

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

**Morphologische und molekularbiologische Charakterisierung
der murinen Plazenta unter dem Einfluss von
Hochfett- sowie Hochfett-/Hochzucker-Diäten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Simone Jauch
aus Leonberg

promoviert am 28. September 2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. W. Dötsch
2. Gutachterin: Professorin Dr. med. G. Rahimi

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 Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Universitätsprofessor Dr. med. J. W. Dötsch
Dr. rer. nat. Sarah Appel
Dr. nat. med. Tobias Kretschmer
Maria Wohlfarth

Weitere Personen waren an der Erstellung 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.

Die Planung und Durchführung des Tierversuchs, die Asservierung und Einbettung der murinen Organe sowie die Erfassung und Dokumentation der phänotypischen Daten erfolgte durch Dr. rer. nat Sarah Appel, Dr. rer. nat Ruth Janoschek, Dr. med. Eva-Maria Turnwald, Dr. nat. med. Tobias Kretschmer und Marion Handwerk. Die umfassende Versorgung der Versuchstiere in der Tierhaltung der Pharmakologie der Uniklinik Köln erfolgte durch das Team der dezentralen Versuchstierhaltung.

Für die Durchführung der in dieser Arbeit angegebenen Experimente wurde ich von meiner Betreuerin Dr. rer. nat Sarah Appel, dem ehemaligen PhD-Studenten Dr. nat. med. Tobias Kretschmer sowie von den biologisch-technischen Assistentinnen Maria Wohlfarth und Marion Handwerk angeleitet. Mit Ausnahme der Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR, welche ausschließlich von Maria Wohlfarth durchgeführt wurde, wurden alle weiteren angegebenen Versuche eigenständig von mir selbst durchgeführt.

Die bioinformatische Auswertung der stereologischen Versuche erfolgte mit der Unterstützung von Peter Zentis aus der Imaging Core Facility des CECAD (Köln, Deutschland). Die weitere Auswertung und Interpretation der ermittelten Ergebnisse sowie die Erstellung der Tabellen und Diagramme in dieser Arbeit erfolgten durch meine Person.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Ludwigsburg, den 07.01.2022

Unterschrift: *Simone Jauch*

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die auf jegliche Art und Weise zum Gelingen dieser Promotion beigetragen haben.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Jörg Dötsch danke ich für die Überlassung des Themas und meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Sarah Appel möchte ich einen besonderen Dank für die zuverlässige, geduldige und intensive Betreuung aussprechen.

Bei Maria Wohlfarth und Dr. nat. med. Tobias Kretschmer möchte ich mich für die praktische Einführung und Anleitung im Labor, sowie für deren geschätzten Rat bei praktischen Problemen jeglicher Art bedanken.

Besonders danke ich auch Peter Zentis für seine fachliche Kompetenz und die große Ausdauer, Zeit und Mühe, die er für dieses Projekt aufgebracht hat.

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Mitdotorandinnen und Mitdotoranden bedanken, die sowohl Freude als auch Frustration immer zu teilen wussten.

Zu guter Letzt gilt ein besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mir den Rücken frei gehalten haben und mich immer wieder motiviert haben, durchzuhalten und das Projekt zu Ende zu bringen.

Für Karin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Zusammenfassung	10
2. Einleitung	12
2.1 Übergewicht und Adipositas	12
2.2 Murine Plazenta	16
2.3 Pathophysiologie mütterlicher Umweltfaktoren während der Schwangerschaft	21
2.4 Zielsetzung der Arbeit	27
3. Material und Methoden	29
3.1 Materialien und Geräte	29
3.2 Tierversuch	38
3.3 Histologische Methoden	44
3.4 Molekulargenetische Methoden: Genotypisierung	50
3.5 Molekulargenetische Methoden: RT-qPCR	53
3.6 Proteinbiochemische Methoden	59
3.7 Bioinformatische Analyse	65
3.8 Statistische Analyse	71
4. Ergebnisse	72
4.1 Diätetischer Effekt auf die Muttertiere	72
4.2 Diätetischer Effekt auf die Feten	76
4.3 Diätetischer Effekt auf die Plazenten	80
4.4 Vergleich der beiden Kontrollgruppen	95
5. Diskussion	101
5.1 Induktion einer mütterlichen Adipositas durch die verschiedenen Interventionsdiäten	101
5.2 Effekte der mütterlichen Ernährung auf Schwangerschaft und Feten	104
5.3 Pathophysiologische Rolle der Plazenta für das negative fetale Outcome unter dem Einfluss der Interventionsdiäten	109
5.4 Bewertung der Control-Diät bezüglich der Eigenschaft als Kontrolldiät	119
5.5 Übertragbarkeit auf den Menschen	123
6. Literaturverzeichnis	125
7. Anhang	134
7.1 Abbildungsverzeichnis	134
7.2 Tabellenverzeichnis	135
7.3 Lizenzen	136

Abkürzungsverzeichnis

Angpt-1	Angiopoetin-1
Angpt-2	Angiopoetin-2
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body-Mass-Index
bp	base pair (Basenpaar)
BSA	Rinderserumalbumin
CD-31	Cluster of Differentiation 31
cDNA	komplementäre DNA
CECAD	Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases
CO	Control
CRP	C-reaktives Protein
Ct	cycle threshold
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DB	Dezidua basalis
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIO	Diet induced obesity- 45 kJ % fat (Lard)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	enhanced chemiluminescence
FAM	Phosphoramidit-Derivat des 6-Carboxyfluorescein
Fc	Fragment crystallizable region (fragmentkristallisierbare Region)
for	forward (vorwärts)
g	G-Zahl (Beschleunigungsgröße für Zentrifugen)
g	Gramm
G	Gestationstag
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure

HE	Hämatoxylin-Eosin
HFD	Hochfettdiät
HPLC	High-performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IgG	Immunglobulin G
JZ	Junctional Zone
kcal	Kilokalorien
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kJ	Kilojoule
LZ	Labyrinth-Zone
M	Molar
m/v	Gewicht pro Volumen
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
MJ	Megajoule
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm ³	Kubikmillimeter
nm	Nanometer
P	Postnataler Tag
PAS	Periodic acid-Schiff reaction
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Phosphat gepuffertes Formaldehyd
rev	reverse (rückwärts)
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
(m)RNA	(messenger) Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROX	5-Carboxy-Rhodamin-X
RT-qPCR	quantitative real time Polymerase chain reaction (quantitative Echtzeit-PCR)

s.	siehe
s.c.	subkutan
s/min	Schüttlungen pro Minute
SD	Standarddiät
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20 (Tris gepufferte Kochsalz- lösung mit Tween-20)
TIE-1	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1
TIE-2	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VE-Cadherin	Vascular Endothelial Cadherin
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WSD	Western diet-butter fat
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer

1. Zusammenfassung

Eine Hauptursache für die zunehmende Prävalenz von Adipositas in der Bevölkerung ist der heutige durch einen hohen Fett- und Zuckergehalt geprägte Ernährungsstil. Insbesondere die steigende Zahl übergewichtiger schwangerer Frauen stellt ein bedeutendes gesundheitliches Problem dar, da eine mütterliche Adipositas während der Schwangerschaft zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität für Mutter und Kind führen kann. Dabei wird vermutet, dass die Plazenta als essentielle Verbindung zwischen Mutter und Kind eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der negativen Auswirkungen einer mütterlichen Adipositas auf das Kind spielt.

Hauptziel dieser Arbeit war es, im Mausmodell zu untersuchen, welche Auswirkungen sich unter dem Einfluss einer mütterlichen Hochfettdiät bzw. einer mütterlichen Hochfett-/Hochzuckerdiät auf die Schwangerschaft, den Fetus und die Plazenta zeigen. Da im Versuch eine Vielzahl der Weibchen unter dem Einfluss der Interventionsdiäten zum Zeitpunkt der Verpaarung keine Adipositas aufwiesen, wurden die Ergebnisse des Versuchs letztlich nur hinsichtlich des Einflussfaktors der mütterlichen Ernährung und nicht hinsichtlich des Einflussfaktors einer mütterlichen Adipositas interpretiert.

In allen drei Gruppen der mütterlichen hochkalorischen Interventionsdiäten zeigten sich negative Auswirkungen auf die Schwangerschaft und das fetale Outcome. Neben einer reduzierten Trächtigkeitsrate und einer längeren Gestationsdauer fand sich eine erhöhte fetale Mortalität sowie eine fetale Wachstumsrestriktion an Gestationstag 15,5. Hierbei ließ sich als möglicher zu Grunde liegender Pathomechanismus eine Entwicklungsstörung der vaskulären Strukturen in der Labyrinth-Zone der Plazenta feststellen. Insbesondere für die fetalen Kapillaren zeigte sich dabei eine Reduktion von Volumen und Oberfläche sowie eine Herunterregulation verschiedener Endothelzellmarker.

Als weiterer Punkt sollte in dieser Arbeit evaluiert werden, ob eine neue Control-Diät in ihrer Eigenschaft als Kontrolldiät als gleichwertig zur bewährten Standarddiät bewertet werden kann und diese daher in zukünftigen Versuchen ersetzen könnte. Unter dem Einfluss der Control-Diät zeigte sich jedoch ein schlechteres fetales Outcome in Form einer erhöhten Mortalität sowie in Form eines reduzierten Gewichts der Nachkommen am zweiten Tag nach der Geburt.

Zudem fand sich an Gestationstag 15,5 neben einem geringeren placentaren Gewicht eine signifikante Reduktion des Volumens und der Oberfläche der fetalen Kapillaren in der placentaren Labyrinth-Zone. Daher konnte die Control-Diät nicht als gleichwertig zur Standarddiät bewertet werden und wird daher in weiteren Versuchen keine Verwendung als Kontrolldiät finden.

Insgesamt hat sich somit gezeigt, dass eine ungünstige mütterliche Ernährung auch ohne das gleichzeitige Vorliegen einer mütterlichen Adipositas negative Auswirkungen auf die Schwangerschaft, die Feten und die Plazenta haben kann. Dabei waren diese negativen Auswirkungen unter dem Einfluss der beiden Hochfett-/Hochzuckerdiäten noch deutlich stärker ausgeprägt als unter der reinen Hochfettdiät. Diese Erkenntnisse sind von besonderer Bedeutung, da die Kombination eines hohen alimentären Fett- und Zuckergehalts der heutigen menschlichen Ernährung sehr nahe kommt und da auch in der menschlichen Realität viele Frauen im gebärfähigen Alter einen ungesunden Ernährungsstil aufweisen, ohne zwingend hierunter eine Adipositas zu entwickeln. Da die Weibchen die spezifische Diät der jeweiligen Futtergruppe ab einem Alter von drei Wochen und über die gesamte Schwangerschaft hinweg erhielten, lässt sich in dieser Arbeit leider nicht differenzieren, ob und inwiefern die mütterliche Ernährung vor der Konzeption und während der Schwangerschaft unterschiedlich stark zu den Effekten auf Fetus und Plazenta beigetragen haben. Generell lässt sich jedoch ableiten, dass die Ergebnisse dieser Arbeit die Relevanz einer gesunden Ernährung für die Schwangerschaft und das Leben des ungeborenen Kindes hervorheben.

2. Einleitung

2.1 Übergewicht und Adipositas

2.1.1 Definition

Eine Adipositas ist definiert als ein Anteil der Fettmasse am Körpergewicht von über 30 % bei Frauen und über 20 % bei Männern [1]. Eine indirekte Abschätzung des Körperfettanteils ermöglicht hierbei der Body-Mass-Index (BMI), welcher sich aus dem Quotienten von Körpergewicht in kg und der Körpergröße in Metern im Quadrat ermitteln lässt [1, 2]. Als Normalgewicht ist für Erwachsene über 18 Jahren ein BMI zwischen 18,5 - 24,9 kg/m² definiert, wohingegen ein BMI unter 18,5 kg/m² als Untergewicht gilt. Ein BMI zwischen 25,0 - 29,9 kg/m² wird als Übergewicht bezeichnet, wobei in diesem Bereich noch von einer Präadipositas gesprochen wird. Erst ein BMI über 30 kg/m² gilt als manifeste Adipositas und wird dabei in drei unterschiedliche Schweregrade klassifiziert. So liegt ab einem BMI von 30 kg/m² eine Adipositas ersten Grades, ab einem BMI von 35 kg/m² eine Adipositas zweiten Grades und ab einem BMI von 40 kg/m² eine Adipositas dritten Grades vor. Im Unterschied zu den Erwachsenen werden für Kinder und Jugendliche unter 18 Jahren die Normwerte für den altersspezifischen BMI aus den jeweiligen Perzentilenkurven ermittelt [2].

Eine weit verbreitete Kritik stellt die Tatsache dar, dass der BMI nur ein indirektes Maß für die Körperfettmasse darstellt und somit beispielsweise auch ein hoher Anteil an Muskelmasse einen erhöhten BMI hervorrufen kann, ohne dass das entscheidende Kriterium einer erhöhten Fettmasse erfüllt ist [2]. Häufig wird daher der BMI als alleinstehendes Diagnosekriterium einer Adipositas als unzureichend angesehen und wird dagegen lediglich als grobe Richtlinie bei der Einschätzung der pathologischen Relevanz des Körpergewichts empfohlen [2].

2.1.2 Epidemiologie

Übergewicht und Adipositas zeigen weltweit steigende Prävalenzen und stellen somit als bedeutende Risikofaktoren für verschiedene Erkrankungen ein zunehmendes gesundheitliches Problem dar.

Zwischen 1975 und 2016 verdreifachte sich die Prävalenz der übergewichtigen Menschen weltweit [3]. Hierbei zeigte sich im internationalen Vergleich, dass Übergewicht und Adipositas im Gegensatz zu früher nicht mehr nur in den Län-

dern mit hohen Einkommen, sondern zunehmend auch in den Ländern mit mittleren und niedrigeren Einkommen an Häufigkeit zunehmen [3]. Weltweit hatten 2016 in der Bevölkerung über 18 Jahren 39 % der Männer und 40 % der Frauen einen BMI über 25 kg/m^2 , davon galten 11 % der Männer und 15 % der Frauen als adipös [3]. Auch in der Bevölkerung zwischen 5 - 19 Jahren zeigte sich geschlechterunabhängig ein Anstieg der Prävalenz eines BMI über 25 kg/m^2 von 4 % im Jahre 1975 auf 18 % im Jahre 2016 [3]. Im gleichen Zeitraum stieg auch die Prävalenz einer Adipositas von anfangs unter 1 % auf 6 % bei Mädchen und 8 % bei Jungen [3]. Ebenso wie in der Gesamtbevölkerung lässt sich eine ähnliche Entwicklung bezüglich des BMI auch unter den schwangeren Frauen beobachten [4]. So stieg die Prävalenz von übergewichtigen schwangeren Frauen im Zeitraum von 2005 bis 2014 insbesondere in Ländern mit mittleren Einkommen auf beispielsweise 22 % in Indien, 33 % in China und über 50 % in Nigeria [4]. Weltweit hatten im Jahre 2014 38,9 Millionen schwangere Frauen einen BMI über 25 kg/m^2 , davon waren 14 Millionen schwangere Frauen adipös [4].

2.1.3 Ursachen

Als Ursache der Adipositas wird ein Ungleichgewicht zwischen einer erhöhten Energieaufnahme und einem verminderten Energieverbrauch angesehen [3]. Begünstigt wird dieses Ungleichgewicht insbesondere durch den mit der Industrialisierung einhergegangenen und in vielen ärmeren Ländern immer noch andauernden tiefgreifenden Wandel der Lebensbedingungen der Menschen [5]. Die Urbanisierung der Lebensräume, der überwiegend sitzende Arbeitsalltag in den meisten Berufen sowie die motorisierten Möglichkeiten von Transport und Mobilität fördern eine verminderte körperliche Aktivität und damit einen verminderten Energieverbrauch [3]. Demgegenüber steht die heutige Ernährungsweise, die überwiegend geprägt ist durch die Aufnahme kalorienreicher Nahrung mit einem hohen Zucker- und Fettgehalt [3].

2.1.4 Westlicher Ernährungsstil

Die menschliche Ernährungsweise unterlag insbesondere innerhalb der letzten sechs Jahrzehnte einem starken Wandel, der auch als „nutrition transition“ [6] bezeichnet wird. Da dieser Wandel zunächst vor allem in den westlichen Ländern mit hohen Einkommen beobachtet wurde, wird der heutige Ernährungsstil

auch als „Western Diet“ [6] bezeichnet. Diese westliche Ernährungsweise ist charakterisiert durch einen hohen Gehalt an gesättigten Fettsäuren, Zucker und verarbeiteten Lebensmitteln sowie einem geringen Gehalt an Ballaststoffen [6]. Es zeigt sich, dass insbesondere der Verbrauch von Speiseöl, kalorienhaltiger Zuckerderivate als Süßungsmittel von beispielsweise Getränken oder verarbeiteten Lebensmitteln sowie der Konsum tierischer Produkte wie Fleisch, Fisch und Milch stark angestiegen ist [6]. Mittlerweile lässt sich diese Entwicklung im Zuge der Modernisierung jedoch auch zunehmend in Ländern mit mittleren und niedrigeren Einkommen feststellen [6]. Als ursächlich für diesen Ernährungswandel werden verschiedene Faktoren wie die Globalisierung und das Wirtschaftswachstum angesehen, die in vielen Ländern im Verlauf zu Wohlstand und höheren Einkommen geführt haben [7]. Auch die modernen Technologien in Bezug auf Landwirtschaft und Lebensmittelindustrie spielen hierbei eine wichtige Rolle, da sie ein starkes Überangebot und neue Verarbeitungsformen von Lebensmitteln ermöglichen [7]. Des Weiteren scheint auch die zunehmende Urbanisierung der Lebensräume sowie die mit dem technischen Fortschritt einhergehenden Veränderungen bezüglich der Gestaltung von Arbeit und Freizeit einen entscheidenden Einfluss auf die Ernährungsweise der Menschen zu haben [7]. Begleitet wird der Ernährungswandel sowohl von einem demographischen als auch von einem epidemiologischen Wandel [8]. So zeigt sich eine Veränderung der demographischen Struktur der Gesellschaft von einer hohen zu einer niedrigen Geburten- und Sterberate und epidemiologisch gesehen treten Infektionskrankheiten durch die verbesserten Lebens- und Hygienebedingungen zunehmend in den Hintergrund [8, 9]. Stattdessen rücken durch die heutzutage höhere Lebenserwartung und durch ernährungsbedingte Faktoren wie Übergewicht und Adipositas chronische und degenerative Erkrankungen in den Vordergrund [9].

2.1.5 Folgen

Der Krankheitswert der Adipositas besteht vor allem darin, dass ein erhöhter BMI einer der Hauptrisikofaktoren für verschiedene nicht übertragbare Erkrankungen darstellt [3]. Dabei zeigt sich eine positive Korrelation zwischen der Höhe des BMIs und dem Erkrankungsrisiko [3]. Insbesondere im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall, verschiedenen Krebsformen wie beispielsweise Endometrium- und Mammakarzi-

nom, Diabetes mellitus Typ 2 und verschiedenen muskuloskelettalen Erkrankungen spielen Übergewicht und Adipositas eine wichtige Rolle [3]. Nicht übertragbare Erkrankungen stellten im Jahr 2018 weltweit die häufigste Todesursache mit 71 % aller Todesfälle dar [10]. Hierbei zählt Adipositas heutzutage hinter Rauchen und Alkoholismus zu den häufigsten vermeidbaren Erkrankungs- und Todesursachen [1].

Auch während der Schwangerschaft sind Übergewicht und Adipositas aktuellen Forschungsergebnissen zu Folge mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität für Mutter und Kind assoziiert [11]. So zeigte sich bei übergewichtigen Schwangeren ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Gestationsdiabetes, einer schwangerschaftsinduzierten Hypertonie sowie einer Präeklampsie [12]. Auch zeigte sich ein erhöhtes Risiko für die Notwendigkeit einer vaginal-operativen Entbindung, einer Schnittentbindung sowie für Wundinfektionen nach Schnittentbindung [13]. Während zudem laut Studien einerseits ein erhöhtes Risiko für eine Frühgeburtlichkeit besteht, zeigen sich andererseits auch häufiger Geburtskomplikationen wie Übertragung, die Notwendigkeit einer Geburtseinleitung oder ein Geburtsstillstand [14-17]. Auch nach der Geburt besteht anscheinend ein erhöhtes Risiko für Komplikationen wie beispielsweise postpartale Blutungen, und insgesamt scheint mütterliches Übergewicht und Adipositas mit einer längeren Hospitalisationsdauer assoziiert zu sein [14, 16, 18].

Für das fetale Outcome zeigte sich, dass ein erhöhter mütterlicher BMI mit einer erhöhten fetalen Mortalität beispielsweise in Form von Aborten oder Totgeburten assoziiert ist [19]. Zusätzlich scheint auch die fetale Morbidität erhöht zu sein, da sich in Studien ein erhöhtes Risiko für verschiedene postpartale fetale Komplikationen und eine erhöhte Rate neonataler Intensivbehandlungen zeigte [14, 16, 18]. Des Weiteren ließ sich ein erhöhtes Risiko für ein abnormes Wachstum des Feten feststellen. Bei einem bereits vor der Schwangerschaft erhöhten BMI über 25 kg/m^2 zeigte sich für die Feten einerseits ein größeres Risiko für ein erhöhtes Geburtsgewicht (über 4000 g) bis hin zu einer fetalen Makrosomie (über 4500 g) sowie für eine Körpergröße über der 90. Perzentilen [20]. Andererseits ließ sich jedoch auch eine positive Korrelation zwischen dem mütterlichen BMI und dem Risiko für eine intrauterine Wachstumsretardierung feststellen [21]. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass durch Mechanismen der perinatalen Programmierung auch die Nachkommen ein erhöhtes Risi-

ko haben im Laufe ihres Lebens eine Adipositas sowie ein metabolisches Syndrom zu entwickeln [20, 22].

2.2 Murine Plazenta

2.2.1. Morphologie und Funktion

Während der Schwangerschaft stellt die Plazenta die essentielle Verbindung zwischen Mutter und Kind dar. Die Versorgung des Kindes und damit das intrauterine Wachstum und Überleben des Fetus hängt entscheidend von der Integrität und Funktion der fetoplazentaren Einheit ab. Die Plazenta stellt mit ihren zahlreichen Transportfunktionen sowohl eine Verbindung als auch eine Barriere gegenüber dem Fetus dar. Als Schlüsselorgan der intrauterinen Versorgung ermöglicht sie einen geregelten Gas-, Hormon- und Nährstoffaustausch, eliminiert fetale Abfallprodukte und schützt den Fetus gleichzeitig vor dem mütterlichen Immunsystem [23].

Obwohl sich die humane Plazenta in ihren histologischen Details und ihrer endokrinen Funktion teilweise von der murinen Plazenta unterscheidet, scheinen die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und Entwicklungsvorgänge von großer Ähnlichkeit zu sein [24]. Histologisch lassen sich hierbei in der reifen murinen Plazenta drei verschiedene Zonen unterscheiden: Den mütterlichen Anteil der Plazenta stellt die Dezidua basalis (DB) dar, welche sich aus dem Endometrium des murinen Uterus entwickelt. Sie vermittelt die Anhaftung der Plazenta an der Uteruswand und enthält ein Netzwerk aus Spiralarterien, welche das mütterliche Blut für den fetomaternalen Stoffaustausch zur Labyrinth-Zone (LZ) der Plazenta führen [25, 26]. Angrenzend befindet sich die Junctional Zone (JZ), welche hauptsächlich die zwei Trophoblastenpopulationen der Spongiotrophoblasten und der Glykogenzellen enthält [27]. Während der Schwangerschaft wird zum einen Glykogen zur Energiegewinnung abgebaut und zum anderen findet gegen Ende der Schwangerschaft eine Migration der Glykogenzellen von der Junctional Zone in die mütterliche Dezidua basalis statt. Insgesamt kommt es somit über die Schwangerschaft hinweg zu einer zunehmenden Verringerung des Gehalts an Glykogenzellen in der Junctional Zone [26]. Zu Beginn der murinen Schwangerschaft wird die Junctional Zone von der Dezidua basalis durch eine zunächst kontinuierliche und im Verlauf zunehmend diskontinuierliche Schicht aus Trophoblast Giant Cells abgegrenzt [25]. Die Junctional Zone

ist für das Überleben des Feten essentiell, ihre genaue Funktion konnte bisher jedoch noch nicht vollständig geklärt werden [28, 29]. Es wird vermutet, dass die Trophoblast Giant Cells zum einen die Invasion der Blastozyste in den murinen Uterus kontrollieren [25]. Zum anderen scheinen sie ebenso wie die Spongiotrophoblasten eine endokrine Funktion zu erfüllen und unter anderem für die Produktion von Wachstumshormonen verantwortlich zu sein, die die plazentare und fetale Entwicklung steuern [26]. Die Glykogenzellen scheinen dagegen als Energiedepot zu dienen, welches bei Mangelzuständen die Versorgung der Plazenta und des Kindes aufrecht erhalten kann [30]. Die Labyrinth-Zone ist die dem Feten nächste Zone und von besonderer Bedeutung, da hier der fetomaternale Stoffaustausch stattfindet [25]. Die fetalen Kapillaren werden dort direkt von mütterlichem Blut umspült, wodurch kurze Diffusionsstrecken entstehen und damit ein effizienter Stoffaustausch ermöglicht wird [25]. Während die fetalen Kapillaren von Endothelzellen ausgekleidet sind, werden die unregelmäßig geformten Räume der maternalen Blutsinuse lediglich von Zytotrophoblasten begrenzt [25]. Hierbei wird die maternale und fetale Blutzirkulation durch die sogenannte „Interhemal Membrane“ [25] voneinander getrennt. Diese wird zum einen durch die Endothelzellen der fetalen Kapillaren und zum anderen durch drei dünne Schichten aus unterschiedlich differenzierten Trophoblasten gebildet [31]. Die erste Schicht, welche in direktem Kontakt zum mütterlichen Blut steht, wird aus mononukleären Zellen eines sinusoidalen Subtyps der Trophoblast Giant Cells gebildet [32]. Ihnen wird insbesondere eine endokrine Funktion zugesprochen [32]. Die zweite und dritte Schicht, wobei letztere an die fetalen Endothelzellen grenzt, bestehen aus fusionierten Trophoblastzellen und bilden damit eine multinukleäre Zellschicht aus Synzytiotrophoblasten [33]. Sie scheinen insbesondere für den Nährstofftransport und zusammen mit den anderen Schichten für die selektive Permeabilität der Interhemal Membrane verantwortlich zu sein [34].

