacht werden kann, könnte eine Tasche des Gels mit einem Längenmarker der Bromphenolblau enthält, mitlaufen. Wenn sich das Bromphenolblau allerdings bereits im Sammelgel befindet, ist der Längenmarker nicht mehr notwendig, da das Bromphenolblau im Sammelgel nicht dort verbleibt, sondern genau wie das Bromphenolblau im Längenmarker vor den Proben mitläuft. Somit wird verhindert, dass die Proben aus dem Gel laufen; gleichzeitig steht für die Elektrophorese eine Tasche mehr im Gel zur Verfügung.

3. Die Elektrophorese läuft mit 25 mA/Gel bei maximal 500 V. Der Elektrophoresepuffer kann mindestens 10 Mal wiederverwendet werden. Durch das Verbrauch des Puffers erhöht sich mit zunehmender Anzahl an Elektrophorese-Durchläufen der Widerstand, wodurch auch eine höhere Spannung erreicht wird. Je nach Volt-Zahl ist die Elektrophorese nach 1-2 Stunde fertig. Wenn die Bromphenolblau-Front bis ca. 1 cm vor das Gelende gelaufen ist, sind auch die Glucose-Banden von den Δ DiHA-Banden klar voneinander getrennt.

Nach Beenden der Elektrophorese werden die Taschen durch sorgfältiges Spülen mit H_2O_d vom ungebundenen AMAC befreit. Danach wird das Gel ohne Gläser analysiert. Werden die Gläser vor dem Waschen entfernt, kann es passieren, dass das ungebundene AMAC über das Gel läuft und ein unregelmäßiges Hintergrundrauschen verursacht.

4.2.4.4 Ergebnisse der Optimierung und Anpassung der PAGE-FS

4.2.4.4.1 Trennung von Glukose und Δ DiHA

In Abbildung 15 ist links die Lichtaufnahme (Foto mit weißem Licht) eines Gels mit Glasplatten zu sehen. Diese Ansicht entspricht der Sicht während der Elektrophorese. Die untere dunkle Linie im Gel zeigt die Bromphenol-Blau Front, die aus dem Sammelgel vor den Proben läuft. In dieser Aufnahme sind die Proben nicht zu sehen. Abbildung 15 rechts zeigt das Gel unter UV-Licht. Die Glasscheiben wurden entfernt und das Sammelgel abgetrennt. Die Bromphenol-Blau Front ist in dieser Ansicht nicht zu sehen.

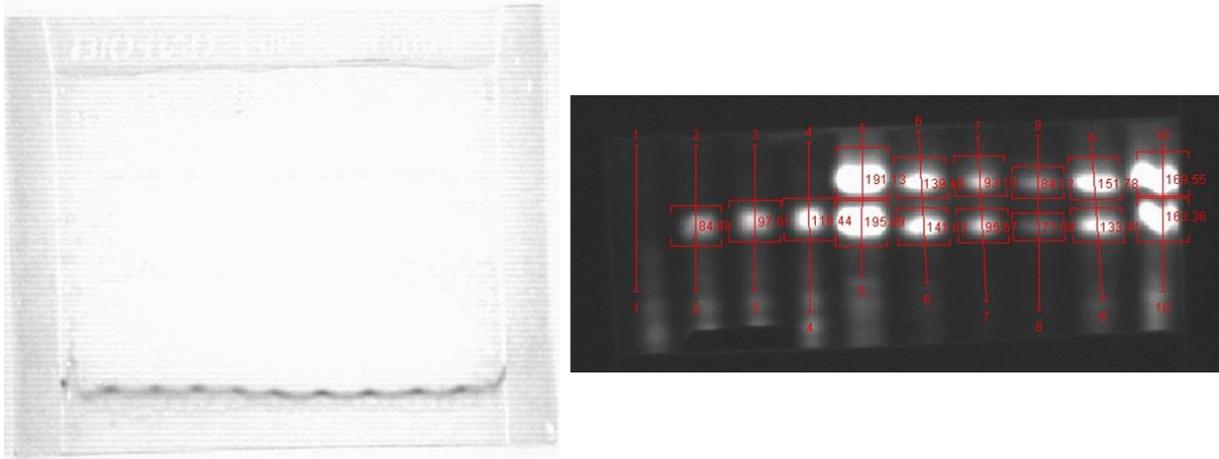


Abbildung 15: Aufnahme eines FACE-Gels mit Glukose- und Δ DiHA-Standards. Links: Lichtaufnahme, rechts: Aufnahme unter UV-Licht (eigenes Beispielergebnis)

Die Zahlen an den senkrechten Strichen repräsentieren die Geltaschen (1 - 10). Die Zahlen an den Banden entsprechen dem jeweiligen Messwert „Volume“ ($\text{INT} \times \text{mm}^2$). Die unteren Taschen der Banden 2 - 10 enthalten Δ DiHA-Standards. Die oberen Banden der Taschen 5 - 10 enthalten Glukose. Tasche 1 enthält den Blindwert ohne Glukose und Δ DiHA. Bei den Taschen 5 und 10 kann das Programm die Banden nicht voneinander unterscheiden. Bei den Taschen 6 - 9 kann das Programm zwischen den Glukose- und Δ DiHA-Banden unterscheiden. Tasche 8 enthält Glukose und Δ DiHA in den richtigen Konzentrationen, da hier keine Licht-Sättigung auftritt.

4.2.4.4.2 Δ DiHA-Standards

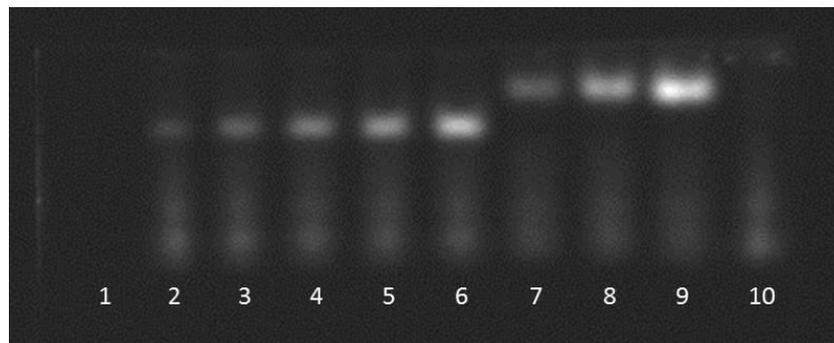


Abbildung 16: FACE-Gel mit Δ DiHA-Standards in 5 verschiedenen Konzentrationen (eigenes Beispielergebnis)

Methodisch-Technischer Hintergrund

Abbildung 16 zeigt einen FACE-Testdurchlauf mit Δ DiHA-Standards. Die Zahlen repräsentieren die Nummern der Taschen 1 – 10: Tasche 2: 0,5 μ mol Δ DiHA; Tasche 3: 1 μ mol Δ DiHA; Tasche 4: 2 μ mol Δ DiHA, Tasche 5: 2,5 μ mol Δ DiHA; Tasche 6: 3 μ mol Δ DiHA, Taschen 7 bis 9 enthalten Glukose in verschiedenen Konzentrationen.

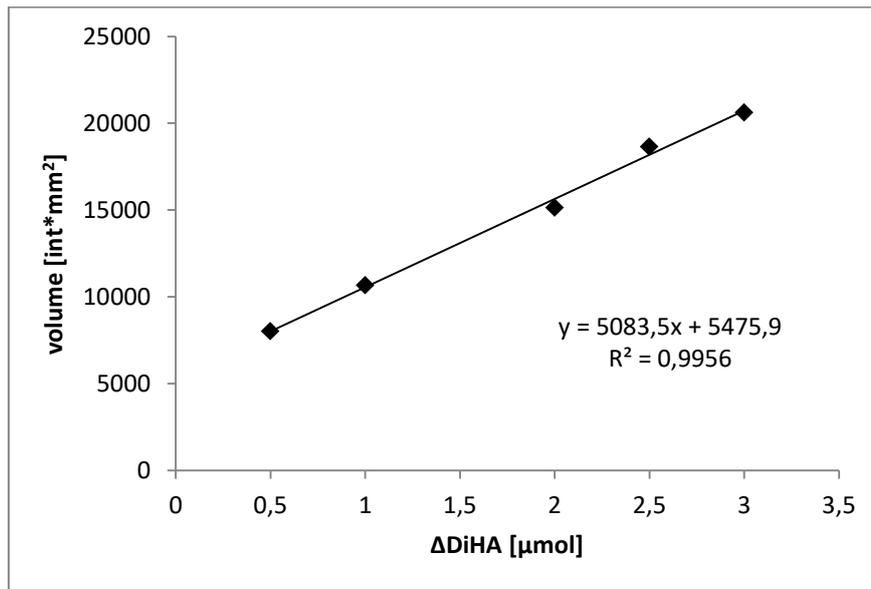


Abbildung 17: Regressionsgerade eines FACE-Gels mit 5 Δ DiHA-Standards (eigenes Beispielergebnis)

Abbildung 17 zeigt die Regressionsgerade aller fünf Werte des Gels aus Abbildung 15 die mit dem Programm QuantityOne berechnet wurde. Der Messwert der Fluoreszenz der Δ DiHA-Banden wird in Volume angegeben. Δ DiHA wird bei den Standardgeraden in μ mol angegeben und die Ergebnisse später in mg/g Gewebe umgerechnet. In Tabelle 1 sieht man zum Vergleich die Berechnung aus Regressionsgeraden der Standardgeraden, die aus jeweils 3 der 5 Standards erstellt wurde. Die 2 Standards, die für die jeweilige Standardgerade nicht verwendet wurden, wurden dem Programm als „sample“ angegeben und die Konzentration automatisch berechnet:

Tabelle 1: Auswertung Standardgerade von Δ DiHA-Standards mittels FACE (eigenes Beispielergebnis)

Taschen	K [μ mol]	Abw.	K [μ mol]	Abw.	K [μ mol]	Abw.	K [μ mol]	Abw.	K [μ mol]	Abw.
2-6	0,50		1,00		2,00		2,50		3,00	
2,3,4							2,73	9%	3,15	5%
2,3,5					1,84	8%			2,87	4%
2,3,6					1,91	5%	2,60	4%		
2,4,5			1,03	3%					2,96	1%
2,4,6			1,05	5%			2,64	6%		
2,5,6			1,00	0%	1,88	6%				
3,4,5	0,53	6%							2,95	2%
3,4,6	0,50	1%					2,64	6%		
3,5,6	0,46	7%			1,87	7%				
4,5,6	0,66	31%	1,14	14%						

Taschen: Nummern der Taschen, die für die Erstellung der jeweiligen Standardgerade verwendet wurde

K [μ mol]: Errechnete Konzentrationen der Δ DiHA-Standards, die für die jeweilige Standardgerade nicht verwendet wurden

Abw: Abweichung der berechneten Konzentration vom Wert, der durch die Standardgerade mit 5 Standards ermittelt wurde

Die fett gedruckten Werte der Tabelle stellen die errechneten Konzentrationen dar, die innerhalb der jeweiligen Standardgeraden liegen.

Das Bestimmtheitsmaß aller Geraden war $R^2 \geq 0,97$. Die Abweichungen (Abw. [%]) 4 weiterer Testdurchläufe mit Werten, die innerhalb der Standardgeraden lagen, betragen max. 8%.

Tabelle 2 zeigt die Berechnung der Δ DiHA-Standards, wenn als Bezug nur ein bekannter Wert verwendet wird. Die Werte (K [μ mol]) werden durch Dreisatz bestimmt. Berechnungsgrundlage ist das gemessene Volume; nicht in der Tabelle dargestellt) der jeweiligen Tasche derselben Spalte.

Tabelle 2: Δ DiHA-Berechnung ohne Standardgerade (eigenes Beispielergebnis)

	Tasche 2		Tasche 3		Tasche 4		Tasche 5		Tasche 6	
Konz. [μmol]	K [μmol]	Abw.								
0,5			0,75	51%	1,06	112%	1,08	115%	1,17	134%
1	0,66	34%			1,41	41%	1,43	43%	1,55	55%
2	0,94	53%	1,42	29%			2,03	1%	2,20	10%
2,5	1,16	54%	1,75	30%	2,46	1%			2,71	9%
3	1,28	57%	1,93	36%	2,72	9%	2,76	8%		

Konz. [mol] Δ DiHA-Konzentration [μmol] des Standards in der jeweiligen Tasche

Tasche: Nummern der Taschen, die für die Berechnung der anderen Werte der jeweiligen Spalte verwendet wurden

K [μmol]: Errechnete Konzentrationen der Δ DiHA-Standards aus dem Wert der jeweiligen Tasche

Abw: Abweichung der berechneten Konzentration vom bekannten wahren Wert

4.3 Device for the Investigation of the Mechanical Properties of Amniotic Sac Tissue

Das „Device for the Investigation of the Mechanical Properties of Amniotic Sac Tissue“ (deutsch: Gerät zur Ermittlung der mechanischen Eigenschaften des Fruchtblasen-Gewebes), kurz DIMPAST, wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Timm Schröder [130] und der Masterarbeit von Peter Linder [77] 2005 im Labor Zellbiophysik der FH Aachen gebaut, um die (bio)mechanischen Eigenschaften humaner fetaler Eihäute zu messen. Danach optimierte Guido Antweiler im Rahmen seiner Diplomarbeit 2007 DIMPAST weiter und führte die ersten biomechanischen Messungen durch [10]. In Abbildung 18 ist das DIMPAST (DIMPAST 1) aus dem Jahr 2005 dargestellt.

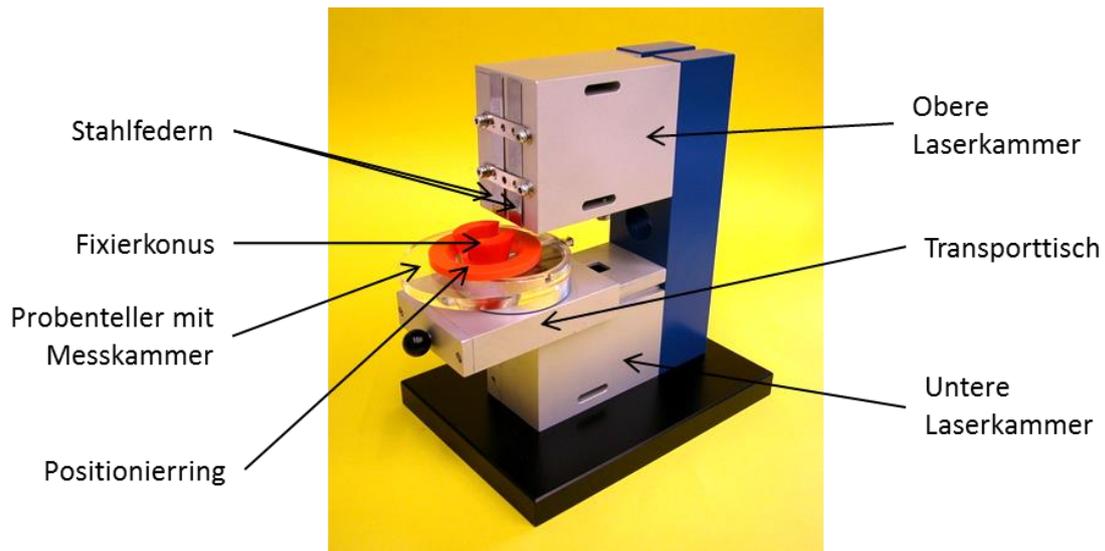


Abbildung 18: DIMPAST 1, Version aus dem Jahr 2005 (Labor für Zellbiophysik, FH Aachen University of Applied Sciences)

4.3.1 Funktionsweise des DIMPAST

Ein Stück fetale Eihaut wird in das DIMPAST eingespannt und durch Druck aufgeblasen. Dabei wölbt sich die Eihaut, so wie es auch während der Schwangerschaft durch den amniotischen, Druck des Fruchtwassers geschieht. Um die Bedingungen möglichst physiologisch zu halten, wurde die Eihaut so in das Gerät eingelegt, dass das Amnion nach unten (Richtung des Druck: von unten nach oben) gerichtet ist. Die Belastungsgrenze des Gewebestücks kann ermittelt werden, indem der Druck erhöht wird, bis das Eihautstück reißt. Der Druckpunkt, bei dem das Eihautstück reißt wird „maximaler Reissdruck“ (engl. maximum bursting pressure) genannt und in kPa angegeben. Der Laser in der unteren Kammer kann während der Reissdruck-Messung die Deformation des Gewebes ermitteln. Zusammen mit dem Laser in der oberen Kammer kann zudem die Dicke der Eihaut gemessen werden. Somit ist es nicht nur möglich die Reißfestigkeit zu bestimmen, sondern auch der Elastizitätsmodul (E-Modul), um zusätzlich Informationen über die mechanischen Eigenschaften der Eihaut zu erhalten. Der E-Modul beschreibt den Zusammenhang zwischen Spannung und Dehnung einer Probe, wobei deren Steifigkeit ermittelt werden kann. Das Hookesche Gesetz besagt, dass die Ausdehnung ϵ eines Körpers linear proportional zur Kraft

ist, die die Deformation (Dehnung) σ verursacht. Wenn eine Probe, wie z. B. die fetale Eihaut, zu sehr gedehnt wird, wird die elastische Deformation zur plastischen Deformation, sodass die Probe nicht mehr in ihre ursprüngliche Form zurück kann ohne beschädigt zu werden [130].

Ein Stück Eihaut wurde so flach wie möglich in die Messkammer eingespannt und mit dem Positioniererring fixiert. Danach wurde der Fixierkonus in die Kammer gedrückt. Die Kammer wurde dann auf den Probenhalter geschoben, sodass die Stahlfedern auf den Fixierkonus drücken und die Probe so fixieren, dass sie während der Messung nicht verrutschen kann.

Die Messung kann als „Zyklischer Oszillations-Test“ (engl.: cyclic oscillation test) oder als „Reiß-Test“ (engl.: rupture test) durchgeführt werden. Beim Zyklischen Oszillations-Test oszilliert der Druck zyklisch zwischen einer oberen und einer unteren Grenze. Diese Grenzen können während des Experiments verändert werden, um die Belastung langsam zu erhöhen. Dieser Modus soll die physiologischen Bedingungen während der Wehen simulieren. Mit dem Reiß-Test hingegen kann der Modus auf maximale Belastung gestellt werden. Damit wird der Druck gleichmäßig erhöht, bis das Gewebe reißt.

Nach den DIMPAST-Messungen wurden die Eihautstücke bei -80 °C eingefroren, um anschließend histologische oder biochemische Messungen durchführen zu können.

4.3.2 Weiterentwicklung und Messungen mit DIMPAST

In den Jahren 2010, 2011 und 2012 wurde DIMPAST weiter optimiert und verändert. Die verschiedenen Versionen des Geräts sind in Abbildung 19 dargestellt.

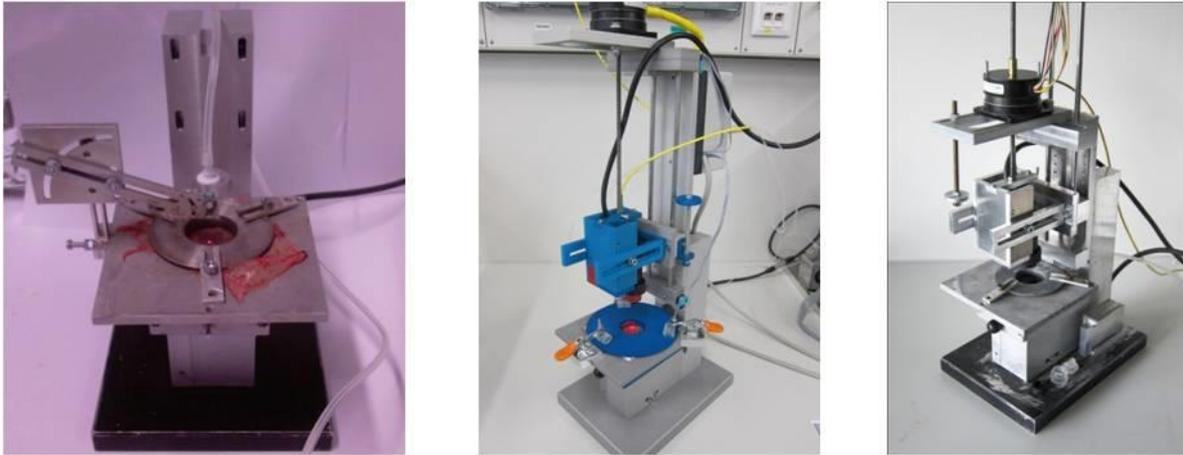


Abbildung 19: DIMPAST-Weiterentwicklung. Links: DIMPAST 2 aus dem Jahr 2010, Mitte: DIMPAST 3 aus dem Jahr 2011, rechts: DIMPAST 4 aus dem Jahr 2012 (Labor für Zellbiophysik, FH Aachen University of Applied Sciences)

Im Jahr 2009 fand Eric Wiemer heraus [151], dass die Dicke der Eihaut gemessen mit dem Laser gleiche Ergebnisse brachte wie die Messung mittels Optischer Kohärenztomographie (= OCT, siehe dazu auch „Kapitel 4.4 Optische Kohärenztomographie“), das zusätzlich in das Gerät eingebaut wurde. Diese Ergebnisse wurden durch histologische Messungen [93] unterstützt. In vivo könnte die Dicke der Eihaut also wahrscheinlich auch mittels OCT bestimmt werden, was weniger Risiken birgt als die Untersuchung mittels Laser.

Hakan Oflaz ermittelte u. a. die Spanungs-Dehnungskurve und den max. Reissdruck der Eihäute. Die in dieser Arbeit verwendeten Werte stammen sowohl von diesen Messungen, als auch den Messungen von Guido Antweiler [10, 93, 103, 104].

4.4 Optische Kohärenztomographie

Die Dicke der fetalen Eihäute wurde mittels optischer Kohärenztomographie (OCT, engl.: optical coherence tomography) ermittelt.

OCT funktioniert ähnlich wie eine Ultraschallmessung, nur dass nicht die Intensität der Rückreflexion von Schallwellen, sondern von Infrarotlicht gemessen wird. Im Gegensatz zum

Ultraschall kann die Intensität der Rückreflexion aufgrund der hohen Geschwindigkeit der Lichtausbreitung nicht elektronisch gemessen werden [24]. Die Auflösung der OCT-Messung kann abhängig von der Kohärenzlänge der Lichtquelle 1 - 15 μm betragen, was dem ein- bis zweifachem von konventionellem Ultraschall entspricht. In den meisten biologischen Geweben ist die Bildtiefe durch die Abschwächung der optischen Streuung auf 2 - 3 mm limitiert [34].