2.2.2 Molekularbiologische Aspekte

2.2.2.1 Endothelzellmarker

Für den geregelten fetomaternalen Stoffaustausch in der Labyrinth-Zone der Plazenta ist die Integrität der Interhemal Membrane und hierbei insbesondere des fetalen Endothels von essentieller Bedeutung [25]. Die fetalen Endothelzellen exprimieren verschiedene teilweise endothelspezifische Proteine, von de-

nen einige in dieser Arbeit untersucht und dabei unter dem Begriff Endothelzellmarker zusammengefasst wurden. Hierzu zählen das Glykoprotein Angiopoetin-1 (Angpt-1), welches über die Bindung an den endothelialen Oberflächenrezeptor TIE-2 eine wichtige Rolle für das Überleben und die Migration der Endothelzellen spielt [35]. Auf zellulärer Ebene fördert es zudem die Interaktion der Endothelzellen mit der umliegenden Matrix und reduziert die endotheliale Permeabilität [36, 37]. Ein weiterer Ligand des TIE-2-Rezeptors stellt das Protein Angiopoetin-2 (Angpt-2) dar, welches kontextabhängig sowohl als Agonist als auch als Antagonist von Angpt-1 fungieren kann [38]. In seiner Funktion als Antagonist trägt Angpt-2 zu einer Destabilisierung der Blutgefäße bei und spielt somit eine wichtige Rolle für das vaskuläre Remodelling und den Abbau von Blutgefäßen [38, 39]. Eine Hemmung der Wirkung von Angpt-1 kann auch durch den endothelialen Oberflächenrezeptor TIE-1 vermittelt werden, indem dieser direkt mit dem TIE-2-Rezeptor interagiert [40]. Ebenso wie Angpt-1 scheint auch das insbesondere von Endothelzellen synthetisierte Protein Apelin eine wichtige Rolle für die Angiogenese während der Embryonalzeit zu spielen [41]. Zudem scheint es in die Regulation des Blutdrucks und des Wasserhaushalts involviert zu sein [42, 43].

Ein weiterer Endothelzellmarker stellt der Von-Willebrand-Faktor (vWF) dar, welcher vor allem von Thrombozyten und Endothelzellen gespeichert und sezerniert wird [44]. Bei Schäden des Endothels vermittelt er im Rahmen der primären Hämostase die Adhäsion von Thrombozyten an die subendotheliale Matrix und stabilisiert im Rahmen der sekundären Hämostase den Gerinnungsfaktor VIII [44].

Ebenfalls zu den Endothelzellmarkern wird im Folgenden das Transmembranprotein CD-31 bzw. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) gezählt. Zusätzlich zu den Endothelzellen wird CD-31 auch auf Zellen des peripheren Blutes wie Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten und einigen T-Zellpopulationen exprimiert [45]. Auch CD-31 scheint eine wichtige Funktion für die Angiogenese und der hiermit verbundenen Migration der Endothelzellen zu erfüllen [46]. In seiner Funktion als Signalmolekül scheint CD-31 neben einem antiapoptotischen und zytoprotektiven Effekt auch an der Signaltransduktion von mechanischen Scherkräften auf die Gefäßwand beteiligt zu sein [46, 47]. Darüber hinaus vermittelt CD-31 über die extrazelluläre Domäne den Zell-Zell-

Kontakt zwischen benachbarten Endothelzellen und spielt damit als Zelladhäsionsmolekül eine wichtige Rolle für die selektive Permeabilität des Endothels [46]. Hierdurch ist CD-31 auch an Entzündungsprozessen beteiligt, wobei es dabei opportunistische Funktionen zu erfüllen scheint. So wirkt es einerseits proinflammatorisch, indem es die Diapedese der Leukozyten aus den Blutgefäßen in das umliegende Gewebe vermittelt [48]. Andererseits scheint CD-31 auch eine antiinflammatorische Wirkung vermitteln zu können, beispielsweise durch eine Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine und durch die Suppression der transendothelialen Zellmigration von Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen [48].

2.2.2.2 Adherens Junction-Marker

Für die Integrität des endothelialen Gewebeverbands und die Regulation der endothelialen Permeabilität spielen die Zell-Zell-Kontakte zwischen den fetalen Endothelzellen eine wichtige Rolle [49]. Diese bestehen aus verschiedenen homophilen Zelladhäsionsmolekülen wie Transmembranproteine und deren assoziierte intrazelluläre Komponenten [50]. Durch eine Konformationsänderung dieser Moleküle können die interzellulären Verbindungen temporär geöffnet werden und eine vermehrte parazelluläre Passierbarkeit insbesondere für zelluläre Blutbestandteile wie Leukozyten ermöglicht werden [51]. Anhand unterschiedlicher beteiligter Moleküle und Funktionen lassen sich unter diesen interzellulären Verbindungen insbesondere Tight Junctions und Adherens Junctions unterscheiden, wobei auch das bereits aufgeführte Protein CD-31 wichtige Zell-Zell-Kontakte vermittelt [46, 49, 51]. Da im Versuch der Fokus auf den Adherens Junctions lag, sollen diese im Folgenden näher betrachtet werden.

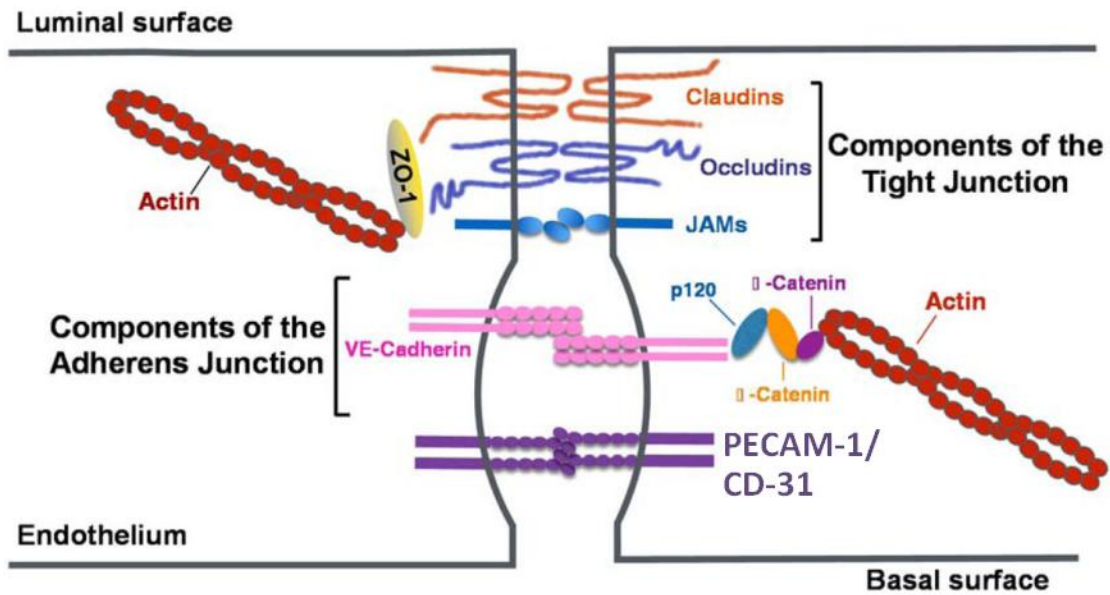


Abbildung 1: Aufbau der Zell-Zell-Kontakte zwischen Endothelzellen

Die Zell-Zell-Kontakte zwischen Endothelzellen bestehen hauptsächlich aus Tight Junctions, Adherens Junctions und den interzellulären Verbindungen durch das Oberflächenprotein PECAM-1/CD-31. Am Aufbau der Tight Junctions sind verschiedene Zelladhäsionsmoleküle wie Claudine, Occludine und Junctional adhesion molecules (JAMs) beteiligt. Adherens Junctions zwischen Endothelzellen bestehen aus dem Zelladhäsionsmolekül Vascular endothelial (VE)-Cadherin, welches über Proteine aus der Gruppe der Catenine mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbunden ist. Auch PECAM-1/CD-31 kann über Catenine Kontakt zum Aktin-Zytoskelett der Endothelzelle aufbauen (hier nicht gezeigt). Abbildung mit der Erlaubnis von Wolters Kluwer Health, Inc. modifiziert nach Lertkiatmongkol et al. und Dejana, E. [46, 49].

Am Aufbau der Adherens Junctions ist insbesondere das Zelladhäsionsmolekül Vascular endothelial (VE)-Cadherin beteiligt, welches zu den Transmembranproteinen aus der Gruppe der Cadherine gehört und bis auf wenige Ausnahmen fast ausschließlich von Endothelzellen exprimiert wird [50, 52]. Neben der Regulation der vaskulären Permeabilität scheint es zudem essentiell für die Ausbildung und Reifung der Blutgefäße in der Embryonalphase und damit unabkömmlich für das Überleben des Organismus zu sein [53, 54]. Darüber hinaus fungiert VE-Cadherin als Signalmolekül, wobei es neben antiapoptotischen und zytoprotektiven Effekten an der Mechanotransduktion von Scherkräften auf die Gefäßwand beteiligt ist und zusätzlich zwischen Zellen in einem stabilen Zellverband eine kontaktinduzierte Wachstumsinhibition bewirken kann [49, 55]. Die zytosolische Domäne von VE-Cadherin ist über verschiedene intrazelluläre Proteine wie beispielsweise das im Versuch ebenfalls untersuchte Protein Beta-Catenin mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbunden [51]. Hierdurch bewirkt VE-Cadherin zusammen mit den intrazellulären Proteinen nicht nur eine Stabilisierung des Zellverbandes, sondern ist auch entscheidend für die zelluläre Morphologie und Polarität [56]. Das Protein Beta-Catenin spielt außerdem

eine wichtige Rolle bei der durch die Adherens Junctions vermittelten Signaltransduktion, indem es nach Translokation in den Zellkern mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagiert und damit die genetische Transkription modifiziert [52]. Hierdurch kann Beta-Catenin eine Induktion des Zellwachstums, eine Modulation der Zelldifferenzierung sowie eine Inhibition der zellulären Apoptose bewirken [49].

2.3 Pathophysiologie mütterlicher Umweltfaktoren während der Schwangerschaft

Die Schwangerschaft stellt aufgrund der hohen Zellteilungsrate, des schnellen Wachstums, der Zelldifferenzierung und der Organentwicklung eine äußerst vulnerable Phase für die kindliche Entwicklung dar [57]. Über verschiedene Mechanismen wie beispielsweise die perinatale Programmierung können daher zahlreiche Umweltfaktoren, die in dieser kritischen Phase auf Mutter und Kind einwirken, sowohl unmittelbar als auch langfristig negative Auswirkungen auf die Entwicklung und die Gesundheit des Kindes haben [57]. Dabei sind als unmittelbare Auswirkungen beispielsweise eine intrauterine Wachstumsretardierung bis hin zu einem intrauterinen Fruchttod zu nennen [58-61]. Als Hinweis auf langfristige Auswirkungen fand sich in epidemiologischen Studien von insbesondere Barker et al. eine positive Korrelation zwischen einem niedrigen Geburtsgewicht beziehungsweise einer hohen Kindersterblichkeit einer Generation und der Sterberate aufgrund einer koronaren Herzerkrankung dieser Generation im späteren Erwachsenenalter [62]. Ebenfalls ließ sich ein Zusammenhang zwischen einem niedrigen Geburtsgewicht und der Entwicklung eines metabolischen Syndroms im späteren Erwachsenenalter feststellen [63-65]. Auf der Grundlage dieser epidemiologischen Zusammenhänge entwickelte sich im weiteren Verlauf die sogenannte Developmental Origins of Health and Disease Hypothese (DOHaD). Laut der DOHaD-Society besagt diese Hypothese ganz Allgemein, dass verschiedene Einflussfaktoren, die während kritischen Entwicklungsphasen auf ein Lebewesen einwirken, über unterschiedliche Mechanismen die Fähigkeit des Organismus beeinflussen mit seinen Umweltbedingungen im späteren Leben umzugehen [66]. So kann beispielsweise die mütterliche Ernährung während der Schwangerschaft im Rahmen der perinatalen Programmierung auf Gen-, Zell-, Gewebe-, Organ- und Systemebene den Stoffwechsel sowie die Struktur und Funktion der fetalen Organe beeinflussen [67]. Diese Ver-

änderungen im Sinne einer physiologischen Anpassung an das perinatale Milieu können im Zusammenhang mit genetischen und weiteren Umweltfaktoren im späteren Leben zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung kardiovaskulärer und metabolischer Erkrankungen im Erwachsenenalter führen [68, 69].

Pathophysiologisch scheint hierbei insbesondere die Plazenta eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Effekte verschiedener Umwelteinflüsse auf den kindlichen Organismus zu spielen [68]. So hat sich gezeigt, dass zahlreiche schädliche Umweltfaktoren während der Schwangerschaft zu morphologischen und funktionellen Veränderungen in der Plazenta führen und damit das intrauterine Umgebungsmilieu des Feten entscheidend beeinflussen [68]. Werden hierbei die physiologischen plazentaren Kompensationsmechanismen eines ungünstigen perinatalen Milieus überschritten, kann dies zu den bereits beschriebenen Auswirkungen auf den kindlichen Organismus führen [68].

Als bedeutende Umwelt- bzw. Einflussfaktoren während der Schwangerschaft sind in diesem Zusammenhang insbesondere mütterliches Übergewicht und die mütterliche Ernährung zu nennen, welche auch im Zentrum dieser Arbeit stehen. Im Folgenden sollen einige bereits bekannte Forschungsergebnisse bezüglich dieser beiden mütterlichen Umweltfaktoren dargelegt werden.

2.3.1 Umweltfaktor mütterliche Adipositas

Humane Studien haben gezeigt, dass eine mütterliche Adipositas während der Schwangerschaft zu den bereits beschriebenen negativen Auswirkungen auf Mutter und Kind führen kann [11]. Die hierbei zugrunde liegenden Pathomechanismen konnten bisher nicht endgültig geklärt werden und sind daher aktuell Gegenstand intensiver Forschung. Im Folgenden soll hierzu eine Hypothese dargelegt werden, deren Fokus auf der pathophysiologischen Rolle der Plazenta liegt und als Grundlage dieser Arbeit zu erachten ist.

Wie bereits beschrieben, zeigte sich in humanen Studien in Zusammenhang mit einer mütterlichen Adipositas unter anderem ein erhöhtes Risiko für Spontanaborte, Totgeburten, eine intrauterine Wachstumsretardierung sowie ein erhöhtes Risiko für eine Frühgeburtlichkeit [14, 15, 19-21]. Hierbei haben Untersuchungen von humanen Plazenten gezeigt, dass die aufgeführten Krankheitsbilder pathophysiologisch anscheinend auf eine gestörte Plazentaentwicklung zurückzuführen sind [58-61]. Insbesondere für eine intrauterine Wachstumsretardierung, welche mit verschiedenen Krankheitsbildern in der Schwangerschaft

einhergeht, konnte als Ursache eine plazentare Dysfunktion nachgewiesen werden [58, 59, 70]. Dies führte zu der Annahme, dass auch die mütterliche Adipositas zu einer plazentaren Dysfunktion führen und durch die kompromittierte fetale Versorgung die genannten fetalen Komplikationen hervorrufen könnte [71]. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass sowohl in humanen Studien als auch in Tierversuchen von unter anderem Appel und Kretschmer et al. unter dem Einfluss einer mütterlichen Adipositas tatsächlich verschiedene morphologische und molekularbiologische Veränderungen der Plazenta nachgewiesen werden konnten [72-78]. Als mutmaßliche Verbindung zwischen einer Adipositas und einer plazentaren Dysfunktion wird dabei unter anderem eine vaskuläre Inflammation der Plazenta diskutiert. Es ist bekannt, dass Fettgewebe als endokrines Organ fungiert und dabei verschiedene proinflammatorische Mediatoren produziert [79, 80]. Die erhöhte Fettmasse im Rahmen einer Adipositas ist mit einer erhöhten Zirkulation dieser proinflammatorischen Mediatoren assoziiert und führt somit zu einem Zustand einer leichten chronischen systemischen Inflammation [79, 81, 82]. Auch die Schwangerschaft ähnelt physiologischerweise dem Zustand einer transienten systemischen Inflammation mit einer Leukozytose sowie erhöhten zirkulierenden proinflammatorischen Mediatoren wie beispielsweise einer erhöhten CRP-Konzentration im Blut [79, 83]. Bei Schwangeren scheint dabei vor allem die Plazenta der Ursprung der verschiedenen proinflammatorischen Mediatoren zu sein [84]. Sowohl im Tierversuch von Kretschmer et al. als auch in humanen Studien ließ sich im Vergleich zu normalgewichtigen Schwangeren bei übergewichtigen Schwangeren eine signifikant erhöhte Zirkulation proinflammatorischer Mediatoren nachweisen. Während hierbei laut Kretschmer et al. der Ursprung der erhöhten proinflammatorischen Mediatoren das mütterliche Fettgewebe zu sein scheint, legen weitere Studien nahe, dass auch die Plazenta selbst bei übergewichtigen Schwangeren mehr proinflammatorische Mediatoren zu produzieren scheint als bei normalgewichtigen Schwangeren [73, 82, 84]. Dabei wird vermutet, dass die vorbestehende chronische Inflammation im Rahmen einer Adipositas zu einer Dysregulation der physiologischen plazentaren Entzündungsreaktion während der Schwangerschaft führt [82]. Diese verstärkte Inflammation scheint dabei negative Auswirkungen insbesondere auf die Entwicklung und Funktion der plazentaren Gefäße zu haben [71, 85, 86]. So hatte sich sowohl in Tierversuchen von

unter anderem Appel und Kretschmer et al. als auch in Untersuchungen an humanen Plazenten gezeigt, dass unter dem Einfluss einer mütterlichen Adipositas insbesondere die vaskulären Strukturen der Plazenta morphologische und molekularbiologische Veränderungen aufwiesen [72-78, 87]. Zusammenfassend lässt sich somit aus den vorliegenden Forschungsergebnissen die Hypothese ableiten, dass unter dem Einfluss einer mütterlichen Adipositas eine vaskuläre Inflammation der Plazenta ausgelöst wird, welche zu einer plazentaren Dysfunktion und damit zu den genannten fetalen Komplikationen führt.

2.3.2 Umweltfaktor mütterliche Ernährung

Neben den Auswirkungen einer Adipositas ist auch der Einfluss der mütterlichen Ernährung während der Schwangerschaft auf das Kind und die Plazenta bereits seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Im Kontext der Mangelernährung in den Entwicklungsländern hatten sich die meisten Untersuchungen zunächst mit einer Unterernährung im Sinne einer energie- und proteinarmer Ernährung während der Schwangerschaft beschäftigt. Im Zuge des bereits beschriebenen Ernährungswandels rückte jedoch zunehmend der Einfluss einer hochkalorischen sowie fett- und zuckerreichen Ernährung während der Schwangerschaft in den Fokus der Untersuchungen.

In Tierversuchen zur Unterernährung in Form einer Kalorien- oder Proteinrestriktion während der Schwangerschaft zeigte sich meist ein übereinstimmendes Ergebnis mit einem zum Zeitpunkt der Geburt reduzierten fetalen und plazentaren Gewicht [68, 88, 89]. Dagegen zeigten sich in Tierversuchen zur Überernährung während der Schwangerschaft starke Diskrepanzen bezüglich der Auswirkungen auf Fetus und Plazenta [68, 90]. So wurden in verschiedenen Tierversuchen mit einem bereits präkonzeptionellen Beginn einer Hochfettdiät sowohl ein erhöhtes, ein unverändertes als auch ein erniedrigtes fetales und plazentares Gewicht an verschiedenen Gestationszeitpunkten beschrieben [68, 72, 76, 87, 91, 92]. Hierbei wird als Ursache für diese diskrepanten Ergebnisse unter anderem die unterschiedliche Nährstoffzusammensetzung der in den Versuchen eingesetzten Interventionsdiäten diskutiert [68, 90]. In bisherigen Versuchen wurden dabei vor allem Hochfettdiäten eingesetzt, wobei neben deren Gesamtfettgehalt auch die Komposition der enthaltenen Fettsäuren eine wichtige Rolle zu spielen scheint [68]. Im Vergleich zu anderen Fettsäuren konnte beispielsweise bei einem hohen Gehalt der gesättigten Fettsäure Palmitinsäure

ein deutlich höheres Risiko für die Entwicklung einer Adipositas und hiermit assoziierter Pathologien nachgewiesen werden [93]. Um im Zuge des Ernährungswandels den westlichen Ernährungsstil des Menschen besser zu imitieren rückt jedoch zunehmend, und so auch in dieser Arbeit, der Einfluss einer durch einen hohen Fett- und Zuckergehalt geprägten mütterlichen Ernährung in den Fokus der Untersuchungen [75].

Als weitere Ursache für die diskrepanten Ergebnisse wird auch der Schweregrad einer bereits präkonzeptionell vorliegenden Adipositas diskutiert [68]. Während das erhöhte Nährstoffangebot im Zuge einer mütterlichen Überernährung einerseits zu einem erhöhten fetalen Gewicht führen kann, ließ sich bei gleichzeitigem Vorliegen einer hochgradigen Adipositas auch ein erhöhtes Risiko für eine fetale Wachstumsrestriktion nachweisen [20, 21, 87, 92]. Somit zeigt sich, dass die beiden Einflussfaktoren einer mütterlichen Überernährung und einer mütterlichen Adipositas teilweise unterschiedliche Effekte auf das fetale Outcome haben können und daher eigentlich gesondert voneinander berücksichtigt werden müssten [68]. Mit diesem Ziel wurde in einigen Versuchen erst postkonzeptionell mit der Nahrungsintervention begonnen, um den Einfluss einer prä-existenten mütterlichen Adipositas und den damit verbundenen Zustand einer chronischen Inflammation zu eliminieren [75, 94-96]. Hierbei ist in der Literatur für Ratten beschrieben worden, dass sich für die Nachkommen von adipösen Weibchen, welche bereits präkonzeptionell eine Hochfettdiät erhielten, ähnliche unmittelbare als auch langfristige Auswirkungen zeigten wie für die Nachkommen von Weibchen, welche eine Hochfettdiät erst postkonzeptionell erhielten [97]. Im Versuch von Janoschek et al. konnte zudem an übergewichtigen Mäusen unter dem Einfluss einer Hochfettdiät nachgewiesen werden, dass eine Umstellung auf eine gesunde mütterliche Ernährung während der Schwangerschaft und Stillzeit die ungünstigen metabolischen Effekte auf das fetale Outcome verhindern konnte [98]. Dies deutet somit daraufhin, dass die mütterliche Ernährung auch unabhängig von einer präkonzeptionell vorliegenden Adipositas einen wesentlichen Einfluss auf die fetale Entwicklung zu haben scheint [68, 97].

Aufgrund des kausalen Zusammenhangs zwischen Überernährung und Adipositas sind diese beiden mütterlichen Umweltfaktoren zwar häufig miteinander vergesellschaftet, dennoch scheinen beide für sich zwei eigenständige bedeu-

tende Einflussfaktoren darzustellen. Daher ist von besonderem Interesse, inwiefern es hierbei zu Wechselwirkungen zwischen der spezifischen Nährstoffkomposition der mütterlichen Überernährung und einer hierdurch induzierten mütterlichen Adipositas in Bezug auf das mütterliche, fetale und plazentare Outcome kommt.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Studien haben gezeigt, dass mütterliches Übergewicht während der Schwangerschaft zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität für Mutter und Kind führen kann, die hierbei zugrunde liegende Pathophysiologie konnte bisher jedoch nicht eindeutig geklärt werden [11]. In dieser Arbeit sollte daher im Mausmodell untersucht werden, welche Rolle die Plazenta bei der Vermittlung des schädlichen Einflusses einer mütterlichen Adipositas auf die Schwangerschaft bzw. das Kind spielen könnte. Hierzu wurden morphologische Aspekte wie die Volumina der verschiedenen plazentaren Zonen sowie das Volumen der Glykogenzellnester und deren Verteilung in der Plazenta berücksichtigt. Zudem wurden die fetalen Kapillaren und die maternalen Blutsinuse morphologisch hinsichtlich ihrer Oberfläche und ihres Volumens sowie molekularbiologisch hinsichtlich der Expression und der Proteinlevel von Endothelzellmarkern und Adherens Junction-Markern untersucht.

In bisherigen Tierversuchen wurde in den meisten Fällen zur Induktion einer mütterlichen Adipositas eine reine Hochfettdiät eingesetzt. Die Menschen der modernen Gesellschaften entwickeln ihre Fettleibigkeit jedoch überwiegend unter dem Einfluss eines westlichen Ernährungsstils, welcher nicht nur reich an Fett, sondern auch reich an Zucker ist [6]. Daher sollte im Tierversuch neben der reinen Hochfettdiät auch eine Hochfett-/Hochzuckerdiät eingesetzt werden, um die menschliche Ernährungsweise besser zu imitieren und damit eine höhere externe Validität des Versuches zu erzielen. Weiteres Ziel dieser Arbeit war daher zu untersuchen, ob und inwiefern sich im Mausmodell unter dem Einfluss einer mütterlichen Adipositas, welche entweder durch eine Hochfett-/Hochzuckerdiät oder durch eine reine Hochfettdiät induziert wurde, ein unterschiedlicher Effekt auf Mutter, Kind und Plazenta zeigt.

Des Weiteren wurden im Tierversuch neben den Interventionsdiäten zwei normokalorische Kontrolldiäten (Standarddiät und Control-Diät) eingesetzt. Hierbei sollte untersucht werden, ob sich diese beiden Diäten in ihrer Eigenschaft als Kontrolldiät als gleichwertig erweisen.

Im Folgenden sind die drei zentralen Fragestellungen der Arbeit zusammengefasst:

1.) Welche Effekte hat eine mütterliche Adipositas im Mausmodell auf die Schwangerschaft und das fetale Outcome und unterscheiden sich diese in Abhängigkeit von der Induktion der Adipositas durch eine Hochfett-/Hochzuckerdiät im Gegensatz zur Induktion durch eine reine Hochfettdiät?

2.) Zeigen sich im Mausmodell morphologische oder molekularbiologische Veränderungen in der Plazenta, welche die zugrunde liegende Pathophysiologie der detektierten schädlichen Effekte einer mütterlichen Adipositas auf das Kind erklären können?

3.) Können die Control-Diät und die Standarddiät in ihrer Eigenschaft als Kontrolldiät als gleichwertig bewertet werden?

Im Vordergrund dieser Arbeit steht somit im Mausmodell zu erforschen, welche pathophysiologische Rolle die Plazenta bei der Vermittlung des schädlichen Einflusses einer durch verschiedene Diäten induzierten mütterlichen Adipositas auf die Feten spielt.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien/Enzyme	Hersteller
5x GoTaq Flexi Reaction Buffer	Promega, Madison/Wisconsin, USA
Acrylamid (30 %) and Bisacrylamid (0.8 %) mix ROTIPHORESE® Gel 30 (37.5:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Albumin Fraktion V, BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat, APS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Antibody Diluent	DAKO Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Diethylpyrocarbonat, DEPC $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
dNTP Mix (10 mM jeweils) für Sex-PCR	Thermo Scientific, Vilnius, Litauen
dNTP Mix (10 mM jeweils) für RT-qPCR	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
Eosin G-Lösung 0,5 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 100 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol $\geq 99,8\%$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat, EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Scientific, Vilnius, Litauen
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland

3. Material und Methoden

GoTaq® DNA Polymerase (5 U/μL)	Promega, Madison/Wisconsin, USA
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega, Mannheim, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff-Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HPLC	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hydrogenchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
ImmPACT DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame/ Kalifornien, USA
Isopropanol ≥ 99.95 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin > 90 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol ≥ 99.8 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid, MgCl ₂ (25 mM)	Promega, Madison/Wisconsin, USA
Midori Green Advance DNA Farbstoff	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT) (200 U/μL)	Promega, Mannheim, Deutschland
M-MLV RT 5X Buffer	Promega, Mannheim, Deutschland
N,N, N', N'-Tetramethylethylendiamin, TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumfluorid, NaF ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid, NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Desoxycholsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat, Na ₃ VO ₄ ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Neo-Clear	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Neo-Mount	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Oligo-dT Primer	Euofins Genomics, Ebersberg, Deutschland

3. Material und Methoden

Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Vilnius, Litauen
Pepstatin A > 75 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Perjodsäure > 99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF \geq 98.5 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phosphate buffered saline, PBS	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA
Platinum qPCR SuperMix-UDG with ROX	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Ponceau S	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K	Thermo Scientific, Vilnius, Litauen
Random Primer	Roche, Basel, Schweiz
RNasin® Ribonuclease Inhibitors (40 U/ μ L)	Promega, Mannheim, Deutschland
RQ1 DNase 10X Reaction Buffer	Promega, Mannheim, Deutschland
RQ1 DNase Stop Solution (20 mM EDTA)	Promega, Mannheim, Deutschland
RQ1 RNase-Free DNase (1 U/ μ L)	Promega, Mannheim, Deutschland
Schiffs Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sea Block Blocking Buffer	Thermo Fisher, Rockford, Illinois, USA
Sodium Dodecyl Sulfate, SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Target Retrieval Solution, Citrat Puffer pH 6	DAKO, Glostrup, Dänemark
TRI Reagent	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TRIS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tabelle 1: Chemikalien und Enzyme

3.1.2 Puffer und Stammlösungen

Puffer/Stammlösung	Zusammensetzung
Lämmli-Puffer (10x) pH 8.3	240 mM Tris 1910 mM Glycin 1 % (m/v) SDS
Modifizierter RIPA-Puffer pH 7,4	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 % (v/v) IGEPAL 0.25 % (v/v) Natrium-Desoxycholat 1 mM EDTA 1 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Pepstatin A 1 µg/ml Leupeptin 1 mM PMSF 1 mM NaF 1 mM NA_3VO_4
Sammelgelpuffer pH 6,8	0,5 M Tris HCl (variabel, pH-abhängig)
Stripping-Puffer pH 6,7	50 mM Tris 2 % (m/v) SDS 100 mM β -Mercaptoethanol
TAE-Puffer pH 8.0	2 M Tris 50 mM EDTA Essigsäure (variabel, pH-abhängig)
Tail Lysis Puffer pH 8.0	100 mM Tris 5 mM EDTA 200 mM NaCl 0.2 % (m/v) SDS
TBST-Puffer pH 7,5	100 mM NaCl 10 mM Tris 0,05 % (v/v) Tween-20
Towbin-Puffer (10x)	250 mM Tris 1,92 M Glycin
Trenngelpuffer pH 8,8	1,5 M Tris HCl (variabel, pH-abhängig)
Western Blot Probenpuffer (5x)	16,4 % (v/v) Sammelgelpuffer 2 % (v/v) SDS 2,6 % (v/v) Bromphenolblau 25 % (v/v) β -Mercaptoethanol 10 % (v/v) Glycerin

Tabelle 2: Puffer und Stammlösungen

3.1.3 Primer

Die im Folgenden aufgeführten Primer wurden mithilfe der Software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) entworfen und von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) hergestellt. Von dieser Arbeitsgruppe bereits an anderer Stelle publiziert wurden die Primer für Beta-Aktin, HPRT, CD-31, Tie-1 und vWF [73], sowie für Beta-Catenin und VE-Cadherin [74] und für GAPDH [99].

	Primer	Sequenz (5'-3')	Ampliconlänge
X-Chromosom	ZFX-L	AACATCCTGAACACCTTGCC	104 bp
	ZFX-R	TAGCTTGTGGCTCTCCAGGT	
Y-Chromosom	YMT/2b_for YMT/2b_rev	CTGGAGCTCTACAGTGATGA CAGTTACCAATCAACACATCA	344 bp

Tabelle 3: Primer Sex PCR

Zielgen	Primer/Sonde	Sequenz (5'-3')
Beta-Catenin	Forward Primer	GGACGTTTCAACCCGGATTG
	Reverse Primer	GGACCCCTGCAGCTACTCTTT
	Taqman Sonde	CCATTGTTTGTGCAGTTGCTTTATTCTCC
CD-31	Forward Primer	AAAGCCAAGGCCAAACAGAA
	Reverse Primer	CCAGAAACATCATCATAACCGTAATG
	Taqman Sonde	AGATGTCCAGGCCAGCTGCTCCACTT
VE-Cadherin	Forward Primer	TGGCCAAAGACCCTGACAAG
	Reverse Primer	TCGGAAGAATTGGCCTCTGT
	Taqman Sonde	CTCAGCGCAGCATCGGGTACTCCAT
vWF	Forward Primer	GGGAGTTTTTTGACATCCATTTG
	Reverse Primer	TACCCAGCCTCGCGTTCTAG
	Taqman Sonde	TGACCAAAGCATCTCCATGCCCTACG

Tabelle 4: Primer und Sonden Taqman RT-qPCR

Zielgen	Primer	Sequenz (5'-3')
Angpt-1	Forward Primer	GGCTGCAAAAACCTTGAGAATTACAT
	Reverse Primer	GGTCTGCTCTGCAGTCTGAGATAA
Angpt-2	Forward Primer	GTCCAACACTACAGGATTCACCTTACAG
	Reverse Primer	GGAACACTTGCAGATGCATTTG
Apelin	Forward Primer	CCCCTTTTAAGTCCTTTGGCATCT
	Reverse Primer	CTCGCTAAAAGTCCCGAAAGTAT
TIE-1	Forward Primer	GCTAAAAGAGTATGCGTCTGAAAATG
	Reverse Primer	GGCCCCAAGAGGTTGATAAT
TIE-2	Forward Primer	GCTCTGGGAGATTGTTAGCTTAGG
	Reverse Primer	CATTAGATCATACACCTCATCATCACA

Tabelle 5: Primer SYBR Green RT-qPCR

Zielgen	Primer/Sonde	Sequenz (5'-3')
GAPDH	Forward Primer	ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	Reverse Primer	TGCCTGCTTCACCACCTTCT
	Taqman Sonde	CCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG
HPRT	Forward Primer	TGGCCATCTGCCTAGTAAAGCT
	Reverse Primer	TAGGCTCATAGTGCAAATCAAAAGTC
	Taqman Sonde	TTTTTAGAAATGTCAGTTGCTGCGTCCCC
Beta-Aktin	Forward Primer	TGACAGGATGCAGAAGGAGATTACT
	Reverse Primer	GCCACCGATCCACACAGAGT
	Taqman Sonde	ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC

Tabelle 6: Primer und Sonden für Abgleichgene von Taqman und SYBR Green RT-qPCR

3.1.4 Antikörper

Die im Folgenden aufgeführten Antikörper stammen von den Herstellern Abcam (Cambridge, UK), Cell Signaling (Danvers/Massachusetts, USA) oder ZytoMed Systems (Berlin, Deutschland).

Erstantikörper	Spezies	Quelle	MW [kDa] Zielprotein	Verdünnung (Medium)	Verwendung
Anti-VE-Cadherin	Kaninchen	Abcam (33168)	115	1:1000 (5 % Milch in TBST)	Western Blot
Anti-CD-31	Kaninchen	Abcam (28364)	110 - 120	1:500 (5 % Milch in TBST) 1:400 (Antibody Diluent DAKO)	Western Blot IHC
Anti-HPRT	Kaninchen	Abcam (10479)	24	1:2000 (5 % Milch in TBST)	Western Blot
Zweitantikörper	Spezies	Quelle	Verdünnung (Medium)		Verwendung
Anti-Kaninchen-IgG (HRP-konjugiert)	Ziege	Cell Signaling (7074)	Anti-VE-Cadherin/ Anti-CD-31: 1:2000	Anti-HPRT: 1:3000	Western Blot
				(5 % Milch in TBST)	
ZytoChem Plus HRP One-Step Polymer (Anti-Maus/ Anti-Kaninchen/ Anti-Ratte, HRP-konjugiert)		ZytoMed Systems			IHC

Tabelle 7: Erst- und Zweitantikörper

MW, Molecular Weight. IHC, Immunhistochemie

3.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
BioDocAnalyze	Biometra, Jena, Deutschland
ChemiDoc™ XRS+-Imager	Bio-Rad, München, Deutschland
Dampfgarer	BRAUN, Kronberg im Taunus, Deutschland
Folienschweißgerät	Severin, Sundern, Deutschland
Gewebeinfiltrationsautomat ASP300	Leica, Wetzlar, Deutschland
Heizblock Thermostat	HLC- Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland
Heizplatte	VWR, Darmstadt, Deutschland
Histoscanner SCN400	Leica, Wetzlar, Deutschland
Homogenisator (Sonopuls SH 70 G)	Bandelin, Berlin, Deutschland
Kühlplatte EG1150 C	Leica, Wetzlar, Deutschland
Laborwaage	Precisa, Dietikon, Schweiz
Magnetrührer	IKA, Staufen, Deutschland
Midi Plus Elektrophorese-Kammer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mikrowelle	Severin, Sundern, Deutschland
Mini-Zentrifuge	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nano Quant Infinite M200 Pro	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Nano Quant Plate™	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Paraffinausgießstation EG1150 H	Leica, Wetzlar, Deutschland
Paraffin-Streckbad TFB 45	Medite, Burgdorf, Deutschland
Pipettierhilfe	VWR, Darmstadt, Deutschland
Plate Heat Sealer	4titude Ltd., Berlin, Deutschland
Plattenzentrifuge Rotina 420R	Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Plattformschüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland

3. Material und Methoden

Rotationsmikrotom RM2255	Leica, Wetzlar, Deutschland
Schwingmühle MM 400	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
Semi-Dry-Blotting System	Peqlab/VWR, Erlangen, Deutschland
Spannungsquelle	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfort, UK Peqlab/VWR, Erlangen, Deutschland
Taqman 7500	AppliedBiosystems, Life Technologies GmbH, Deutschland
Thermocycler	Biometra, Jena, Deutschland
Trockenschrank	WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland
Vertikales Gelelektrophorese-System	Peqlab/VWR, Erlangen, Deutschland
Vortexer	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5224R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 8: Geräte

3.1.6 Software

Software	Hersteller
7500 Software v2.0.6	AppliedBiosystems, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
BioDocAnalyze Live	Biometra, Jena, Deutschland
Endnote Version X8.2	Clarivate Analytics, Boston/Massachusetts, USA
GraphPad Prism Version 7	La Jolla, Kalifornien, USA
ImageJ-Fiji Version 2011	National Institutes of Health, Bethesda/Maryland, USA
ImageLab™ v5.2.1	Bio-Rad, München, Deutschland
ImageScope Version 12.2.2.5015	Leica, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond/Washington, USA

NormFinder Excel Add-In v0.953	Department of Molecular Medicine (MOMA), Aarhus University Hospital, Aarhus, Dänemark
Primer Express 3.0	AppliedBiosystems, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tecan i-control 2.0	Tecan, Crailsheim, Deutschland

Tabelle 9: Software

3.2 Tierversuch

3.2.1 Futter-Diäten

Im Tierversuch wurden fünf verschiedene Futter-Diäten eingesetzt, die aus der Herstellung der Firmen Ssniff (Soest, Deutschland) oder Altromin (Lage, Deutschland) stammten. Die inhaltliche Zusammensetzung der verschiedenen Diäten ist der *Tabelle 10* zu entnehmen.

Die Standarddiät (SD) ist das standardmäßig in der dezentralen Tierhaltung der Uniklinik Köln eingesetzte normokalorische Haltungsfutter und diente im Versuch als Diät für die Kontrollgruppe. Bei dieser Diät sind jedoch produktionsbedingt nur grobe Angaben vom Hersteller bezüglich der inhaltlichen Zusammensetzung aus den einzelnen Nährstoffen erhältlich. Aufgrund der Überlegung in folgenden Tierversuchen eine Kontrolldiät mit präziseren Angaben bezüglich der Inhaltsstoffe einzusetzen, sollte im Versuch die Control-Diät (CO-Diät) als weitere normokalorische Kontrolldiät ausgetestet werden. Diese zeichnet sich durch eine genaue gewichtsbezogene Angabe der Inhaltsstoffe aus und wird vom Hersteller als Kontrolldiät zur Western diet-butter fat (WSD) angeboten. Hierbei sollte untersucht werden, ob sich im Tierversuch eine Gleichwertigkeit der beiden Kontrolldiäten feststellen lässt und damit in folgenden Tierversuchen in der Kontrollgruppe anstatt der SD die CO-Diät eingesetzt werden kann.

Hersteller	Ssniff	Ssniff	Altromin	Ssniff	Ssniff
Bezeichnung	Standard-Diät	Control-Diät	Hochfett-Diät	Diet induced obesity- 45 kJ % fat (Lard)	Western diet-butter fat
Abkürzung	SD	CO	HFD	DIO	WSD
	R/M-H	E15720-04	Mod. C1057	E15744-344	E15775-34
Metab. Energie [kcal/kg]	3225	3750	5237	4615	4595
Metab. Energie [MJ/kg]	13,5	15,70	21,9	19,30	19,20
Fett [kJ %]	9	13	60	45	43
Protein [kJ %]	24	18	16	20	15
Kohlenhydrate [kJ %]	67	69	24	35	42
Fett [g/kg]	33	51	351	236	220
Protein [g/kg]	190	173	208	220	173
Kohlenhydrate [g/kg]	413	639	417	387	470,8
Zucker [g/kg]	54	110	121	211	344

Tabelle 10: Nährwerte der verschiedenen Futterdiäten

Angabe des Energiegehalts sowie des Gehalts einiger ausgewählter Nährstoffe der verschiedenen Futterdiäten.
Metabol. Energie; Metabolisierbare Energie.

Als Interventionsdiäten wurden die Hochfettdiät (HFD), die Diet induced obesity-45 kJ % fat (Lard) (DIO) und die Western diet-butter fat (WSD) eingesetzt. Die HFD zeichnet sich mit 21,9 MJ/kg durch den höchsten metabolisierbaren Energiegehalt und mit 351 g/kg durch den höchsten Fettgehalt unter den drei Interventionsdiäten aus. Dagegen enthält sie jedoch mit 121 g/kg weniger Zucker als die beiden anderen Interventionsdiäten. In dieser Arbeit liegt dem Begriff Zucker die Definition der WHO zugrunde, wonach hierunter Polyole sowie die für diese Arbeit relevanten Monosaccharide und Disaccharide zusammengefasst werden. Zucker stellt neben den Oligo- und Polysacchariden eine der drei Untergruppen der Kohlenhydrate dar [100].

Die DIO und WSD zählen zu den sogenannten Western Style Diäten, welche sich im Gegensatz zur HFD nicht nur durch einen hohen Fettgehalt, sondern auch durch einen hohen Zuckergehalt auszeichnen. Hiermit soll eine bessere Simulation des in den Industrie- und zunehmend auch in den Entwicklungsländern vorherrschenden Ernährungsstils erzielt werden, für den besonders die Kombination aus einem hohen Fett- und Zuckergehalt charakteristisch ist. Während die beiden Western Style Diäten einen etwa gleich hohen metabolisierbaren Energie- und Fettgehalt haben, zeichnet sich die WSD mit 344 g/kg durch einen noch höheren Zuckergehalt als die DIO mit 211 g/kg aus.

Anhand der drei verschiedenen Interventionsdiäten sollte untersucht werden, ob sich die Auswirkungen einer mütterlichen Adipositas auf die Schwangerschaft dahingehend unterscheiden, ob sie durch eine hochkalorische Ernährung mit einem hohen Fett- und Zuckergehalt oder durch einen hohen Fettgehalt allein induziert wurde.

3.2.2 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Unter den bereits an anderer Stelle von dieser Arbeitsgruppe beschriebenen Haltungsbedingungen fanden alle Versuche an C57BL6/N-Wildtyp-Mäusen der französischen Firma Janvier Labs statt [101]. Die Tiere wurden ab einem Alter von drei Wochen in der Tierhaltung der Pharmakologie der Uniklinik Köln untergebracht. Hier erfolgte die Haltung der Tiere bei einer kontrollierten Umgebungstemperatur von 22 +/- 2 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 - 60 %. Der zirkadiane Rhythmus der Tiere wurde durch einen Hell-Dunkelzyklus von jeweils 12 Stunden mit einem Wechsel der Lichtverhältnisse um 6 und 18 Uhr gesteuert. Während der gesamten Versuchsdauer erhielten die Tiere Futter und

Wasser ad libitum. Die Weibchen wurden über den kompletten Versuch mindestens zu zweit bis maximal zu dritt in einem Käfig gehalten. Dahingegen konnten die Männchen nur bis zur Verpaarung zu mehreren (max. 5 Tiere/Käfig) in einem Käfig gehalten werden, anschließend war verhaltensbedingt nur noch eine Einzelhaltung möglich.

3.2.3 Versuchsaufbau

Im Versuch sollte der Einfluss einer durch unterschiedliche Diäten induzierten mütterlichen Adipositas auf den Fetus und die Plazenta im Rahmen einer Schwangerschaft untersucht werden. Hierzu sollte mithilfe der drei verschiedenen Interventionsdiäten ab einem Alter von drei Wochen bis zur Verpaarung im Alter von 12 - 19 Wochen eine mütterliche Adipositas induziert werden. Anschließend wurde die jeweilige Diät auch während der Verpaarung und der darauffolgenden Schwangerschaft und Stillzeit fortgeführt, um den Einfluss der unterschiedlichen Ernährungsbedingungen beizubehalten.

Zu Beginn erfolgte eine zufällige Aufteilung der drei Wochen alten weiblichen Mäuse in die fünf verschiedenen Futtergruppen, die über die gesamte Versuchsdauer hinweg eine der fünf unterschiedlichen Diäten erhielten. In der vierten Woche erhielten die Weibchen zunächst noch weiterhin das Standardfutter aus der vorangegangenen Haltung, wobei die spezifische Diät der jeweiligen Futtergruppe ergänzend zugefüttert wurde. Ab dem Beginn der fünften Woche erhielten die Weibchen dann jedoch über den gesamten Versuch hinweg ausschließlich die Diät ihrer jeweiligen Futtergruppe. Die Verpaarung der Weibchen fand in einem Alter von 12 - 19 Wochen statt. Um nach erfolgreicher Verpaarung den Gestationstag der schwangeren Weibchen möglichst exakt bestimmen zu können, betrug die Verpaarungszeit maximal 24 Stunden. Die Männchen hatten nur innerhalb der 24 Stunden der Verpaarung Zugang zur jeweiligen Diät der Futtergruppe des Weibchens und erhielten ansonsten über die gesamte Versuchsdauer hinweg das gleiche Standardfutter.

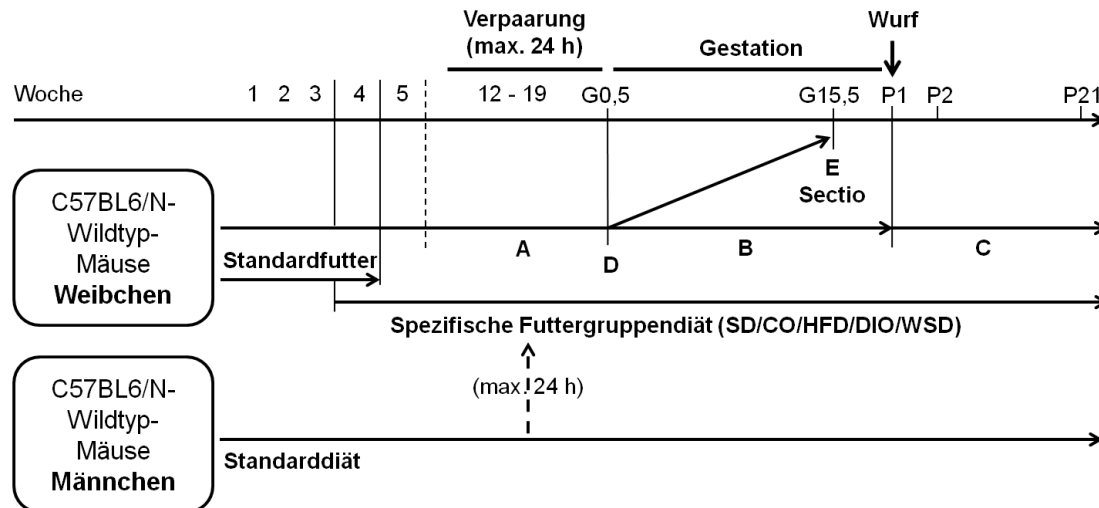
Um die Nahrungs- und Wasseraufnahme der Mäuse in den unterschiedlichen Futtergruppen zu erfassen, wurden nach der Verpaarung repräsentativ für jede Futtergruppe einige Weibchen für die gesamte Gestationsdauer in Einzelhaltung gesetzt. Durch tägliches Wiegen der hierbei eingesetzten tropffreien Trinkflaschen und speziellen Futterraufen konnten damit quantitative Daten über die Aufnahme von Nahrung und Wasser der tragenden Weibchen generiert wer-

den.

Die Feststellung einer Schwangerschaft erfolgte durch die Beobachtung der Gewichtsentwicklung der Weibchen. Hierzu wurde deren Gewicht am Tag der Verpaarung und zu einem Zeitpunkt zwischen 12 und 15 Tagen nach der Verpaarung erfasst. Bei einer adäquaten Gewichtszunahme von mehr als zwei Gramm wurde eine Schwangerschaft des Weibchens angenommen. Konnte nach der Verpaarung keine Schwangerschaft festgestellt werden, wurden die Weibchen in der Regel zwei- bis dreimal bzw. in seltenen Fällen bis zu maximal fünfmal erneut verpaart. Hierbei erfolgte die Erfassung der Trächtigkeitsrate der Weibchen in den verschiedenen Futtergruppen. Da alle tragenden Weibchen entweder noch während der Schwangerschaft oder spätestens nach dem Absetzen der Jungtiere an P21 getötet wurden, war dabei maximal ein Wurf pro Weibchen möglich. Von den tragenden Weibchen trug ein Teil die Schwangerschaft aus, wobei von allen die Gestationsdauer und von einigen repräsentativ für die jeweilige Futtergruppe die Nahrungs- und Wasseraufnahme der Weibchen erfasst wurde. Zudem wurde von den Nachkommen dieser Weibchen der Anteil der lebenden Nachkommen am Tag der Geburt (P1) sowie die Überlebensrate bis Tag 2 (P2) und bis Tag 21 (P21) nach der Geburt ermittelt. Da der Anteil der lebenden Nachkommen an P1 erst mehrere Stunden nach der Geburt erfasst wurde, war bei den toten Nachkommen an P1 keine Differenzierung zwischen einer Totgeburt und einer Lebendgeburt mit innerhalb dieses Zeitfensters eingetretenem Tod möglich. Zusätzlich wurde von den lebenden Nachkommen an P2 das Körpergewicht ermittelt.

Der andere Teil der tragenden Mäuse wurde an Gestationstag 15,5 euthanasiert und anschließend, wie an anderer Stelle von dieser Arbeitsgruppe bereits beschrieben, präpariert [73]. Hierzu wurde den Mäusen 30 Minuten vor der Tötung 0,1 mg/kg KG Buprenorphin s.c. gespritzt, bevor sie anschließend in CO₂-Narkose euthanasiert wurden. Nach der Erfassung von Körpergewicht und Körperlänge wurde bei der anschließenden Präparation der Mäuse zunächst die Bauchhöhle eröffnet und der Uterus entnommen. Nach Eröffnung des Uterus wurden die Feten aus den Fruchtblasen extrahiert und unmittelbar darauf dekapitiert. Hierbei erfolgte die Erfassung der fetalen Gewichte, der Wurfgröße und der Anzahl resorbierter Feten sowie die Asservierung der fetalen Schwanzspitzen und deren weitere Aufbewahrung bei -80 °C für die spätere Genotypisie-

nung des fetalen Geschlechts. Anschließend wurden die Plazenten aus dem Uterus entnommen. Von Plazenten bzw. Plazentahälften, welche für molekulargenetische und proteinbiochemische Analysen vorgesehen waren, wurden Fruchtblase, Eihäute und Nabelschnur abpräpariert und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Hierbei wurde von einer ganzen Plazenta nach Abpräparation des anhängenden Gewebes das Gewicht erfasst. An Plazenten, welche für histologische Analysen vorgesehen waren, wurden dagegen Fruchtblase, Eihäute und Nabelschnur anhängend belassen. Für die histologischen Analysen wurden diese Plazenten entweder in 4 % PFA fixiert und in Paraffin eingebettet oder nativ in Cryo-Medium auf Trockeneis eingefroren und anschließend ebenfalls bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.



Erfasste Parameter:

- A: Trächtigkeitsrate
- B: Gestationsdauer, tägliche Nahrungs- und Wasseraufnahme
- C: Anteil der lebenden Nachkommen an P1 und Überlebensrate der Nachkommen bis P2 und P21
Körpergewicht der Nachkommen an P2
- D: Gestationstag 0,5: Mütterliches Körpergewicht
- E: Gestationstag 15,5: - Mütterliches Körpergewicht und BMI
 - Feten: Wurfgröße, Resorptionsrate, Gewicht, Geschlechterverhältnis
 - Plazenta: Gewicht, Effizienz, morphologische und molekularbiologische Untersuchungen

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Tierversuchs

Ab einem Alter von drei Wochen wurden die weiblichen C57BL6/N-Wildtyp-Mäuse zufällig einer der fünf Futtergruppen zugewiesen und erhielten für den Rest des Versuchs die spezifische Futtergruppendiät. Nach der Verpaarung und dem Eintritt einer Schwangerschaft wurde zufällig ausgewählt, welche Weibchen die Schwangerschaft austragen durften und welche stattdessen an Gestationstag 15,5 zur Organasservierung und Erfassung der angegebenen phänotypischen Parameter euthanasiert wurden. G, Gestationstag; P, Postnataler Tag.