Das Prinzip der OCT-Messung basiert auf der Weißlichtinterferometrie. Bei der OCT werden allerdings nicht lichtdurchlässige Proben, sondern teildurchlässige Materialien mit unterschiedlichen Grenzschichten, die jeweils zu einer Reflexion des Lichtes führen, untersucht [116].

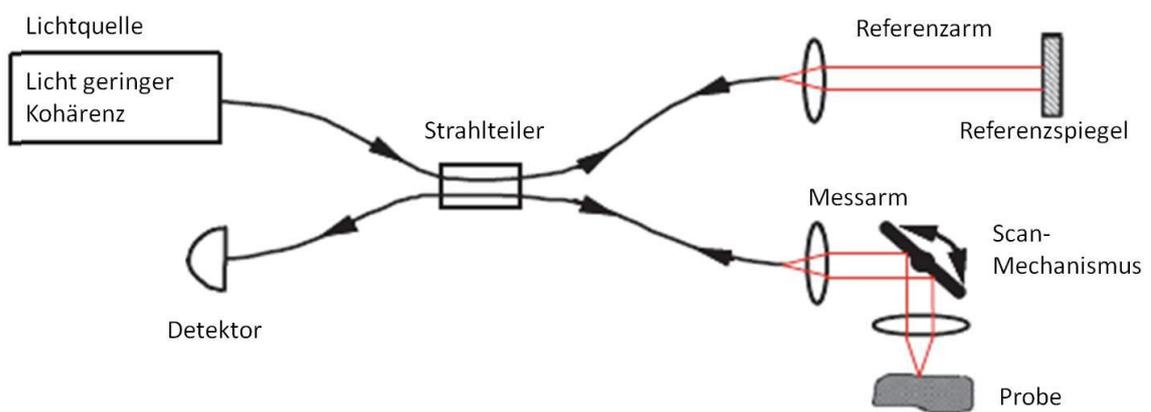


Abbildung 20: Genereller Aufbau einer OCT-Messeinrichtung. Die schwarzen Pfeile symbolisieren den Faseroptikpfad und die roten Linien stellen den Freiraum-Lichtweg dar (modifiziert) [34]

Abbildung 20 zeigt das grundsätzliche Prinzip der OCT-Messung: Eine Lichtquelle strahlt Licht geringer Kohärenz auf einen Strahlteiler (Interferometer). Dieser Strahlteiler teilt das einfallende Licht gleichmäßig auf Referenzarm und Messarm auf. Das Licht wird am Ende des Referenzarms von dem Referenzspiegel reflektiert und trifft dann wieder auf den Strahlteiler. Das Licht, das in den Messarm geschickt wird, trifft zunächst auf einen Scan-Mechanismus, der den Lichtstrahl auf die Probe richtet und einen fokussierten Punkt in ein oder zwei laterale Richtungen scannt. Dies geschieht gewöhnlich computergesteuert. Das von der Probe rückgestreute oder reflektierte Licht wird, genau wie das Licht aus dem

Referenzarm, über die Faseroptik zurück zum Strahlteiler geschickt. Die Interferenz der Signale der beiden Arme wird von einem Lichtempfänger oder Detektor registriert und zum sogenannten A-Signal (A-Scan = axialer Scan) weiterverarbeitet. Das A-Signal repräsentiert das tiefenaufgelöste Reflektivitätsprofil der Probe am Brennpunkt des Lichtstrahls an der fixierten lateralen Position des Scan-Mechanismus. Dadurch, dass der Scan-Mechanismus den Fokus des Lichtstrahls auf die Probe verändern kann, entstehen mehrere A-Scans, die von einem Computer in ein zwei-dimensionales Querschnittsbild zusammengefügt werden. Dieses Querschnittsbild wird dann als B-Scan bezeichnet. Durch ein Rasterscan von einer Serie von B-Scans kann darüber hinaus ein drei-dimensionaler Datensatz (3D-OCT) erstellt werden [34].

Durch die mögliche Bildtiefe der OCT ist es möglich fetale Eihäute komplett durch zu scannen und somit auch deren Dicke zu bestimmen. In vorherigen Studien [93] wurde bereits gezeigt, dass die Dickenmessung mittels OCT mit der Dickenmessung aus histologischen Untersuchungen korreliert. Abbildung 21 zeigt die OCT-Aufnahme einer menschlichen Eihaut in-vitro. Es können sowohl Amnion und Chorion voneinander unterschieden werden, als auch die dazwischen befindliche Schwammschicht (engl. spongy layer) und eine eventuelle Lücke zwischen den Schichten sichtbar gemacht werden. Das obere Ende des Chorion und das untere Ende des Amnion sind klar erkennbar und die absolute Dicke (engl. total thickness) kann so ermittelt werden.

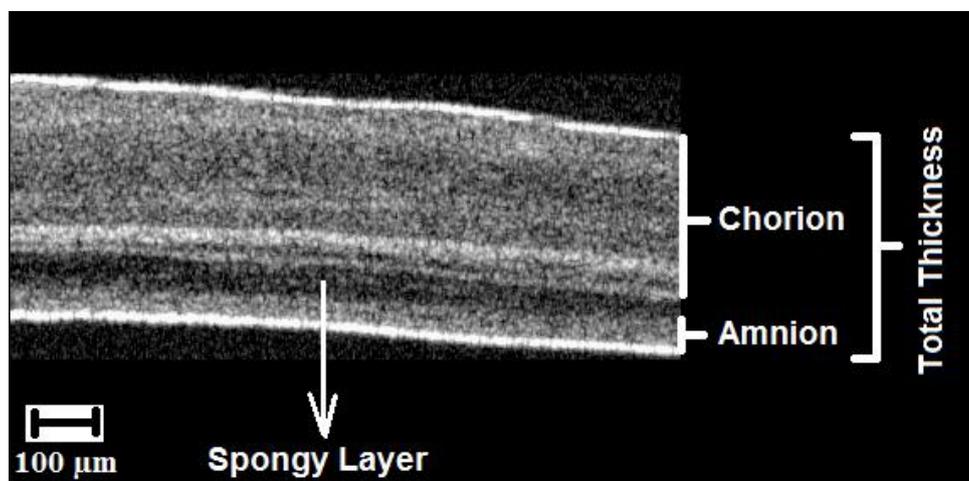


Abbildung 21: OCT-Aufnahme einer menschlichen Eihaut in-vitro [103]

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien

Bezeichnung	CAS Nummer	Anwendung	Hersteller
1,9-Dimethyl-Methylen Blau = Taylor's Blue	931418-92-7	Nachweis sulfierter Glykosaminoglykane mittels DMMB	Sigma-Aldrich, 341088
1-Propanol	71-23-8	Nachweis sulfierter Glykosaminoglykane mittels DMMB	Sigma-Aldrich, 34871
2,4,6-Trinitrophenol = Pikrinsäure	88-89-1	Kollagenbestimmung mittels Anfärbung durch Direct Dye	Sigma-Aldrich, 74069
2-Aminoacridon = AMAC	27918-14-5	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Sigma-Aldrich, 06627
2-Hydroxypropan-1,2,3-tricarbonsäure = Zitronensäure	77-92-9	Kollagenbestimmung mittels Hydroxyprolinbestimmung	Roth, X863.1
2-Propanol = Isopropanol	67-63-0	Kollagenbestimmung mittels Hydroxyprolinbestimmung	Sigma-Aldrich, 34965
3,3',5,5'-Tetrabromphenolsulfonphthalein = Bromphenolblau = BPB	115-39-9	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Roth, T116.1
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat = CHAPS	75621-03-3	Kollagenbestimmung mittels Anfärbung durch Direct Dye	Roth, 1479.1
3,5-Dihydroxytoluol = 5-Methylresorcin = Orcin = Orcinol	504-15-4	Nachweis des Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehaltes mittels Orcin-Test	Alfa Aesar, L18567
4-(Dimethylamino)benzaldehyd = p-Dimethylaminobenzaldehyd	100-10-7	Kollagenbestimmung mittels Hydroxyprolinbestimmung	Sigma-Aldrich, 33130
Acrylamid	79-06-1	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Sigma-Aldrich, A3553
Ammoniumacetat	631-61-8	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Sigma-Aldrich, A1542
Ammoniumpersulfat = APS	7727-54-0	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	215589
Borsäure	10043-35-3	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Sigma-Aldrich, B7901
Chondroitinsulfat	9007-28-7	Nachweis sulfierter Glykosaminoglykane mittels DMMB	Roth, 5197.1
cis-4-Hydroxy-L-proline = Hydroxyprolin	618-27-9	Kollagenbestimmung mittels Hydroxyprolinbestimmung	Sigma-Aldrich, H1637
Collagen Solution, 3mg/ml, Ultrapure Bovine	9007-34-5	Kollagenbestimmung mittels Anfärbung durch Direct Dye	Sigma-Aldrich, C4243

Material und Methoden

Bezeichnung	CAS Nummer	Anwendung	Hersteller
D(+)-Glucose	50-99-7	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Merck, 8337.1000
D-Glucuronsäure-3,6-lacton = Glucuronolacton	32449-92-6	Nachweis des Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehaltes mittels Orcin-Test	Fluka 49340
Direct Red 80 = Sirius Red 3FB	2610-10-8	Kollagenbestimmung mittels Anfärbung durch Direct Dye	Alfa Aesar, B21693
Ethylendiamintetraessigsäure = EDTA	25102-12-9	Kollagenextraktion	Sigma-Aldrich, ED2P
Ethylendiamintetraessigsäure Dikaliumsalz Dihydrat = EDTA Dikaliumsalz Dihydrat	25102-12-9	Kollagenextraktion	Sigma-Aldrich, ED2P
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat = EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	6381-92-6	Kollagenextraktion	Sigma-Aldrich, E5134
Eisen(III)-Chlorid	10025-77-1	Nachweis des Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehaltes mittels Orcin-Test	RS 551-277
Essigsäure	64-19-7	Kollagenextraktion	Roth, 7332.2
Ethanol	64-17-5	Nachweis sulfierter Glykosaminoglykane mittels DMMB	Roth, 9065.1
Guanidinhydrochlorid = GuHCl	50-01-1	Nachweis sulfierter Glykosaminoglykane mittels DMMB	Sigma-Aldrich, 50950
Hyaluronic acid sodium salt from <i>Streptococcus equi</i> , Poly(β -glucuronic acid-[1 \rightarrow 3]- β -N-acetylglucosamine-[1 \rightarrow 4]), alternating	9067-32-7	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Sigma-Aldrich, 53747
Hyaluronic acid disaccharide Δ DiHA sodium salt = α - Δ UA-(1 \rightarrow 3)-GlcNAc	149368-06-9	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Sigma-Aldrich, H9649
Hyaluronidase SD (<i>Streptococcus dysgalactiae</i>), Enzyme Commission (EC) Number: 4.2.2	9001-54-137259-53-3	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Northstar, 100741
Kollagen 3mg/ml	231-791-2	Kollagenbestimmung mittels Anfärbung durch Direct Dye	Sigma-Aldrich, C4243
Methansäure = Ameisensäure	64-18-6	Nachweis sulfierter Glykosaminoglykane mittels DMMB	Sigma-Aldrich, 94318
Natriumacetat Trihydrat	6131-90-4	Kollagenbestimmung mittels Hydroxyprolinbestimmung, Nachweis sulfierter Glykosaminoglykane mittels DMMB	Sigma-Aldrich, 71193
Natriumborhydrid	169-40-66-2	Extraktion der Glykosaminoglykane	Sigma-Aldrich, S9125

Material und Methoden

Bezeichnung	CAS Nummer	Anwendung	Hersteller
Natriumchlorid = NaCl	7647-14-5	Kollagenextraktion	Roth, 3957.1
Natriumcyanoborhydrid	25895-60-7	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Sigma-Aldrich, 156159
Natriumformiat	141-53-7	Nachweis sulfierter Glykosaminoglykane mittels DMMB	Fluka 71540
Natriumhydroxid = NaOH	1310-73-2	Kollagenbestimmung mittels Hydroxyprolinbestimmung, Kollagenbestimmung mittels Anfärben mit Sirius Red 3FB, Extraktion der Glykosaminoglykane, Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Roth, 6771.1
Natriumhydroxid	1310-73-2	Extraktion der Glykosaminoglykane	Roth, 9356.1
Pepsin	9001-75-6	Kollagenextraktion	Merck, 71970100
Perchlorsäure 60%	7601-90-3	Kollagenbestimmung mittels Hydroxyprolinbestimmung	Sigma-Aldrich, 77232
Phenolsulfonphthalein = Phenolrot	143-74-8	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Sigma-Aldrich, 32661
Protease Inhibitor Cocktail	N. A.	Kollagenextraktion	Sigma-Aldrich, P2714
Proteinase K from <i>Tritirachium albu</i> , <i>Endopeptidase K</i> , Enzyme Commission (EC) Number: 3.4.21.64	39450-01-6	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Sigma-Aldrich, P4850
Salzsäure = HCl	7647-01-0	Nachweis des Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehaltes mittels Orcin-Test, Kollagenbestimmung mittels Hydroxyprolinbestimmung, Extraktion der Glykosaminoglykane, Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Roth
Natriumdodecylsulfat = Sodium dodecyl sulfate = SDS	151-21-3	Extraktion der Glykosaminoglykane	Sigma-Aldrich, L4390
N,N'-methylenbisacrylamid	110-26-9	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Sigma-Aldrich, M7279
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin = TEMED	110-18-9	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Sigma-Aldrich, T7024

Material und Methoden

Bezeichnung	CAS Nummer	Anwendung	Hersteller
Toluol-2-sulfonchloramidnatrium = Chloramin T-Trihydrat	7080-50-4	Kollagenbestimmung mittels Hydroxyprolinbestimmung	Roth, 0271.1
Trichloressigsäure = TCA	76-03-9	Extraktion der Glykosaminoglykane	Roth, 3744.2
Tris(hydroxymethyl)aminomethan = Tris = Trizma base = Sigma 7-9	77-86-1	Nachweis von Hyaluronsäure mittels FACE / PAGEFS	Sigma-Aldrich, T1378
Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid = Tris HCl = Trizma [®] hydrochloride	1185-53-1	Kollagenextraktion	Sigma-Aldrich, T3253

Sigma-Aldrich = Sigma-Aldrich Co. LLC

Roth = Carl Roth GmbH & Co KG

Northstar = Northstar BioProducts - Associates of Cape Cod, Inc. (Seikagaku Corporation)

5.2 Geräte

Gerät	Name / Modell	Anwendung	Hersteller
pH-Meter	pH-Meter 766 Calimatic	Einstellung des pH-Werts in Lösungen	Knick Elektronische Messgeräte
heizfähiger Schüttler für Reaktionsgefäße	Thermomixer compact	Inkubation von 1,5 mL Reaktionsgefäßen	Eppendorf
Gefriertrockner	Lyovac GT2	Trocknung und Wassergehaltsbestimmung	GEA Lyophil GmbH
Gefriertrockner	Alpha 2-4	Trocknung und Wassergehaltsbestimmung	Martin Christ GmbH
Autoklav 23	Autoklav 23	Autoklavieren von Lösungen	Melag
Autoklav 2540 EL	Autoklav 2540 EL	Autoklavieren von Lösungen	Systec GmbH
Zentrifuge	Biofuge 15R	Zentrifugation von 15 mL Zentrifugationsröhrchen oder größer	Heraeus Sepatech
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Zentrifugation von 1,5 mL Reaktionsgefäßen	Heraeus Sepatech
Wärmeschrank	T5060 E	Wärmetrocknung und Inkubation	Heraeus Sepatech
Waage	MC1 weight machine	Abwiegen der verwendeten Chemikalien	Sartorius
Wasserbad	Shaking Water Bath System	Inkubation im Wasserbad	PolyScience
Reagenzschüttler	Vortex VIBRAX-VXR	Vermischung von Lösungen in Reaktionsgefäßen oder Zentrifugationsröhrchen	IKA-Werke GmbH & CO. KG
Spektrophotometer	V-550, Jasco	Ermittlung der Absorption von Lösungen in Küvetten	Labor- und Datentechnik GmbH
Microplaterereader	Model 680	Ermittlung der Absorption von Lösungen in Mikrotiterplatten	BIORAD
Magnetrührer mit Heizfunktion	IKAMAG RET	Vermischung von Lösungen in größeren Gefäßen	IKA-Werke GmbH & CO. KG

5.3 Probenahme, -bearbeitung und Wassergehaltsbestimmung

Die in dieser Studie verwendeten Eihäute stammen von der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Uniklinik Köln. Die Eihäute wurden als Nachgeburt gesammelt, von der Placenta getrennt und mit 0,9 % NaCl gewaschen.

Anschließend wurden die Eihäute kartiert (Mapping) und auf ihre mechanischen Eigenschaften hin untersucht [10, 103]. Nach dieser Untersuchung wurden die einzelnen Stücke einer Eihaut bei -80 °C eingefroren.

Tiefgefrorene Stücke wurden mittels flüssigem Stickstoff und Mörser und Pestil zu einem feinen Puder verarbeitet. Jeweils 70 – 100 mg dieses Homogenats wurden in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen (im Folgenden „Tubes“ genannt) abgefüllt und erneut bei -80 °C eingefroren.

Die Proben wurden in einem Lyophilisator in den Tubes gefriergetrocknet und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung erneut bei -80 °C eingefroren.

Die Wassergehaltsbestimmung erfolgte mittels Differenzwiegen der Proben vor und nach der Gefriertrocknung:

Formel 1: Bestimmung des Wassergehalts

$$\text{Wassergehalt [\%]} = \frac{\text{Einwaage Probe [g] nach dem Gefriertrocknen}}{\text{Einwaage Probe [g] vor dem Gefriertrocknen}} \times 100$$

5.4 Bestimmung des Kollagengehaltes

5.4.1 Extraktion

Die Proben werden mit jeweils 1 mL NSC-Lösung versetzt (1 M NaCl, 0,05 M TrisHCl, 1 % Protease Inhibitor Cocktail), für 72 h geschüttelt und anschließend zentrifugiert (10.000 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wird abgenommen, als NSC-Fraktion gesammelt und bis zur Messung bei -80 °C eingefroren. Auf die Pellets wird jeweils 1 mL APSC-Lösung (0,5 M konz. Essigsäure, 0,5 % Pepsin, 5 mM EDTA (hergestellt aus EDTA dipotassium salt dihydrate)) gegeben und für 24 h geschüttelt. Alle Proben werden zentrifugiert (10.000 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wird als APSC-Fraktion gesammelt und bis zur Messung bei -80 °C eingefroren. Die Pellets, die das unlösliche quervernetztes Kollagen (ISC = insoluble collagen) beinhalten werden ebenfalls bei -80 °C eingefroren. Die ISC-Fraktion kann nicht mit der Kollagengehaltbestimmung durch Anfärben (siehe Kapitel 4.1.3 und 5.4.3) bestimmt werden, da diese Methode nur für Kollagene funktioniert, die sich in Lösung befinden. Die ISC-Fraktion kann nur mit der Kollagengehaltbestimmung mit Hydroxyprolin (siehe Kapitel 4.1.2 und 5.4.2) ermittelt werden.

5.4.2 Bestimmung mit Hydroxyprolin

Zu jeder Probe wird 500 µL 2 M NaOH gegeben. Die Tubes werden mit Aluminiumfolie abgedeckt und autoklaviert (120 °C, 20 min). Anschließend werden die Tubes zentrifugiert (10 min, 4 °C, 10.000 x g). Jeweils 50 µL des Überstandes, der Proben und der Oxidationslösung (300 mg Chloramin-T, 50 ml Oxidationspuffer) als Blindwert und Hydroxyprolin-Standard aus der Stammlösung (1 mg/mL Hydroxyprolin gelöst in 10 mM HCl) werden in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Der Citrat-Acetat-Puffer (34 g NaOH, 34 g Zitronensäuremonohydrat, 120 g Natriumacetat trihydrat) und der Oxidationspuffer (600 mL Isopropanol, 330 mL H₂O, 390 mL Citrat-Acetat-Puffer -> mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 6,0 einstellen -> auf 1 L mit H₂O auffüllen) werden hergestellt. In jedes Well einer Mikrotiterplatte wird 100 µL Oxidationslösung pipettiert und für 5 min geschüttelt. Zu jedem Well wird anschliessend 100 µL Ehrlich's Reagenz (6 g 4-(Dimethylamino)-

benzaldehyd, 52 mL Isopropanol, 16 mL 50 %ige Perchlorsäure) pipettiert und durchmischt. Die Mikrotiterplatte wird abgedeckt und 45 min im Wasserbad bei 60 °C inkubiert. Die Absorptionen werden bei 540 nm gemessen.

5.4.3 Bestimmung durch Anfärben

Zu 1 L siedendem Wasser wird zum bis zur Sättigung Pikrinsäure gegeben. Nach Abkühlen werden 1 g Sirius Red 3FB (Direct Red 80) und 125 mg CHAPS zugegeben. Der Farbstoff wird in lichtundurchlässigen Flaschen maximal 3 Jahre bei Raumtemperatur gelagert.

Die Standards wurden aus Kollagen mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL und 0,0625 mg/mL. Als Blindwert dient je nach Fraktion die NSC- bzw. die APSC-Stammlösung.

100 µL Blindwert, Standard oder Probe (NSC- oder APSC-Fraktion) wird jeweils in ein Tube gefüllt und mit 1 mL Direct Dye versetzt. Bei zu hoher Kollagenkonzentration in den Fraktionen wird weniger als 1 mL in die Tubes gefüllt – eine Verdünnung ist nicht erforderlich. Die Tubes werden im Thermomix geschüttelt (30 min, 33 °C, 1.000 rpm). Anschließend werden alle Tubes zentrifugiert (15.000 x g, 4 °C, 15 min). Der Überstand wird verworfen und Reste der Flüssigkeit entfernt. Zu den Pellets wird 1 mL Alkalisches Reagenz (0,5 M NaOH) gegeben und die Tubes werden geschüttelt, bis sich die Pellets gelöst haben. Die Absorption der Blindwerte, Standards und Proben wird mit dem ELISA-Plate-Reader bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Dazu werden aus jedem Tube 200 µL in jedes Well der Mikrotiterplatte pipettiert.