3.3 Histologische Methoden

3.3.1 Theorie der Stereologie

Die histologische Aufarbeitung von Geweben ermöglicht es, durch ein zweidimensionales Schnittbild einen Einblick in das Innere eines Organs zu erhalten. Da hierbei die strukturelle Zusammensetzung des Organs weitestgehend erhalten bleibt, lassen sich mit wenigen Schnitten vor allem qualitative Aussagen über Struktur und Integrität eines Organs treffen [102]. Die Stereologie stellt in der Histologie einen etablierten Ansatz dar, mit dem darüber hinaus auch quantitative Aussagen über dreidimensionale Größen aus den zweidimensionalen Schnittbildern des untersuchten Organs generiert werden können [102]. Dem zugrunde liegt die Annahme, dass zufällig ausgewählte zweidimensionale Schnitte eines Organs als repräsentativ für das gesamte Organ angesehen werden können. Diese Annahme wiederum erlaubt, dass quantitative Daten, welche an den zweidimensionalen Schnitten erhoben wurden, auf das gesamte Organ hochgerechnet werden können [102]. Hierbei werden zwei unterschiedliche Ansätze unterschieden: die Modell-basierte Stereologie und die Design-basierte Stereologie [103]. Bei der Modell-basierten Stereologie wird von einem homogenen Objekt ausgegangen, dessen strukturelle Zusammensetzung in jedem Teil des Objekts rein zufällig ist. In diesem Fall ist es für die Objektivität der Analyse nicht von Bedeutung, von welchen Positionen im Objekt die zweidimensionalen Schnitte gewonnen werden, da sich die Zufälligkeit der quantitativen Informationen der Schnittbilder schon aufgrund der zufälligen strukturellen Zusammensetzung des Objekts ergibt. Bei dem Design-basierten Ansatz hingegen wird von einem inhomogenen Objekt ausgegangen, dessen strukturelle Zusammensetzung einer spezifischen Organisation unterliegt und daher nicht rein zufällig ist. In diesem Fall ist es daher unbedingt notwendig, dass die analysierten zweidimensionalen Schnitte von rein zufälligen Positionen im Objekt stammen, um dessen strukturelle Zusammensetzung adäquat zu repräsentieren und eine Verfälschung der gewonnenen quantitativen Informationen zu vermeiden [103].

Die folgenden stereologischen Untersuchungen der Plazenten wurden in der Annahme einer inhomogenen strukturellen Zusammensetzung nach dem Design-basierten Ansatz durchgeführt. Daher musste eine ausreichend große Anzahl von zufällig ausgewählten Schnitten über das gesamte Organ hinweg ana-

lysiert werden. Hierfür wurde vor der histologischen Aufarbeitung der Plazenten anhand einer systematischen zufälligen Stichprobenauswahl bestimmt, welche Schnitte zur weiteren Analyse asserviert werden sollten. Bei einer systematischen zufälligen Stichprobenauswahl liegt zwar zwischen den einzelnen Stichproben ein festgelegtes Schnittintervall, der erste analysierte Schnitt wird jedoch zufällig bestimmt. Dadurch ist auch die Zufälligkeit für alle weiteren Schnitte gegeben und gleichzeitig wird durch das festgelegte Schnittintervall gesichert, dass mit der Stichprobenauswahl alle Bereiche des Organs gleichermaßen erfasst werden. Damit die Schnitte nicht nur in Bezug auf den Bereich der Plazenta sondern auch in allen drei Ebenen zufällig bzw. isotrop sind, war es zudem erforderlich, dass die Plazenta in einem zufälligen Winkel an- bzw. zerschnitten wurde [102].

Im Rahmen der anschließenden bioinformatischen Analyse wurden die gewonnenen Schnittbilder mit einem Grid versehen. Anhand der Anzahl der Schnittpunkte des Grids mit der untersuchten Struktur kann die gesuchte quantitative Größe der untersuchten Struktur ermittelt werden. Hierbei muss die Summe aus der Dimension der gesuchten Größe und der mathematischen Einheit des Grids stets drei ergeben. So werden bei der Ermittlung eines Volumens Punkte und bei der Ermittlung einer Oberfläche Linien als Grid verwendet. Auch hierbei ist von Bedeutung, dass das Grid in einer zufälligen Anordnung über die Schnittbilder gelegt wird, um die Objektivität der Analyse zu gewährleisten [102].

Da in der Stereologie stets nur ein kleiner Teil einer großen Gesamtheit analysiert wird, ergibt sich aus der Analyse der Schnittbilder stets ein Schätzwert der Größe der untersuchten Struktur (Y) bezogen auf eine Volumeneinheit eines Gesamt- bzw. Referenzvolumens $V(\mathit{ref})$. Dieser ermittelte Schätzwert wird als Dichte bezeichnet, wobei diese im Falle von Oberflächen (S) als Oberflächendichte (S_V) und im Falle von Volumina (V) als Volumendichte (V_V) bezeichnet wird [102]:

$$S_V(Y, \mathit{ref}) = \frac{S(Y)}{V(\mathit{ref})} \quad (1)$$

$$V_V(Y, \mathit{ref}) = \frac{V(Y)}{V(\mathit{ref})} \quad (2)$$

Bei der Berechnung der Volumendichte wird vorausgesetzt, dass das Verhältnis der in den Schnitten analysierten Fläche der untersuchten Struktur $A(Y)$ zur

Fläche der Referenzstruktur $A(\mathit{ref})$ identisch ist zum Verhältnis derer Volumina. Da die Flächen auf den einzelnen Schnitten anhand eines Grids aus Punkten ermittelt werden, gilt dies ebenfalls für das Verhältnis zwischen der Anzahl der Punkte auf der untersuchten Struktur $P(Y)$ und der Anzahl der Punkte auf der Referenzstruktur $P(\mathit{ref})$. Dies lässt sich anhand folgender Formel beschreiben [102]:

$$\frac{V(Y)}{V(\mathit{ref})} = \frac{A(Y)}{A(\mathit{ref})} = \frac{P(Y)}{P(\mathit{ref})} \quad (3)$$

Während die Dichte der untersuchten Struktur aus den histologischen Schnitten ermittelt werden kann, zeigt sich anhand der Formeln, dass für die Bestimmung der absoluten Größe der untersuchten Struktur zusätzlich die Bestimmung des Referenzvolumens $V(\mathit{ref})$ notwendig ist. Hierfür wird häufig die Methode nach Cavalieri angewendet. Das untersuchte Objekt wird dabei komplett in systematisch randomisierte Schnitte zerlegt und in einem konstanten Abstand von T wird ein Schnitt asserviert. Mithilfe eines Grids aus Punkten wird die Fläche A der Referenzstruktur auf den einzelnen Schnitten bestimmt und mit dem Abstand T multipliziert. Aus der Summe dieser Produkte ergibt sich das Volumen V der Referenzstruktur. Die folgende Formel beschreibt das Vorgehen [102]:

$$V = (T \times A_1) + (T \times A_2) + (T \times A_m) = T \times \sum_{i=1}^m A_i \quad (4)$$

Die Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Peter Zentis aus der Imaging Core Facility des CECAD (Köln, Deutschland).

3.3.2 Einbetten und Schneiden

Nach der Organentnahme wurden die Plazenten im Ganzen zur Fixierung für 24 Stunden bei 4 °C in Paraformaldehyd (PFA) 4 % eingelegt und anschließend bis zur Einbettung in Isopropanol 70 % gelagert. Im Rahmen des Einbettens erfolgte die Entwässerung und anschließende Gewebeeinfiltration der Plazenten mit Paraffin mithilfe des Gewebeeinfiltrationsautomaten ASP300. Daraufhin wurden die Plazenten mithilfe der Paraffinausgießstation EG1150 H in toto in Paraffin eingeblockt.

In Anlehnung an die bereits an anderer Stelle von Kretschmer et al. beschriebene Methode erfolgte die stereologische Aufarbeitung der Plazenten [73]. Hierzu wurden mit dem Rotationsmikrotoms RM2255 7 µm dicke Schnitte der

Plazenten angefertigt. Die Plazenten wurden dabei in einem zufälligen Winkel angeschnitten, um die Isotropie der Schnitte als Bedingung für die stereologische Analyse zu gewährleisten. Um den Durchmesser der Plazenta bestimmen zu können, wurden die Plazenten vollständig zerschnitten und die Gesamtanzahl der Schnitte mit der Schnittdicke multipliziert. Für die drei unterschiedlichen Färbungen wurden drei Schnittserien erstellt, wobei innerhalb einer Schnittserie exakt 40 Schnitte bzw. ein Abstand von 280 µm zwischen den für die Färbungen asservierten Schnitten bestand. Zwischen dem 1. und dem 40. Schnitt wurde zufällig der erste Schnitt der ersten Schnittserie bestimmt. Um mit den drei Schnittserien möglichst alle Bereiche der Plazenta zu erfassen, wurde ein möglichst gleichmäßiges Intervall zwischen den Schnittserien gewählt. So wurde der erste Schnitt der zweiten bzw. der dritten Schnittserie mit einem Abstand von 15 Schnitten (105 µm) bzw. 30 Schnitten (210 µm) zum ersten Schnitt der ersten Schnittserie gewählt. So ergaben sich beispielsweise für die erste Schnittserie die Schnittnummern 5, 45, 85, etc., für die zweite Schnittserie die Schnittnummern 20, 60, 100, etc. und für die dritte Schnittserie die Schnittnummern 35, 75, 115, etc. Die nach diesen Vorgaben ausgewählten Schnitte wurden mithilfe eines Paraffin-Streckbads TFB 45 auf Objektträgern (Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA) asserviert und zunächst über Nacht bei 37 °C im Trockenschrank getrocknet und danach bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

3.3.3 HE-Färbung

Zur histologischen Darstellung der verschiedenen Zonen der Plazenta wurde von einer Schnittserie eine nach Avwioro modifizierte Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefertigt [104]. Der Farbstoff Hämalaun sauer nach Mayer färbt DNA und damit Zellkerne blau-violett an und der Farbstoff Eosin G färbt das Eiweiß von Zytoplasma und extrazellulärer Matrix rosa an [105].

Zu Beginn wurden beide Farbstoffe filtriert, wobei das Eosin G 0,5 % wässrig anschließend mit einem Tropfen Eisessig pro 100 ml Farbstoff versetzt wurde. Zur Entparaffinierung wurden die histologischen Schnitte zunächst über Nacht und anschließend für zweimal zehn Minuten mit Neo-Clear entparaffiniert. Da die verwendeten Farbstoffe wasserlöslicher Natur sind, erfolgte anschließend die Rehydrierung der Schnitte mit einer absteigenden Alkoholreihe aus 100 %-, 96 %-, 80 %- und 70 %-Ethanol für jeweils eine Minute. Nach einer Minute in

VE-Wasser erfolgte für vier Minuten die Färbung mit der Hämalaunlösung sauer nach Mayer. Nach kurzem Spülen in VE-Wasser wurden die Schnitte für fünf Minuten in kaltem Leitungswasser gebläut und danach erneut kurz in VE-Wasser gegeben. Anschließend wurden die Schnitte für zwei Minuten in Eosin G 0,5 % wässrig gefärbt und danach zweimal kurz in VE-Wasser gespült. Da das verwendete Eindeckmedium auf organischer Basis beruhte, erfolgte anschließend die Dehydrierung der Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe aus 70 %-, 80 %-, 96 %- und 100 %-Ethanol für jeweils eine Minute. Anschließend wurden die Schnitte für zweimal fünf Minuten mit Neo-Clear versetzt, bevor das Eindecken der histologischen Präparate mit dem Eindeckmedium Neo-Mount erfolgte. Die eingedeckten Präparate trockneten für eine Nacht bei Raumtemperatur.

3.3.4 PAS-Färbung

Zur histologischen Darstellung der Glykogenzellen wurde von einer Schnittserie mithilfe von Perjodsäure und Schiffs Reagenz eine nach McManus modifizierte Periodic acid-Schiff reaction (PAS)-Färbung angefertigt [106]. Hierbei stellen sich Polysaccharide wie Glykogen, Glykoproteine, Glykolipide und Muzine rosa bis magenta dar [105]. Als Gegenfärbung erfolgte die Anfärbung der Zellkerne in blau-violett mit Hämalaunlösung sauer nach Mayer.

Zunächst erfolgte analog zum Protokoll der HE-Färbung die Entparaffinierung der histologischen Schnitte mit Neo-Clear und die Rehydrierung mit einer absteigenden Alkoholreihe und VE-Wasser. Anschließend wurden die Schnitte für zehn Minuten mit Perjodsäure 1 % (1 g Perjodsäure in 100 ml VE-Wasser) versetzt. Es folgten zweimal fünf Minuten in Leitungswasser und zweimal zwei Minuten in VE-Wasser. Daraufhin wurden die Schnitte für 10 - 15 Minuten mit Schiffs-Reagenz versetzt, bevor eine Inkubation für fünf Minuten in warmem Leitungswasser bei 42 °C im Trockenschrank erfolgte. Nach einer Minute in VE-Wasser erfolgte für zwei Minuten die Gegenfärbung mit zuvor filtrierter und verdünnter Hämalaunlösung sauer nach Mayer (1:1 mit VE-Wasser verdünnt). Anschließend wurden die Schnitte für sechs Minuten in kaltem Leitungswasser gebläut und für eine Minute mit VE-Wasser versetzt. Analog zur HE-Färbung folgte die Dehydrierung der Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Zugabe von Neo-Clear für zweimal fünf Minuten. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Neo-Mount eingedeckt und über Nacht getrocknet.

3.3.5 Immunhistochemische Färbung

An einer Schnittserie erfolgte zur Darstellung der fetalen Gefäße die immunhistochemische Färbung des auf Endothelzellen exprimierten Oberflächenproteins CD-31 [45]. In der Labyrinth-Zone der murinen Plazenta findet sich lediglich in den fetalen Kapillaren eine Auskleidung mit Endothelzellen, wohingegen diese in den maternalen Blutsinussen fehlt [25]. Daher ist mit diesem Endothelzellmarker in der Labyrinth-Zone der Plazenta eine selektive Darstellung der fetalen Kapillaren möglich.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte nach der von Kretschmer et al. bereits an anderer Stelle beschriebenen Vorgehensweise [73]. Es handelte sich hierbei um eine indirekte immunhistochemische Färbung, bei der zunächst ein Erstantikörper spezifisch an ein bestimmtes Protein bindet, es zur Anfärbung jedoch eines Zweitantikörpers bedarf. Dieser bindet an den Erstantikörper und ist mit einem Enzym gekoppelt, wodurch es nach Zugabe des entsprechenden Substrats im Rahmen einer Enzym-Substrat-Reaktion zu einer sichtbaren Färbung kommt [105]. Der im Versuch verwendete Zweitantikörper war an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt und als Substrat wurde das 3,3-Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Dieses wird durch das HRP-Enzym bei gleichzeitiger Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zu einem braunen Reaktionsprodukt umgesetzt, wodurch sich die CD-31 exprimierenden fetalen Endothelzellen lichtmikroskopisch braun darstellen.

Analog zum Protokoll der HE-Färbung erfolgte zunächst die Entparaffinierung der histologischen Schnitte mit Neo-Clear und die Rehydrierung mit einer absteigenden Alkoholreihe und VE-Wasser. Anschließend wurden die Schnitte mit 1x Citratpuffer versetzt und für 25 Minuten in einem Dampfgarer bei 95 °C erhitzt, um fixierungsbedingte Proteinvernetzungen aufzulösen und die Epitope der Proteine für den spezifischen Antikörper besser zugänglich zu machen [107]. Nach einer Abkühlungszeit von 30 Minuten wurden die Schnitte zunächst mit PBS gewaschen, woraufhin jeder Paraffinschnitt mit einem Liquid-Blocker Pap-Pen (Daido Sangyo, Tokio, Japan) umrandet wurde. Anschließend wurden die Paraffinschnitte mit einer Wasserstoffperoxidlösung (3 % H₂O₂ in VE-Wasser) für zehn Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt benetzt. Danach wurden die Schnitte kurz in PBS gewaschen und jeder Paraffinschnitt lichtgeschützt für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Sea Block Blocking Buffer zur Blockie-

zung von freien Proteinbindungsstellen versetzt. Nach Entfernung des Puffers wurde jeder Paraffinschnitt mit 150 µl des verdünnten Anti-CD-31-Primärantikörpers (1:400 in DAKO Antibody Diluent) benetzt. Dabei wurde ein Paraffinschnitt als Negativkontrolle lediglich mit Antibody Diluent versetzt, um hinterher die Spezifität der Färbung überprüfen zu können. Die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper lichtgeschützt über Nacht bei 4 °C inkubiert und daraufhin für dreimal fünf Minuten in PBS auf dem Schüttler gewaschen, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Schnitte mit jeweils 150 µl des Sekundärantikörpers (ZytoChem Plus HRP One-Step Polymer) für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Nach einem erneuten Waschschrift für dreimal fünf Minuten in PBS wurde das Substrat DAB für das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym HRP hinzugeben. Hierzu wurden die Schnitte mit jeweils 150 µl des verdünnten DAB (3 % in wasserstoffperoxidhaltigem DAB-Diluent) für vier Minuten bei Raumtemperatur benetzt und anschließend mit VE-Wasser versetzt, um die Enzym-Substrat-Reaktion zu stoppen. Daraufhin erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit filtrierter Hämalaunlösung sauer nach Mayer für eine Minute und das Bläuen der Schnitte für fünf Minuten in kaltem Leitungswasser. Nach dem Spülen der Schnitte in VE-Wasser für eine Minute folgte analog zur HE-Färbung die Dehydrierung der Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und die Zugabe von Neo-Clear für zweimal fünf Minuten. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Neo-Mount eingedeckt und über Nacht getrocknet.

3.4 Molekulargenetische Methoden: Genotypisierung

3.4.1. DNA-Isolation

Für jeden Mäuse-Embryo wurde das Geschlecht bestimmt, um eine Aussage über das Geschlechterverhältnis der Feten innerhalb eines Wurfes treffen zu können. Außerdem sollten die nachfolgend beschriebene qRT-PCR sowie die proteinbiochemischen Untersuchungen der Plazenten nach Geschlechtern getrennt durchgeführt werden. Die hierfür notwendige DNA wurde hauptsächlich aus asserviertem Schwanzspitzengewebe der Embryonen modifiziert nach Wang et al. isoliert [108]. Alternativ wurde in wenigen Fällen Plazentagewebe oder Fruchtwasser des Embryos verwendet. Für den Zellaufschluss wurde das

Gewebe mit jeweils 500 µl Tail Lysis Buffer und 5 µl Proteinase K über 18 Stunden bei 55 °C auf dem Schüttler bei 500 s/min inkubiert. Zur Ausfällung der DNA wurde das lysierte Gewebe anschließend mit 500 µl Isopropanol versetzt und nach einer Ruhezeit von zehn Minuten bei Raumtemperatur für 15 Minuten bei 4 °C mit 15.700 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das entstandene DNA-Pellet mit 500 µl von bei -20 °C gekühltem 70 %-Ethanol versetzt. Nach erneuter Abzentrifugation für zehn Minuten bei 4 °C mit 15.700 x g wurde der entstandene Überstand erneut verworfen und das Pellet für 15 Minuten bei 55 °C auf dem Heizblock luftgetrocknet. Daraufhin erfolgte die Lösung der DNA durch die Zugabe von 50 µl H₂O mit einer anschließenden Ruhezeit von entweder 18 Stunden bei 4 °C oder alternativ 15 Minuten bei 55 °C auf dem Schüttler.

3.4.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode um ausgehend von einer geringen Menge eines DNA-Templates einen bestimmten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen. Hierzu wird für jeden zu amplifizierenden DNA-Abschnitt ein spezifisches Primerpaar benötigt, deren Basensequenzen komplementär zu jeweils einem Ende des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes sind. Während der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge getrennt, sodass sich die Primer während des darauffolgenden Annealings an die komplementären Basensequenzen der einzelsträngigen DNA-Matrize anlagern können. Mithilfe von synthetischen Desoxynucleosid-Triphosphaten (dNTPs) und dem Enzym Taq-Polymerase, einer hitzebeständigen DNA-Polymerase, findet während der Elongation die Synthese des zur DNA-Matrize komplementären DNA-Stranges statt. Durch die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte resultiert hierbei eine exponentielle Vervielfältigung der spezifischen DNA-Abschnitte [109].

Für die Genotypisierung des fetalen Geschlechts erfolgte eine Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnittes des X-Chromosoms, sowie bei männlichem Geschlecht zusätzlich des Y-Chromosoms, durch eine nach Lorenz modifizierte PCR [110]. Die hierfür verwendeten spezifischen Primer sind der *Tabelle 3* zu entnehmen. Bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl wurde zu 1 µl DNA-Template aus der isolierten Schwanzspitzen-DNA des Fetus 9 µl eines

PCR Master Mix hinzugegeben. Der PCR Master Mix setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenz	Menge [μ l]
MilliQ-Water (deionisiertes Wasser)	4,9
5x GoTaq Flexi Reaction Buffer	2
25 mM MgCl ₂	1,2
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,2
10 μ M Forward Primer X-Chromosom	0,4
10 μ M Reverse Primer X-Chromosom	0,4
10 μ M Forward Primer Y-Chromosom	0,4
10 μ M Reverse Primer Y-Chromosom	0,4
5 U/ μ l Taq-Polymerase	0,1

Tabelle 11: PCR Master Mix

Die Vervielfältigung der spezifischen DNA-Abschnitte erfolgte anschließend in einem Thermocycler, in dem der Reaktionsansatz repetitiv verschiedene Temperaturzyklen durchlief. Die PCR-Bedingungen lauteten wie folgt:

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [mm:ss]	
Initialisierung	95	03:00	
Denaturierung	95	00:30	} 35 Zyklen
Annealing	58	01:00	
Elongation	72	01:00	
Finale Elongation	72	10:00	
Lagerung	4	∞	

Tabelle 12: PCR-Bedingungen

3.4.3 Agarosegelelektrophorese

Um die amplifizierten DNA-Abschnitte, die Amplicons, ihrer Größe nach aufzutrennen und zu visualisieren, wurde eine nach Voytas modifizierte Agarosegelelektrophorese durchgeführt [111]. Hierbei werden die PCR-Produkte auf ein Agarose-Gel aufgetragen und in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. DNA-Fragmente gleicher Größe gruppieren sich an der entsprechen-

den Stelle im Gel und können bei ausreichender Menge anschließend als Bande sichtbar gemacht werden [109].

Für das Agarose-Gel wurde 1,5 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Buffer unter mehrfachem Aufkochen gelöst und anschließend mit 6 µl des Fluoreszenzfarbstoffs Midori-Green versetzt. Dieser bindet an die DNA und kann mithilfe von UV-Licht bei 530 nm zur Emission eines grünen Fluoreszenzsignals angeregt werden. Das Gel wurde in eine entsprechende Form gegossen und mit einem Kamm versetzt. Nach einer Polymerisationszeit von mindestens 30 Minuten wurde von jeder Probe jeweils 8 µl des PCR-Produkts in eine Tasche des Gels aufgetragen. Um das Molekulargewicht der Amplicons bestimmen zu können, wurde 8 µl eines 100 bp-DNA Markers aufgetragen. Nach der anschließenden Elektrophorese von circa 30 Minuten wurde das Gel in einem UV-Transilluminator mit UV-Licht bestrahlt. Das dadurch emittierte Fluoreszenzsignal der DNA-Banden wurde mithilfe des Programms BioDocAnalyze Live detektiert und fotografisch dokumentiert.

3.5 Molekulargenetische Methoden: RT-qPCR

Die im folgenden aufgeführten Methoden wurden von Maria Wohlfarth durchgeführt und die Ergebnisse durch meine Person ausgewertet.

3.5.1 RNA-Isolation

Zur Quantifizierung der Expression verschiedener Zielgene in den Plazenten der Muttertiere aus den verschiedenen Futtergruppen wurde eine Analyse der RNA-Transkripte der Zielgene durchgeführt.

Die Isolierung der RNA von den anderen zellulären Bestandteilen erfolgte modifiziert nach Chomczynski gemäß der von Appel et al. bereits an anderer Stelle beschriebenen Vorgehensweise [99, 112]. Für den Zellaufschluss wurde von jeder zu untersuchenden Plazenta Gewebe gewonnen und mit 1 ml TRI Reagent pro 100 mg Gewebe versetzt. Anschließend wurde das Gemisch für 30 Sekunden bei 30 Hertz in einer Schwingmühle homogenisiert und für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung wurden daraufhin pro Milliliter TRI Reagent 200 µl Chloroform hinzugegeben und auf dem Vortexer für 15 Sekunden vermischt und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation des Gemisches mit 13.680 x g bei 4 °C für 15

Minuten wurde der RNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und mit 500 µl Isopropanol pro Milliliter TRI Reagent versetzt. Nach erneutem Vortexen wurde das Gemisch für 20 Minuten auf Eis inkubiert und für 15 Minuten mit 21.380 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das hierbei entstandene RNA-Pellet wurde vom überstehenden Isopropanol getrennt und mit 1 ml 75 %-Ethanol pro Milliliter TRI Reagent zur Aufreinigung versetzt. Nach händischem Mischen erfolgte eine erneute Zentrifugation für fünf Minuten mit 21.380 x g bei 4 °C und das Trennen des überstehenden Ethanol vom RNA-Pellet. Nach Wiederholung der Aufreinigung der RNA durch die erneute Zugabe von 75 %-Ethanol und der nachfolgenden Schritte, wurde das vom Ethanol getrennte RNA-Pellet für 90 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die RNA in Abhängigkeit von der Pelletgröße in 20 - 200 µl DEPC-Wasser gelöst und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.5.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentrationen der hergestellten RNA-Lösungen aus den verschiedenen Plazenten erfolgte spektralphotometrisch mithilfe des Nano Quant Infinite M200 Pro und der Software Tecan i-control 2.0 modifiziert nach Nolan et al. [113].

Nukleinsäuren und somit auch RNA besitzen ein Absorptionsmaximum für elektromagnetische Strahlung bei einer Wellenlänge von 260 nm, bei Proteinen liegt dies dagegen bei 280 nm [114]. Für das Blanking wurde in jedes Probenfeld einer Nano Quant Plate™ zunächst 2 µl DEPC-Wasser aufgetragen und eine Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm durchgeführt, um einen Referenzwert für die Hintergrundabsorption ohne aufgetragene Probe zu erhalten. Anschließend wurde von jeder RNA-Lösung 2 µl aufgetragen und erneut die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Durch die Subtraktion der optischen Dichte bei 260 nm des Leerwertes vom Probenwert konnte die spezifische Absorption durch die RNA in der Probe ermittelt werden und daraus die RNA-Konzentration der Probe berechnet werden. Die gemessene optische Dichte bei 280 nm wurde zur Überprüfung der Reinheit des RNA-Isolats herangezogen. Für eine ausreichende Reinheit der RNA sollte der Quotient aus der optischen Dichte der Probe bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) zwischen 1,8 und 2,1 liegen [114].

Andernfalls musste von einer Verunreinigung des RNA-Isolats ausgegangen und eine erneute RNA-Isolation vorgenommen werden.

3.5.3 cDNA- Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte modifiziert nach Nolan et al. gemäß der von Appel et al. an anderer Stelle bereits beschriebenen Vorgehensweise [99, 113]. Nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung wird bei der cDNA-Synthese von der isolierten RNA eine DNA-Kopie hergestellt. Da sich DNA und RNA in ihrem Aufbau ähnlich sind, kann mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, anhand der einzelsträngigen RNA als Matrize ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert werden [114]. Im Versuch wurden hierfür zwei verschiedene Primerarten verwendet: Oligo-dT Primer sind Primer, deren Basensequenz komplementär zum Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der messenger RNA (mRNA) ist. Sie führen daher stets ausgehend vom gleichen mRNA-Abschnitt zu einer selektiven DNA-Kopie der mRNA des Gewebes. Dagegen besteht die Basensequenz der Random Primer aus einer zufälligen Kombination von sechs Basen, welche an komplementäre Basensequenzen aller RNA-Moleküle an unterschiedlichen Stellen binden können [114].

Von jeder Probe wurde anhand der zuvor bestimmten RNA-Konzentrationen das entsprechende Volumen für 1 µg RNA in ein Reaktionsgefäß überführt und DEPC-Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 24 µl hinzugegeben. Anschließend wurde jeweils 1 µl RQ1 10x DNase Puffer und 1 µl RQ1 RNase-free DNase (1 U/µl) hinzugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierdurch wurde gegebenenfalls noch vorhandene DNA in der RNA-Lösung abgebaut. Durch die Zugabe von jeweils 3 µl RQ1 DNase Stop Solution (20 mM EDTA), mischen mit dem Vortexer und anschließender Erhitzung bei 65 °C im Heizblock für 15 Minuten wurde die zuvor zugegebene DNase inaktiviert und damit der DNA-Abbau beendet. Nach kurzer Zentrifugation wurde zu jedem Reaktionsansatz jeweils 0,6 µl Random-Primer (0,5 µg/µl), 0,4 µl Oligo-dT Primer (0,5 µg/µl) und 4 µl DEPC-Wasser hinzugegeben und mit dem Vortexer gemischt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für fünf Minuten bei 70 °C inkubiert, danach kurz zentrifugiert und für eine Minute auf Eis abgekühlt. Im nächsten Schritt erfolgte schließlich die eigentliche cDNA-Synthese, indem zu jedem Reaktionsansatz jeweils 5 µl 5x MMLV-Puffer, 1,25 µl dNTP-Mix

(10 mM jeweils), 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl), 1 µl M-MLV RT (200 U/µl) und 2,25 µl DEPC-Wasser hinzugegeben wurde. Nach kurzem Mischen mit dem Vortexer erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei 37 °C und eine anschließende Abkühlung auf Eis, um die Reaktion zu beenden. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde die synthetisierte cDNA bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.5.4 Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung und Quantifizierung von spezifischen DNA-Abschnitten. Da die Quantifizierung der cDNA-Abschnitte in Echtzeit während der exponentiellen Phase der Polymerase-Kettenreaktion erfolgt, wird das Verfahren als quantitative Real Time-PCR bezeichnet [114]. Im Versuch wurden hierzu die nach Yin et al. modifizierten Methoden der SYBR Green qRT-PCR und der Taqman qRT-PCR gemäß dem von Appel et al. beschriebenen Verfahren angewandt [99, 115, 116].

Die Taqman qRT-PCR beruht auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) zwischen dem Donor und dem Akzeptor einer Taqman-Sonde [117]. Eine Taqman-Sonde ist ein Oligonukleotid, dessen Basensequenz komplementär zu einem Abschnitt des Zielgens ist und am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff als Donor und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff als Akzeptor versehen ist [114]. Die im Versuch eingesetzten Taqman-Sonden waren hierbei mit dem Reporter-Farbstoff FAM und dem Quencher-Farbstoff TAMRA gelabelt. Der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer kann nur erfolgen, wenn sich Donor und Akzeptor in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander befinden. Werden Donor und Akzeptor räumlich voneinander getrennt, emittiert der Reporter-Farbstoff ein messbares Fluoreszenzsignal [117]. Während der Annealing-Phase der Polymerase-Kettenreaktion hybridisiert die Taqman-Sonde mit dem komplementären Abschnitt der DNA-Matrize. Im Rahmen der darauffolgenden Elongation baut das Enzym Taq-Polymerase mit ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die Taqman-Sonde ab und ersetzt sie durch die entsprechenden Nukleotide. Hierbei werden Donor und Akzeptor räumlich voneinander getrennt und es entsteht proportional zur Menge der amplifizierten DNA-Abschnitte ein quantifizierbares Fluoreszenzsignal [114].

Die SYBR Green qRT-PCR beruht dagegen auf der Verwendung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes, wobei hierfür im Versuch BRYT Green® ein-

gesetzt wurde. Dieser besitzt eine hohe Affinität zu doppelsträngiger DNA und lagert sich in diese ein. Er fungiert als Reporter-Farbstoff, dessen emittiertes Fluoreszenzsignal nach der Elongation am Ende jedes PCR-Zyklus gemessen wird und proportional zur Menge der amplifizierten doppelsträngigen DNA-Abschnitte ist. Im Gegensatz zur Taqman qRT-PCR ist hierbei kein Quencher notwendig [114].

Um den Effekt unspezifischer Signalschwankungen zu minimieren, wird bei beiden Methoden der passive Fluoreszenzfarbstoff ROX als interne Referenz eingesetzt und das Fluoreszenzsignal des Reporter-Farbstoffes darauf normalisiert [113].

Der Vorteil der Taqman qRT-PCR gegenüber der SYBR Green qRT-PCR ist die höhere Sensitivität und Spezifität. Während die das Fluoreszenzsignal generierende Taqman-Sonde komplementär zu einem Abschnitt des Zielgens ist, kann das Fluoreszenzsignal bei der SYBR Green qRT-PCR auch durch unspezifische doppelsträngige PCR-Produkte oder Primer-Dimere generiert werden [115].

Im Vorfeld wurden die spezifischen Forward- und Reverse-Primer sowie die Taqman-Sonden für die zu untersuchenden Gene mithilfe der Software Primer Express 3.0 entworfen und von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) hergestellt. Die untersuchten Ziel- und Abgleichgene und die hierfür eingesetzten Primer und Sonden sind den entsprechenden Tabellen (*Tabelle 4*, *Tabelle 5*, *Tabelle 6*) zu entnehmen. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Taqman-Sonden mit HPLC-Wasser auf eine Konzentration von 2 μM , die Primer für die Taqman qRT-PCR auf eine Konzentration von 6 μM und die Primer für die SYBR Green qRT-PCR auf 10 μM verdünnt. In jedes Well einer FrameStar 96 Well Semi-Skirted PCR Plate (4titude Ltd., Berlin, Deutschland) wurde unter Verwendung von epT.I.P.S. LoRetention Filterspitzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für die Taqman bzw. für die SYBR Green qRT-PCR der in der *Tabelle 13* bzw. in der *Tabelle 15* aufgeführte PCR-Ansatz pipettiert. Als Negativkontrolle wurde pro Platte ein Well mit HPLC-Wasser anstelle von cDNA versetzt. Anschließend wurde die Platte mithilfe eines Plate Heat Sealers mit einem Clear Seal Cover (4titude Ltd., Berlin, Deutschland) luftdicht verschlossen und für drei Minuten bei Raumtemperatur mit 235 x g in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert. Mithilfe des Taqman 7500 Real-Time PCR Systems und der

7500 Software v2.0.6 erfolgte schließlich die qRT-PCR unter den für die beiden Methoden in der *Tabelle 14* und *Tabelle 16* aufgeführten Reaktionsbedingungen.

Reagenz	Menge [μ l]
Platinum® qPCR SuperMix-UDG with ROX	12,5
HPLC	8,5
Forward Primer (6 μ M)	0,5
Reverse Primer (6 μ M)	0,5
Taqman-Sonde (2 μ M)	0,5
cDNA	2,5

Tabelle 13: PCR-Ansatz Taqman qRT-PCR

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [mm:ss]	
UDG Inkubation	50	02:00	
DNA-Polymerase-Aktivierung	95	10:00	
Denaturierung	95	00:15	} 40 Zyklen
Annealing/Elongation	60	01:00	

Tabelle 14: Taqman qRT-PCR-Bedingungen

UDG; Uracil-DNA-Glycosylase.

Reagenz	Menge [μ l]
SYBR Green qPCR Master Mix	10
HPLC	7
Forward Primer (10 μ M)	1
Reverse Primer (10 μ M)	1
cDNA	1

Tabelle 15: PCR-Ansatz SYBR Green qRT-PCR

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [mm:ss]	
DNA-Polymerase-Aktivierung	95	02:00	
Denaturierung	95	00:15	} 40 Zyklen
Annealing/Elongation	60	01:00	
Dissoziation	95	00:15	

Tabelle 16: SYBR Green qRT-PCR-Bedingungen

Die Analyse der Ergebnisse erfolgte als relative Quantifizierung anhand der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode modifiziert nach Kuang et al. [114]. Hierfür wurde für jedes untersuchte Gen der Cycle-Threshold-Wert (Ct-Wert) der jeweiligen Probe bestimmt. Dieser gibt den PCR-Zyklus (Cycle) an, in dem das spezifische vom Reporterfarbstoff emittierte Fluoreszenzsignal größer wird als die unspezifische Hintergrundfluoreszenzemission und dabei einen bestimmten Schwellenwert (Threshold) überschreitet [114]. Der Ct-Wert verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Ausgangsmenge des Templates. Die Expression der Zielgene wurde auf die Expression eines konstitutiv exprimierten Abgleichgens normalisiert, um Unterschiede in der Ausgangskonzentration der eingesetzten cDNA auszugleichen. Im Versuch wurden hierfür die sogenannten Housekeeping-Gene GAPDH, Beta-Aktin und HPRT verwendet und der Δ -Ct-Wert berechnet. Aus der Differenz der Δ -Ct-Werte der Interventionsgruppen bzw. der CO-Gruppe von den Δ -Ct-Werten der SD-Gruppe ergab sich der $\Delta\Delta$ -Ct-Wert. Dieser beschreibt anhand der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ die n-fache Expression des Zielgens in der Interventionsgruppe bzw. in der CO-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe [114]. Zur Evaluierung der Housekeeping-Gene hinsichtlich einer unerwünschten Regulation erfolgte mithilfe der Software Normfinder die Berechnung eines Stabilitätswertes anhand der Analyse der Δ -Ct-Werte in Bezug auf die Inter- und Intra-gruppenvariabilität [118]. Für die Housekeeping-Gene GAPDH und Beta-Aktin ergaben sich adäquate und ähnliche Stabilitätswerte, wohingegen sich für HPRT diesbezüglich eine deutliche Unterlegenheit zeigte. Daher blieb das Housekeeping-Gen HPRT in der weiteren Auswertung unberücksichtigt.

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Proteinisolation

Die Isolation plazentarer Proteine erfolgte gemäß der von Appel et al. bereits an anderer Stelle beschriebenen Vorgehensweise [99]. Hierfür wurde von jeder zu untersuchenden Plazenta 100 - 200 mg Gewebe gewonnen und mit jeweils 400 μ l modifiziertem RIPA-Puffer versetzt. Der RIPA-Puffer war hierfür unmittelbar vor Gebrauch mit verschiedenen Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzt worden, welche der *Tabelle 2* zu entnehmen sind. Für den Zellaufschluss wurde das Gemisch zunächst gemörsert und anschließend für 20

Sekunden bei 50 % der Maximalenergie und 3 x 10 % Cycle mit einem Homogenisator sonifiziert. Daraufhin wurden die Proben für eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C für fünf Minuten mit 18.407 x g zentrifugiert. Der hierbei entstandene lösliche Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

3.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Modifiziert nach Smith et al. erfolgte zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen mithilfe des Bicinchoninic acid (BCA)-Kits eine quantitative kolorimetrische Analyse der Proteinkonzentrationen im Vergleich zu einer Standardreihe [119]. Die Grundlage der Methode bildet hierbei die sogenannte Biuret-Reaktion, bei der es unter alkalischen Bedingungen zu einer Komplex-Bildung zwischen Kupferionen, Proteinen und der Bicinchoninsäure kommt. Dieser Komplex weist eine violette Farbe auf und hat ein photometrisches Absorptionsmaximum bei 562 nm. Dabei verhält sich die Intensität des Farbumschlags proportional zur Proteinkonzentration der Probe [119].

Zunächst wurde von jeder Probe der Proteinisolation eine 1:10-Verdünnung aus 3 µl Proteinisolat und 27 µl modifiziertem RIPA-Puffer hergestellt. Anschließend wurde aus purem BSA (2 mg/ml) und modifiziertem RIPA-Puffer eine Standardreihe aus jeweils 30 µl einer 1:2-, 1:4-, 1:8-, 1:16- und 1:32-Verdünnung erstellt. Für den Null-Wert wurde reiner RIPA-Puffer verwendet und für den Maximalwert pures BSA. Auf einer 96-Well-Platte (Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA) wurden zur Doppelbestimmung jeweils zweimal 10 µl der Standardreihe und der verdünnten Proben aufgetragen. Das BCA-Working-Reagent wurde aus einer 1:50-Verdünnung des BCA-Reagenz und der beige-fügten Verdünnungslösung des BCA-Kits hergestellt. Hiervon wurde zu jeder Probe jeweils 200 µl hinzugegeben und die 96-Well-Platte anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung des entstandenen Farbsignals bei 562 nm mithilfe des Nano Quant Infinite M200 Pro und der Software Tecan i-control 2.0.

Bei der weiteren Auswertung in Excel wurde auf der Grundlage der photometrisch ermittelten optischen Dichtewerte der Standardreihe eine lineare Trendlinie erstellt. Anhand dieser konnte jedem photometrischen Analysewert der jeweiligen Probe eine Proteinkonzentration zugeordnet und auf die unverdünnte Probe umgerechnet werden.

3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren, um auf ein Gel aufgetragene Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufzutrennen und wurde in diesem Versuch modifiziert nach Bass et al. und Mahmood et al. durchgeführt [120, 121]. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine vor dem Auftragen mit einem SDS- und β -Mercaptoethanolhaltigen Puffer versetzt und erhitzt. SDS als anionisches Detergenz bindet an die Proteine und führt zu einer überwiegend einheitlichen negativen Ladung der Proteine. β -Mercaptoethanol und die Erhitzung bewirken eine Denaturierung und damit Auflösung bzw. Entfaltung der räumlichen Struktur der Proteine. Hierdurch soll sichergestellt werden, dass die Proteine bei der Gelelektrophorese ausschließlich ihrer Masse nach aufgetrennt werden und keine Ladungs- oder räumliche Strukturunterschiede zum Tragen kommen [120].

Das Gel zeichnet sich je nach Polyacrylamidanteil (Prozentigkeit) durch unterschiedlich große Poren aus. Die Prozentigkeit des Gels verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Porengröße und zur Laufgeschwindigkeit der Proteine [120]. Die aufgetragenen Proteine werden zunächst in einem niedrigprozentigen Sammelgel auf einer einheitlichen Lauffront konzentriert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel aufgetrennt. Hierbei gilt, dass umso geringer das Molekulargewicht der Proteine und umso größer die Poren des Gels, desto höher ist die Laufgeschwindigkeit der Proteine [120].

Im Versuch bestand das Trenngel aus einem Stufengel, wobei die untere Hälfte zur besseren Auftrennung kleinerer Proteine aus einem 10 %-igen Trenngel und die obere Hälfte zur besseren Auftrennung größerer Proteine aus einem 8 %-igen Trenngel bestand. Die Zusammensetzung der einzelnen Gele lautete wie folgt:

	10 %-iges Trenngel (pH 8,8)	8 %-iges Trenngel (pH 8,8)	Sammelgel (pH 6,8)
VE-H₂O	40 %	46 %	68 %
Acrylamid-Mix	10 %	8 %	5,1 %
Puffer	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
SDS	0,1 %	0,1 %	0,1 %
APS	0,1 %	0,1 %	0,1 %
TEMED	0,04 %	0,06 %	0,1 %

Tabelle 17: Zusammensetzung Gele für SDS-PAGE

Die Analyse der Proteine wurde geschlechterspezifisch auf zwei verschiedenen Gelen durchgeführt. Von jeder Probe wurde anhand der zuvor bestimmten Proteinkonzentrationen das entsprechende Volumen für 20 µg Protein in ein Reaktionsgefäß überführt und VE-Wasser bis zu einem Gesamtvolumen der Probe von 12 µl hinzugegeben. Nach Zugabe von jeweils 3 µl eines 5x Probenpuffers wurden die Proben zur Denaturierung für zehn Minuten bei 70 °C im Heizblock erhitzt und danach kurz abzentrifugiert.

Die SDS-PAGE wurde in einer Elektrophorese-Kammer mit 1x-Lämmli-Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Zu Beginn wurden auf das Sammelgel jeweils 15 µl der vorbereiteten Proben und 8 µl Page Ruler Prestained Protein Ladder als Größenstandard aufgetragen. Um die Proteine im Sammelgel auf eine einheitliche Lauffront zu konzentrieren, wurde das elektrische Feld für die ersten 30 Minuten mit einer Spannung von 80 Volt angelegt. Anschließend erfolgte bei einer Spannung von 120 Volt die Auftrennung der Proteine im Trenngel, bis deren Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

3.6.4 Western Blot

Das Western-Blotting ist ein semi-quantitatives Verfahren, um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine von einem Gel auf eine Membran zu übertragen und diese anschließend mithilfe spezifischer Antikörper zu detektieren und zu analysieren [120]. Bei der im Versuch angewandten Semi-Dry-Transfermethode handelt es sich um ein horizontales Blottingverfahren, bei der mithilfe einer Blottingkammer ein elektrisches Feld senkrecht zu Gel und Membran angelegt wird, sodass im Rahmen des Proteintransfers das Auftrennungsmuster der Gelelektrophorese erhalten bleibt. Namensgebend für dieses Verfahren ist, dass nur geringe

Mengen an Transferpuffer in die Blottingkammer hinzugegeben werden. Dadurch soll ein möglichst hoher Anteil des Stromflusses gezielt durch das Gel und die Membran verlaufen, um die notwendige Zeit für den Proteintransfer zu verkürzen [122]. Die im Versuch eingesetzten Erstantikörper besitzen eine spezifische Bindungsstelle für ein bestimmtes Antigen bzw. Protein und können mithilfe eines Zweitantikörpers, welcher speziesspezifisch an Bereiche des Fc-Fragments des Erstantikörpers bindet, detektiert werden [120]. Die Zweitantikörper dieses Versuchs waren an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt und als Substrat wurde das auf Luminol-basierende enhanced chemiluminescent (ECL) verwendet. Im Rahmen dieser Enzym-Substrat-Reaktion entsteht eine als Chemilumineszenz bezeichnete Lichtemission, welche detektiert und semiquantitativ analysiert werden kann [120].

Die Durchführung und Ergebnisanalyse des Western Blotting erfolgte nach dem von Appel et al. bereits an anderer Stelle beschriebenen Verfahren modifiziert nach Mahmood [99, 121]. Zunächst wurden für den Proteintransfer der im Rahmen der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine einige Gel Blotting Paper (GE Healthcare, Solingen, Deutschland) und eine in VE-Wasser getränkte Nitrozellulose-Western-Blot-Membran (GE Healthcare, Solingen, Deutschland) auf die Größe des Trenngels zugeschnitten. Anschließend wurde der Transferpuffer aus 10 % Methanol (v/v) und 10 % Towbin-Puffer (v/v) in VE-Wasser angesetzt und sowohl die Filterpapiere als auch die Membran für 30 Minuten darin getränkt. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Sammelgel verworfen und das Trenngel zunächst in Transferpuffer eingelegt, bevor es zusammen mit den Filterpapieren und der Membran in der Blotting-Kammer angeordnet wurde. Anschließend erfolgte der Proteintransfer vom Gel auf die Membran bei einer Stromstärke von 1,4 - 1,45 mA pro cm² Gelfläche für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Zur Überprüfung des erfolgreichen Proteintransfers erfolgte nach dem Western-Blotting zunächst eine Färbung der Membran mit Ponceau S-Lösung (0,2 % (v/v) Ponceau S, 3 % (v/v) Trichloressigsäure in H₂O). Hierfür wurde die Membran für zwei Minuten auf dem Schüttler in Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend dreimal mit VE-Wasser gewaschen, um überschüssige Farbreste von der Membran zu entfernen. Mithilfe des ChemiDoc™ XRS+-Imagers und der Software ImageLab™ v5.2.1 wurde das Ergebnis der Übersichtsfärbung digital dokumentiert. Anhand des Größenstandards wurde die

Membran anschließend mit einem Skalpell (BRAUN, Kronberg im Taunus, Deutschland) auf einer Höhe von 40 kDa sowie von 100 kDa entlang der in der Übersichtsfärbung dargestellten Banden durchtrennt. Die Membranabschnitte unter 40 kDa und über 100 kDa wurden asserviert und für eine Stunde auf dem Schüttler in einer Blocking-Solution (5 % (v/v) Milch, 2 % (v/v) BSA in TBST) inkubiert. Ziel ist hierbei das Blockieren freier Proteinbindungsstellen auf der Membran, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranen mit jeweils 10 ml eines in 5 % (v/v) Milch in TBST verdünnten Erstantikörpers für zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und anschließend über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Daraufhin wurden die Membranen dreimal für zehn Minuten in TBST auf dem Schüttler gewaschen, um ungebundene Reste des Erstantikörpers von den Membranen zu entfernen. Danach wurden die Membranen mit jeweils 10 ml eines in 5 % (v/v) Milch in TBST verdünnten Zweitantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und erneut dreimal für zehn Minuten in TBST auf dem Schüttler gewaschen. Die hierbei verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen sind der *Tabelle 7* zu entnehmen.

Anschließend erfolgte die Entwicklung der Membranen mit ECL. Hierzu wurde das erforderliche Volumen der beiden ECL-Reagenzien in einem 1:1-Verhältnis angesetzt und für eine Einwirkzeit von einer Minute auf die Membranen gegeben. Mithilfe des ChemiDoc™ XRS+-Imagers und der Software ImageLab™ v5.2.1 wurde das durch die Enzym-Substrat-Reaktion entstandene Chemilumineszenzsignal detektiert und digital dokumentiert. Nach Auswahl der passenden Belichtungszeit erfolgte anschließend die semiquantitative Analyse des emittierten Chemilumineszenzsignals. Für die Analyse eines weiteren Proteins ähnlicher Größe auf derselben Membran mussten zunächst die bereits gebundenen Antikörper wieder entfernt werden. Hierzu wurden die Membranen zunächst für dreimal zehn Minuten in TBST auf dem Schüttler gewaschen und anschließend mit 15 ml Stripping-Puffer bei 56 °C im Wasserbad für 25 Minuten inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Membran für dreimal 10 Minuten in TBST auf dem Schüttler erfolgte die erneute Inkubation für 90 - 120 Minuten auf dem Schüttler in der Blocking-Solution (5 % (v/v) Milch, 2 % (v/v) BSA in TBST). Danach konnte die Membran für eine weitere Proteinanalyse mit einem neuen Erstantikörper versetzt werden.

Für die semiquantitative Analyse des detektierten Chemilumineszenzsignals erfolgte mithilfe der Software ImageLab™ v5.2.1 die densitometrische Auswertung der einzelnen Banden. Aus dem Abgleich der densitometrischen Werte der Banden des untersuchten Proteins mit den Werten der Banden des Housekeeping-Gens HPRT wurde der relative densitometrische Wert für die jeweilige Probe ermittelt. Aus dem Vergleich der relativen densitometrischen Werte konnten somit Rückschlüsse auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe gezogen werden. Die anschließende statistische Testung sowie die graphische Darstellung der relativen densitometrischen Werte der Proben der verschiedenen Futtergruppen erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism Version 7.

3.7 Bioinformatische Analyse

Die bioinformatische Analyse erfolgte in Anlehnung an das von Howard und Reed und Coan et al. beschriebene Vorgehen [25, 102]. Die im Folgenden aufgeführten mathematischen Formeln entstammen diesen Quellen und wurden, wie von Kretschmer et al. bereits beschrieben, entsprechend der im Versuch angewandten Vorgehensweise modifiziert [73, 74].

Alle Objekte der drei gefärbten Schnittserien wurden mithilfe des Histoscanners SCN400 digitalisiert und konnten mit der Software ImageScope Version 12.2.2.5015 visualisiert werden. Dabei wurde die HE-gefärbte Schnittserie in 10-facher Vergrößerung, die PAS-gefärbte Schnittserie in 20-facher Vergrößerung und die immunhistochemisch-gefärbte Schnittserie in 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Anschließend wurden die digitalisierten Schnitte mit einem Grid aus Punkten mit genau definierten Abständen versehen, wobei sich die Punkte zur besseren Erkennbarkeit aus dem Schnittpunkt der beiden Balken eines Kreuzes ergaben. Sowohl in x- als auch in y-Richtung betrug dieser Abstand zwischen den Punkten für die HE-gefärbte Schnittserie 500 μm , für die PAS-gefärbte Schnittserie 273,86 μm und für die immunhistochemisch-gefärbte Schnittserie 111,6 μm . Dies entsprach damit einer Fläche pro Punkt von 250.000 μm^2 für die HE-Färbung, 75.000 μm^2 für die PAS-Färbung und 12.500 μm^2 für die immunhistochemische Färbung. Bei der immunhistochemischen Färbung wurde das Grid lediglich auf die Labyrinth-Zone der Schnitte gelegt, wobei diese zusätzlich mit parallelen Linien in zufälliger Ausrichtung versehen wurden. Die Labyrinth-Zone wurde zuvor manuell aus der digitalisierten Aufnahme des Schnitts ausgeschnitten, sodass der entstandene Ausschnitt

in gleich große 4096 x 4096 Pixel-Einzelbilder geteilt werden konnte. Aus der entstandenen Bildserie aus 4096 x 4096 Pixel-Einzelbildern wurde im Anschluss zufällig ein Einzelbild, welches augenscheinlich zu mehr als der Hälfte der Oberfläche mit Labyrinth-Zone bedeckt war, für die Auswertung ausgewählt. Mithilfe der Software ImageJ-Fiji und dem Plug-in Cell Counter wurden die Punkte nach unterschiedlichen Kriterien auf allen Schnitten manuell ausgezählt.