Aus den gemessenen Absorptionen der Standards wird eine Standardgerade erstellt und über die Geradengleichung der linearen Regression die Kollagenkonzentration der Proben errechnet.

5.5 Nachweis der Glykosaminoglykane

5.5.1 Extraktion

Auf maximal 20 mg Eihaut wird 1 mL GAG-Extraktionslösung (0,8 % NaBH₄, 0,5 % SDS, 0,1 M NaOH) gegeben. Die Proben werden für 16 h bei RT inkubiert. Anschließend werden die Proben mit 200 µL 1 M Natriumacetat und dann mit 300 µL 1 M HCl versetzt. Zu den Proben wird Trichloressigsäure gegeben, bis eine Konzentration von 10 % erreicht ist. Die Proben werden 30 min auf Eis gelagert und anschließend 15 min bei maximaler Drehzahl bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthält die Glykosaminoglykane. Das Vierfache des Probenvolumens an 99 %igem Ethanol wird zur Probe gegeben und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Zuletzt werden die Proben für 15 min bei maximaler Drehzahl bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den Glykosaminoglykanen wird abgenommen und bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

5.5.2 Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt - Orcin-Test

Standards enthalten Uronsäure in folgenden Konzentrationen: 5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL und 200 µg/mL

Auf die aufgeschlossene Probe (vgl. Kapitel 5.5.1) sowie Standards und Blindwert wird 750 µL Orcinol-Reagenz (2 g Orcinol, 50 mL Eisen-Reagenz (0,75 g FeCl₃ aufgefüllt auf 50 mL mit H₂O) und 1 L HCl-Reagenz (850 mL konz. HCl zu 150 mL H₂O)) gegeben und bei 100 °C für 20 min inkubiert. Nach Abkühlung auf RT werden die Absorptionen der Proben bei 670 nm gemessen.

5.5.3 Nachweis sulfierter Glykosaminoglykane

Die Standards enthalten Chondroitinsulfat in folgenden Konzentrationen: 0 µg, 1 µg, 5 µg, 10 µg, 25 µg und 50 µg.

Material und Methoden

Die hergestellten Lösungen sind bei Raumtemperatur bis zu vier Monate haltbar. DMMB-haltige Lösungen müssen bei Dunkelheit aufbewahrt werden.

Format-Lösung (25 mL Ethanol, 100 mL 1 M Guanidinhydrochlorid (= GuHCl), 1 g Natriumformiat, 1 mL 98% Ameisensäure -> aufgefüllt auf 500 mL mit H₂O) und DMMB-Lösung (16 mg 4-(Dimethylamino)benzaldehyd (= DMMB), 25 mL Ethanol -> durch Filterpapier filtern, 100 mL 1 M GuHCl, 1 g Natriumformiat, 1 mL 98%ige Ameisensäure -> aufgefüllt auf 500 mL mit H₂O) werden hergestellt. Auf die Proben, Standards und Blindwert (besteht aus H₂O) werden jeweils 1 mL DMMB-Medium (1:1 Mischung aus Format-Lösung und DMMB-Lösung) gegeben. Die Proben werden 30 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert (12.000 x g, 4 °C, 10 min). Der Überstand wird verworfen und die Tubes auf einem Papiertuch abgetropft. Anschließend wird 1 mL Dissoziationslösung (50 mM Natriumacetat, 10 % 1-Propanol, 4 M GuHCl) zu jedem Pellet gegeben. Der Komplex aus Farbstoff und sulfierten GAGs geht in Lösung und das DMMB färbt die Lösung blau. Die Absorption wird bei 656 nm gemessen.

5.5.4 Bestimmung des Hyaluronsäuregehaltes

5.5.4.1 Extraktion

Für die Hyaluronsäurebestimmung wurden Proben verwendet die wie in „5.3 Probenahme, -bearbeitung und Wassergehaltsbestimmung“ beschrieben, vorbereitet wurden.

Zu jeder Probe wird 300 µL Protease K Lösung (>20 U/ml Protease K auf erforderliches Volumen mit Ammonium-Acetat Puffer (100 mM Ammonium-Acetat, 0,0005 % Phenolrot, pH auf 7,0 mit NaOH einstellen) einstellen) gegeben. Für den Blindwert wird ein leeres Tube mit demselben Volumen Protease K Lösung befüllt. Mit den Blindwerten wird weiterhin genauso verfahren wie mit den Proben. Die Proben werden für 18 – 24 Stunden bei 60 °C inkubiert. Die Protease K Reaktion wird gestoppt, indem alle Proben für 5 min auf 100 °C erhitzt werden. Anschließend werden die Proben zentrifugiert (10 min, 4 °C, 10.000 x g). Der Überstand wird gesammelt und während der Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. 100 µL des Überstands wird mit 1 mL auf -20 °C vorgekühltem Ethanol versetzt. Die Proben werden

4 Stunden bei -20 °C inkubiert. Anschließend werden alle Proben zentrifugiert (15 min, 4 °C, 10.000 x g). Die Pellets werden gesammelt, bei -80 °C eingefroren und gefriergetrocknet.

5.5.4.2 Enzymatische Spaltung der HA-Ketten in Disaccharideinheiten und Derivatisierung

Zu jedem gefriergetrocknetem Pellet werden 100 µL Hyaluronidase SD Lösung (100 mU/mL Hyaluronidase SD auf erforderliches Volumen mit Ammonium-Acetat Puffer eingestellt, Aliquote von 100 µL bei -20 °C gelagert) gegeben. Alle Proben werden für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation werden alle Proben mit 900 µL auf -20 °C vorgekühltem Ethanol versetzt und für 2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Die Proben werden zentrifugiert (20 min, 4 °C, 10.000 x g). Der Überstand wird gesammelt, bei -80 °C eingefroren und gefriergetrocknet.

Die Derivatisierung erfolgt für Proben Blindwert und Standards gleichermaßen. Δ DiHA Standards bestehen aus Aliquoten von 0,5 nmol – 3,0 nmol aus Δ DiHA Stammlösung ((50 µmol/L Δ DiHA) in Tubes abfüllen, trocknen und bei -20 °C gelagert).

Zu jeder Probe wird 40 µL AMAC Lösung (12,5 mM 2-Aminoacridon auf erforderliches Volumen mit DMSO/ Eisessig (85/15, v/v) eingestellt) hinzugefügt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wird zu jeder Probe 40 µL frisch zubereitete Natriumcyanoborhydrid Lösung (1,25 M Natriumcyanoborhydrid) gegeben und über Nacht (für mind. 16 Stunden) bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird jede Probe mit 20 µL Glycerol versetzt

Die Derivatisierungsprodukte werden sofort analysiert oder bei -80 °C bis zur Messung eingefroren. Die Derivatisierungsprodukte sind bei dieser Temperatur 6 Monate stabil [113].

5.5.4.3 Elektrophorese der derivatisierten Produkte

Die Acrylamidlösung für Laufgel (T 25 % / C 3,75 %) (N,N'-methylenbisacrylamid, Acrylamid, 187,5 mM TRIS-Borat aus TRIS-Borat Puffer, 187,5 mM TRIS-HCl aus TRIS-HCl Puffer) und die Acrylamidlösung für Sammelgel (T 5 % / C 1,5 %) (N,N'-methylenbisacrylamid, Acrylamid, 0,36 M TRIS-HCl aus TRIS-HCl Puffer, Bromphenol-Blau) werden hergestellt.

Das Laufgel (für 2 Gele: 10 mL Acrylamidlösung für Laufgel, 5 μ L TEMED, 50 μ L 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat) wird fertig gestellt und sofort zwischen die Glasscheiben gegossen (~ 5,5 cm hoch). Isopropanol wird auf das Laufgel gegeben; die Polymerisierung dauert ca. 20 min. Das Isopropanol wird wieder abgegossen und mit H_2O_d gespült. Das Sammelgel (für 2 Gele: 2,5 mL Acrylamidlösung für Sammelgel, 5 μ L TEMED, 25 μ L 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat) wird hergestellt, zwischen die Scheiben gegossen und die Kämme eingesetzt; die Polymerisierung dauert ca. 45 min. Die Kämme werden entfernt und überschüssige Flüssigkeit in den Taschen mit Filterpapierstücken entfernen.

TRIS-Borat Puffer (1,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 1,5 M Borsäure, pH auf 8,8 mit 5 M NaOH eingestellt) und der TRIS-HCl Puffer (1,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethane, pH auf 8,8 mit konz. HCl eingestellt) werden hergestellt. Die Gele werden mit einem Kühlblock in die Elektrophorese-Kammer gesetzt (Temperatur sollte 10 °C nicht überschreiten) und die Kammer mit Elektrophoresepuffer (0,15 M TRIS-Borat aus TRIS-Borat Puffer hergestellt) gefüllt (ca. 1 L). Jeweils 5 μ L der derivatisierten Proben werden in jede Gel-Tasche gefüllt. Die Elektrophorese erfolgt bei 100 mA/Gel, 30 W, max. 500 V. Die Elektrophorese wird beendet, wenn das Bromphenolblau aus dem Sammelgel bis ca. 1 cm vor Glasende gelaufen ist.

5.5.4.4 Analyse und Auswertung der aufgetrennten Proben

Die Taschen werden gründlich mit H_2O gespült. Die Gläser werden vom Gel entfernt und das Sammelgel abgetrennt.

In jedem Gel laufen mindestens 3 Standards in verschiedenen Konzentrationen und ein Blindwert mit. Die Analyse der Gele erfolgt mit dem Programm „QuantityOne“ von BioRad unter UV-Licht. Messgröße ist „Volume“ bzw. „Adj. Volume“ wenn der Blindwert abgezogen wurde. „Volume“ ist nach BioRad definiert als die Summe der Intensitäten der Pixel innerhalb der Volumenmarkierung multipliziert mit der Pixelfläche ($INT \times mm^2$). Der Blindwert wird dabei als „Global Background Subtraction“ von allen anderen Werten abgezogen. Das bedeutet, dass die durchschnittliche Pixelintensität in der Volumenmarkierung des Blindwertes berechnet und von allen anderen Pixeln der anderen Volumenmarkierungen (Proben und Standards) abgezogen wird [160]. Anhand der linearen Regression und

Geradengleichung wird die Konzentration der jeweiligen Proben bestimmt. Ergebnisse werden akzeptiert, wenn das Bestimmtheitsmaß der Standardgerade $R^2 \geq 0,9$ ist.

5.6 Statistische Analyse

Die Statistischen Analysen erfolgten mit dem Programm IBM SPSS Statistics 19. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) wurden mit einem Obelisk (*) gekennzeichnet. Der Vergleich der Kollagenkonzentrationen wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Für die Korrelationen wurde die Pearson Korrelation verwendet. Die Ergebnisse werden mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. Das Konfidenzintervall der Korrelationen wurde mit einem Konfidenzniveau von 95 % in die jeweiligen Graphiken eingezeichnet.

6 Ergebnisse

6.1 Kollagengehaltbestimmung mit Hydroxyprolin

Tabelle 3 und Abbildung 22 zeigen den Kollagengehalt von Term, Preterm, PROM und PPROM Membranen ermittelt durch Hydroxyprolin-Bestimmung (hyp). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 3: Hydroxyprolingehalt von Term, Preterm, PROM und PPROM Membranen

Membran	Nr.	Anzahl	hyp [mg/g]
Term	1	n = 7	1,24 ± 0,10
	2	n = 7	
Preterm	1	n = 3	1,16 ± 0,08
	2	n = 5	
PROM	1	n = 6	1,29 ± 0,40
	2	n = 8	
PPROM	1	n = 2	0,79 ± 0,19
	2	n = 6	
	3	n = 4	

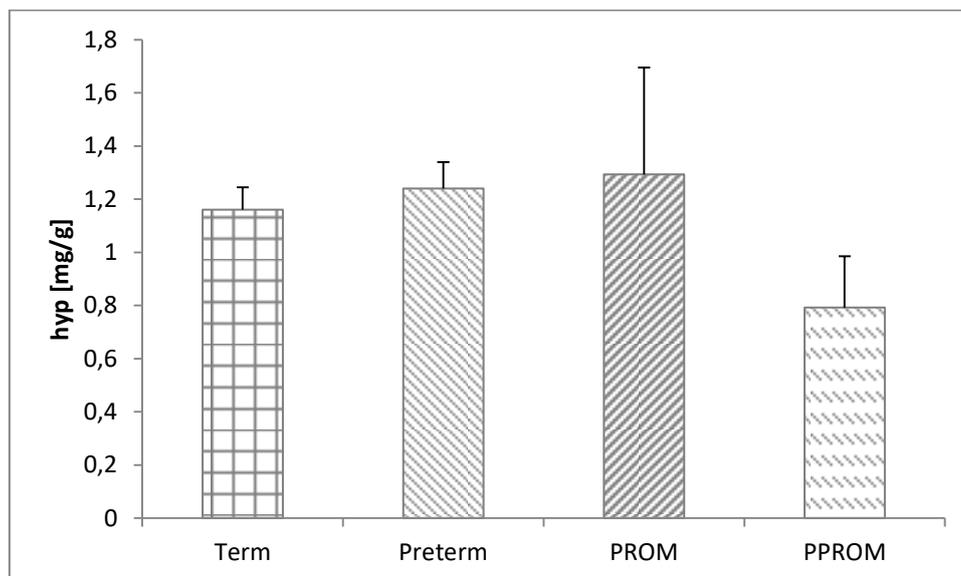


Abbildung 22: Hydroxyprolingehalt (hyp) von Term, Preterm, PROM und PPROM Membranen

6.2 Kollagengehaltbestimmung durch Anfärben

Zur Färbung von Kollagen wurde Sirius Red 3FB benutzt. Tabelle 4 und Abbildung 23 zeigen den Gehalt an gesamt-löslichen Kollagen von Term, PROM und PPRM Membranen. Es besteht ein signifikanter Unterschied beim TSC zwischen Term und PROM Membranen ($*p < 0,001$) und zwischen Term und PPRM Membranen ($^{\Delta}p < 0,001$). Kein signifikanter Unterschied besteht zwischen dem TSC- Gehalt von PROM und PPRM Membranen ($p = 0,088$).

Tabelle 4: TSC-Gehalt von Term, PROM und PPRM Membranen

Membran	Nr.	Anzahl	TSC-Gehalt [mg/g]	TSC-Gehalt [mg/g]
Term	1	n = 9	24,2 ± 5,6	28,6 ± 3,3
	2	n = 9	32,6 ± 4,9	
	3	n = 9	28,8 ± 1,2	
PROM	1	n = 9	14,9 ± 3,1	18,6 ± 2,9
	2	n = 9	21,9 ± 5,3	
	3	n = 9	18,9 ± 5,3	
PPROM	1	n = 5	24,6 ± 3,8	22,1 ± 2,0
	2	n = 9	21,9 ± 3,3	
	3	n = 6	19,7 ± 1,8	

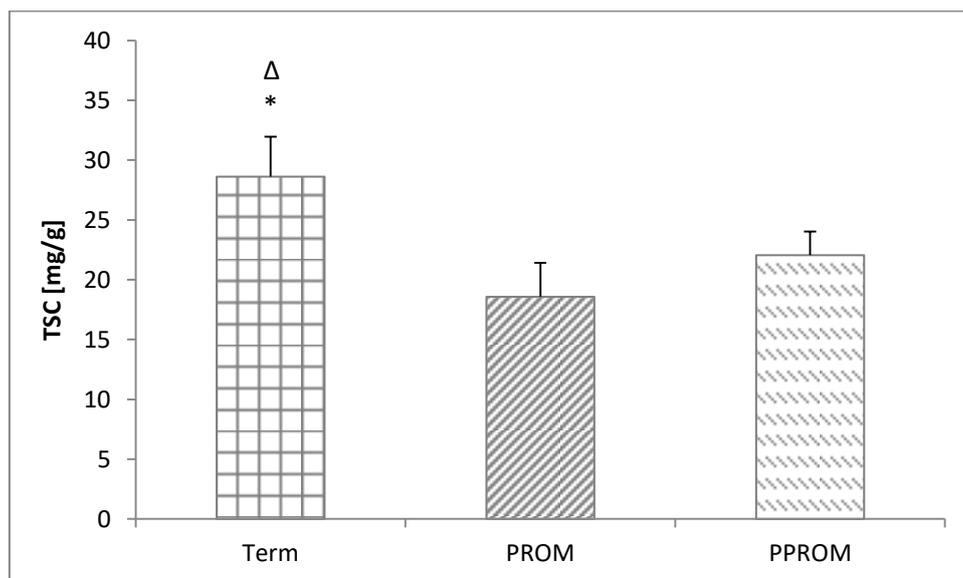


Abbildung 23: TSC-Gehalt von Term, PROM und PPRM Membranen

6.3 Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt - Orcin-Test

Tabelle 5 und Abbildung 24 zeigen den gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt (gGAG) von Preterm, Term, PROM und PPROM Membranen ermittelt durch Nachweis der Uronsäure. Es besteht ein signifikanter Unterschied im Uronsäuregehalt zwischen Term und Preterm Membranen (* $p = 0,003$), zwischen Term und PPROM Membranen (** $p = 0,008$) und zwischen PROM und Preterm Membranen ($\Delta p = 0,038$).

Tabelle 5: gGAG-Gehalt von Preterm, Term, PROM und PPROM Membranen

Membran	Anzahl	Uronsäure [mg/g]
Preterm	n = 18	94,5 ± 11,2
Term	n = 25	125,6 ± 25,3
PROM	n = 26	130,2 ± 23,1
PPROM	n = 17	98,7 ± 21,2

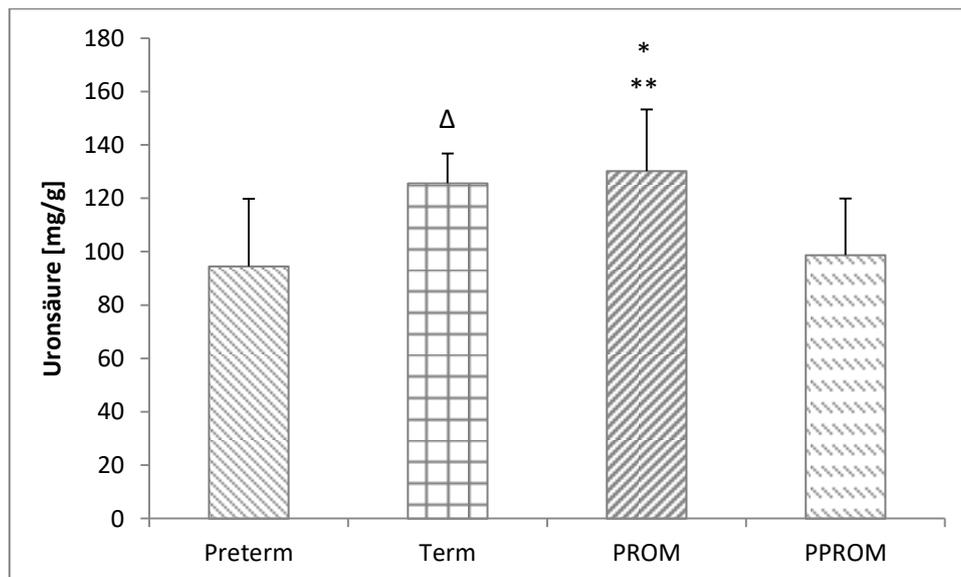


Abbildung 24: gGAG Gehalt von Preterm, Term, PROM und PPROM Membranen

6.4 Sulfierte Glykosaminoglykane

Tabelle 6 und Abbildung 25 zeigen den Gehalt an sulfierten Glykosaminoglykanen (sGAG) von Preterm, Term, PROM und PPROM Membranen ermittelt durch Nachweis mit DMMB. Es wurden keine signifikanten Unterschiede im sGAG-Gehalt zwischen den 4 Gruppen gefunden.

Tabelle 6: sGAG-Gehalt von Preterm, Term, PROM und PPROM Membranen

Membran	Anzahl	sGAG [mg/g]
Preterm	n = 18	1,78 ± 1,13
Term	n = 27	1,81 ± 0,79
PROM	n = 27	2,47 ± 0,79
PPROM	n = 18	1,17 ± 0,50

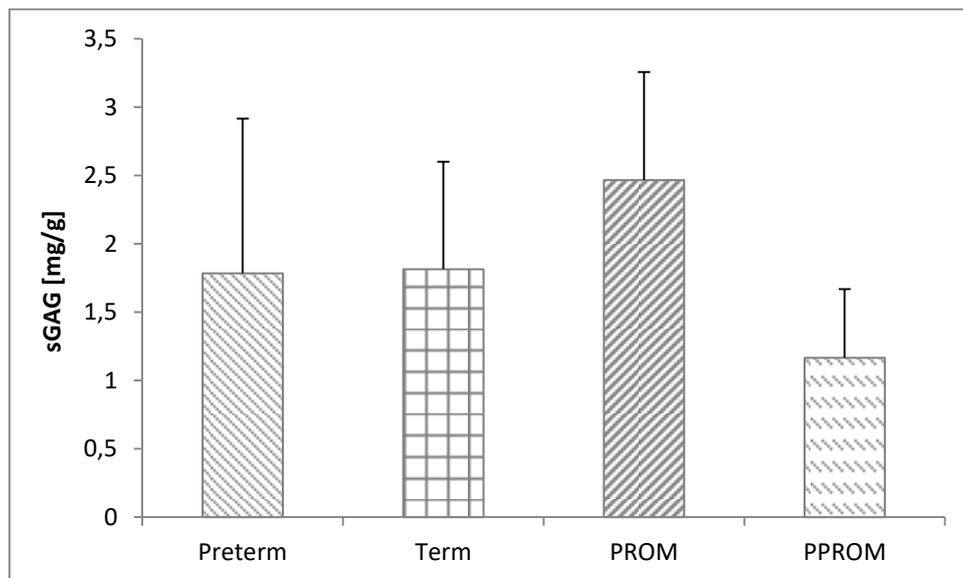


Abbildung 25: sGAG-Gehalt von Preterm, Term, PROM und PPROM Membranen

6.5 Bestimmung des Hyaluronsäuregehaltes

Tabelle 7 und Abbildung 26 zeigen den Hyaluronsäuregehalt (Δ DiHA) von Term, PROM und PPRM Membranen ermittelt durch FACE. Die Probenanzahl ist für eine Statistik zu gering, sodass keine signifikanten Unterschiede ermittelt wurden.