HE-Färbung:

Anhand der HE-Färbung sollte das Volumen der Labyrinth-Zone, der Junctional Zone, der Dezidua basalis sowie das Gesamtvolumen der Plazenta bestimmt werden. Hierfür wurde manuell ausgezählt, wie viele Punkte auf den einzelnen Schnitten auf die jeweilige Zone fielen. Für jeden aufgezogenen Schnitt wurde die Anzahl der gezählten Punkte pro Zone (P_1) mit der zu einem Punkt zugehörigen Fläche ($a/p = 250.000 \mu\text{m}^2$) multipliziert, was der Fläche der Zone (A_1) in dem jeweiligen Schnitt entsprach [25]:

$$A_1 = P_1 \times a/p \quad (5)$$

Von allen ausgezählten Schnitten einer Plazenta wurde anschließend der Mittelwert (\bar{A}) aus den ermittelten Flächen der jeweiligen Zone berechnet. In Anlehnung an die Cavalieri-Methode wurde diese mittlere Fläche einer Zone mit dem Gesamtdurchmesser (d) der Plazenta multipliziert und ergab damit das Volumen (V) der jeweiligen Zone in der untersuchten Plazenta [25]:

$$V = \left(\frac{A_1 + A_2 + A_3 + A_n}{n} \right) \times d = \bar{A} \times d \quad (6)$$

A_1 = Fläche der Zielstruktur in einem Schnitt

P_1 = Punkte auf der Zielstruktur in einem Schnitt

a/p = Fläche pro Punkt (HE-Färbung: $250.000 \mu\text{m}^2$, PAS-Färbung: $75.000 \mu\text{m}^2$)

n = Anzahl ausgezählter Schnitte

V = Volumen der Zielstruktur

\bar{A} = Mittelwert der Fläche der Zielstruktur von allen ausgezählten Schnitten einer Plazenta

d = Durchmesser Plazenta = Gesamtanzahl Schnitte \times Schnittdicke ($7 \mu\text{m}$)

PAS-Färbung:

Anhand der PAS-Färbung sollte das Volumen der Glykogenzellnester in der Plazenta bestimmt werden, wobei bezüglich deren Lokalisation in der Labyrinth-Zone und außerhalb der Labyrinth-Zone differenziert werden sollte. Hierfür wurde auf den Schnitten die Anzahl der Punkte gezählt, die auf Glykogenzellen in der Labyrinth-Zone und auf Glykogenzellen außerhalb der Labyrinth-Zone fielen. Als Bezugsvolumina wurden zudem das Volumen der Labyrinth-Zone sowie das Volumen außerhalb der Labyrinth-Zone und das Gesamtvolumen der Plazenta ermittelt. Hierfür wurden in jedem Schnitt die Punkte gezählt, die auf die Labyrinth-Zone fielen und welche auf Plazentagewebe außerhalb der Labyrinth-Zone fielen. Die Berechnung erfolgte analog zur HE-Färbung: Zunächst wurde für jeden Schnitt die Summe der gezählten Punkte auf der entsprechenden Zielstruktur (P_1) mit der zu einem Punkt zugeordneten Fläche ($a/p = 75.000 \mu\text{m}^2$) multipliziert. Anschließend wurde die mittlere Fläche (\bar{A}) dieser Zielstruktur über alle ausgezählten Schnitte einer Plazenta hinweg ermittelt und mit dem Durchmesser (d) der Plazenta multipliziert. Hieraus ergab sich das Volumen (V) der entsprechenden Zielstruktur in der Plazenta [25].

Immunhistochemische Färbung:

Die immunhistochemische Färbung des Proteins CD-31 ermöglichte die Unterscheidung zwischen maternalen und den sich durch die Färbung braun darstellenden fetalen Gefäßen. Daher sollte hiermit das Volumen und die Oberfläche der fetalen und der maternalen Gefäße bestimmt werden.

Da hierbei nur die Labyrinth-Zone von Bedeutung war, wurde diese zunächst manuell mithilfe der Software ImageJ-Fiji aus den digitalisierten Schnitten extrahiert und deren Fläche anschließend automatisch berechnet. Von jeder Plazenta wurde dabei gleichzeitig bestimmt, welches der erste und der letzte Schnitt war, auf dem die Labyrinth-Zone angeschnitten wurde. Aus dieser Angabe konnte durch Multiplikation mit der Schnittdicke von $7 \mu\text{m}$ näherungsweise der Durchmesser (d) der Labyrinth-Zone bestimmt werden. In Anlehnung an die Cavalieri-Methode wurde der Durchmesser der Labyrinth-Zone mit dem Mittelwert der berechneten Flächen (\bar{A}) der ausgeschnittenen Labyrinth-Zonen multipliziert. Hieraus ergab sich das Gesamtvolumen (V_{LZ}) der Labyrinth-Zone, welches als Referenzvolumen für die nachfolgenden Berechnungen verwendet wurde [25]:

$$V_{LZ} = \bar{A} \times d \quad (7)$$

V_{LZ} = Volumen der Labyrinth-Zone

\bar{A} = mittlere Fläche der Labyrinth-Zone pro Schnitt

d = Durchmesser der Labyrinth-Zone

Anschließend wurden die ausgeschnittenen Labyrinth-Zonen zufällig in mehrere unterschiedlich große Abschnitte zerteilt. Jeder Abschnitt wurde anschließend mit dem oben beschriebenen Grid und den parallelen Linien versehen. Von jedem zweiten aufgezogenen Schnitt, das entsprach jedem 80. Schnitt der Plazenta, wurde jeweils ein zufällig ausgewählter Ausschnitt aus der Labyrinth-Zone analysiert.

Für das Volumen der Gefäße wurde hierbei manuell gezählt, wie viele Punkte auf fetale bzw. auf maternale Gefäße und wie viele auf Trophoblastengewebe zwischen den Gefäßen fielen. Die Anzahl der Punkte auf der entsprechenden Zielstruktur (P_1) wurde anschließend geteilt durch die Gesamtanzahl der Punkte auf dem analysierten Labyrinth-Ausschnitt (ΣP).

$$Q_1 = \frac{P_1}{\Sigma P} \quad (8)$$

Aus diesem Quotienten (Q_1) wurde von allen analysierten Schnitten einer Plazenta für die jeweilige Zielstruktur ein gewichteter Mittelwert (\bar{Q}_{gew}) gebildet. Anhand eines gewichteten Mittelwertes sollte ausgeglichen werden, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein Punkt auf die entsprechende Zielstruktur fällt umso geringer ist, umso kleiner der Ausschnitt aus der Labyrinth-Zone auf dem analysierten Bild ist. Zur Berechnung des gewichteten Mittelwertes wurde hierbei zunächst für jeden Labyrinth-Ausschnitt der Quotient (Q_1) für die jeweilige Zielstruktur mit der Wurzel der Gesamtanzahl der Punkte auf dem Labyrinth-Ausschnitt ($\sqrt{\Sigma P}$) multipliziert.

$$R_1 = Q_1 \times \sqrt{\Sigma P} \quad (9)$$

Anschließend wurde von diesem Produkt (R_1) von allen analysierten Schnitten einer Plazenta der Mittelwert (\bar{R}) gebildet und durch den Mittelwert der Wurzeln der Gesamtanzahlen der Punkte auf diesen Labyrinth-Ausschnitten ($\sqrt{\Sigma P}$) ge-

teilt.

$$\bar{Q}_{gew} = \frac{R_1 + R_2 + R_n}{n} \div \frac{\sqrt{\sum P_{R_1}} + \sqrt{\sum P_{R_2}} + \sqrt{\sum P_{R_n}}}{n} = \bar{R} \div \sqrt{\sum P} \quad (10)$$

Das Ergebnis (\bar{Q}_{gew}) entsprach dem mittleren Anteil der Fläche der Zielstruktur pro Flächeneinheit eines Labyrinth-Ausschnittes. Dieser Anteil wurde im nächsten Schritt auf das Volumen der Labyrinth-Zone hochgerechnet, indem der gewichtete Mittelwert (\bar{Q}_{gew}) mit dem zuvor berechneten Gesamtvolumen der Labyrinth-Zone (V_{LZ}) als Referenzvolumen multipliziert wurde.

$$V_v = \bar{Q}_{gew} \times V_{LZ} \quad (11)$$

V_v = Volumen Zielstruktur

V_{LZ} = Volumen Labyrinth-Zone

\bar{Q}_{gew} = gewichteter Mittelwert des Anteils der Fläche der Zielstruktur pro Flächeneinheit eines LZ-Ausschnittes

Q_1 = Anteil Fläche der Zielstruktur an Gesamtfläche des LZ-Ausschnittes

P_1 = Punkte auf der Zielstruktur in einem LZ-Ausschnitt

$\sum P$ = Gesamtanzahl Punkte auf einem LZ-Ausschnitt

n = Anzahl ausgezählter LZ-Ausschnitte

Zur Bestimmung der Oberfläche der Gefäße wurden in den ausgewählten Labyrinth-Ausschnitten neben den Punkten auch die parallelen Linien verwendet. Dabei wurde die Anzahl der Schnittpunkte der Linien mit fetalen bzw. maternalen Gefäßwänden ($\sum I$) erfasst. Anhand der folgenden Formel wurde die Oberfläche (S_1) der fetalen bzw. maternalen Gefäße in dem jeweiligen Labyrinth-Ausschnitt berechnet [102]:

$$S_1 = \frac{2 \times \sum I}{l/p \times \sum P} \left[\frac{1}{\mu\text{m}} \right] \quad (12)$$

S_1 = Surface (Oberfläche) auf einem LZ-Ausschnitt pro Volumeneinheit

$\sum I$ = Summe der Schnittpunkte (Intersections) von Linie mit Gefäßwand auf einem LZ-Ausschnitt

l/p = Länge pro Punkt (27,9 μm)

$\sum P$ = Gesamtanzahl Punkte auf einem LZ-Ausschnitt

Um die jeweilige Oberfläche zu bestimmen, wurde hierbei für $\sum I$ entweder die Anzahl der Schnittpunkte der Linien mit den fetalen Gefäßwänden oder mit der aus Trophoblasten gebildeten Begrenzung der maternalen Blutsinuse verwendet. Die hiermit berechnete Oberfläche bezog sich zunächst auf eine bestimmte Volumeneinheit und musste daher noch auf das Gesamtvolumen der Labyrinth-Zone hochgerechnet werden. Zunächst wurde auch an dieser Stelle der gewichtete Mittelwert (\bar{S}_{gew}) über die Oberflächen in allen ausgezählten Schnitten einer Plazenta gebildet.

$$R_1 = S_1 \times \sqrt{\sum P} \quad (13)$$

$$\bar{S}_{gew} = \frac{R_1 + R_2 + R_n}{n} \div \frac{\sqrt{\sum P_{R_1}} + \sqrt{\sum P_{R_2}} + \sqrt{\sum P_{R_n}}}{n} = \bar{R} \div \sqrt{\sum P} \quad (14)$$

Das Ergebnis entsprach der mittleren Oberfläche der jeweiligen Zielstruktur pro Volumeneinheit der Labyrinth-Zone. Durch die Multiplikation mit dem Volumen der Labyrinth-Zone (V_{LZ}) als Referenzvolumen wurde diese mittlere Oberfläche pro Volumeneinheit auf das Gesamtvolumen der Labyrinth-Zone hochgerechnet [25].

$$S = \bar{S}_{gew} \times V_{LZ} \quad (15)$$

S = Gesamtoberfläche Zielstruktur

V_{LZ} = Volumen Labyrinth-Zone

\bar{S}_{gew} = gewichteter Mittelwert der Oberfläche der Zielstruktur pro
Volumeneinheit der LZ

n = Anzahl ausgezählter LZ-Ausschnitte

3.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte anhand der Software Graph Pad Prism Version 7. Wurde die Abhängigkeit einer Variablen von den verschiedenen Diäten untersucht, wurden zunächst statistisch signifikante Ausreißer aus den Datensätzen eliminiert. Dies erfolgte mithilfe des Grubbs-Tests mit einem Signifikanzniveau von 0,05, wobei pro Datensatz maximal ein Wert aus der weiteren Analyse ausgeschlossen wurde. Anschließend wurde mithilfe des D'Agostino-Pearson Omnibus Tests geprüft, ob bei den zu vergleichenden Datensätzen eine Gaußsche Normalverteilung vorlag. War dies für alle zu vergleichenden Gruppen der Fall, erfolgte die Testung bei zwei Vergleichsgruppen mithilfe eines zweiseitigen Student's t-Tests mit einem Konfidenzintervall von 95 % und einem Signifikanzniveau von 0,05. Wurden dagegen mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, erfolgte die Testung mithilfe eines One-way ANOVA-Tests. Konnte in mindestens einer der Vergleichsgruppen keine Gaußsche Normalverteilung angenommen werden, erfolgte die statistische Analyse beim Vergleich zweier Gruppen mit einem Mann-Whitney-Test und beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen mit einem Kruskal-Wallis-Test. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte die Testung ohne ein Matching der Daten als Testung der Interventionsgruppen gegen die Standarddiät-Gruppe als Kontrollgruppe sowie als Testung aller Gruppen gegeneinander. Im Rahmen des One-way ANOVA-Tests resultierende signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mithilfe eines zweiseitigen Student's t-Tests mit einem Konfidenzintervall von 95 % und einem Signifikanzniveau von 0,05 verifiziert. Aus dem Kruskal-Wallis-Test resultierende signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden durch einen Mann-Whitney-Test verifiziert.

Die Ergebnisse der statistischen Analyse sind, wenn nicht anders vermerkt, in den folgenden Graphen als Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ festgelegt ($p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***), $p \leq 0,0001$ (****)).

4. Ergebnisse

4.1 Diätetischer Effekt auf die Muttertiere

4.1.1 Nahrungs- und Wasseraufnahme während der Schwangerschaft

Die Fütterung der Weibchen mit dem spezifischen Futter ihrer zufällig zugewiesenen Futtergruppe erfolgte bereits präkonzeptionell ab der dritten Lebenswoche und wurde auch über die Dauer von Schwangerschaft und Stillzeit hinweg fortgeführt. Da hierbei insbesondere die Wasser- und Nahrungsaufnahme während der Schwangerschaft von Interesse war, wurde diese von einigen Weibchen pro Gruppe, welche die Schwangerschaft austrugen, repräsentativ für die jeweilige Futtergruppe erfasst. Hieraus wurden anschließend die über die gesamte Schwangerschaft gemittelten Werte für die tägliche Aufnahme von Wasser und Nahrung bzw. der einzelnen Nährstoffe berechnet (s. *Tabelle 18*).

Um den steigenden Energiebedarf während der Schwangerschaft zu decken, zeigte sich unabhängig von der mütterlichen Diät über die Schwangerschaft hinweg bis wenige Tage vor der Geburt insgesamt eine deutliche Zunahme sowohl der Nahrungs- als auch der Wasseraufnahme pro Tag. In den Interventionsgruppen zeigte sich ein Peak der täglichen Nahrungs- und Wasseraufnahme in der Mitte der zweiten Hälfte der Schwangerschaft, wohingegen sich in der SD-Gruppe ein zweigipfeliges Verhalten mit einem zusätzlichen geringer ausgeprägten Peak in der Mitte der ersten Hälfte der Schwangerschaft fand. Dieser Verlauf ist exemplarisch anhand der Nahrungsaufnahme in Gramm pro Tag in *Abbildung 3* dargestellt und ließ sich in gleicher Weise auch für die einzelnen Nährstoffe und die Wasseraufnahme beobachten.

Mittlere mütterliche Nahrungs- /Wasseraufnahme	SD	HFD	DIO	WSD	Signifikanzen Vergleich Interventionsdiäten		
					HFD/WSD	DIO/WSD	DIO/HFD
Metabolisierbare Energie [kcal/Maus/Tag]	15,58 ± 0,56	14,02 ± 0,44	14,60 ± 0,37	15,97 ± 0,57	†		
Nahrungsmenge [g/Maus/Tag]	4,83 ± 0,17	2,68 ± 0,08 ****	3,16 ± 0,08 ****	3,47 ± 0,12 **	†††		
Fett [g/Maus/Tag]	0,16 ± 0,01	0,94 ± 0,03 ****	0,75 ± 0,02 ****	0,76 ± 0,03 ****			◇
Proteine [g/Maus/Tag]	0,92 ± 0,03	0,56 ± 0,02 ****	0,70 ± 0,02	0,60 ± 0,02 ****			◇◇
Kohlenhydrate [g/Maus/Tag]	2,00 ± 0,07	1,12 ± 0,04 ****	1,23 ± 0,03 ****	1,68 ± 0,05	†††	†	
Zucker [g/Maus/Tag]	0,26 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,67 ± 0,02 ****	1,22 ± 0,03 ****	††††		◇◇◇
Wasseraufnahme [ml/Maus/Tag]	5,12 ± 0,19	3,70 ± 0,13 ****	3,44 ± 0,18 ****	3,43 ± 0,19 ****	†		◇

Tabelle 18: Mittlere mütterliche Nahrungs- und Wasseraufnahme pro Tag während der Schwangerschaft in den verschiedenen Futtergruppen

Angabe der Daten als Mittelwert ± SEM von n unabhängigen Mäusen: SD n = 19; HFD n = 20; DIO n = 20; WSD n = 21. Signifikante Unterschiede wurden angenommen bei $p \leq 0.05$: im Vergleich zur SD (fettgedruckt): ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$; im Vergleich zur HFD: ◇ $p \leq 0.05$, ◇◇ $p \leq 0.01$, ◇◇◇ $p \leq 0.001$; im Vergleich zur WSD: † $p \leq 0.05$, ††† $p \leq 0.001$, †††† $p \leq 0.0001$.

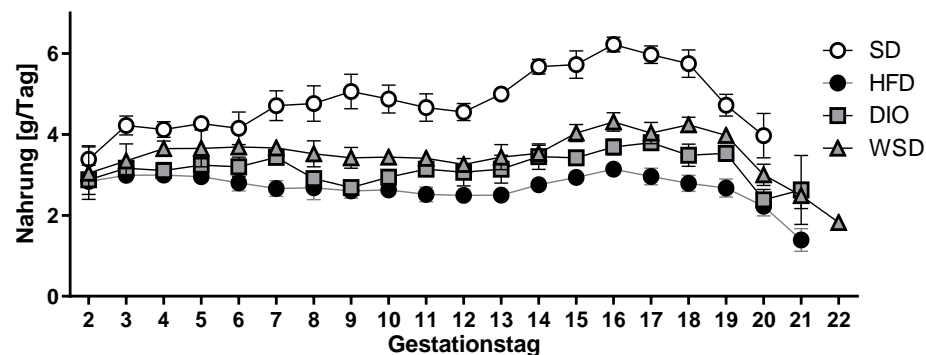


Abbildung 3: Mütterliche Nahrungsaufnahme während der Schwangerschaft

Gezeigt ist die aufgenommene Nahrungsmenge der Muttertiere in Gramm pro Tag in den verschiedenen Futtergruppen an den einzelnen Gestationstagen. Angabe der Daten als Mittelwert ± SEM von n unabhängigen Mäusen pro Gruppe: SD n = 19; HFD n = 20; DIO n = 20; WSD n = 21.

Für den Großteil der Schwangerschaft fiel insbesondere eine signifikant höhere mittlere Nahrungsaufnahme in Gramm pro Tag in der SD-Gruppe im Vergleich zu den Interventionsgruppen auf. Bei niedrigerem Energiegehalt aber höherer aufgenommener Nahrungsmenge führte dies in der SD-Gruppe zu einer ähnlich hohen mittleren Energieaufnahme pro Tag wie in den Interventionsgruppen, sodass sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen und der SD-Gruppe nachweisen ließ. Beim Vergleich der Interventionsgruppen untereinander ließ sich in der WSD-Gruppe im Mittel eine signifikant höhere tägliche Nahrungs- und Energieaufnahme im Vergleich zur HFD-Gruppe feststellen.

Obwohl sich die verschiedenen Diäten nur gering in ihrem Proteingehalt unterschieden, resultierte in der SD-Gruppe aus der im Mittel höheren täglichen Nahrungsaufnahme auch eine höhere mittlere Proteinaufnahme pro Tag im Vergleich zu den Interventionsgruppen. Außer für die DIO-Gruppe ließ sich hierbei für alle Interventionsgruppen ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur SD-Gruppe nachweisen. Beim Vergleich der Interventionsgruppen untereinander fand sich in der DIO-Gruppe eine signifikant höhere mittlere Proteinaufnahme als in der HFD-Gruppe.

Neben der höheren mittleren Proteinaufnahme zeigten die Weibchen in der SD-Gruppe auch eine höhere mittlere Kohlenhydrataufnahme pro Tag im Vergleich zu den drei Interventionsgruppen. Ein signifikanter Unterschied ließ sich hierbei jedoch nur im Vergleich zur HFD- und zur DIO-Gruppe nachweisen, in denen sich gleichzeitig auch eine signifikant geringere mittlere Kohlenhydrataufnahme im Vergleich zur WSD-Gruppe zeigte.

Wie aufgrund der inhaltlichen Zusammensetzung der Diäten zu erwarten, ließ sich für die Weibchen der SD-Gruppe eine signifikant geringere mittlere Fettaufnahme pro Tag im Vergleich zu den Weibchen der drei Interventionsgruppen feststellen. Dabei zeigte sich die höchste mittlere Fettaufnahme in der HFD-Gruppe, wohingegen in den beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen eine etwas geringere und im Vergleich untereinander ähnlich hohe mittlere Fettaufnahme feststellbar war. Hierbei konnte ein statistisch signifikanter Unterschied auch zwischen der HFD- und der DIO-Gruppe nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich, wie zu erwarten, in den beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen im Mittel eine signifikant höhere tägliche Zuckeraufnahme so-

wohl im Vergleich zur SD-Gruppe als auch im Vergleich zur HFD-Gruppe. Des Weiteren ließ sich eine signifikant höhere mittlere Wasseraufnahme pro Tag in der SD-Gruppe im Vergleich zu allen drei Interventionsgruppen feststellen. Beim Vergleich der Interventionsgruppen untereinander zeigte sich zudem in der HFD-Gruppe eine signifikant höhere mittlere Wasseraufnahme pro Tag im Vergleich zu den beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen.

4.1.2 Körpergewicht und BMI der Muttertiere

Das Körpergewicht der Weibchen aus den verschiedenen Futtergruppen wurde am Tag vor der Verpaarung an Gestationstag 0 und am Tag der Euthanasie an Gestationstag 15,5 erfasst. Zu letzterem Zeitpunkt wurde zusätzlich auch die Körperlänge gemessen und der BMI berechnet. Eingeschlossen wurden nur Weibchen mit mindestens fünf lebenden Feten pro Wurf zum Zeitpunkt der Sectio an Gestationstag 15,5. Im Versuch zeigte sich im Mittel in allen drei Interventionsgruppen an beiden Messzeitpunkten ein höheres mütterliches Körpergewicht und an Gestationstag 15,5 auch ein leicht höherer BMI im Vergleich zur SD-Gruppe (s. *Tabelle 20*). Während sich dabei für die HFD-Gruppe zu beiden Messzeitpunkten ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur SD-Gruppe nachweisen ließ, war dies für die WSD-Gruppe nur an Gestationstag 0,5 und für die DIO-Gruppe nur an Gestationstag 15,5 der Fall. Im Gegensatz zum mütterlichen Körpergewicht konnten für den mütterlichen BMI an Gestationstag 15,5 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Futtergruppen nachgewiesen werden.

Durch die Fütterung der drei Interventionsdiäten sollte eine mütterliche Adipositas induziert werden, wobei als Grenzwert, ab dem die Tiere als adipös galten, ein Körpergewicht von mindestens 23 g zum Zeitpunkt der Verpaarung festgelegt wurde. Im Einzelnen ließen sich jedoch in allen drei Interventionsgruppen einige Weibchen feststellen, welche keine adäquate Gewichtszunahme unter dem Einfluss der hochkalorischen Interventionsdiäten entwickelten. Als sogenannte Non-Responder wurden dabei die Weibchen definiert, welche zum Zeitpunkt der Verpaarung weniger als 23 g wogen und somit nicht vom Vorliegen einer mütterlichen Adipositas ausgegangen werden konnte. Während sich in der HFD-Gruppe bei insgesamt 15 Weibchen ein Drittel davon als Non-Responder erwiesen, war dies in der DIO-Gruppe für die Hälfte von insgesamt

sechs Weibchen und in der WSD-Gruppe sogar für 60 % von insgesamt fünf Weibchen der Fall.

4.1.3 Trächtigkeitsrate und Gestationsdauer

Im Versuch wurde von allen Futtergruppen die Trächtigkeitsrate der Weibchen ermittelt. Hierbei ließ sich in allen drei Interventionsgruppen eine niedrigere Trächtigkeitsrate im Vergleich zur SD-Gruppe feststellen, wobei diese in der WSD-Gruppe noch deutlich geringer war als in der HFD- und in der DIO-Gruppe (s. *Tabelle 20*).

Des Weiteren wurde von den Weibchen, welche die Schwangerschaft austrugen, die Gestationsdauer unter dem Einfluss der verschiedenen Diäten erfasst. Hierbei zeigte sich in allen drei Interventionsgruppen eine signifikant längere Gestationsdauer im Vergleich zur SD-Gruppe (s. *Tabelle 20* und *Abbildung 4*). Die insgesamt längste Gestationsdauer fand sich in der WSD-Gruppe und war hierbei im Mittel um etwa einen Tag länger als in der SD-Gruppe.