Tabelle 7: Hyaluronsäuregehalt von Term, PROM und PPRM Membranen

Membran	Membran	Anzahl	HA [mg/g]	Anzahl	HA [mg/g]
Term	1	n = 2	26,4 ± 8,9	n = 2	33,2 ± 6,8
	2	n = 2	39,9 ± 8,6		
PROM	1	n = 1	12,2	n = 3	32,9 ± 14,7
	2	n = 1	45,0		
	3	n = 2	41,5 ± 11,1		
PPROM	1	n = 2	21,2 ± 6,3	n = 1	21,2

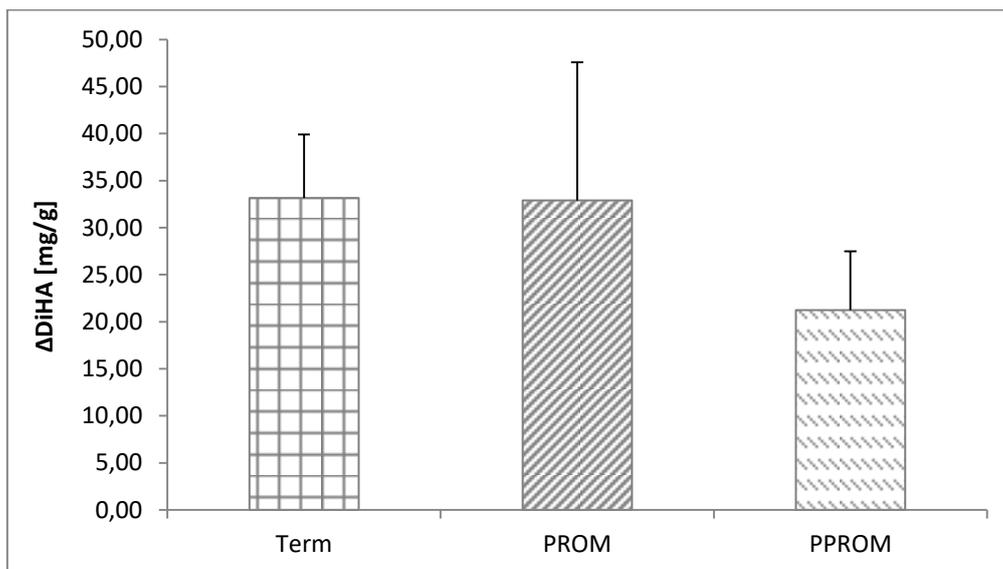


Abbildung 26: Hyaluronsäuregehalt von Term, PROM und PPRM Membranen

6.6 Wassergehalt

Tabelle 8 und Abbildung 27 zeigen den Wassergehalt von Preterm, Term, PROM und PPROM Membranen ermittelt durch Gefriertrocknung. Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Wassergehalt zwischen den 4 Gruppen ermittelt.

Tabelle 8: Wassergehalt von Term, PROM und PPROM Membranen

Membran	Membran	Anzahl	Wassergehalt [%]	Anzahl	Wassergehalt [%]
Preterm	1	n = 3	85,3 ± 0,5	n = 2	84,6 ± 0,8
	2	n = 5	83,8 ± 1,6		
Term	1	n = 7	83,6 ± 1,0	n = 2	83,5 ± 0,4
	2	n = 7	86,3 ± 0,3		
PROM	1	n = 6	86,9 ± 3,5	n = 2	87,6 ± 0,2
	2	n = 8	85,2 ± 2,5		
PPROM	1	n = 6	84,4 ± 0,0	n = 2	82,0 ± 0,8
	2	n = 4	81,3 ± 0,4		

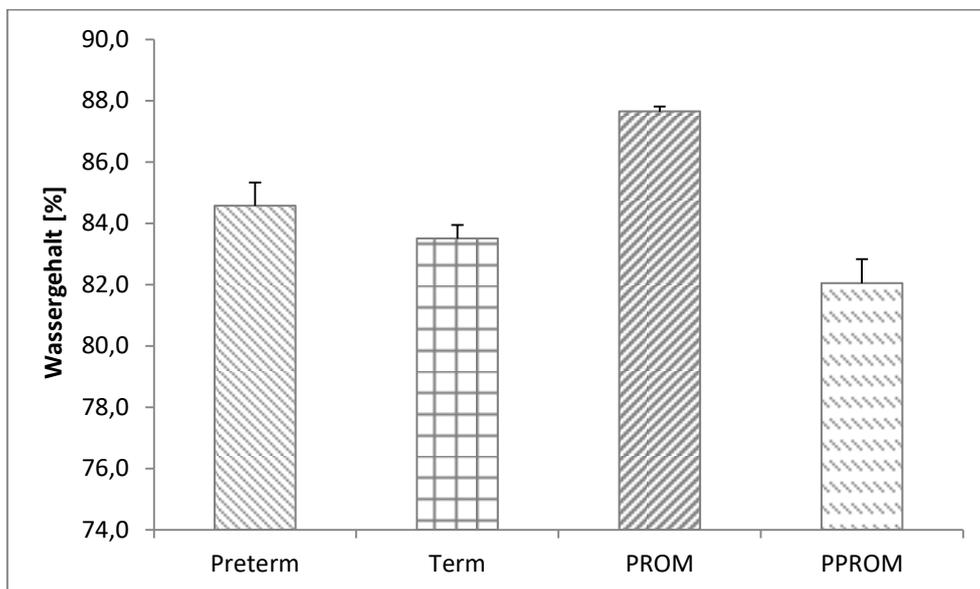


Abbildung 27: Wassergehalt von Term, PROM und PPROM Membranen

6.7 Korrelationen

6.7.1 TSC-Gehalt und Hydroxyprolin

Der Kollagengehalt wurde mit zwei verschiedenen Methoden (vgl. Kapitel 4.1.2 und 4.1.3) ermittelt. Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Bestimmungsmethoden besteht. Abbildung 28 zeigt die Korrelation zwischen dem Gehalt an gesamt-löslichen Kollagen ermittelt durch Anfärben mit Sirius Red 3FB (TSC) und dem Kollagengehalt ermittelt durch Hydroxyprolin-Bestimmung (hyp). Es wurde keine Korrelation zwischen dem TSC-Gehalt und dem Hydroxyprolin-Gehalt ermittelt.

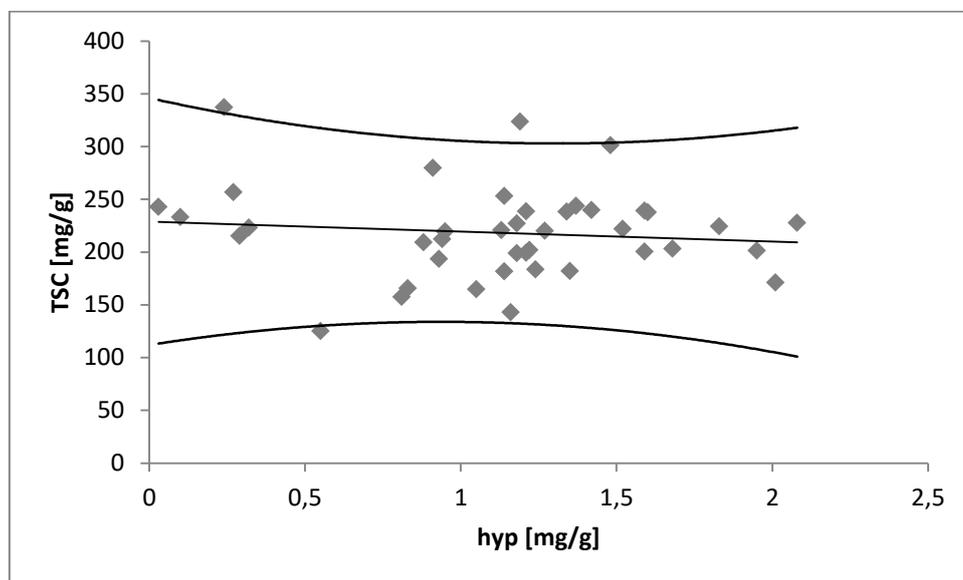
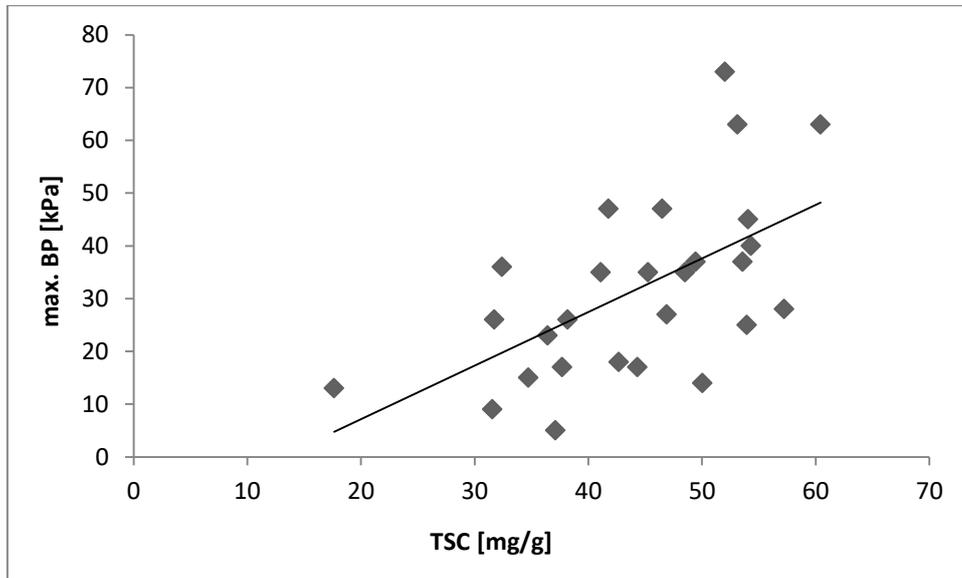


Abbildung 28: TSC-Gehalt und Hydroxyprolin ($r = -0,110$; $p = 0,493$; $n = 41$)

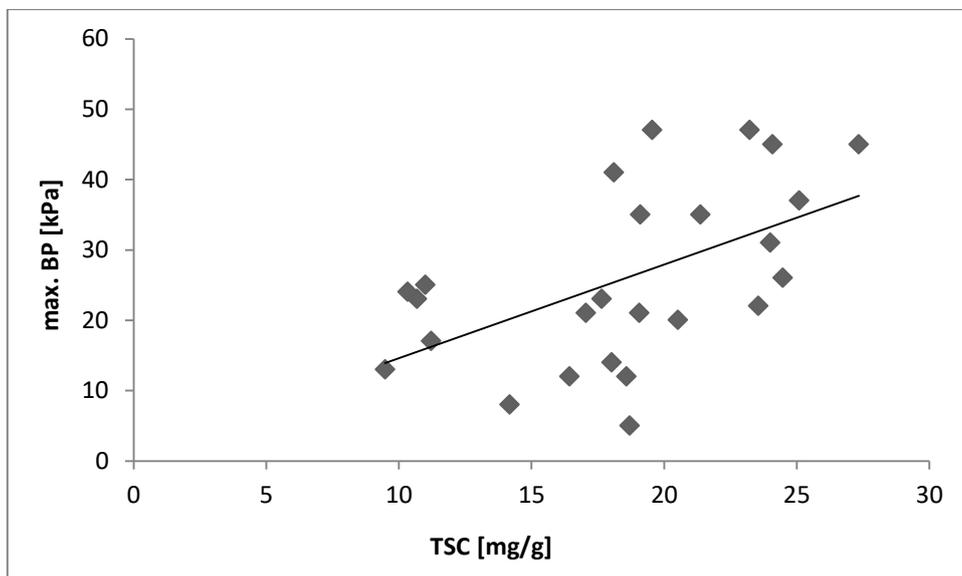
6.7.2 TSC-Gehalt und maximaler Reissdruck

Abbildung 29, Abbildung 30 und Abbildung 31 zeigen die Korrelation zwischen dem Gehalt an gesamt-löslichen Kollagen ermittelt durch Anfärben mit Sirius Red 3FB (TSC) und dem maximalem Reissdruck (max. BP) ermittelt durch DIMPAST-Messungen. Es wurde eine positive Korrelation zwischen bei Term Membranen als auch bei PROM Membranen ermittelt. Keine Korrelation des TSC-Gehaltes konnte zwischen dem maximalen Reißdruck und dem TSC-Gehalt von PPRM Membranen gefunden werden.

Ergebnisse



**Abbildung 29: TSC-Gehalt und maximaler Reissdruck bei Term Membranen
($r = 0,559$; $p = 0,002$; $n = 27$)**



**Abbildung 30: TSC-Gehalt und maximaler Reissdruck bei PROM Membranen
($r = 0,539$; $p = 0,005$; $n = 25$)**

Ergebnisse

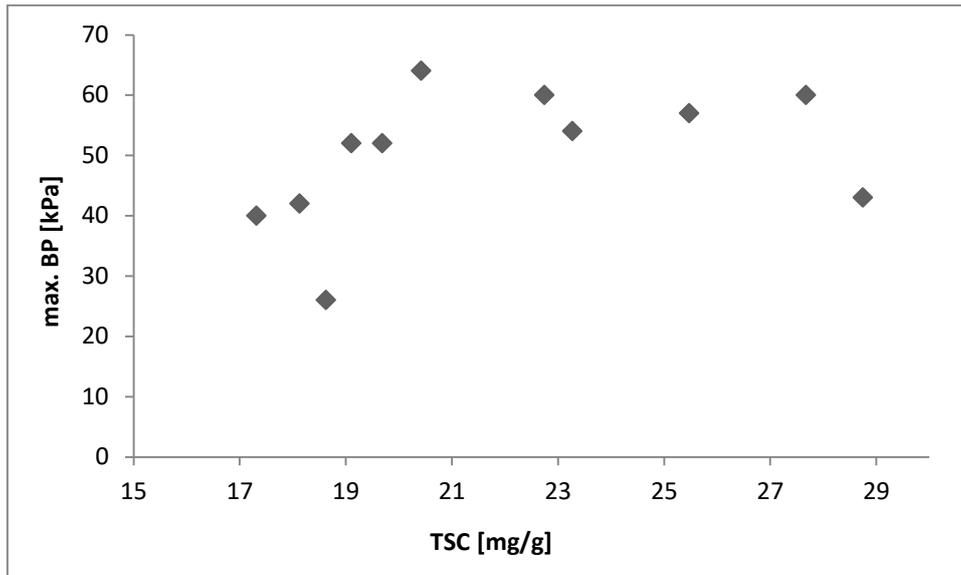


Abbildung 31: TSC-Gehalt und maximalem Reissdruck bei PPRM Membranen ($r = 0,389$; $p = 0,237$; $n = 11$)

6.7.3 Wassergehalt und maximaler Reissdruck

Abbildung 32 zeigt die Korrelation zwischen dem Wassergehalt ermittelt durch Gefriertrocknung und dem maximalen Reissdruck (max. BP) ermittelt durch DIMPAST-Messungen. Es wurde eine signifikante negative Korrelation zwischen dem maximalen Reißdruck und dem Wassergehalt ermittelt.

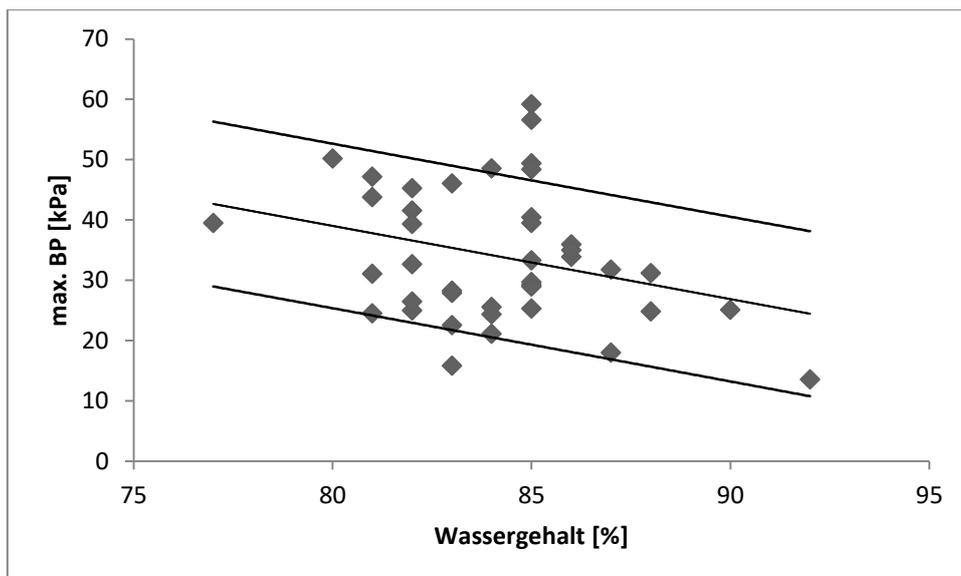


Abbildung 32: Wassergehalt und maximaler Reissdruck ($r = -0,310$; $p = 0,013$; $n = 41$)

6.7.4 Wassergehalt und Dicke

Abbildung 33 zeigt die Korrelation zwischen Wassergehalt ermittelt durch Gefriertrocknung und Dicke ermittelt durch DIMPAST-Messungen. Es wurde eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Wassergehalt und der Dicke ermittelt.

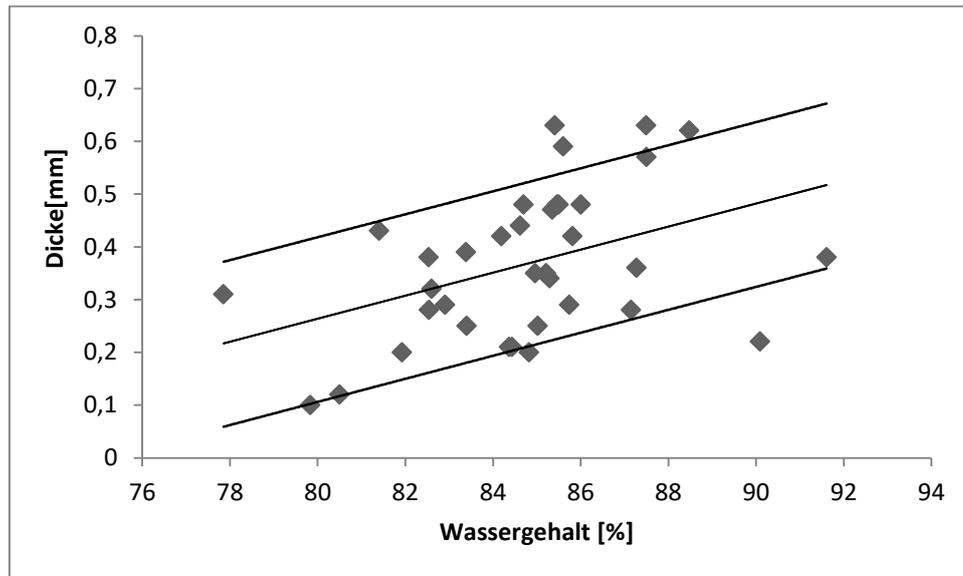


Abbildung 33: Korrelation zwischen Membranwassergehalt und –dicke ($r = 0,420$; $p = 0,011$; $n = 36$)

6.7.5 Wassergehalt und Hyaluronsäure

Abbildung 34 zeigt die Korrelation zwischen dem Wassergehalt ermittelt durch Gefriertrocknung und dem Hyaluronsäuregehalt (Δ DiHA) ermittelt durch FACE. Da die Probenanzahl zu gering für eine Statistik war, wird hier nur die Tendenz einer positiven Korrelation zwischen dem Wassergehalt und dem Hyaluronsäuregehalt angegeben.

Ergebnisse

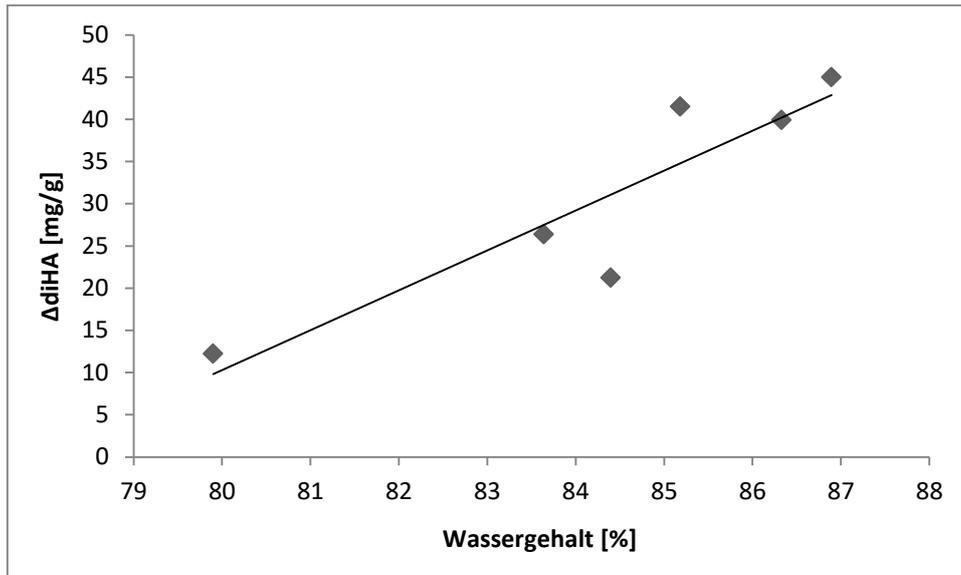


Abbildung 34: Korrelation zwischen Wassergehalt und Hyaluronsäure ($r = 0,906$; $p = 0,013$; $n = 6$)

6.7.6 Hyaluronsäure und maximaler Reissdruck

Abbildung 35: Hyaluronsäure und maximaler Reissdruck
Abbildung 35 zeigt die Korrelation zwischen dem Hyaluronsäuregehalt (ΔDiHA) ermittelt durch FACE und dem maximalen Reissdruck (max. BP) ermittelt durch DIMPAST-Messungen. Da die Probenzahl zu gering für eine Statistik ist, wurde keine Korrelation zwischen dem maximalen Reißdruck und dem Hyaluronsäuregehalt ermittelt.

Ergebnisse

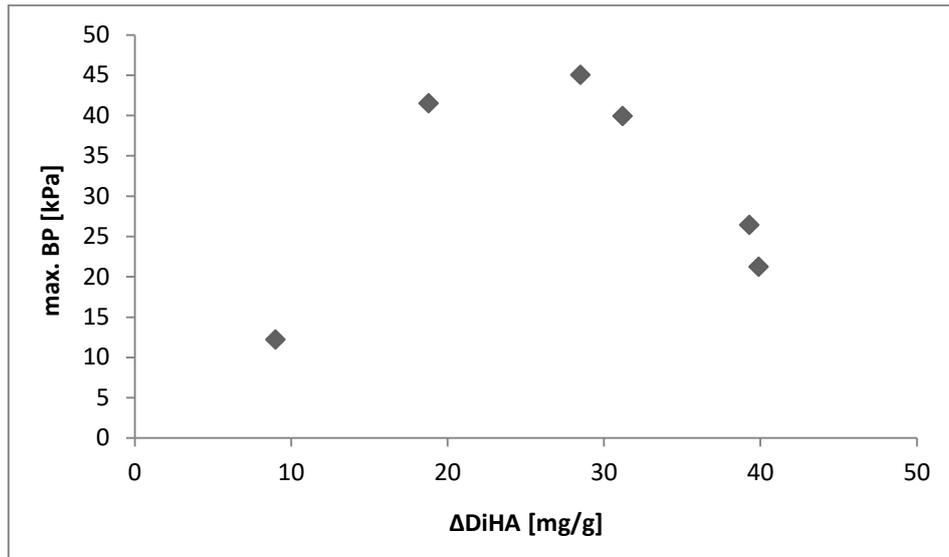


Abbildung 35: Hyaluronsäure und maximaler Reissdruck ($r = 0,363$; $p = 0,479$; $n = 6$) Korrelation bei untersuchten Probenzahlen nicht gefunden

6.7.7 Hyaluronsäure und Dicke

Abbildung 36 zeigt die Korrelation zwischen dem Hyaluronsäuregehalt (ΔDiHA) ermittelt durch FACE und der Dicke ermittelt durch DIMPAST-Messungen. Da die Korrelation zu gering für eine Statistik sind, wurde keine Korrelation zwischen der Dicke und dem Hyaluronsäuregehalt ermittelt.

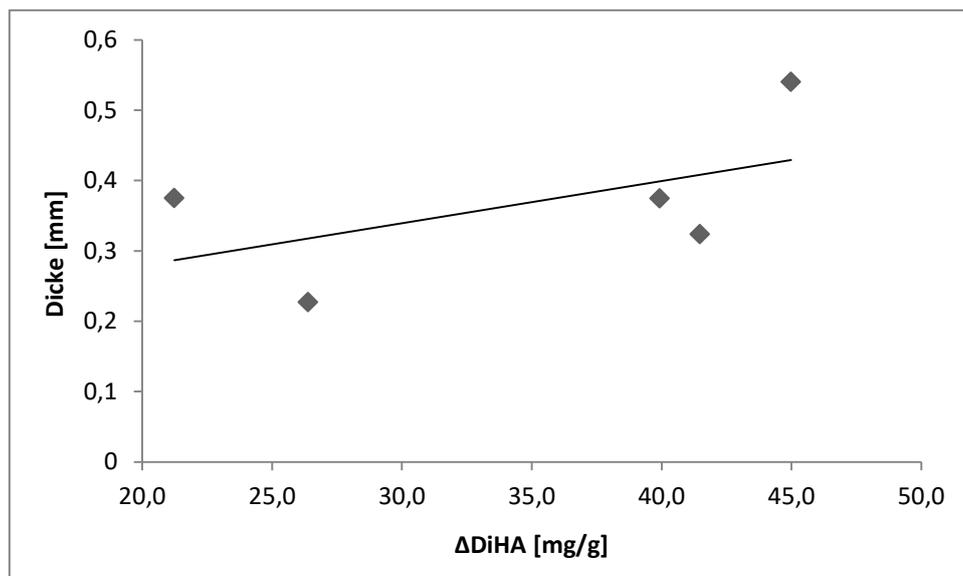


Abbildung 36: Korrelation zwischen Hyaluronsäure und Dicke ($r = 0,724$; $p = 0,167$; $n = 5$)

6.7.8 Hyaluronsäure und TSC-Gehalt

Abbildung 37 zeigt die Korrelation zwischen dem Hyaluronsäuregehalt (Δ DiHA) ermittelt durch FACE und dem Gehalt an gesamt-löslichen Kollagen ermittelt durch Anfärben mit Sirius Red 3FB (TSC). Da die Probenzahl zu gering für eine Statistik sind, wurde keine Korrelation zwischen dem Hyaluronsäuregehalt und dem TSC-Gehalt ermittelt.

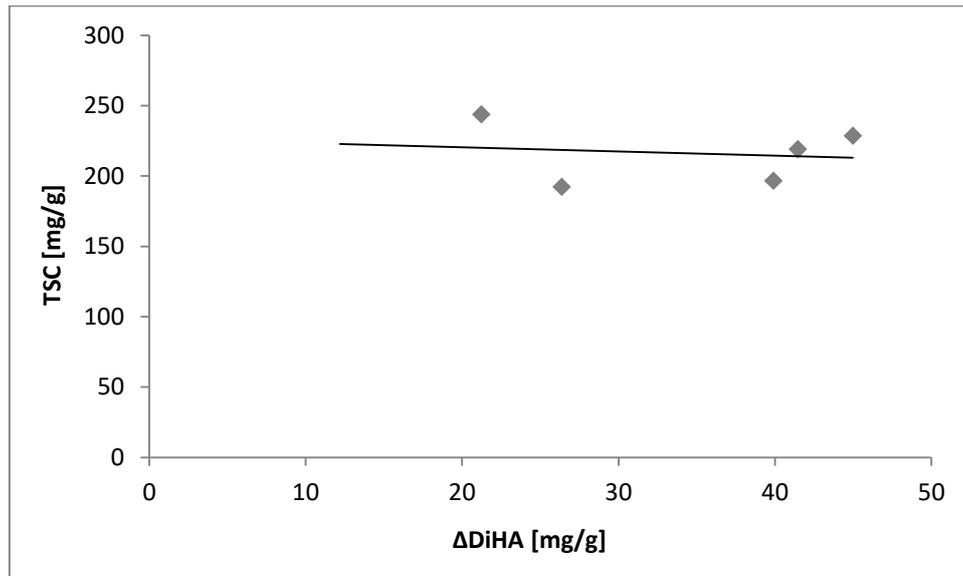


Abbildung 37: Hyaluronsäure und TSC-Gehalt ($r = 0,336$; $p = 0,580$; $n = 5$)

6.7.9 Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt und Dicke

Abbildung 38 zeigt die Korrelation zwischen dem gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt (gGAG) ermittelt durch Nachweis der Uronsäure und der Dicke ermittelt durch DIMPAST-Messungen. Es wurde keine Korrelation zwischen dem Uronsäuregehalt und der Dicke ermittelt.

Ergebnisse

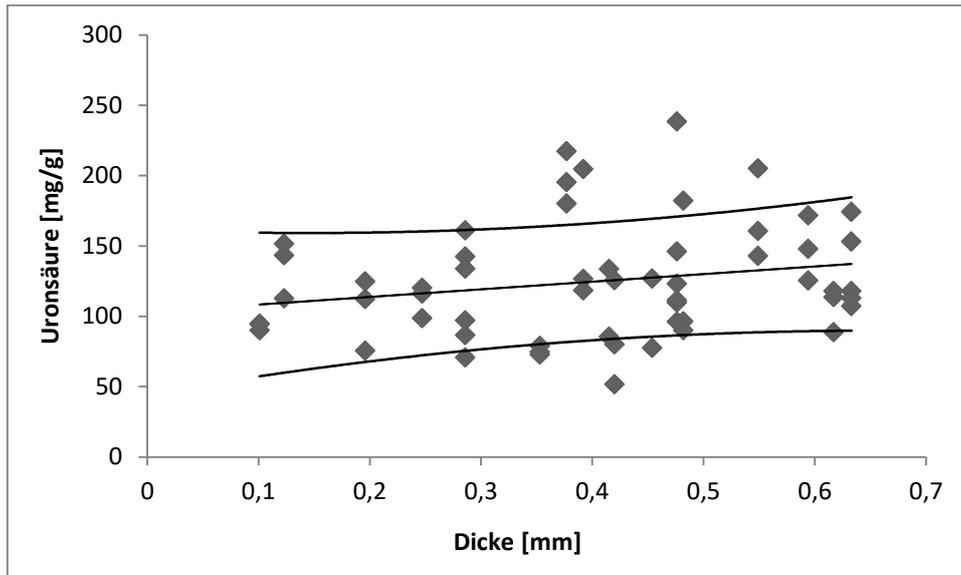


Abbildung 38: gGAG und Dicke ($r = 0,193$; $p = 0,146$; $n = 58$)

6.7.10 Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt und maximaler Reissdruck

Abbildung 39 zeigt die Korrelation zwischen dem gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt (gGAG) ermittelt durch Nachweis der Uronsäure und dem maximalen Reissdruck (max. BP) ermittelt durch DIMPAST-Messungen. Es wurde eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Uronsäuregehalt und dem maximalen Reißdruck ermittelt.

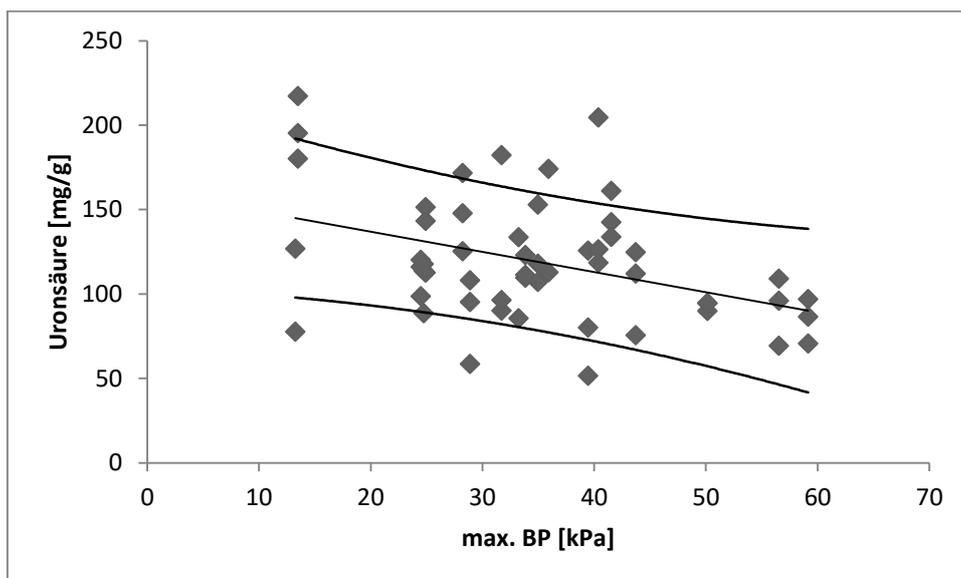


Abbildung 39: gGAG und maximaler Reissdruck ($r = -0,358$; $p = 0,007$; $n = 54$)

6.7.11 Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt und TSC-Gehalt

Abbildung 40 zeigt die Korrelation zwischen dem gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt (gGAG) ermittelt durch Nachweis der Uronsäure und dem Gehalt an gesamt-löslichen Kollagen ermittelt durch Anfärben mit Sirius Red 3FB (TSC). Es wurde eine negative Korrelation zwischen dem Uronsäuregehalt und dem TSC-Gehalt ermittelt.

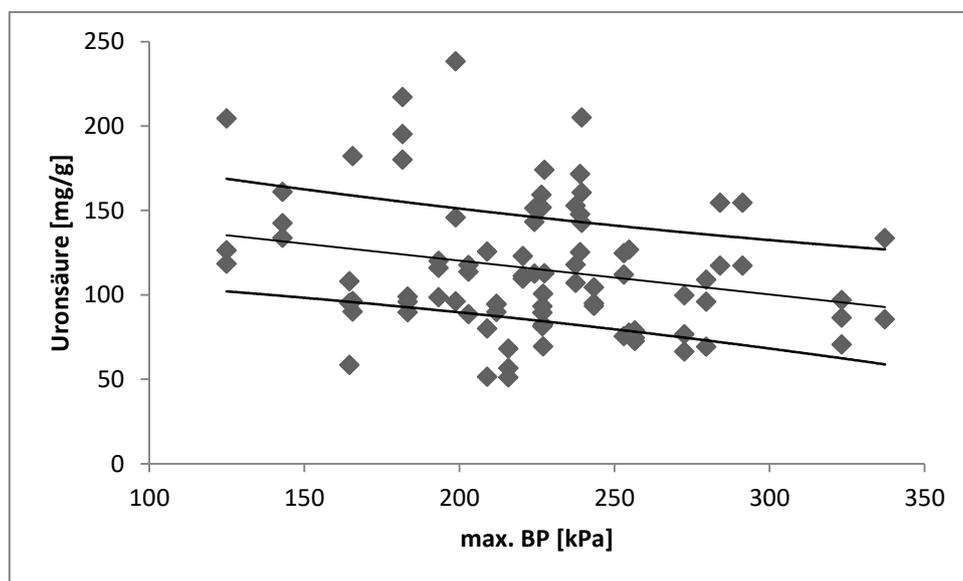


Abbildung 40: Korrelation zwischen gGAG und TSC-Gehalt ($r = -0,295$; $p = 0,005$; $n = 86$)

6.7.12 Gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt und Wassergehalt

Abbildung 41 zeigt die Korrelation zwischen dem gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt (gGAG) ermittelt durch Nachweis der Uronsäure und des Wassergehalts ermittelt durch Gefriertrocknung. Es wurde eine positive Korrelation zwischen dem Uronsäuregehalt und dem Wassergehalt ermittelt.

Ergebnisse

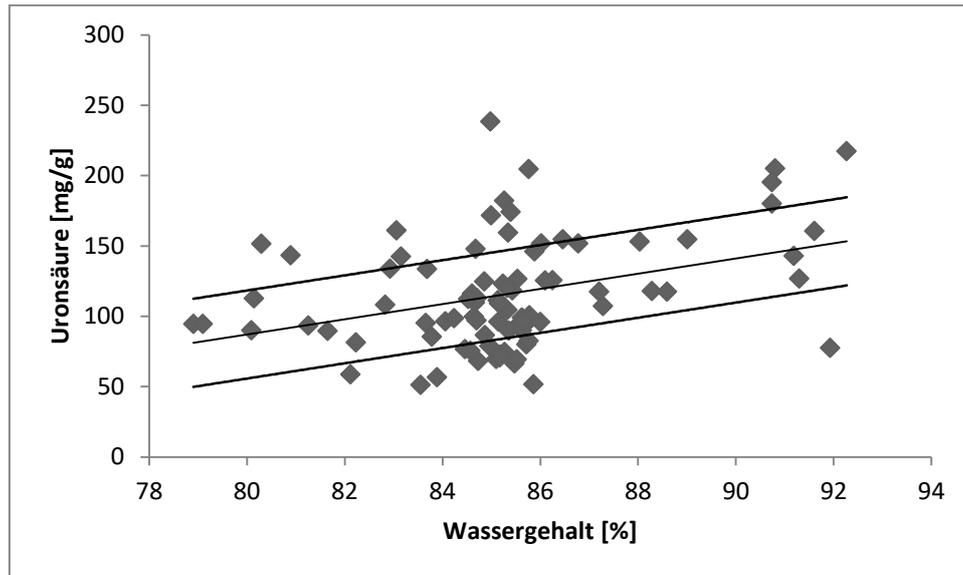


Abbildung 41: Korrelation zwischen gGAG und Wassergehalt ($r = 0,380$; $p < 0,001$; $n = 86$)

6.7.13 Sulfierte Glykosaminoglykane und Dicke

Abbildung 42 zeigt die Korrelation zwischen dem Gehalt sulfierter Glykosaminoglykane (sGAG) ermittelt durch Nachweis mit DMMB und der Dicke ermittelt durch DIMPAST-Messungen. Es wurde eine positive Korrelation zwischen dem sGAG-Gehalt und der Dicke ermittelt.

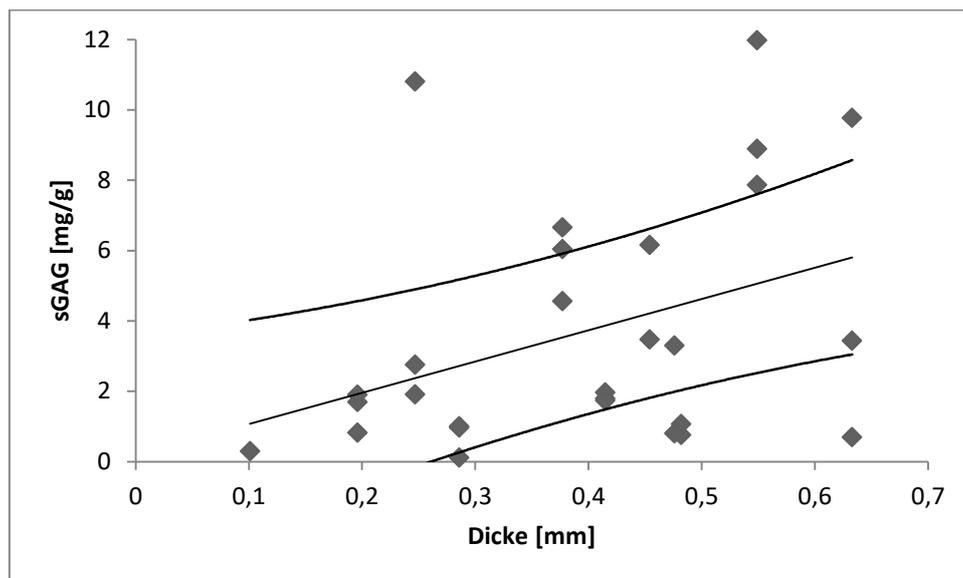


Abbildung 42: Korrelation zwischen sGAG und Dicke ($r = 0,378$; $p = 0,047$; $n = 28$)

6.7.14 Sulfierte Glykosaminoglykane und maximaler Reissdruck

Abbildung 43 zeigt die Korrelation zwischen dem Gehalt sulfierter Glykosaminoglykane (sGAG) ermittelt durch Nachweis mit DMMB und dem maximalen Reissdruck (max. BP) ermittelt durch DIMPAST-Messungen. Es wurde eine negative Korrelation zwischen dem sGAG-Gehalt und dem maximalen Reißdruck ermittelt.

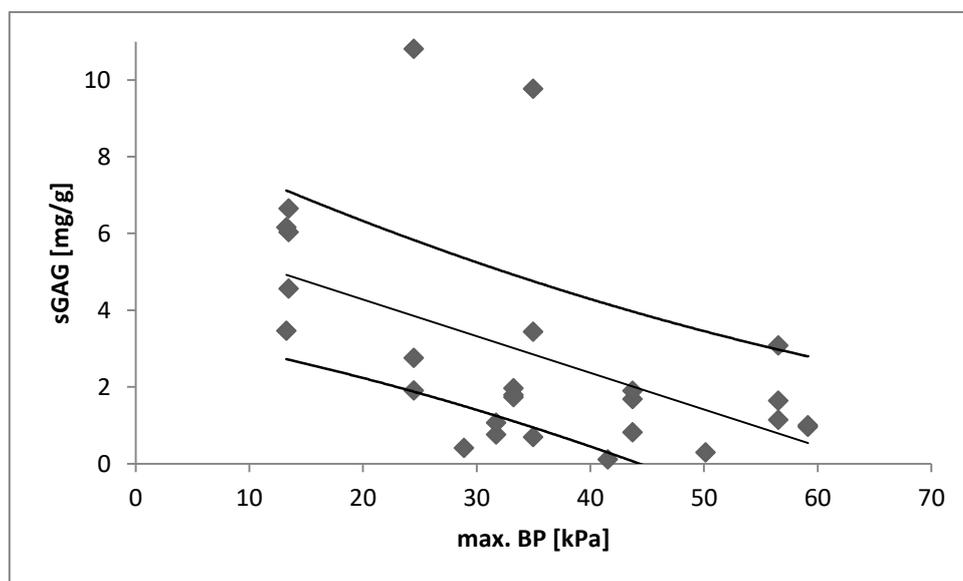


Abbildung 43: Korrelation zwischen sGAG und max. BP ($r = -0,508$; $p = 0,007$; $n = 27$)

6.7.15 Sulfierte Glykosaminoglykane und TSC-Gehalt

Abbildung 44 zeigt die Korrelation zwischen dem Gehalt sulfierter Glykosaminoglykane (sGAG) ermittelt durch Nachweis mit DMMB und dem Gehalt an gesamt-löslichen Kollagen ermittelt durch Anfärben mit Sirius Red 3FB (TSC). Es wurde eine positive Korrelation zwischen dem sGAG-Gehalt und dem TSC-Gehalt ermittelt.

Ergebnisse

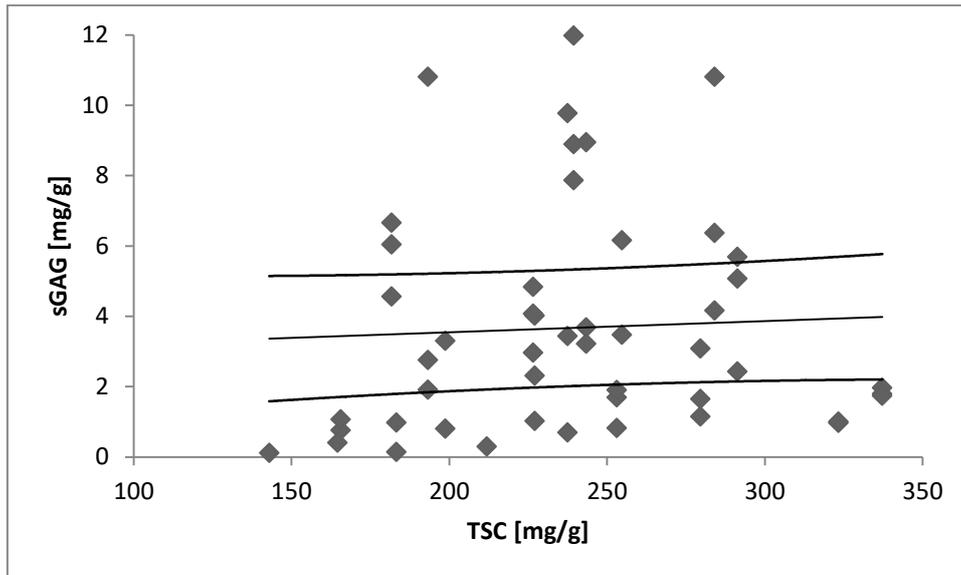


Abbildung 44: sGAG und TSC ($r = 0,732$; $p = 0,05$; $n = 49$)

6.7.16 Sulfierte Glykosaminoglykane und Wassergehalt

Abbildung 45 zeigt die Korrelation zwischen dem Gehalt sulfierter Glykosaminoglykane (sGAG) ermittelt durch Nachweis mit DMMB und des Wassergehalts ermittelt durch Gefriertrocknung. Es wurde eine positive Korrelation zwischen dem sGAG-Gehalt und dem Wassergehalt ermittelt.