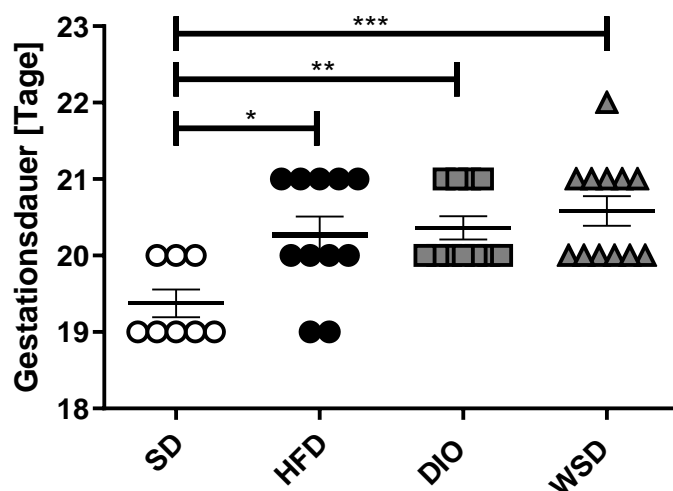


Abbildung 4: Gestationsdauer der Weibchen unter dem Einfluss der verschiedenen mütterlichen Diäten

Schwangerschaftsdauer in Tagen von n Weibchen pro Gruppe (1 Punkt repräsentiert 1 Weibchen): SD n = 8; HFD n = 11; DIO n = 11; WSD n = 12. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

4.2 Diätetischer Effekt auf die Feten

Von den an Gestationstag 15,5 euthanasierten und sektionierten Weibchen wurden die Feten aus dem Uterus entnommen und das fetale Gewicht ermittelt. Des Weiteren erfolgte die Erfassung der Wurfgröße und die Anzahl der resorbierten Feten sowie daraus die Berechnung der Resorptionsrate. Das jeweilige Geschlecht der asservierten Feten wurde im Verlauf anhand der Genotypisierung mittels PCR bestimmt und daraus das Geschlechterverhältnis der Feten des jeweiligen Wurfs ermittelt.

Im Versuch fanden sich durchschnittlich 7 - 8 Feten pro Wurf, wobei sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Wurfgröße zwischen den verschiedenen Futtergruppen nachweisen ließ (s. *Tabelle 20*). Für die Geschlechter der Feten eines Wurfs zeigte sich in der SD- und in der WSD-Gruppe ein ausgeglichenes Verhältnis, wohingegen sich in der HFD- und in der DIO-Gruppe im Mittel ein höherer Anteil männlicher Feten pro Wurf feststellen ließ (s. *Tabelle 20*). Allerdings ließ sich hierbei ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Futtergruppen nachweisen. Im Gegensatz dazu zeigten sich für den Anteil der resorbierten Feten pro Wurf deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Futtergruppen, wobei sich in allen drei Interventionsgruppen im Mittel eine höhere Resorptionsrate im Vergleich zur SD-Gruppe feststellen ließ (s. *Tabelle 20* und *Abbildung 5*). Eine statistische Signifikanz ließ sich hierbei jedoch nur für die WSD-Gruppe nachweisen, in der sich unter allen Futtergruppen die höchste mittlere Resorptionsrate zeigte.

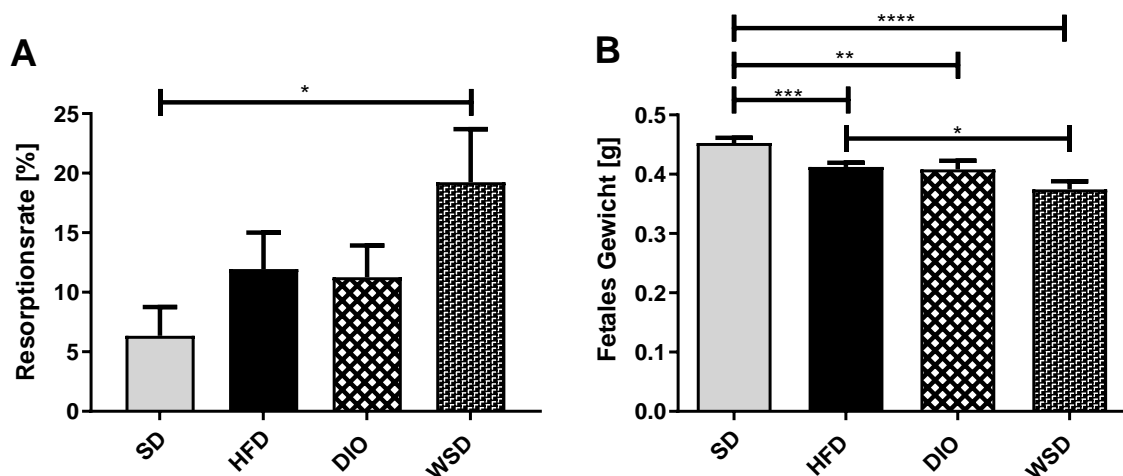


Abbildung 5: Fetales Outcome unter dem Einfluss der verschiedenen mütterlichen Diäten

(A) Resorptionsrate der Feten pro Wurf an Gestationstag 15,5. Bei einem Wurf pro Maus wurden pro Gruppe n Mäuse analysiert: SD n = 13; HFD n = 15; DIO n = 6; WSD n = 5.

(B) Fetales Körpergewicht an Gestationstag 15,5. Daten von n Feten von n Müttern: SD n = 97/13; HFD n = 115/15; DIO n = 45/6; WSD n = 42/5.

Angabe der Daten als Mittelwert ± SEM. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Auch für das fetale Gewicht an Gestationstag 15,5 zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Futtergruppen, wobei sich in allen drei Interventionsgruppen ein signifikant geringeres fetales Gewicht im Vergleich zur SD-Gruppe zeigte (s. *Tabelle 20* und *Abbildung 5*). Das geringste fetale Gewicht ließ sich für die Feten der WSD-Gruppe feststellen, wobei nicht nur im Vergleich zur SD-Gruppe, sondern auch im Vergleich zur HFD-Gruppe ein sig-

nifikanter Unterschied nachweisbar war. Zwei Tage nach Geburt (P2) ließ sich dagegen kein signifikanter Gewichtsunterschied mehr zwischen den lebenden Nachkommen der verschiedenen Futtergruppen nachweisen (s. *Tabelle 20*).

Des Weiteren wurde von den Nachkommen der Weibchen, die die Schwangerschaft austrugen, der Anteil der lebenden Nachkommen am Tag der Geburt (P1) sowie die Überlebensrate bis P2 und bis P21 (Ende der Stillzeit) erfasst (s. *Tabelle 19*). Insbesondere an P1 und bis P2 zeigte sich in der HFD-Gruppe und noch ausgeprägter in der WSD-Gruppe eine deutliche Reduktion der Überlebensrate der Nachkommen. In der DIO-Gruppe ließ sich dagegen zu allen drei Zeitpunkten nur eine sehr geringe Reduktion der Überlebensrate im Vergleich zur SD-Gruppe feststellen.

Überleben der Nachkommen [%]	SD	HFD	DIO	WSD
Anteil lebender Nachkommen an P1	98,73	90,91	97,70	82,54
Überlebensrate bis P2	97,44	88,33	94,12	82,69
Überlebensrate bis P21	100	100	97,50	94,12

Tabelle 19: Überleben der Nachkommen unter dem Einfluss der verschiedenen mütterlichen Diäten

Anteil lebender Nachkommen sowie Überlebensraten der Nachkommen der Weibchen aus den verschiedenen Futtergruppen in Prozent. n als Gesamtanzahl Nachkommen bei Geburt von n Würfen jeweils verschiedener Muttertiere: SD n = 79/8; HFD n = 66/9; DIO n = 87/10; WSD n = 63/9. P, Postnataler Tag.

4. Ergebnisse

Phänotypische Daten	SD	HFD	DIO	WSD
Mütterliches Körpergewicht an G0 [g]	21,72 ± 0,21 n = 12	24,46 ± 0,75 ** n = 15	23,71 ± 1,23 n = 6	22,78 ± 0,39 * n = 4
Mütterliches Körpergewicht an G15,5 [g]	32,09 ± 0,38 n = 13	34,91 ± 0,87 ** n = 15	35,18 ± 1,11 * n = 6	34,27 ± 1,21 n = 5
Mütterlicher BMI an G15,5 [(g/cm ²)*10]	3,25 ± 0,04 n = 12	3,37 ± 0,06 n = 15	3,44 ± 0,12 n = 6	3,34 ± 0,07 n = 5
Gestationsdauer [Tage]	19,38 ± 0,183 n = 8	20,27 ± 0,24 * n = 11	20,36 ± 0,15 ** n = 11	20,58 ± 0,19 *** n = 12
Trächtigkeitsrate [%]	29,21 n = 74	24,63 n = 123	23,08 n = 36	18,48 n = 37
Wurfgröße	7,7 ± 0,3 n = 13	8,3 ± 0,4 n = 15	8,0 ± 0,5 n = 6	8,4 ± 0,9 n = 5
Resorptionsrate [%]	6,34 ± 2,41 n = 13	11,95 ± 3,07 n = 15	11,27 ± 2,66 n = 6	19,24 ± 4,45 * n = 5
Geschlechterverhältnis [Männchen pro Wurf in %]	50,48 ± 8,35 n = 78/10	58,57 ± 7,09 n = 83/10	70,14 ± 8,08 n = 48/6	51,61 ± 4,87 n = 42/5
Fetales Gewicht an G15,5 [g]	0,4526 ± 0,0090 n = 97/13	0,4123 ± 0,0071 *** † n = 115/15	0,4082 ± 0,0145 ** n = 45/6	0,3744 ± 0,0137 **** n = 42/5
Gewicht Nachkommen an P2 [g]	1,39 ± 0,01 n = 51/8	1,43 ± 0,03 n = 36/6	1,39 ± 0,02 n = 58/10	1,37 ± 0,02 n = 24/4
Plazentares Gewicht an G15,5 [g]	0,0979 ± 0,0038 n = 22/11	0,0912 ± 0,0028 n = 34/13	0,0852 ± 0,0036 * † n = 11/5	0,0953 ± 0,0029 n = 13/4
Plazentaeffizienz an G15,5	4,552 ± 0,292 n = 22/11	4,799 ± 0,186 n = 33/13	4,937 ± 0,291 n = 11/5	4,262 ± 0,245 n = 13/4

Tabelle 20: Phänotypische Daten von Muttertieren, Feten und Plazenten

Angabe der Daten als Mittelwert ± SEM bzw. für die Trächtigkeitsrate als absoluter Wert je Futtergruppe. Ausgenommen von der Resorptionsrate und der Wurfgröße war ein Einschlusskriterium für die Analyse eine Wurfgröße von ≥ 5 Feten. Berechnung der Plazentaeffizienz aus dem Quotienten fetales Gewicht/Plazentagewicht. Phänotypische Daten der Muttertiere, Wurfgröße und Resorptionsrate von n unabhängigen Weibchen. Fetales Gewicht, Gewicht Nachkommen an P2, plazentares Gewicht und Plazentaeffizienz als n Feten oder Plazenten von n Weibchen. Geschlechterverhältnis als n Feten von n Würfen jeweils unterschiedlicher Muttertiere. Signifikante Unterschiede wurden angenommen bei p ≤ 0.05: im Vergleich zur SD (fettgedruckt): * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.0001; im Vergleich zu WSD: † p ≤ 0.05. G, Gestationstag; P, Postnataler Tag.

4.3 Diätetischer Effekt auf die Plazenten

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen, dass unter dem Einfluss der verschiedenen Interventionsdiäten und der hierdurch induzierten mütterlichen Adipositas negative Auswirkungen auf die fetale Entwicklung zu beobachten sind, die auf eine kompromittierte fetale Versorgung hindeuten. Bezüglich der hierbei zugrunde liegenden Pathophysiologie sollte untersucht werden, ob die mütterliche Diät bzw. Adipositas ungünstige Veränderungen in der Plazenta induziert, welche zu einer plazentaren Dysfunktion führen und damit ursächlich für die fetale Entwicklungsstörung sein könnten. Hierzu wurden die Plazenten phänotypisch, histologisch und molekularbiologisch auf Unterschiede zwischen den verschiedenen Futtergruppen untersucht.

4.3.1 Plazentares Gewicht und Plazentaeffizienz an Gestationstag 15,5

Im Versuch wurde von einigen Plazenten der an Gestationstag 15,5 euthanasierten und sektionierten Weibchen das Gewicht ermittelt. Während sich im Versuch für das plazentare Gewicht kein wesentlicher Unterschied zwischen der WSD- und der SD-Gruppe zeigte, ließ sich in der HFD- und in der DIO-Gruppe ein geringeres plazentares Gewicht im Vergleich zur SD-Gruppe feststellen (s. *Tabelle 20*). Eine statistische Signifikanz ließ sich hierbei jedoch nur für die DIO-Gruppe nachweisen, wobei sich das plazentare Gewicht signifikant geringer sowohl im Vergleich zur SD-Gruppe als auch im Vergleich zur WSD-Gruppe zeigte. Im Hinblick auf die Frage bezüglich des Vorliegens einer plazentaren Dysfunktion wurde die Plazentaeffizienz aus dem Quotienten des fetalen Gewichts und des Gewichts der zugehörigen Plazenta ermittelt. Während sich für die Plazenten der WSD-Gruppe eine leicht reduzierte Plazentaeffizienz feststellen ließ, zeigte sich dagegen für die Plazenten der HFD- und der DIO-Gruppe eine leicht erhöhte Plazentaeffizienz im Vergleich zur SD-Gruppe (s. *Tabelle 20*). Allerdings ließ sich hierbei für die Unterschiede zwischen den Futtergruppen keine statistische Signifikanz nachweisen.

4.3.2 Diätetischer Effekt auf die Volumina der plazentaren Zonen

Bei der stereologischen Analyse der Plazenten sollte unter anderem untersucht werden, ob sich ein Einfluss der mütterlichen Diät bzw. Adipositas auf das Gesamtvolumen der Plazenten, sowie auf die Volumina der drei verschiedenen plazentaren Zonen nachweisen ließ.

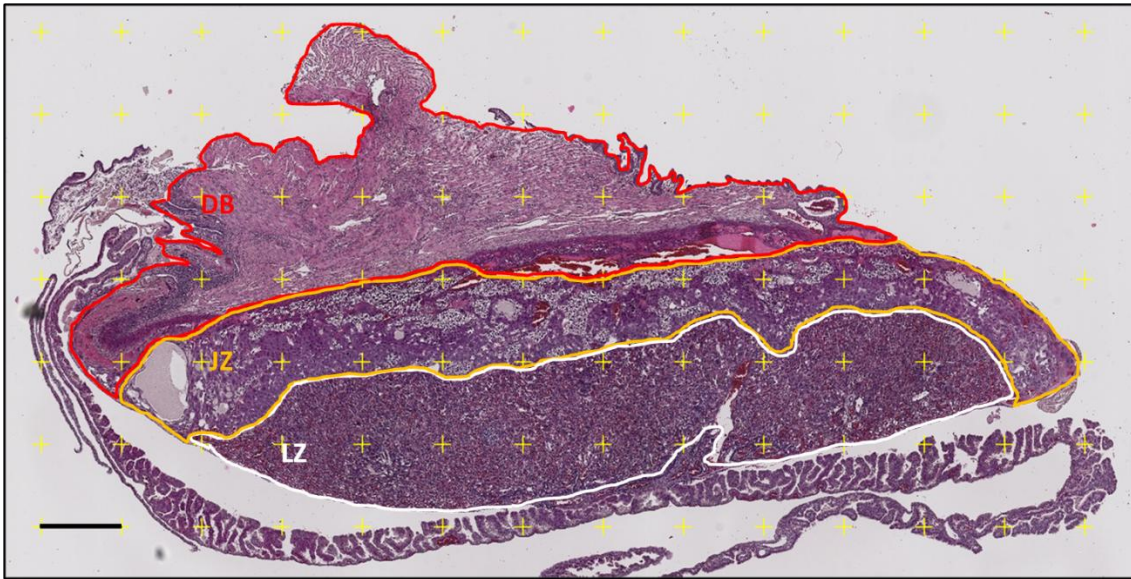


Abbildung 6: Repräsentatives Bild eines histologischen Schnitts für die stereologische Analyse der placentaren Zonen

HE-gefärbter histologischer Schnitt durch eine gesamte Plazenta aus der DIO-Gruppe in 10x-Vergrößerung. Hervorhebung der verschiedenen placentaren Zonen durch farbige Umrandung: Labyrinth-Zone (LZ): weiß; Junctional Zone (JZ): orange; Dezidua basalis (DB): rot. Grid aus Kreuzen (gelb) zur stereologischen Analyse der Volumina der placentaren Zonen, wobei ein Kreuz eine Fläche von $250.000 \mu\text{m}^2$ repräsentiert. Größenbalken: $500 \mu\text{m}$.

Die Labyrinth-Zone als Ort des fetomaternalen Stoffaustausches war hierbei von besonderem Interesse, da Veränderungen dieser Zone unmittelbare Folgen für die fetale Versorgung haben können. Mit der Funktion als Energiedepot durch die enthaltenen Glykogenzellen sowie der Produktion von Hormonen durch die beiden Spongiotrophoblastenpopulationen, wurde jedoch auch der Junctional Zone besondere Beachtung zuteil [26, 30].

Im Versuch zeigte sich für das Gesamtvolumen der Plazenten (Summe der Volumina von LZ, JZ und DB) in der HFD-Gruppe ein leicht erhöhtes Volumen im Vergleich zur SD-Gruppe, wohingegen sich in der DIO- und in der WSD-Gruppe ein leicht vermindertes Volumen der Plazenten im Vergleich zur SD-Gruppe feststellen ließ (s. *Tabelle 21*). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für das absolute Volumen der Junctional Zone sowie für den Volumenanteil der Junctional Zone am Gesamtvolumen der Plazenta (s. *Tabelle 21*). Allerdings ließen sich hierbei weder für das Gesamtvolumen der Plazenten noch für das Volumen der Junctional Zone statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Futtergruppen nachweisen.

Das absolute Volumen der Labyrinth-Zone sowie der Volumenanteil der Labyrinth-Zone am Gesamtvolumen der Plazenta zeigte sich in den beiden Hoch-

fett-/Hochzuckerinterventionsgruppen reduziert im Vergleich zur SD-Gruppe (s. *Tabelle 21*). Eine statistische Signifikanz ließ sich hierbei jedoch nur für das absolute Volumen der Labyrinth-Zone in der WSD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe nachweisen. Zwischen der HFD-Gruppe und der SD-Gruppe ließ sich dagegen weder für das absolute Volumen noch für den Volumenanteil der Labyrinth-Zone am Gesamtvolumen der Plazenta ein wesentlicher Unterschied feststellen (s. *Tabelle 21*).

Des Weiteren zeigte sich im Versuch in allen Interventionsgruppen, und hierbei insbesondere in der WSD-Gruppe, ein erhöhtes absolutes Volumen der Dezidua basalis sowie ein erhöhter Volumenanteil der Dezidua basalis am Gesamtvolumen der Plazenta im Vergleich zur SD-Gruppe (s. *Tabelle 21*). Ein signifikanter Unterschied ließ sich jedoch nur für den Volumenanteil der Dezidua basalis am Gesamtvolumen der Plazenta zwischen der WSD-Gruppe und der SD-Gruppe nachweisen. Für das absolute Volumen der Dezidua basalis zeigte sich jedoch ebenfalls zumindest ein starker Trend für ein größeres Volumen in der WSD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe ($p = 0,0519$).

Zusammenfassend konnte für die Volumina der placentaren Zonen somit nur in der WSD-Gruppe und hierbei nur für die Labyrinth-Zone und die Dezidua basalis ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur SD-Gruppe nachgewiesen werden.

4.3.3 Diätetischer Effekt auf das Volumen der Glykogenzellnester der Plazenta

Die Glykogenzellen in der Plazenta stellen ein Energiedepot dar, welches bei Mangelzuständen die Versorgung der Plazenta und die des Kindes aufrecht erhalten kann [30]. Zur Untersuchung der pathophysiologischen Rolle der Plazenta war dabei von besonderem Interesse, wie sich das Volumen der Glykogenzellnester und deren Verteilung innerhalb der Plazenta unter dem Einfluss der verschiedenen mütterlichen Diäten verhält. Bei der stereologischen Analyse der Plazenten wurde daher das Gesamtvolumen der Glykogenzellnester sowie deren Lokalisation innerhalb der placentaren Zonen untersucht. Da die Glykogenzellen physiologischerweise im Laufe der Schwangerschaft von der Junctional Zone in die Dezidua basalis migrieren, wurden diese beiden Zonen als eine Einheit betrachtet und daher bei der Untersuchung der Lokalisation lediglich zwischen Glykogenzellnestern innerhalb und außerhalb der Labyrinth-Zone un-

terschieden [26]. Der Hintergrund ist hierbei die Annahme, dass Glykogenzellen innerhalb der Labyrinth-Zone aufgrund der räumlichen Nähe zu den fetalen Gefäßen überwiegend der fetalen Versorgung dienen, wohingegen Glykogenzellen außerhalb der Labyrinth-Zone vor allem der Plazenta selbst als Energielieferant dienen.



Abbildung 7: Repräsentatives Bild eines histologischen Schnitts für die stereologische Analyse des Volumens der Glykogenzellnester in der Plazenta

PAS-gefärbter histologischer Schnitt durch eine gesamte Plazenta aus der SD-Gruppe in 20x-Vergrößerung. Gemeinsame Umrandung der Junctional Zone (JZ) und der Deidua basalis (DB) in schwarz und der Labyrinth-Zone (LZ) in weiß. Grid aus Kreuzen (gelb) zur stereologischen Analyse des Volumens der Glykogenzellnester, wobei ein Kreuz eine Fläche von $75.000 \mu\text{m}^2$ repräsentiert. Der Pfeil zeigt auf ein Glykogenzellnest in der Labyrinth-Zone. Größenbalken: $274 \mu\text{m}$.

Im Vergleich zur SD-Gruppe zeigte sich das Gesamtvolumen der Glykogenzellnester sowie das Volumen der Glykogenzellnester innerhalb bzw. außerhalb der Labyrinth-Zone in der WSD-Gruppe minimal und in der HFD-Gruppe noch etwas stärker erhöht, wohingegen sich in der DIO-Gruppe kein wesentlicher Unterschied im Vergleich zur SD-Gruppe zeigte (s. *Tabelle 21*). Insgesamt konnte jedoch für keinen der drei untersuchten Aspekte ein signifikanter Unterschied zwischen den Futtergruppen nachgewiesen werden. Somit ergab sich kein Hinweis darauf, dass die mütterliche Adipositas oder die mütterliche Diät an Gestationstag 15,5 einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtvolumen der Glykogenzellnester oder deren Lokalisation innerhalb der Plazenta hat.

4. Ergebnisse

	SD	HFD	DIO	WSD
Volumen plazentarer Kompartimente [mm³]	n = 6	n = 5	n = 6	n = 5
Plazenta gesamt	45,937 ± 2,141	49,680 ± 3,693	41,962 ± 2,204	43,578 ± 2,289
Labyrinth-Zone	16,448 ± 1,127	16,536 ± 1,265	14,400 ± 0,411	13,708 ± 0,480 *
Junctional Zone	16,492 ± 1,364	18,762 ± 2,6595	14,035 ± 1,2062	14,726 ± 1,8520
Dezidua basalis	12,998 ± 0,692	14,382 ± 1,321	13,530 ± 1,491	15,150 ± 0,557
Volumenanteil plazentarer Kompartimente [%]	n = 6 (LZ n = 5)	n = 5	n = 6 (LZ n = 5)	n = 5
Labyrinth-Zone	33,74 ± 0,81	33,66 ± 2,50	32,71 ± 1,05	31,59 ± 0,81
Junctional Zone	35,72 ± 1,82	37,45 ± 3,30	33,31 ± 1,74	33,31 ± 2,56
Dezidua basalis	28,33 ± 0,87	28,88 ± 1,36	31,84 ± 2,69	35,10 ± 2,13 **
Volumen Glykogenzellnester der Plazenta [mm³]	n = 6	n = 5	n = 6	n = 5
Gesamt	10,241 ± 0,565	12,847 ± 1,750	9,908 ± 1,032	11,231 ± 0,825
Volumen Glykogenzellnester in LZ	0,414 ± 0,072	0,645 ± 0,145	0,449 ± 0,063	0,500 ± 0,036
Volumen Glykogenzellnester außerhalb LZ	9,827 ± 0,576	12,202 ± 1,692	9,460 ± 1,021	10,731 ± 0,852

Tabelle 21: Ergebnisse der stereologischen Analyse der Plazenten: Volumina plazentarer Zonen und der Glykogenzellnester

Angabe der Werte als Mittelwert ± SEM von n Plazenten jeweils verschiedener Muttertiere. Anteil Plazenten männlicher Feten pro Gruppe: SD = 50 %; HFD = 60 %; DIO = 66,66 %; WSD = 60 %. Volumenanteil plazentarer Kompartimente: Volumen Kompartiment/Gesamtvolumen Plazenta. Signifikante Unterschiede wurden angenommen bei $p \leq 0.05$: im Vergleich zur SD (fettgedruckt): * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. Für den Vergleich der Interventionsdiäten untereinander ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen. LZ, Labyrinth-Zone.

4.3.4 Diätetischer Effekt auf das Volumen und die Oberfläche der vaskulären Strukturen in der Labyrinth-Zone

Die vaskulären Strukturen in der Labyrinth-Zone der Plazenta spielen als Ort des fetomaternalen Stoffaustausches eine wichtige Rolle bei der Klärung der zugrunde liegenden Pathophysiologie einer kompromittierten fetalen Versorgung. Im Versuch wurden mit stereologischen Methoden das Volumen und die Oberfläche der fetalen Kapillaren und der maternalen Blutsinusse ermittelt, da diese wichtige Parameter für die Effektivität des fetomaternalen Stoffaustausches darstellen. Des Weiteren wurde das Volumen des Trophoblastengewebes zwischen den vaskulären Strukturen der Labyrinth-Zone erfasst, welches das Gesamtvolumen der Interhemal Membrane repräsentiert.