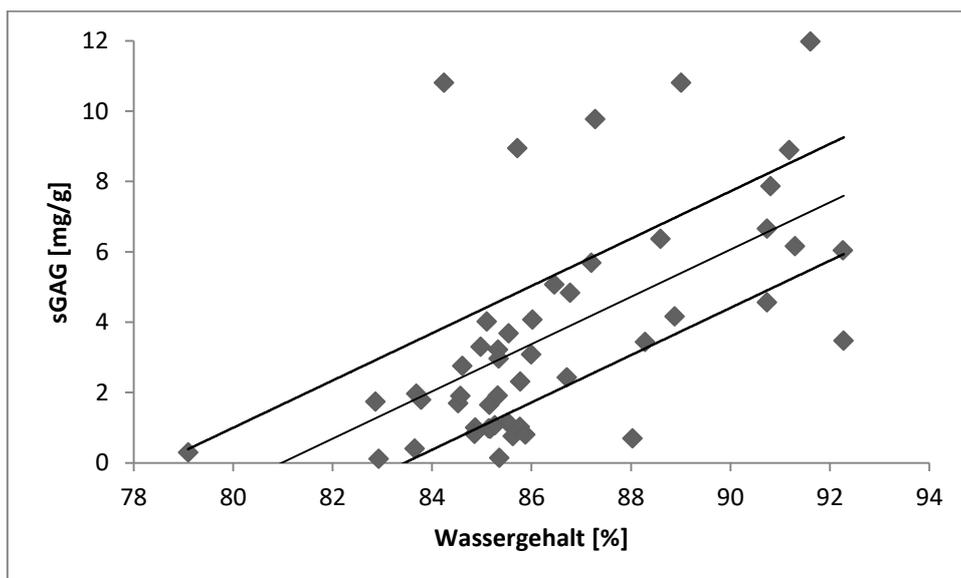


Abbildung 45: sGAG und Wassergehalt ($r = 0,591$; $p < 0,001$; $n = 49$)

7 Diskussion

Eine der Hauptursachen der Frühgeburtlichkeit ist der frühe vorzeitige Blasensprung (fVBS) der Eihäute, der in 30 – 40 % aller Fälle zu einer Frühgeburt führt [127]. Diese Tatsache ist als kritisch anzusehen, da die neonatale Sterberate vor allem durch die Mortalität zu früh geborene Babys zustande kommt. Gynäkologen haben bisher noch kein zuverlässiges diagnostisches Mittel, um die Wahrscheinlichkeit eines bevorstehenden Blasensprungs zu bestimmen. Die Fruchtblase, auch Eihaut oder fetale Membran genannt, besteht aus einem dünnen aber stabilen Membran-Paar: Amnion und Chorion. Wenn die Eihaut reißt, tritt Fruchtwasser aus und das Baby muss nach kurzer Zeit geboren werden. Aus diesem Grund sind Stabilität und Komponenten der Eihaut von besonderem Interesse. Die Hauptkomponente der Eihäute ist die Extrazelluläre Matrix (EZM) und bestimmt die physikalischen Eigenschaften. Die EZM wiederum besteht zum großen Teil aus Kollagen und Glykosaminoglykanen, wie z. B. der Hyaluronsäure, die ein extremes Wasserbindungsvermögen aufweist [3]. Um einen bevorstehenden Blasensprung vorhersagen zu können, muss es zuerst ein generelles Verständnis über den Zusammenhang der biochemischen und biomechanischen Eigenschaften der EZM der Eihäute geben.

Diese Arbeit ist Teilprojekt eines großen Forschungsvorhabens an der FH Aachen, in dem angestrebt wurde, zu zeigen, welche Parameter (biochemisch und biomechanisch) der fetalen Eihäute beim (f)VBS (im Folgenden „PROM“ bzw. „PPROM Membranen“ genannt) bzw. bei einer Frühgeburt (im Folgenden „Preterm Membranen“ genannt) im Gegensatz zu zeitlich regelgerechten Geburten (im Folgenden „Term Membranen“ genannt) eine wichtige Rolle spielen. Anhand dieser Ergebnisse soll eine Auswahl an Messungen getroffen werden, die später in klinischen Studien Verwendung finden. In diesen klinischen Studien sollen die fetalen Eihäute berührungslos von einer Sonde während der Schwangerschaft vermessen werden. Daher wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, dass für die hier verwendeten Messungen Methoden verwendet wurden, die Ergebnisse liefern, wie sie auch physiologisch und auch bei in vivo Messungen zu erwarten wären. Für die vorliegende Arbeit wurden also nur Methoden zur Parameterbestimmung verwendet, die vergleichbare Ergebnisse zu den Methoden die bei der Sonde Verwendung finden, liefern.

Diskussion

In einem Großteil der Studien über menschliche Eihäute wird nur das Amnion für die biochemischen Methoden herangezogen, da das Amnion bei Reißtests nach dem Chorion reißt (siehe Abbildung 46) und somit als stabilitätsbestimmend gilt [104, 109].

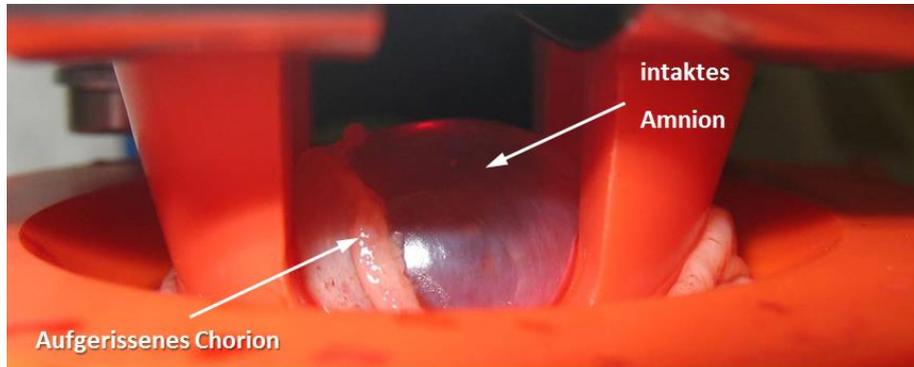


Abbildung 46: Beim Platztest im DIMPAST reißt das Chorion vor dem Amnion [130]

Amnion und Chorion unterscheiden sich in ihrem EZM-Komponenten und Eigenschaften [7, 25]. In vivo arbeiten diese beiden Gewebsschichten jedoch zusammen, sodass z. B. Messungen des maximalen Reissdrucks durch die alleinige Messung des Amnions verfälscht werden könnten. Aus diesem Grund wurden für diese Arbeit nur Messungen der gesamten Eihaut und nicht nur mit dem Amnion durchgeführt. Dieser Unterschied der Probemethodik kann einen großen Unterschied von Ergebnissen bei sonst vergleichbaren Studien bringen. Zudem könnte es sein, dass die Methode, die später bei in vivo Messungen verwendet wird (z. B. OCT-Aufnahmen), nur in der Lage sind, Amnion und Chorion gemeinsam zu messen, da diese in vivo natürlich nicht trennbar sind. Wenn Ergebnisse nur mit dem Amnion gewonnen werden würden, könnte man die Ergebnisse mit späteren in vivo Messungen nicht vergleichen.

Kollagen als Hauptbestandteil der EZM fetaler Eihäute spielt eine wichtige Rolle für die Stabilität der Membranen. Allerdings unterscheiden sich die Meinungen in der Literatur, ob eine generelle Abnahme der Kollagenkonzentration [53, 136], eine Veränderung der Kollagen-Typen Verteilung [8], eine Veränderung der chemischen Struktur des Kollagens [5], oder eine Veränderung des Kollagenmetabolismus wie z. B. der erhöhten Löslichkeit von Kollagen [141, 144] in der EZM der fetalen Eihäute das Gewebe schwächt. Zudem wurde gezeigt, dass verschiedene Ergebnisse auch dadurch erreicht werden, indem verschiedene Kollagenbestimmungsmethoden oder Kollagenextraktionen verwendet wurden, dass mal

Diskussion

das Amnion, mal das Chorion oder beide Schichten als Probe dienten, dass die Kollagenkonzentration pro Gewichtseinheit oder pro Fläche angegeben wurde, und ob bestimmte Bereiche (wie z. B. die Rissstelle) von der Beprobung ausgeschlossen wurden oder nicht. Zudem verwenden einige Studien als Kontrollgruppe Eihäute von zeitlich regelgerechten Geburten (Term Membranen) und manche von Frühgeburten (Preterm Membranen) [84].

Wenn Kollagen durch die Bestimmung von Hydroxyprolin ermittelt wird, wird auch vollständig degradiertes Kollagen ohne stabilitäts-bestimmende Eigenschaften für die EZM mitgemessen. Das gemessene TSC (total soluble collagen = gesamt-lösliches Kollagen) in dieser Arbeit repräsentiert nur Kollagen mit intakter Triple-Helix, das in der Lage ist, die Stabilität der Eihaut zu bestimmen. Während Mac Dermott [84] und AlZaid [5] keine Abnahme der Hydroxyprolinkonzentration im Amnion von PROM Membranen fanden, zeigte Skinner [7] eine Reduktion des Hydroxyprolin-Gehaltes in PROM Membranen. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Hydroxyprolinegehalt zwischen Term, Preterm, PROM und PPRM Membranen gefunden (siehe Abbildung 22). Die gegensätzlichen Ergebnisse könnten an den verschiedenen angewendeten Methoden liegen oder dadurch zu Stande kommen, dass der Hydroxyprolinegehalt nicht den tatsächlichen Kollagengehalt der fetalen Eihäute repräsentiert. Diese Vermutung wird durch den Vergleich von Hydroxyprolinegehalt und TSC-Gehalt in dieser Arbeit unterstützt: So konnte keine Korrelation zwischen Hydroxyprolinegehalt und TSC-Gehalt ermittelt werden ($r = -0,110$; $p = 0,493$; $n = 41$). Zudem zeigte Hampson [53] eine Abnahme des Kollagengehaltes in PPRM Membranen gegenüber Preterm Membranen. Als Methode verwendete er das Sircol Kit der Firma biocolor, das nach dem gleichen Prinzip funktioniert wie die in dieser Arbeit beschriebene „Kollagengehaltbestimmung durch Anfärben“ (vgl. Kapitel 4.1.3 und 5.4.3). Die Messungen in dieser Arbeit zeigten in etwa gleiche Ergebnisse: Der TSC-Gehalt von PROM Membranen ($p < 0,001$) und PPRM Membranen ($p < 0,001$) waren signifikant niedriger als der TSC-Gehalt von Term Membranen. Es wurde hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen dem TSC-Gehalt von PROM und PPRM Membranen gefunden ($p = 0,088$). Aus diesem Grund ist in der vorliegenden Arbeit nur das intakte

Kollagen, messbar als TSC-Gehalt, von Interesse, da dieses die Eigenschaften der fetalen Eihäute repräsentiert.

Es wurde bereits in vorangegangenen Studien an der FH Aachen, Institut für Bioengineering gezeigt, dass der Reissdruck von Term Membranen signifikant höher ist als der von PROM Membranen [104]. Daher wird angenommen, dass Eihäute zeitlich regelgerechter Geburten stabiler sind, als Eihäute von einem vorzeitigem Blasensprung [104]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es eine positive Korrelation zwischen dem TSC-Gehalt und dem maximalen Reissdruck (max. BP) sowohl bei Term Membranen ($r = 0,559$; $p = 0,002$) als auch bei PROM Membranen ($r = 0,539$; $p = 0,005$) gibt. Das bedeutet, dass der Gehalt an Kollagen einen Biomarker für die Stabilität der fetalen Eihäute darstellen könnte.

Vor der Konzentrationsbestimmung der Hyaluronsäure, wurde die Bestimmungsmethode mittel PAGE-FS / FACE nach Calabro et al. [26, 27] und Karousou et al. [66, 67] optimiert und an die vorherrschende Fragestellung angepasst (siehe Kapitel 4.2.4.3): In dieser Arbeit wurde der erste Waschschrift ausgelassen, der dazu dienen soll, störende Glukose aus den Proben zu eliminieren. Dieser Waschschrift wird vorgeschlagen, da in allen physiologischen Proben Glukose natürlich vorkommt und der Δ DiHA-Bande so nahe gelegen ist, dass sie oft schwer voneinander zu trennen sind. Der erwähnte erste Waschschrift hat jedoch den Nachteil, dass es gleichzeitig zum Verlust von sehr kleinen Hyaluronsäuremolekülen kommen kann und die Ergebnisse so verfälscht werden. In Vorversuchen in dieser Arbeit wurden für die Elektrophorese gleichzeitig Glukose und vorverdaute Δ DiHA-Moleküle (kommerziell erworben) verwendet. In diesen Testläufen war das Bromphenol-Blau bereits in das Sammelgel gegeben worden; In den Protokollen von Calabro und Karousou wurde vorgeschlagen, eine Tasche mit einem gewöhnlichen Protein-Elektrophorese-Standard, der Bromphenol-Blau enthält, zu verwenden. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch das Bromphenol-Blau beim Gießen in das Sammelgel gegeben und die Elektrophorese gestoppt, wenn die Bromphenol-Blau Front ca. 1 cm vor das Gelende gelaufen war (siehe Abbildung 15 links). Maßstab für eine ausreichende Trennleistung der Banden ist, dass keines der Pixel einer Bande an einem der Pixel einer anderen Bande liegt, damit die Auswerte-Software QuantityOne die Pixel klar den jeweiligen Banden zuordnen kann. Wie in Abbildung 15 rechts, Tasche 8 zu sehen ist, kann die Glukose-Bande klar von den Δ DiHA-Banden getrennt

Diskussion

werden, sodass eine Quantifizierung möglich ist. Bedingung hierfür ist, dass die Konzentration bzw. Verdünnung der Probe so gewählt wird, dass es nicht zu einem Überleuchten wie in den Taschen 4 - 7 und 9 - 10 kommt. Diese Vorversuche zeigen einerseits, dass der Fortlauf der Elektrophorese mit Hilfe des Bromphenol-Blau im Sammelgel überwacht werden kann, ohne eine zusätzliche Tasche für einen Marker verwenden zu müssen und dass andererseits der Waschschrift zur Glukose-Eliminierung entfallen kann, da die Glukose- und die Δ DiHA-Banden weit genug voneinander entfernt sind, um die Δ DiHA-Banden zu analysieren.

Im Springer-Protokoll [119] wird weiterhin vorgeschlagen als Standard eine Tasche mit bekannter Konzentration an Δ DiHA zu befüllen und die unbekannt Konzentrationen mit Hilfe von Dreisatz aus diesem einen Standard zu berechnen. Im Vergleich zu Vorversuchen in dieser Arbeit mit Standardgeraden mit mindestens fünf Standards (Berechnung der unbekannt Konzentration anhand der Geradengleichung der Regressionsgeraden), ergaben sich allerdings wesentlich höhere Abweichungen. Das liegt daran, dass der Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz des an Δ DiHA gebundenen AMAC und der Δ DiHA-Konzentration zwar linear, jedoch nicht proportional ist. Das wäre aber eine Voraussetzung dafür, die Berechnung per Dreisatz durchzuführen. Der nicht-proportionale Zusammenhang ist daran zu erkennen, dass die Standardgerade niemals durch den Nullpunkt verläuft d. h. der Wert des y-Achsenabschnitt der Geradengleichung nie nahe bei 0 liegt (siehe Abbildung 17). In Tabelle 2 sieht man, dass der Fehler bei der Berechnung mittels Dreisatz umso größer wird, je weiter der Messwert vom Referenzwert liegt. Im extremen Fall entstehen so Fehler von 57 % - 135 % Abweichung. So kann es bei der Berechnung nach dem Springer-Protokoll nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen kommen und die Verwendung einer Standardgeraden ist zum Erlangen richtiger Werte unerlässlich. Weitere Testdurchläufe zeigten, dass die Verwendung von drei Standards zur Erstellung einer Standardgerade ausreichend ist. Es wurden bei den Messungen in dieser Arbeit keine Messwerte verwendet, die höher oder niedriger waren als die Standards. Somit ist gesichert, dass die Messwerte im linearen Bereich liegen und durch die Geradengleichung die Konzentration berechnet werden kann. Hier gab es bei Testdurchläufen Abweichungen von max. 8 % (siehe Tabelle 2). Durch diese Vorversuche konnte ein vereinfachtes Protokoll für den Nachweis von Hyaluronsäure mittels PAGE-FS / FACE erstellt werden, das problemlos für Versuche an

humanen Eihäuten anwendbar ist und gleichzeitig eine günstige Alternative zur häufig verwendeten Bestimmung mittel ELISA (= Enzyme Linked Immunosorbent Assay) bietet.

Hyaluronsäure verhält sich in der EZM wie ein `Sieb`. Bei Konzentrationen über 1 g/L bildet es ein Netzwerk und reguliert so den Transport von anderen Makromolekülen durch den extrazellulären Raum [72] und begünstigt deren Fortbewegung [142]. Aufgrund dieser Eigenschaften ist Hyaluronsäure in der Lage, die MMP-Expression und Aktivierung von latenten MMPs zu erhöhen [61]. MMPs sind für den Abbau der EZM, vor allem für den Kollagenabbau, verantwortlich und könnten dadurch die Kollagenkonzentration in fetalen Eihäuten senken oder die Kollagenlöslichkeit erhöhen. Es wurde bereits dokumentiert, dass eine erhöhte Aktivität von MMP-2 [106] und MMP-9 [143] für den Abbau der EZM der fetalen Eihäute verantwortlich ist. Darüber hinaus berichten Meinert et al. [90], dass Hyaluronsäure durch sein hohes Wasserbindungsvermögen die Fähigkeit hat, enorme Quelldrücke aufzubauen. Dies unterstützt die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse der positiven Korrelation sowohl zwischen Hyaluronsäure und Wassergehalt ($r = 0,906$; $p = 0,013$) als auch zwischen Wassergehalt und Dicke ($r = 0,420$; $p = 0,011$). Auch sulfurierte Glykosaminoglykane (= sGAG) besitzen die Fähigkeit Wasser zu binden, wenn auch nicht im gleichen Maße wie Hyaluronsäure. Dies zeigt die in dieser Arbeit ermittelte positive Korrelation zwischen sGAG und Wasser ($r = 0,591$; $p < 0,001$; $n = 49$) als auch dem gesamt-Glykosaminoglykan-Gehalt (= gGAG; Hyaluronsäure und sGAG zusammen) und Wasser ($r = 0,380$; $p < 0,001$; $n = 86$). Diese Quelldrücke können in der EZM der fetalen Eihäute herrschen und zu einer weiteren Disorganisation zwischen den Kollagenfibrillen führen [122], wodurch die Quervernetzungen gestört werden und außerdem das Amnion vom Chorion getrennt wird. Das ist eine Erklärung für die dramatische Senkung der mechanischen Festigkeit, da Amnion und Chorion durch die Trennung nicht mehr als zusammenhängender Gewebeverband agieren können [90]. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine positive Korrelation zwischen dem TSC-Gehalt und dem sGAG-Gehalt bei Term, Preterm, PROM und PPRM Membranen ermittelt ($r = 0,732$; $p = 0,05$; $n = 49$). Zusätzlich wurde eine negative Korrelation zwischen TSC-Gehalt und gGAG-Gehalt ermittelt ($r = -0,295$; $p = 0,005$; $n = 86$). Skinner et. al fanden ebenfalls eine Korrelation zwischen TSC- und sGAG-Gehalt bei Term und PROM Membranen. Gleichzeitig fand Skinner eine negative Korrelation zwischen TSC-Gehalt und Hyaluronsäure [137]. Das bedeutet, dass mit zunehmender Konzentration von

Hyaluronsäure, nicht aber von sulfurierten Glykosaminoglykanen, die Kollagenkonzentration abnimmt. Diese Ergebnisse unterstreichen die Vermutung, dass die Disorganisation der Kollagene vor allem durch Hyaluronsäure verursacht wird und nicht von anderen sulfurierten Glykosaminoglykanen. Di Lullo et al. bestätigten dies, indem sie mittels histologischer Untersuchungen Hyaluronsäure in Gelatine-artiger Form zwischen Amnion und Chorion fanden. Sie interpretierten dies als Grund der Trennung der beiden Schichten, was zu einer beschleunigten Ruptur der Eihäute führt [82]. Zudem fand Skinner eine signifikante Erhöhung der Hyaluronsäurekonzentration in Term gegenüber Preterm Membranen [137]. Diese Erkenntnis spricht dafür, dass Hyaluronsäure im Eihautgewebe bis zum Geburtstermin ganz natürlich zunimmt und im Fall eines PROM oder PPRM Hyaluronsäure zu früh in zu großer Konzentration in die fetalen Eihäute eingelagert wird, was wiederum zu einer zu frühen Ruptur der Eihäute führt. Auch wenn die Probenzahl für eine Korrelation zwischen maximalem Reissdruck und Hyaluronsäure und den Geburtsgruppen (Preterm, Term, PROM, PPRM) in dieser Arbeit nicht ausreicht, so zeigt die negative Korrelation zwischen Wassergehalt und maximaler Reissdruck ($r = -0,310$; $p = 0,013$) die Tendenz einer Wasserzunahme und somit auch eine Zunahme des Hyaluronsäuregehaltes, was zu einer Schwächung des Gewebes führen kann.

Frühere Arbeiten von Oflaz et al. [93, 103, 104] zeigten, dass es technisch möglich ist, Eihäute berührungslos und damit ohne Zerstörung auf biomechanische Parameter zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass durch die Untersuchungen mit Hilfe des Einsatzes einer Sonde bei Schwangeren, Parameter gemessen werden könnten, die eine Risikoabschätzung über einen bevorstehenden frühen vorzeitigen Blasensprung und damit einer Frühgeburt möglich macht. Die in dieser Arbeit erlangten Daten unterstreichen die Vermutung, dass nicht eine einzelne EZM-Komponente die Eigenschaften und Stabilität der Eihäute ausmachen, sondern dass ein Zusammenspiel zwischen verschiedenen EZM-Komponenten für ein zu frühes Reißen der Eihäute verantwortliche ist und zu einem fVBS führen kann. Abbau und Zerstörung der EZM kann eine Folge der veränderten Kollageneigenschaften wie z. B. Abnahme der Konzentration oder Erhöhung der Löslichkeit in der Matrix oder beides sein. Diese Veränderungen sind zu einem wesentlichen Teil die Konsequenz eines programmierten, biochemisch initialisierten Schwächungsprozess, der

Diskussion

ohne Vorliegen einer Infektion der fetalen Eihäute stattfindet [96, 111]. Ohne eine direkte Veränderung des Kollagens, z. B. Kollagenabbau oder dem Herunterregeln der Kollagenexpression, ist Hyaluronsäure in der Lage organisierte Kollagenfasern in der EZM zu stören, was zu einer Schwächung des Gewebes führen kann, wodurch ein fVBS begünstigt wird. Weiterhin zeigt diese Arbeit, dass Parameter wie Kollagen, Hyaluronsäure, Wassergehalt und Stabilität Faktoren sind, die bei einer in vivo Messungen, d. h. Vermessung der Eihäute bei schwangeren Frauen, Erkenntnisse über einen bevorstehenden Blasensprung liefern können. Wenn Maßnahmen ergriffen werden sollen, um einen fVBS zu verhindern oder vorherzusagen, sollten in vivo die Eihäute in ihrer Gesamtheit und nicht einzelne Komponenten oder Eigenschaften untersucht werden. Zudem könnte sich herausstellen, dass nicht eine Momentaufnahme der erwähnten Parameter Auskunft über einen bevorstehenden Blasensprung liefert, sondern dass die Veränderungen der Eihaut über die Zeit Aufschluss über ein solches Risiko gibt und schlussendlich eine Wahrscheinlich über das Risiko eines bevorstehenden frühen vorzeitigen Blasensprung liefert.

8 Zusammenfassung

Eine der Hauptursachen der neonatalen Sterblichkeit ist der frühe vorzeitige Blasensprung (fvBS) der Eihäute, der in 30 – 40 % aller Fälle zu einer Frühgeburt führt. Bei einem fvBS reißt die Eihaut vor Einsetzen der Wehen und vor der 37. Schwangerschaftswoche. Die Hauptkomponente der Eihäute ist die Extrazelluläre Matrix (EZM) und bestimmt die physikalischen Eigenschaften. Die EZM wiederum besteht zum großen Teil aus Kollagen und Glykosaminoglykanen. Gynäkologen haben bisher noch kein zuverlässiges diagnostisches Mittel, um die Wahrscheinlichkeit eines bevorstehenden Blasensprungs zu bestimmen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es eine positive Korrelation zwischen dem Kollagengehalt und dem maximalen Reissdruck sowohl bei Term als auch bei PROM Membranen gibt. Das bedeutet, dass Kollagen ein wichtiger Biomarker für die Stabilität der fetalen Eihäute darstellen könnte. Es wurde jedoch keine Korrelation zwischen dem max. Reissdruck und dem Kollagengehalt von PPROM Membranen gefunden. Dies könnte wiederum zeigen, dass der Zusammenbruch der EZM der fetalen Eihäute nicht nur durch die Veränderung einer einzelnen EZM-Komponente verursacht wird, sondern zeigt vielmehr, dass ein Zusammenspiel zwischen verschiedenen EZM-Komponenten herrscht. In diesem Zusammenhang ist die Rolle der Glykosaminoglykane im Prozess des Blasensprungs von besonderem Interesse. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass vor allem das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure beim Zusammenbruch der fetalen Eihäute eine große Rolle spielt. Hyaluronsäure hat ein enormes Wasserbindungsvermögen, das geordnete Kollagenstrukturen stören kann und somit die Stabilität der Eihäute herabsetzt. Hyaluronsäure könnte als Biomarker in vivo indirekt entweder durch den Wassergehalt oder der Dicke der Eihäute bestimmt werden. Das wäre durch den Einsatz der Technik der Optischen Kohärenztomographie theoretisch möglich und könnte als Sonde berührungslos die Eihäute vermessen. Kollagen könnte in solch einer Sonde mittels Autofluoreszenz ebenfalls berührungslos gemessen werden und so ebenfalls als Biomarker dienen. Wenn eine Sonde in vivo zum Einsatz kommt und während der Schwangerschaft so Vermessungen der Eihaut vornimmt, könnte ein Tool geschaffen werden, um eine Risikoabschätzung eines

Zusammenfassung

bevorstehen frühen vorzeitigen Blasensprungs vorzunehmen und eine Frühgeburt verhindern helfen.

Wie oben erwähnt, stellen diese Forschungen nur einen Ausschnitt aus einem Spektrum von Parametern dar, die im Zusammenhang mit der Prognose des frühen vorzeitigen Blasensprungs am Institut für Bioengineering untersucht werden. Hinzu kommen geometrische, biophysikalische und mechanische Parameter. Letztlich geht es bei den Arbeiten in diesem Zusammenhang darum, `gute Prognosekandidaten` zu finden. Diese sollen dann mit einer geeigneten endoskopartigen Messsonde messtechnisch in vivo und berührungslos erfasst werden. Erst großräumige klinische Studien mit hohen Fallzahlen in Verbindung mit einer geeigneten Auswertesoftware (z. B. Verwendung Neuronaler Netze) können dann mit Aussicht auf Erfolg zu dem hohen Ziel führen, dem sich ein Teil dieser Arbeit gewidmet hat, der Prognose des frühen vorzeitigen Blasensprung, einfügen.

9 Literaturverzeichnis

1. Abdelazim I (2013) Fetal fibronectin (Quick Check fFN test[®]) for detection of premature rupture of fetal membranes. *Arch Gynecol Obs* 287:205–210. doi: 10.1007/s00404-012-2548-3
2. Akierman A, Iwanicki S (1988) Premature rupture of membranes: Combined Obstetric and Neonatal Management. *Can Fam Physician* 34:2031–2034.
3. Alberts B, Bray D, Lewis J (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Taylor & Francis
4. Allan J, Docherty A, Barker P, Huskisson N, Reynolds J, Murphy G (1995) Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J* 309 (Pt 1):299–306.
5. Al-Zaid N, Bou-Resli M, Goldspink G (1980) Bursting pressure and collagen content of fetal membranes and their relation to premature rupture of the membranes. *Br J Obstet Gynaecol* 87:227–229.
6. Al-Zaid N, Bou-Resli M, Ibrahim M (1980) Study of the connective tissue of human fetal membranes. *J Reprod Fertil* 59:383–386.
7. Al-Zaid N, Gumaa K, Bou-Resli M, Ibrahim M (1986) Site variability in the solubility of collagen of human fetal membranes. *J Reprod Fertil* 77:665–668.
8. Al-Zaid N, Gumaa K, Bou-Resli M, Ibrahim M (1988) Premature rupture of fetal membranes changes in collagen type. *Acta Obstet Gynecol Scand* 67:291–295.
9. Ambrosius M (2008) *Analyse von Glycosaminoglykanen in humanen Zellen und Körperflüssigkeiten*. Bielefeld University
10. Antweiler G (2007) *Optimierung der Messtechnik und Durchführung biomechanischer Untersuchungen an humane Eihäuten*. FH Aachen
11. Athayde N, Edwin S, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, Menon R (1998) A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 179:1248–1253.
12. Athayde N, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, Mazor M, Yoon B, Fortunato S, Menon R, Ghezzi F, Edwin S Matrix metalloproteinases-9 in preterm and term human parturition. *J Matern Fetal Med* 8:213–219. doi: 10.1002/(SICI)1520-6661(199909/10)8:5<213::AID-MFM3>3.0.CO;2-R
13. Barbosa I, Garcia S, Barbier-Chassefière V, Caruelle J, Martelly I, Papy-García D (2003) Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* 13:647–653.
14. Baud O, Emilie D, Pelletier E, Lacaze-Masmonteil T, Zupan V, Fernandez H, Dehan M, Frydman R, Ville Y (1999) Amniotic fluid concentrations of interleukin-1beta, interleukin-6 and TNF-alpha in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome. *Br J Obstet Gynaecol* 106:72–77.
15. Becker J, Marcy A, Rokosz L, Axel M, Burbaum J, Fitzgerald P, Cameron P, Esser C, Hagmann W, Hermes J (1995) Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. *Protein Sci* 4:1966–1976. doi: 10.1002/pro.5560041002

Literaturverzeichnis

16. Benninghoff A, Drenckhahn D, Zenker W (1994) Anatomie, Band 2, 15.Auflage ed. Urban & Fischer Verlag
17. Van den Berg F (2003) Angewandte Physiologie 1: Das Bindegewebe des Bewegungsapparates verstehen und beeinflussen, 2. Auflage. Thieme Georg Verlag
18. Biocolor Sircol™ Soluble Collagen Assay Manual .
19. Biocolor Blyscan Glycosaminoglycan Assay.
20. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci* 1990:649–657.
21. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard M, Chou D, Moller A, Narwal R, Adler A, Vera Garcia C, Rohde S, Say L, Lawn J (2012) National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet* 379:2162–2172. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60820-4
22. Bode W (1995) A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain. *Structure* 3:527–530.
23. Bode W, Gomis-Rüth F, Stöckler W (1993) Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins”. *FEBS Lett* 331:134–410.
24. Brezinski ME (2006) Optical Coherence Tomography: Principles and Applications, 1st ed. 599.
25. Bryant-Greenwood G (1998) The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta* 19:1–11.
26. Calabro A, Benavides M, Tammi M, Hascall VC, Midura R (2000) Microanalysis of enzyme digests of hyaluronan and chondroitin/dermatan sulfate by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE). *Glycobiology* 10:273–281.
27. Calabro A, Hascall VC, Midura R (2000) Adaptation of FACE methodology for microanalysis of total hyaluronan and chondroitin sulfate composition from cartilage. *Glycobiology* 10:283–293.
28. Campbell NA (1987) Biology, 1. Auflage. Benjamin/Cummings Pub Co
29. Cho C-KJ, Shan SJ, Winsor EJ, Diamandis EP (2007) Proteomics analysis of human amniotic fluid. *Mol Cell Proteomics* 6:1406–1415. doi: 10.1074/mcp.M700090-MCP200
30. Clark I, Cawston T (1989) Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization. *Biochem J* 263:201–206.
31. Darj E, Lyrenäs S (1998) Insulin-like growth factor binding protein-1, a quick way to detect amniotic fluid. *Acta Obstet Gynecol Scand* 77:295–7.
32. Desai P (2007) Cytokines in Obstetrics and Gynaecology. *J Obs Gynecol India* 57:205–209.
33. Dräger M, Saling E, Lüthje J (2003) Allgemeines zu Früh- und Fehlgeburten. In: Erich Saling-Institut für Perinat. Medizin e.V. <http://www.saling-institut.de/german/03infomo/01fruehfehl.html>. Accessed 20 Aug 2009

Literaturverzeichnis

34. Drexler W, Fujimoto JG (2008) *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications (Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering)*. 1346.
35. Egarter C (1998) Medikamentöse Therapie vorzeitiger Wehen und des vorzeitigen Blasensprungs. *Gynäkologe* 31:962–969.
36. Egarter C (2001) Der frühe vorzeitige Blasensprung. *Gynäkologe* 34:732–738. doi: 10.1007/s001290170006
37. El-Bastawissi A, Williams M, Riley D, Hitti J, Krieger J (2000) Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: a review. *Obstet Gynecol* 95:1056–1064.
38. Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, Edwin S, Rathnasabapathy C, Gomez R, Bujold E, Camacho N, Kim Y, Hassan S, Blackwell S, Whitty J, Berman S, Redman M, Yoon B, Sorokin Y (2003) Antimicrobial peptides in amniotic fluid: defensins, calprotectin and bacterial/permeability-increasing protein in patients with microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, preterm labor and premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 13:2–21. doi: 10.1080/jmf.13.1.2.21
39. Fini M, Cook J, Mohan R, Brinckerhoff C (1998) Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *Matrix Met.*
40. Fortunato S, Menon R (2001) Distinct molecular events suggest different pathways for preterm labor and premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 184:1399–1405; discussion 1405–1406.
41. Fortunato S, Menon R, Lombardi S (1998) Presence of four tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3 and -4) in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol* 40:395–400.
42. Fratzl P (2008) *Collagen: Structure and Mechanics*. Springer
43. Friese K, Plath C, Briese V (2000) *Frühgeburt und Frühgeborenes: Eine interdisziplinäre Aufgabe (German Edition)*, 1. Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg
44. Garg HG, Hales CA (2004) *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. Butterworth Heinemann
45. Garg HG, Linhardt RJ, Hales CA (2005) *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*, 1st ed. Elsevier
46. Garnier Y (2006) Problemfeld Frühgeburtlichkeit und Inflammation - Besteht eine genetische Determinierung? *Geburtsh Frauenheilk* 66:939–946. doi: 10.1055/s-2006-924275
47. Gay S, Kalden J, Ganten D, Ruckpaul K (2003) *Molekularmedizinische Grundlagen von rheumatischen Erkrankungen*, 1. Auflage. Springer
48. Goerke K, Steller J, Valet A (2008) *Klinikleitfaden Gynäkologie, Geburtshilfe*, 7. Auflage. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH
49. Goldenberg RL, Goepfert AR, Ramsey PS (2005) Biochemical markers for the prediction of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 192:36–46. doi: 10.1016/j.ajog.2005.02.015
50. Gomez D, Alonso D, Yoshiji H, Thorgeirsson U (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74:111–122.

Literaturverzeichnis

51. Große-Drieling D (2006) Die Rolle der Matrix-Metalloproteinasen MMP-1, MMP-2 und MMP-9, des Gewebeinhibitors der Matrix-Metalloproteinasen TIMP-1 und des Urokinase-Plasminogenaktivators uPA bei vorzeitigem Blasensprung. 76.
52. Halberstadt E, Wulf K-H, Schmidt-Matthiesen H (1987) Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe Band 6 Frühgeburt - Mehrlingsschwangerschaft. Urban & Schwarzenberg
53. Hampson V, Liu D, Billett E, Kirk S (1997) Amniotic membrane collagen content and type distribution in women with preterm premature rupture of the membranes in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 104:1087–1091.
54. Hatzidaki E, Gourgiotis D, Manoura A, Korakaki E, Bossios A, Galanakis E, Giannakopoulou C (2005) Interleukin-6 in preterm premature rupture of membranes as an indicator of neonatal outcome. *Acta Obstet Gynecol Scand* 84:632–638. doi: 10.1111/j.0001-6349.2005.00747.x
55. Heine H (2006) Lehrbuch der biologischen Medizin: Grundregulation und Extrazelluläre Matrix, 3rd ed. Hippokrates
56. Heinrich C Den Frühchen eine Chance. In: ZEIT ONLINE. <http://www.zeit.de/2009/35/M-Fruehchen?page=1>. Accessed 20 Aug 2009
57. Hermanns-Lê T, Piérard G, Quatresooz P (2005) Ehlers-Danlos-like dermal abnormalities in women with recurrent preterm premature rupture of fetal membranes. *Am J Dermatopathol* 27:407–410.
58. Hof H, Dörries R (2009) Medizinische Mikrobiologie, 4th ed. 752.
59. Holst R-M, Laurini R, Jacobsson B, Samuelsson E, Sävman K, Doverhag C, Wennerholm U-B, Hagberg H (2007) Expression of cytokines and chemokines in cervical and amniotic fluid: relationship to histological chorioamnionitis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 20:885–893. doi: 10.1080/14767050701752601
60. Horn F (2012) Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium, 5th ed. 664.
61. Isnard N, Legeais J, Renard G, Robert L (2001) Effect of hyaluronan on MMP expression and activation. *Cell Biol Int* 25:735–739. doi: 10.1006/cbir.2001.0759
62. Jackson D, Bentley J (1960) On the significance of the extractable collagens. *J Biophys Biochem Cytol* 7:37–42.
63. Joyce E, Moore J, Sacks M (2009) Biomechanics of the fetal membrane prior to mechanical failure: review and implications. *Eur J Obs Gynecol Reprod Biol* 144:121–127. doi: 10.1016/j.ejogrb.2009.02.014
64. Kanayama N, Terao T, Kawashima Y, Horiuchi K, Fujimoto D (1985) Collagen types in normal and prematurely ruptured amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 153:899–903.
65. Karlson P, Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W (2005) Karlsons Biochemie und Pathologie, 5th ed. Thieme Georg Verlag, Stuttgart
66. Karousou EG, Militopoulou M, Porta G, De Luca G, Hascall VC, Passi A (2004) Polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labeled hyaluronan and chondroitin sulfate disaccharides: application to the analysis in cells and tissues. *Electrophoresis* 25:2919–2925. doi: 10.1002/elps.200406034
67. Karousou EG, Viola M, Genasetti A, Vigetti D, Luca GD, Karamanos NK, Passi A (2005) Application of polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labeled saccharides for analysis of hyaluronan and

Literaturverzeichnis

- chondroitin sulfate in human and animal tissues and cell cultures. *Biomed Chromatogr* 19:761–765. doi: 10.1002/bmc.511
68. Keusch P (2003) Orcin-Reaktion. http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/p32_rib_rna.htm. Accessed 6 Mar 2011
69. El Khwad M, Stetzer B, Moore R, Kumar D, Mercer BM, Arikat S, Redline R, Mansour J, Moore J (2005) Term human fetal membranes have a weak zone overlying the lower uterine pole and cervix before onset of labor. *Biol Reprod* 72:720–726. doi: 10.1095/biolreprod.104.033647
70. Kiechle M (2006) *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH
71. Knupp C, Squire J (2001) A new twist in the collagen story—the type VI segmented supercoil. *EMBO J* 1:372–376.
72. Laurent T, Laurent U, Fraser J (1995) Functions of hyaluronan. *Ann Rheum Dis* 54:429–432.
73. Lawrenz N (2008) *Biochemical, Histological and Mechanical Data from Fetal Membranes. Is there any Correlation?* FH Aachen, Campus Jülich
74. Lei H, Furth E, Kalluri R, Chiou T, Tilly K, Tilly J, Elkon K, Jeffrey J, Strauss J (1996) A program of cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J Clin Invest* 98:1971–1978. doi: 10.1172/JCI119001
75. Lembet A, Eroglu D, Ergin T, Kuscu E, Zeyneloglu H, Batioglu S, Haberal A (2002) New rapid bed-side test to predict preterm delivery: phosphorylated insulin-like growth factor binding protein-1 in cervical secretions. *Acta Obstet Gynecol Scand* 81:706–12.
76. Lillie RD Sirius Red F3B. In: *Stainsfile*. <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/graphics/35780.gif>. Accessed 11 Jan 2013
77. Linder P (2005) *Examination of Mechanical Properties of Human Amniotic Sac Membranes*. FH Aachen
78. Listgarten MA (1999) *Mikroskopische Anatomie des Zahnhalteapparates: Gingivale Fasern - Kollagenfasern*. In: Univ. Pennsylvania, Temple Univ. Ohio State Univ. und Univ. Pittsburgh. <http://www.dental.pitt.edu/informatics/periostology/de/gu0207m.htm>. Accessed 26 Aug 2009
79. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A (2007) *Molecular Cell Biology*, 6th ed. Palgrave Macmillan, New York
80. Löffler G, Petrides P (1998) *Biochemie und Pathobiochemie*, 6. Auflage. Springer
81. Lucovnik M, Kornhauser-Cerar L, Premru-Srsen T, Gmeiner-Stopar T, Derganc M (2011) Neutrophil defensins but not interleukin-6 in vaginal fluid after preterm premature rupture of membranes predict fetal/neonatal inflammation and infant neurological impairment. *Acta Obstet Gynecol Scand* 90:908–916. doi: 10.1111/j.1600-0412.2011.01177.x
82. Di Lullo GA, Sweeney SM, Korkko J, Ala-Kokko L, San Antonio JD (2002) Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J Biol Chem* 277:4223–4231. doi: 10.1074/jbc.M110709200
83. Luttkus A (2011) *Das Ehlers-Danlos-Syndrom: Eine interdisziplinäre Herausforderung*. de Gruyter

Literaturverzeichnis

84. MacDermott R, Landon C (2000) The hydroxyproline content of amnion and prelabour rupture of the membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92:217–221.
85. Mändle C, Opitz-Kreuter S (2007) *Das Hebammenbuch: Lehrbuch der praktischen Geburtshilfe*, Auflage 5. Schattauer
86. Marcellin L, Goffinet Francois (2012) Are biological markers relevant for the diagnosis and the prognosis of preterm premature rupture of membranes (PPROM)? *Clin Chem Lab Med* 50:1015–1019. doi: 10.1515/cclm-2011-1850
87. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi M, Bianco K, Ghezzi F, Yoon B (2000) Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 183:914–920. doi: 10.1067/mob.2000.108879
88. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi M, Gomez R, Edwin S, Yoon B (2000) Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 183:887–894. doi: 10.1067/mob.2000.108878
89. Maymon E, Romero R, Pacora P, Gomez R, Mazor M, Edwin S, Chaiworapongsa T, Kim J, Yoon B, Menon R, Fortunato S, Berry S (2001) A role for the 72 kDa gelatinase (MMP-2) and its inhibitor (TIMP-2) in human parturition, premature rupture of membranes and intraamniotic infection. *J Perinat Med* 29:308–316. doi: 10.1515/JPM.2001.044
90. Meinert M, Eriksen G, Petersen A, Helmig R, Laurent C, Uldbjerg N, Malmström A (2001) Proteoglycans and hyaluronan in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 184:679–685. doi: 10.1067/mob.2001.110294
91. Mercer BM (2008) Preterm Premature Rupture of the Membranes. *Glob Libr women's med*. doi: 10.3843/GLOWM.10120
92. Mercer BM, Goldenberg RL, Meis P, Moawad A, Shellhaas C, Das A, Menard M, Caritis S, Thurnau G, Dombrowski M, Miodovnik M, Roberts JM, McNellis D (2000) The Preterm Prediction Study: prediction of preterm premature rupture of membranes through clinical findings and ancillary testing. The National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol* 183:738–745.
93. Micili SC, Valter M, Ofiaz H, Ozogul C, Linder P, Fockler N, Artmann GM, Digel I, Artmann AT (2013) Optical coherence tomography: A potential tool to predict premature rupture of fetal membranes. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med* 227:393–401. doi: 10.1177/0954411912468557
94. Minkoff H, Grunebaum A, Schwarz R, Feldman J, Cummings M, Crombleholme W, Clark L, Pringle G, McCormack W (1984) Risk factors for prematurity and premature rupture of membranes: a prospective study of the vaginal flora in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 150:965–972.
95. Modena AB, Fieni S (2004) Amniotic fluid dynamics. *Acta Biomed* 75 Suppl 1:11–13.
96. Moore R, Mansour J, Redline RW, Mercer B, Moore J (2006) The physiology of fetal membrane rupture: insight gained from the determination of physical properties. *Placenta* 27:1037–51.
97. Moutquin J-M (2003) Classification and heterogeneity of preterm birth. *BJOG* 110 Suppl :30–33.

Literaturverzeichnis

98. Müller-Lissner A Früh geboren, spät Probleme. In: ZEIT ONLINE.
<http://www.zeit.de/online/2009/25/fruehgeburten-probleme?page=1>.
99. Muona A (2000) Collagen genes. In: Oulu Univ. Libr.
<http://herkules.oulu.fi/isbn9514265858/html/x678.html>. Accessed 26 Aug 2009
100. Nagase H (1996) Matrix Metalloproteinases. In: Hooper NM, Hooper H, Hooper N (eds) Zinc Met. Heal. Dis. Zinc Metalloproteases In Health And Disease CRC Press, London, pp 153–204
101. Nagase H, Woessner JF (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491–21494.
102. Obladen M (2001) Neugeborenenintensivpflege: Grundlagen und Richtlinien, 6. Auflage. Springer-Verlag Berlin
103. Oflaz H (2012) Entwicklung eines Prototypen zur Prognose von Frühgeburten Ein biomedizintechnischer Ansatz. Universität zu Köln
104. Oflaz H, Temiz Artmann A, Mallmann P, Kuckelkorn S, Linder P, Foeckler N, Valter M, Artmann GM
Biomechanical evaluation of a fetal membrane with a new experimental device.
105. Ogawa M, Moody MW, Portier RJ, Bell J, Schexnayder MA, Lusso JN (2003) Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. *J Agric Food Chem* 51:8088–8092. doi: 10.1021/jf034350r
106. Ota A, Yonemoto H, Someya A, Itoh S, Kinoshita K, Nagaoka I (2006) Changes in matrix metalloproteinase 2 activities in amniochorions during premature rupture of membranes. *J Soc Gynecol Investig* 13:592–597. doi: 10.1016/j.jsg.2006.10.001
107. Overall C (2007) Mammalian MMPs and Substrates The overall lab. In: Overall Lab; Cent. Blood Res. Univ. Br. Columbia. http://www.clip.ubc.ca/mmp_timp_folder/mmp_substrates.shtm.
108. Oxlund H, Helmig R, Halaburt J, Ulbjerg N (1990) Biomechanical analysis of human chorioamniotic membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 34:247–255.
109. Oyen ML, Calvin SE, Landers D V (2006) Premature rupture of the fetal membranes: is the amnion the major determinant? *Am J Obstet Gynecol* 195:510–515. doi: 10.1016/j.ajog.2006.02.010
110. Padubidri V, Anand E (2006) Textbook of Obstetrics. B.I. Publications Pvt Ltd., Janpath, New Delhi
111. Parry S, Strauss J (1998) Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 338:663–670. doi: 10.1056/NEJM199803053381006
112. Peaceman AM, Andrews W, Thorp JM, Cliver S, Lukes A, Iams J, Coultrip L, Eriksen N, Holbrook R, Elliott J, Ingardia C, Pietrantonio M (1997) Fetal fibronectin as a predictor of preterm birth in patients with symptoms: a multicenter trial. *Am J Obs Gynecol* 177:13–18. doi: 10.1016/S0002-9378(97)70431-9
113. Plaas A, West L, Midura R, Hascall VC (2001) Disaccharide composition of hyaluronan and chondroitin/dermatan sulfate. Analysis with fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *Methods Mol Biol* 171:117–128. doi: 10.1385/1-59259-209-0:117
114. Popowski T, Goffinet F, Batteux F, Maillard F, Kayem G (2011) Prediction of maternofetal infection in preterm premature rupture of membranes: serum maternal markers. *Gynécologie, Obs Fertil* 39:302–308. doi: 10.1016/j.gyobfe.2010.11.006

Literaturverzeichnis

115. Ragosch V, Dudenhausen W, Grauel L, Schneider K, Vetter K, Weitzel H, Friese K, Gingelmaier A, Mylonas I (2006) Empfehlungen zum Vorgehen beim vorzeitigen Blasensprung. Berlin
116. Rahlves M, Seewig J (2009) Optisches Messen technischer Oberflächen: Messprinzipien und Begriffe, 1st ed. 79.
117. Rahn H Methoden zur Quantifizierung des sulfierten und des gesamt-Glycosaminoglycangehalts in menschlichen Eihäuten. FH Aachen, University of Applied Sciences Jülich
118. Reinhardt D, Götz M, Kraemer R, Schöni M (2001) Cystische Fibrose. Springer
119. Renato V, Iozzo M (2001) Proteoglycan Protocols (Methods in Molecular Biology). Springer, Humana Press
120. Reuter P (2004) Springer Lexikon Medizin, 1st ed. Springer
121. Romero R, Mazor M, Sepulveda W, Avila C, Copeland D, Williams J (1992) Tumor necrosis factor in preterm and term labor. Am J Obstet Gynecol 166:1576–1587.
122. Roughley P, Lee E (1994) Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. Microsc Res Tech 28:3853–97. doi: 10.1002/jemt.1070280505
123. Savitz D, Blackmore C, Thorp JM (1991) Epidemiologic characteristics of preterm delivery: etiologic heterogeneity. Am J Obstet Gynecol 164:467–471.
124. Schmidt W, Klima G (1989) Experimental and histologic studies on fetal membrane tensility and membrane rupture. Zentralbl Gynakol 111:129–141.
125. Schmitz G, Endres S, Götte D (2008) Biomarker: Bedeutung für den medizinischen Fortschritt und Nutzenbewertung, 1. Auflage. Schattauer
126. Schneider H, Husslein P, Schneider K (2004) Die Geburtshilfe, 2. Auflage. Springer-Verlag
127. Schneider H, Naiem A, Malek A, Hänggi W (1994) Ätiologische Klassifikation der Frühgeburt und ihre Bedeutung für die Prävention. Geburtshilfe Frauenheilkd 54:12–19. doi: 10.1055/s-2007-1023544
128. Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC (2005) Human defensins. J Mol Med (Berl) 83:587–595. doi: 10.1007/s00109-005-0657-1
129. Schober E, Kusy R, Savitz D Resistance of fetal membranes to concentrated force applications and reconciliation of puncture and burst testing. Ann Biomed Eng 22:540–548.
130. Schröder TM (2005) Entwicklung eines Messgerätes (DIMPAST) zur Bestimmung des E-Moduls und der Reißfestigkeit von natürlichen Membranen am Beispiel der menschlichen Fruchtblase. FH Aachen
131. Schütt C, Bröker B (2011) Grundwissen Immunologie, 3rd ed. Spektrum Akademischer Verlag
132. Schwetlick K (2009) Organikum (German Edition), 23rd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH
133. Seikagaku Biobusiness Corporation, Hyaluronan SD data sheet (2010) Hyaluronan. Tokyo
134. Sherwood L (2009) Human Physiology: From Cells to Systems, 7th ed. Cengage Learning

Literaturverzeichnis

135. Sigma-Aldrich 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt.
http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure5/118/mfcd19686959.eps/_jcr_content/renditions/medium.png. Accessed 10 Feb 2013
136. Skinner S, Campos G, Liggins G (1981) Collagen content of human amniotic membranes: effect of gestation length and premature rupture. *Obstet Gynecol* 57:487–489.
137. Skinner S, Liggins G (1981) Glycosaminoglycans and collagen in human amnion from pregnancies with and without premature rupture of the membranes. *J Dev Physiol* 3:111–121.
138. sparkleys (2012) Mechanism of Hydroxyproline Assay. <http://i.imgur.com/FRXJ5.png>.
139. Steffensen B, Wallon U, Overall C (1995) Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J Biol Chem* 270:11555–11566.
140. Strauss A (2006) *Geburtshilfe Basics*, 1. Auflage. Springer
141. Tejero E, Perichart O, Pfeffer F, Casanueva E, Vadillo-Ortega F (2003) Collagen synthesis during pregnancy, vitamin C availability, and risk of premature rupture of fetal membranes. *Int J Gynaecol Obstet* 81:29–34.
142. Turley E (1989) The role of a cell-associated hyaluronan-binding protein in fibroblast behaviour. *Ciba Found Symp* 143:121–133.
143. Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Furth E, Lei H, Muschel R, Stetler-Stevenson W, Strauss J (1995) 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *Am J Pathol* 146:148–156.
144. Vadillo-Ortega F, González-Avila G, Karchmer S, Cruz N, Ayala-Ruiz A, Lama M (1990) Collagen metabolism in premature rupture of amniotic membranes. *Obstet Gynecol* 75:84–88.
145. Vadillo-Ortega F, Hernandez A, González-Avila G, Bermejo L, Iwata K, Strauss J (1996) Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 174:1371–1376.
146. Vassalli P (1992) The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10:411–452. doi: 10.1146/annurev.iy.10.040192.002211
147. Vetter K, Goeckenjan M (2004) Geburtseinleitung bei vorzeitigem Blasensprung. *Gynäkologe* 37:335–341. doi: 10.1007/s00129-004-1509-8
148. De Vos M, Nuytinck L, Verellen C, De Paepe A (1999) Preterm premature rupture of membranes in a patient with the hypermobility type of the Ehlers-Danlos syndrome. A case report. *Fetal Diagn Ther* 14:244–247.
149. Wang HL, Zhou C, Zhang YZ (2005) Role of matrix metalloproteinase-2,9 and their inhibitors in premature rupture of membranes. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 40:29–33.
150. Van Wart H, Birkedal-Hansen H (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5578–5582.

Literaturverzeichnis

151. Wiemer E (2009) Collagen Content and their Structural Properties by Optical Techniques. FH Aachen University of Applied Sciences
152. Winkler M, Rath W (1996) The role of cytokines in the induction of labor, cervical ripening and rupture of the fetal membranes. *Z Geburtshilfe Neonatol* 200 Suppl :1–12.
153. Woessner JF (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5:2145–2154.
154. Wolff F (1997) Prävention der Frühgeburt. *Gynakologe* 30:726–736. doi: 10.1007/PL00003076
155. Worwood M (2007) Assessing the iron status of populations ANNEX 2 Indicators of the iron status of populations: ferritin. 108.
156. Zusammenhang zwischen Leistungsmenge und Ergebnisse bei der Versorgung von Früh- und Neugeborenen mit sehr geringem Geburtsgewicht; Berichtsplan (vorläufige Version). In: Inst. für Qual. und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswes. http://www.iqwig.de/download/V07_01_Berichtsplan_vorlaeufige_Version_Menge_und_Ergebnis_bei_der_Versorgung_von_Fruehgeborenen.pdf. Accessed 20 Aug 2009
157. Neonatal and Perinatal Mortality. Country, Regional and Global Estimates World Health. In: World Heal. Organ. http://www.who.int/making_pregnancy_safer/publications/neonatal.pdf. Accessed 20 Aug 2009
158. Gesundheitliche Risiken für Frühchen erkennen und vermeiden. In: Abbott GmbH Co. KG. http://www.fruehgeboren.de/content/index_ger.html. Accessed 20 Aug 2009
159. Hydroxyprolin. In: Univ. Diessen und Marbg. <http://www.augen.med.uni-giessen.de/erhaltung/hydroxyprolin.html?m=32>.
160. Quantity One® User Guide for Version 4.6.3 Windows and Macintosh.
161. (1970) The prevention of perinatal mortality and morbidity. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 457:1–60.
162. (2006) Blastozyste Schema. In: Embryog. Humanembryologie Embryog. Vor. http://www.embryology.ch/images/imgmultuse/e1b_blastozyste.gif.
163. (2006) Humanembryologie Embryogenese Vorimplantation. In: embryology.ch. <http://www.embryology.ch/allemand/evorimplantation/resumevorimp01.html>.

10 Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

1. Oflaz H, Temiz Artmann A, Mallmann P, Kuckelkorn S, Linder P, Foeckler N, et al.: *Biomechanical evaluation of a fetal membrane with a new experimental device*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, submitted
2. Micili SC, Valter M, Oflaz H, Ozogul C, Linder P, Fockler N, Artmann GM, Artmann AT: *Optical coherence tomography: A potential tool to predict premature rupture of fetal membranes*. Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med. SAGE Publications; 2013 Dec 6;227(4):393–401.
3. Föckler N, M. Valter M, Mallmann P, Artmann GM, (Temiz) Artmann: *The Impact of biochemical and biomechanical properties of human fetal membranes linked to preterm premature rupture during pregnancy*. 5th Graduate Symposium, Germany. FH Aachen University of Applied Sciences, 2012
4. Lawrenz N, Mallmann P, Valter M, Artmann GM, Temiz Artmann A: *Biochemical properties of fetal membranes linked with premature birth*. 4th Graduate Symposium, Germany. FH Aachen University of Applied Sciences, 2011
5. Lawrenz N, Mallmann P, Valter M, Artmann GM, Temiz Artmann A: *Biochemical structure of fetal membranes linked with premature birth*. 3rd Graduate Symposium, Germany. FH Aachen University of Applied Sciences, 2010
6. Lawrenz N, Valter M, Oflaz H, Cilaker Micili S, Mallmann P, Artmann GM, Temiz Artmann A: *Biomarker for Prognosis of Premature Birth-A Biomedical Approach*. 8th International Conference on Cell & Stem Cell Engineering, Dublin-Ireland. 2010, 72
7. Lawrenz N, Mallmann P, Valter M, Artmann GM, Temiz Artmann A: *Biomarker for Prognosis of Premature Birth - A Biomedical Approach*. 2nd Graduate Symposium, Germany. FH Aachen University of Applied Sciences, 2010

Vorangegangene Studienarbeiten des Projekts CARA

Diese Doktorarbeit ist Teil des Forschungsprojekts CARA (ZIM, FKZ: VP2425601AB9). Bisher wurden folgende Arbeiten mit verschiedenen Methoden und Techniken im Rahmen dieses Projektes verfasst:

1. Hakan Oflaz (Doktorarbeit): Entwicklung eines Prototypen zur Prognose von Frühgeburten. Ein biomedizintechnischer Ansatz Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität zu Köln, September 2012
2. Çağdaş Dinç (Masterarbeit): DIMPAST IV with OCT probe: the Last Step Before an in-vivo Prototype in Prediction of Birth Types, FH Aachen, Labor für Medizinische und Molekulare Biologie, 2012
3. Helena Rahn (Diplomarbeit): Methoden zur Quantifizierung des sulfierten und des gesamt-Glycosaminoglycangehalts in menschlichen Eihäuten, FH Aachen, Labor für Medizinische und Molekulare Biologie, Juni 2011
4. Marius Grauwinkel (Diplomarbeit): Adaption einer in vitro Methode zur Kollagen- und Wassergehaltsbestimmung in menschlichen fetalen Eihäuten, FH Aachen, Labor für Medizinische und Molekulare Biologie, Juni 2011
5. Thomas Dambrowski (Diplomarbeit): Kollagenquantifizierung mittels Hydroxyprolinbestimmung in humanen Eihäuten, FH Aachen, Labor für Medizinische und Molekulare Biologie, Juli 2011
6. Tristan Hufen (Bachelorarbeit): Optimierung eines Gerätes zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften von fetalen Eihäuten FH Aachen, Labor für Zellbiophysik, 2011
7. Sebastian Kuckelkorn (Diplomarbeit): Weiterentwicklung des DIMPAST zur Integration einer OCT-Messeinheit, FH Aachen, Labor für Zellbiophysik, Oktober 2010
8. Eric Wiemer (Diplomarbeit): Human Fetal Membranes` Collagen Content and their Structural Properties by Optical Techniques FH Aachen, Labor für Medizinische und Molekulare Biologie, 2009
9. Nicole Lawrenz (Diplomarbeit): Biochemical, Histological and Mechanical Data from Fetal Membranes. Is there any Correlation?, FH Aachen, Labor für Medizinische und Molekulare Biologie, Februar 2008

Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

10. Guido Antweiler (Diplomarbeit): Optimierung der Messtechnik und Durchführung biomechanischer Untersuchungen an humanen Eihäuten, FH Aachen, Labor für Medizinische und Molekulare Biologie, August 2007
11. Mark Kemmerich (Diplomarbeit): Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an fetalen Eihäuten zur Quantifizierung des Kollagengehaltes, FH Aachen, Labor für Zellbiophysik, Mai 2007
12. Peter Linder (Masterarbeit): Examination of Mechanical Properties of Human Amniotic Sac Membranes, FH Aachen, Labor für Zellbiophysik, Juli 2006
13. Timm Schröder (Diplomarbeit): Entwicklung eines Messgerätes (DIMPAST) zur Bestimmung des E-Moduls und der Reißfestigkeit von natürlichen Membranen am Beispiel der menschlichen Fruchtblase, FH Aachen, Labor für Zellbiophysik, Mai 2006

Acknowledgement:

Diese Arbeit als Teilprojekt des Forschungsprojekts CARA wurde finanziert vom BMWi (ZIM, FKZ: VP2425601AB9), der Kompetenzplattform (KOPF) Bioengineering sowie dem Gleichstellungsbüro der FH Aachen für ein Promotionsstipendium.

11 Anhang

11.1 Abbildungsverzeichnis

1: Menschlicher Fetus gegen Ende des 3. Trimesters	6
2: Querschnitt einer menschlichen fetalen Eihaut	7
3: Blastozyste Schema	8
4: EZM-Bestandteile von Amnion und Chorion	9
5: Aufbau einer Kollagen-Fibrille	11
6: Ausschnitt eines Hyaluronsäure-Moleküls	14
7: Liste der bisher entdeckten Säugetier-MMPs	17
8: Gruppe von Kollagenfasern mit unterschiedlicher Kräuselung	19
9: Wirkungsmechanismus der Hydroxyprolin-Bestimmung	43
10: Die Struktur des Farbstoffs Sirius Red 3FB	44
11: Umwandlung von D-Glucuronsäure zu Glucuronolacton	45
12: Kondensationsreaktion des Glucuronolacton mit Orcin	46
13: Strukturformel von 1,9-Dimethylmethylenblau	46
14: Reaktion des Disaccharids mit AMAC	49
15: Aufnahme eines FACE-Gels mit Glukose- und Δ DiHA-Standards	52
16: FACE-Gel mit Δ DiHA-Standards in 5 verschiedenen Konzentrationen	52
17: Regressionsgerade eines FACE-Gels mit 5 Δ DiHA-Standards	53
18: DIMPAST 1, Version aus dem Jahr 2005	56
19: DIMPAST-Weiterentwicklung	58
20: Genereller Aufbau einer OCT-Messeinrichtung	59
21: OCT-Aufnahme einer menschlichen Eihaut in-vitro	60
22: Hydroxyprolingehalt von Term, Preterm, PROM und PPRM Membranen	74
23: TSC-Gehalt von Term, PROM und PPRM Membranen	75
24: gGAG Gehalt von Preterm, Term, PROM und PPRM Membranen	76
25: sGAG-Gehalt von Preterm, Term, PROM und PPRM Membranen	77
26: Hyaluronsäuregehalt von Term, PROM und PPRM Membranen	78

Anhang

27: Wassergehalt von Term, PROM und PPRM Membranen	79
28: TSC-Gehalt und Hydroxyprolin	80
29: TSC-Gehalt und maximaler Reissdruck bei Term Membranen	81
30: TSC-Gehalt und maximaler Reissdruck bei PROM Membranen	81
31: TSC-Gehalt und maximalem Reissdruck bei PPRM Membranen	82
32: Wassergehalt und maximaler Reissdruck	82
33: Korrelation zwischen Membranwassergehalt und –dicke	83
34: Korrelation zwischen Wassergehalt und Hyaluronsäure	84
35: Hyaluronsäure und maximaler Reissdruck	84
36: Korrelation zwischen Hyaluronsäure und Dicke	85
37: Hyaluronsäure und TSC-Gehalt	86
38: gGAG und Dicke	86
39: gGAG und maximaler Reissdruck	87
40: Korrelation zwischen gGAG und TSC-Gehalt	88
41: Korrelation zwischen gGAG und Wassergehalt	88
42: Korrelation zwischen sGAG und Dicke	89
43: Korrelation zwischen sGAG und max. BP	90
44: sGAG und TSC	91
45: sGAG und Wassergehalt	91
46: Beim Platztest im DIMPAST reißt das Chorion vor dem Amnion	93

11.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswertung Standardgerade von Δ DiHA-Standards mittels FACE	54
Tabelle 2: Δ DiHA-Berechnung ohne Standardgerade (eigenes Beispielergebnis)	55
Tabelle 3: Hydroxyprolinegehalt von Term, Preterm, PROM und PPRM Membranen	74
Tabelle 4: TSC-Gehalt von Term, PROM und PPRM Membranen	75
Tabelle 5: gGAG-Gehalt von Preterm, Term, PROM und PPRM Membranen	76
Tabelle 6: sGAG-Gehalt von Preterm, Term, PROM und PPRM Membranen	77
Tabelle 7: Hyaluronsäuregehalt von Term, PROM und PPRM Membranen	78
Tabelle 8: Wassergehalt von Term, PROM und PPRM Membranen	79

12 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.