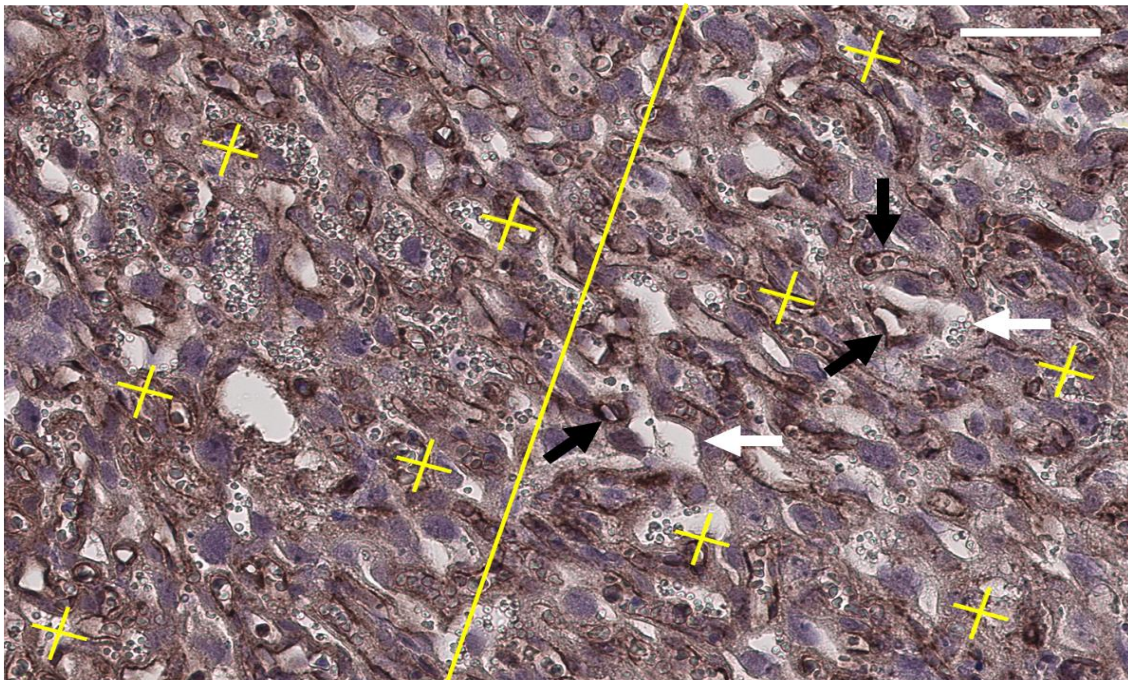


Abbildung 8: Repräsentativer Bildausschnitt eines histologischen Schnitts für die stereologische Analyse der vaskulären Strukturen in der plazentaren Labyrinth-Zone

Bildausschnitt aus der Labyrinth-Zone eines immunohistochemisch gefärbten histologischen Schnitts einer Plazenta aus der SD-Gruppe in 40x-Vergrößerung. Färbung des fetalen Endothels mit einem Antikörper gegen CD-31 und Gegenfärbung mit Hämalaunlösung sauer nach Mayer. Grid aus Linie und Kreuzen (gelb) zur stereologischen Analyse der Oberfläche und des Volumens der vaskulären Strukturen, wobei ein Kreuz eine Fläche von $12.500 \mu\text{m}^2$ repräsentiert. Schwarze Pfeile zeigen auf fetale Kapillaren (CD-31 positiv), weiße Pfeile zeigen auf maternale Blutsinusse (CD-31 negativ). Größenbalken: $55 \mu\text{m}$.

Für das Volumen des Trophoblastengewebes in der Labyrinth-Zone der Plazenta ließen sich zwischen der HFD- und der SD-Gruppe keine wesentlichen Unterschiede feststellen (s. *Tabelle 22*). Dagegen zeigte sich in den beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen ein erhöhtes absolutes Volumen des Tro-

phoblastengewebes im Vergleich zur SD-Gruppe, wobei sich jedoch keine statistische Signifikanz nachweisen ließ (s. *Tabelle 22*). Dafür ließ sich ein signifikant höherer Volumenanteil des Trophoblastengewebes am Gesamtvolumen der Labyrinth-Zone in den beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen sowohl im Vergleich zur SD-Gruppe als auch im Vergleich zur HFD-Gruppe feststellen (s. *Tabelle 22*).

Für die fetalen Kapillaren konnte in beiden Hochfett/Hochzuckerinterventionsgruppen ein signifikant geringeres Gefäßvolumen im Vergleich zur SD-Gruppe nachgewiesen werden (s. *Tabelle 22*). Gleiches zeigte sich auch für den Volumenanteil der fetalen Kapillaren am Gesamtvolumen der Labyrinth-Zone (s. *Tabelle 22*). Dagegen ließen sich im Versuch für die Plazenten der HFD-Gruppe keine wesentlichen Unterschiede bezüglich des fetalen Gefäßvolumens im Vergleich zur SD-Gruppe feststellen. Beim Vergleich der Interventionsgruppen untereinander ließ sich jedoch für die Plazenten der HFD-Gruppe ein signifikant höheres absolutes fetales Gefäßvolumen im Vergleich zur DIO-Gruppe und ein signifikant höherer Volumenanteil der fetalen Kapillaren am Gesamtvolumen der Labyrinth-Zone im Vergleich zu beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen nachweisen (s. *Tabelle 22*).

Ähnliche Verhältnisse wie für das fetale Gefäßvolumen zeigten sich auch für die fetale Gefäßoberfläche (s. *Tabelle 22*). Hierbei ließ sich in den Plazenten der beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen eine geringere Oberfläche der fetalen Kapillaren im Vergleich zur SD-Gruppe feststellen, wobei sich jedoch nur für die DIO-Gruppe eine statistische Signifikanz nachweisen ließ. Für die Plazenten der HFD-Gruppe ließ sich für die fetale Gefäßoberfläche zwar kein wesentlicher Unterschied im Vergleich zur SD-Gruppe feststellen, dagegen zeigte sich jedoch beim Vergleich der Interventionsdiäten untereinander in der HFD-Gruppe eine signifikant höhere fetale Gefäßoberfläche im Vergleich zur DIO-Gruppe.

Somit zeigte sich in diesem Versuch unter dem Einfluss der beiden Hochfett-/Hochzuckerdiäten ein statistisch signifikanter Effekt auf das fetale Gefäßvolumen und die fetale Gefäßoberfläche, wohingegen sich dies unter dem Einfluss der reinen Hochfettdiät nicht nachweisen ließ.

Für das Volumen und die Oberfläche der maternalen Blutsinuse wurden ähnliche Ergebnisse wie für die fetalen Gefäße ermittelt (s. *Tabelle 22*). So zeigte

sich ein signifikant geringeres maternales Gefäßvolumen in den beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen sowohl im Vergleich zur SD-Gruppe als auch im Vergleich zur HFD-Gruppe. Auch der Volumenanteil der maternalen Blutsinuse am Gesamtvolumen der Labyrinth-Zone zeigte sich in den beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen geringer sowohl im Vergleich zur HFD-Gruppe als auch im Vergleich zur SD-Gruppe. Eine statistische Signifikanz ließ sich hierbei jedoch nur im Vergleich zur HFD-Gruppe nachweisen. Für die Plazenten der HFD-Gruppe zeigten sich im Versuch keine signifikanten Unterschiede für das absolute Volumen oder den Volumenanteil der maternalen Blutsinuse am Gesamtvolumen der Labyrinth-Zone im Vergleich zur SD-Gruppe. Gleiches ließ sich auch für die Oberfläche der maternalen Blutsinuse beim Vergleich der HFD-Gruppe mit der SD-Gruppe feststellen. Für die Plazenten der beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen zeigte sich zwar eine geringere maternale Gefäßoberfläche im Vergleich zur SD-Gruppe, allerdings ließ sich hierbei keine statistische Signifikanz nachweisen (s. *Tabelle 22*).

Analog zu den Ergebnissen für die fetalen Gefäße legen somit auch die Resultate für die maternalen Blutsinuse nahe, dass sich die beiden Hochfett-/Hochzuckerdiäten in ihrem Effekt auf die plazentaren Gefäße von der reinen Hochfett-diät unterscheiden.

4. Ergebnisse

	SD	HFD	DIO	WSD
Volumen Kompartimente der LZ [mm³]	n = 6 (FK n = 5)	n = 5	n = 6	n = 5
Fetale Kapillaren	3,882 ± 0,105	3,680 ± 0,351	2,673 ± 0,161 ** ◇	2,919 ± 0,189 **
Maternale Blutsinusse	6,662 ± 0,625	6,376 ± 0,476	4,707 ± 0,226 ** ◇◇	4,477 ± 0,404 * ◇
Trophoblastengewebe in LZ	6,925 ± 0,578	6,171 ± 0,695	7,530 ± 0,410	7,284 ± 0,345
Volumenanteil Kompartimente der LZ [%]	n = 6 (FK n = 5)	n = 5 (FK n = 4)	n = 6	n = 5
Fetale Kapillaren	23,52 ± 0,57	24,86 ± 0,38	17,96 ± 1,14 ** ◇◇	19,96 ± 1,35 * ◇
Maternale Blutsinusse	36,55 ± 2,40	39,22 ± 1,92	31,49 ± 1,13 ◇	30,62 ± 2,22 ◇
Trophoblastengewebe in LZ	38,63 ± 2,42	37,71 ± 3,08	50,33 ± 1,88 ** ◇	49,70 ± 1,32 ** ◇
Oberfläche Kompartimente der LZ [cm²]	n = 5	n = 5	n = 6	n = 5
Fetale Kapillaren	15,44 ± 0,59	14,81 ± 1,05	11,28 ± 0,62 ** ◇	13,01 ± 1,02
Maternale Blutsinusse	18,34 ± 1,30	18,45 ± 0,89	16,01 ± 1,27	16,40 ± 1,98

Tabelle 22: Ergebnisse der stereologischen Analyse der Plazenten: Volumen und Oberfläche der vaskulären Strukturen in der Labyrinth-Zone

Angabe der Werte als Mittelwert ± SEM von n Plazenten jeweils verschiedener Muttertiere. Anteil Plazenten männlicher Feten pro Gruppe: SD = 50 %; HFD = 60 %; DIO = 66,66 %; WSD = 60 %. Volumenanteil Kompartimente der LZ: Volumen Kompartiment/Gesamtvolumen LZ. Signifikante Unterschiede wurden angenommen bei $p \leq 0.05$: im Vergleich zur SD (fettgedruckt): * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$; im Vergleich zur HFD: ◇ $p \leq 0.05$, ◇◇ $p \leq 0.01$. LZ, Labyrinth-Zone; FK, Fetale Kapillaren.

4.3.5. Diätetischer Effekt auf die fetalen Endothelzellen in der Plazenta

Das Endothel der fetalen Kapillaren spielt als Teil der Interhemal Membrane eine wichtige Rolle für den fetomaternalen Stoffaustausch. Die im Folgenden unter dem Begriff Endothelzellmarker zusammengefassten Proteine sind insbesondere für die Angiogenese, die Migration und das Überleben der einzelnen Endothelzellen von Bedeutung [35, 39, 123]. Dagegen spielen die Adherens Junctions vor allem für den endothelialen Gewebeverband eine wichtige Rolle und sind dabei essentiell für die Integrität und Stabilität sowie für die selektiv permeable Barrierefunktion der fetalen Kapillaren [46, 47, 51, 54]. Sowohl Störungen der einzelnen Endothelzellen als auch des endothelialen Gewebeverbands der fetalen Kapillaren in der Plazenta können die fetale Versorgung entscheidend beeinflussen. Daher sollte untersucht werden, ob die beobachtete fetale Entwicklungsstörung unter dem Einfluss der mütterlichen Interventionsdiäten bzw. der mütterlichen Adipositas auf eine Veränderung des fetalen Endothels in der Plazenta zurückzuführen sein könnte. Hierzu wurden die Plazenten der verschiedenen Futtergruppen auf quantitative Unterschiede bezüglich der Expression und der Proteinlevel von Endothelzellmarkern und Adherens Junction-Markern an Gestationstag 15,5 untersucht. Die Plazenten wurden hierbei nach dem Geschlecht der zugehörigen Feten getrennt analysiert. Auf mRNA-Ebene erfolgte dabei der Abgleich des untersuchten Gens gegen die beiden Housekeeping-Gene Beta-Aktin und GAPDH, wobei eine relevante Veränderung der Expression nur angenommen wurde, wenn in beiden Abgleichen ein signifikanter Unterschied nachweisbar war. Auf Proteinebene erfolgte dagegen der Abgleich gegen das Housekeeping-Gen HPRT. Signifikante Unterschiede ließen sich bezüglich der Proteinlevel sowohl beim Vergleich der Interventionsdiäten mit der Standarddiät, als auch beim Vergleich der Interventionsdiäten untereinander nachweisen. Bezüglich der Genexpression fanden sich dagegen lediglich beim Vergleich der Interventionsdiäten mit der Standarddiät signifikante Unterschiede, daher wurde im Folgenden von einer Darstellung der Ergebnisse des Vergleichs der Interventionsdiäten untereinander auf mRNA-Ebene abgesehen.

4.3.5.1 Diätetischer Effekt auf die Expression und das Proteinlevel von Endothelzellmarkern in der Plazenta

Im Versuch wurden die Endothelzellmarker Angpt-1, Angpt-2, TIE-1, TIE-2, Apelin, vWF und CD-31 auf mRNA-Ebene sowie CD-31 zusätzlich auf Proteinebene auf relevante Veränderungen der Genexpression bzw. des Proteinlevels in der Plazenta unter dem Einfluss der verschiedenen mütterlichen Diäten untersucht (s. *Tabelle 23* und *Abbildung 9*).

Gen	HFD	DIO	WSD
Weiblich			
Angpt-1	0,77 ± 0,07 (*)	0,27 ± 0,04 **	0,42 ± 0,05 **
Angpt-2	0,87 ± 0,08	0,48 ± 0,09 *	0,97 ± 0,12
TIE-1	0,83 ± 0,04 (*)	0,98 ± 0,08	0,85 ± 0,02 (*)
TIE-2	0,75 ± 0,05 **	0,83 ± 0,06	0,72 ± 0,06 (**)
Apelin	0,71 ± 0,06 **	0,26 ± 0,06 **	0,75 ± 0,08 (**)
vWF	0,86 ± 0,08	0,99 ± 0,25	0,92 ± 0,07
CD-31	0,91 ± 0,07	0,61 ± 0,06 **	0,78 ± 0,06 (*)
Männlich			
Angpt-1	0,92 ± 0,12	0,73 ± 0,08 *	0,89 ± 0,15
Angpt-2	0,75 ± 0,09 (*)	0,75 ± 0,16	1,05 ± 0,24
TIE-1	0,88 ± 0,05	1,07 ± 0,06	1,01 ± 0,10
TIE-2	0,94 ± 0,08	1,09 ± 0,06	1,02 ± 0,13
Apelin	0,91 ± 0,10	1,16 ± 0,35	1,10 ± 0,21
vWF	0,91 ± 0,07	0,93 ± 0,07	0,80 ± 0,10
CD-31	0,95 ± 0,04	0,91 ± 0,08	0,98 ± 0,09

Tabelle 23: Genexpression von Endothelzellmarkern in den Plazenten der verschiedenen Futtergruppen

Mittels qRT-PCR wurde nach Geschlechtern getrennt die relative Genexpression von Endothelzellmarkern in den Plazenten der Interventionsgruppen im Vergleich zur SD-Gruppe (relative Expression = 1) an Gestationstag 15,5 ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse für die Normalisierung auf das Abgleichgen Beta-Aktin, für das Abgleichgen GAPDH zeigten sich ähnliche Ergebnisse (nicht dargestellt). Angabe der Werte als Mittelwert ± SEM von n Plazenten jeweils unterschiedlicher Muttertiere pro Geschlechtergruppe: Weiblich: SD n = 7; HFD n = 6 - 7; DIO n = 4; WSD n = 5; Männlich: SD n = 7; HFD n = 7; DIO n = 6; WSD n = 4 - 5. Signifikante Unterschiede wurden angenommen bei $p \leq 0.05$: im Vergleich zur SD (fettgedruckt): * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. (*) Signifikante Unterschiede im Abgleich zu Beta-Aktin, jedoch nicht im Abgleich zu GAPDH. Angpt-1, Angiotensinogen; Angpt-2, Angiotensinogenase II; vWF, von-Willebrand-Faktor.

Für die Plazenten der männlichen Feten zeigte sich auf mRNA-Ebene lediglich in der DIO-Gruppe und nur für den endothelialen Wachstumsfaktor Angpt-1 eine signifikant geringere Expression im Vergleich zur SD-Gruppe. Dagegen ließen sich für die Plazenten der weiblichen Feten für mehrere Endothelzellmarker signifikante Veränderungen der Expression in den Interventionsgruppen im Vergleich zur SD-Gruppe nachweisen. In der WSD-Gruppe zeigte sich als einzige signifikante Veränderung eine Herunterregulation von Angpt-1. Dagegen zeigte sich in der HFD-Gruppe eine verminderte Expression von Apelin und des TIE-2-Rezeptors. In der DIO-Gruppe ließen sich unter den Interventionsgruppen die meisten signifikanten Veränderungen im Vergleich zur SD-Gruppe nachweisen. Hierbei zeigte sich wie in der WSD-Gruppe eine Herunterregulation von Angpt-1 und analog zur HFD-Gruppe auch eine Herunterregulation von Apelin. Zudem zeigte sich eine signifikant verminderte Expression von Angpt-2 und CD-31. Dagegen ließ sich für den TIE-1-Rezeptor und für den vWF für beide Geschlechter in keiner der Interventionsgruppen eine relevante Veränderung der Genexpression im Vergleich zur SD-Gruppe nachweisen.

Für die Plazenten der weiblichen Feten zeigte sich in der DIO-Gruppe konkordant zur Herunterregulation von CD-31 auf mRNA-Ebene auch ein geringeres CD-31-Proteinlevel. Auf Proteinebene ließ sich dabei eine statistische Signifikanz sowohl beim Vergleich der DIO-Gruppe mit der SD-Gruppe als auch mit der WSD-Gruppe nachweisen. Dagegen ließ sich zwischen den Plazenten der weiblichen Feten aus der WSD-Gruppe und der SD-Gruppe kein wesentlicher Unterschied bezüglich des Proteinlevels von CD-31 feststellen (s. *Abbildung 9*). Auch in der HFD-Gruppe zeigte sich sowohl für die Plazenten der weiblichen als auch der männlichen Feten ein geringeres Proteinlevel von CD-31 im Vergleich zur SD-Gruppe. Hierbei ließ sich jedoch nur für die Plazenten der männlichen Feten eine statistische Signifikanz nachweisen. In den beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen zeigte sich dagegen für die Plazenten der männlichen Feten ein signifikant höheres Proteinlevel von CD-31 sowohl im Vergleich zur SD-Gruppe als auch im Vergleich zur HFD-Gruppe. Somit ließ sich unter dem Einfluss der Hochfett-/Hochzuckerdiäten für die Plazenten männlichen Geschlechts ein gegensätzlicher Effekt auf das Proteinlevel von CD-31 als unter dem Einfluss der reinen Hochfett-diät feststellen (s. *Abbildung 9*).

Insgesamt deuten die Ergebnisse auf mRNA-Ebene darauf hin, dass alle drei Interventionsdiäten zu einer Herunterregulation jeweils verschiedener Endothelzellmarker führen. Konkordant hierzu zeigte sich in der HFD-Gruppe für den Endothelzellmarker CD-31 für beide Geschlechter auch ein geringeres Proteinlevel. Dagegen ließen sich für die Plazenten der beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen teilweise gegensätzliche geschlechterabhängige Unterschiede bezüglich des CD-31-Proteinlevels im Vergleich zur SD-Gruppe nachweisen.

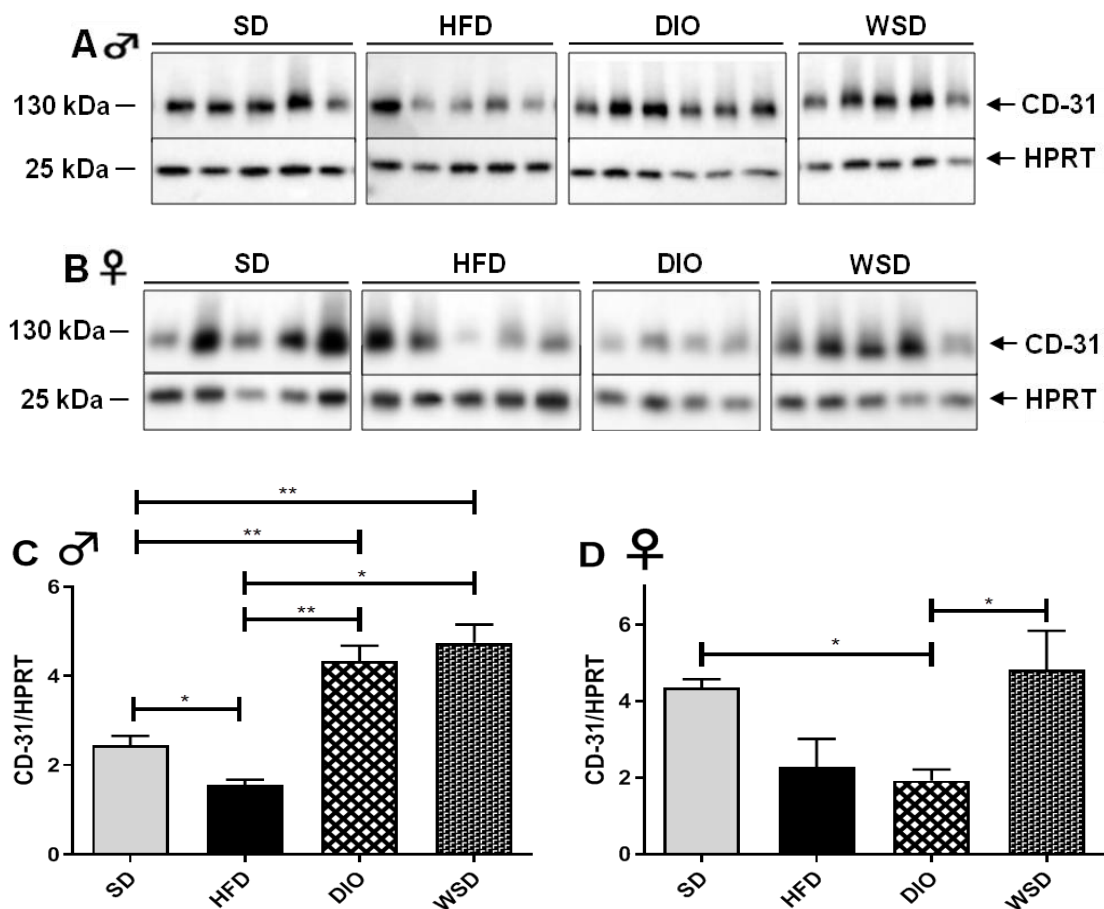


Abbildung 9: Proteinlevel von CD-31 in den Plazenten der verschiedenen Futtergruppen
 Ergebnisse der Western-Blot-Analyse des Proteinlevels von CD-31 (130-140 kDa) mit HPRT (24 kDa) als Abgleich aus Plazentalysaten von A) Plazenten männlicher Feten und von B) Plazenten weiblicher Feten der verschiedenen Futtergruppen an Gestationstag 15,5. Zur besseren Übersicht erfolgte ein Zuschnitt der digitalisierten Membranen, um die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse für die verschiedenen Futtergruppen in der gleichen Reihenfolge aufzuführen wie die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung. Analyse von n Plazenten jeweils unterschiedlicher Muttertiere pro Geschlechtergruppe: A) SD n = 5; HFD n = 4; DIO n = 6; WSD n = 5; B) SD n = 4; HFD n = 5; DIO n = 4; WSD n = 5. Die Graphen zeigen die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Western Blots für CD-31 normalisiert auf HPRT für Plazenten C) männlicher Feten und für D) weiblicher Feten. Angabe der relativen densitometrischen Werte als Mittelwert \pm SEM. Signifikante Unterschiede wurden angenommen bei $p \leq 0.05$: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. HPRT, Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase.

4.3.5.2 Diätetischer Effekt auf die Expression und das Proteinlevel von Adherens Junction-Markern in der Plazenta

Im Versuch wurden zwei verschiedene Komponenten der Adherens Junctions untersucht, welche dabei unter dem Begriff Adherens Junction-Marker zusammengefasst wurden. Hierbei wurde VE-Cadherin und Beta-Catenin auf mRNA-Ebene sowie VE-Cadherin zusätzlich auf Proteinebene auf relevante Veränderungen der Genexpression bzw. des Proteinlevels in der Plazenta unter dem Einfluss der verschiedenen mütterlichen Diäten untersucht (s. *Tabelle 24* und *Abbildung 10*).

Auf mRNA-Ebene konnte nur für die Plazenten weiblicher Feten aus der DIO-Gruppe eine signifikant geringere Expression von Beta-Catenin im Vergleich zur SD-Gruppe nachgewiesen werden. Für die Expression von VE-Cadherin konnte dagegen auf mRNA-Ebene für beide Geschlechter kein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen und der SD-Gruppe festgestellt werden (s. *Tabelle 24*).

Gen	HFD	DIO	WSD
Weiblich			
Beta-Catenin	0,79 ± 0,05 (*)	0,58 ± 0,09 **	0,77 ± 0,05 (*)
VE-Cadherin	1,00 ± 0,06	1,16 ± 0,08	1,16 ± 0,05
Männlich			
Beta-Catenin	0,93 ± 0,04	0,99 ± 0,07	1,03 ± 0,05
VE-Cadherin	0,98 ± 0,05	1,02 ± 0,11	1,05 ± 0,06

Tabelle 24: Genexpression von Adherens Junction-Markern in den Plazenten der verschiedenen Futtergruppen

Mittels qRT-PCR wurde nach Geschlechtern getrennt die relative Genexpression von Adherens Junction-Markern in den Plazenten der Interventionsgruppen im Vergleich zur SD-Gruppe (relative Expression = 1) an Gestationstag 15,5 ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse für die Normalisierung auf das Abgleichgen Beta-Aktin, für das Abgleichgen GAPDH zeigten sich ähnliche Ergebnisse (nicht dargestellt). Angabe der Werte als Mittelwert ± SEM von n Plazenten jeweils unterschiedlicher Muttertiere pro Geschlechtergruppe: Weiblich: SD n = 7; HFD n = 6 - 7; DIO n = 4; WSD n = 5. Männlich: SD n = 7; HFD n = 7; DIO n = 6; WSD n = 5. Signifikante Unterschiede wurden angenommen bei $p \leq 0.05$: im Vergleich zur SD (fettgedruckt): * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. (*) Signifikante Unterschiede im Abgleich zu Beta-Aktin, jedoch nicht im Abgleich zu GAPDH. VE-Cadherin, Vascular Endothelial Cadherin.

Für die Plazenten weiblichen Geschlechts konnte für VE-Cadherin auch auf Proteinebene kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Futtergruppen festgestellt werden. Allerdings deuteten die Ergebnisse auf ein höheres Proteinlevel von VE-Cadherin in den Plazenten der beiden Hochfett-/Hoch-

zuckerinterventionsgruppen im Vergleich zur SD-Gruppe hin. Für die Plazenten männlichen Geschlechts zeigte sich in allen drei Interventionsgruppen ein höheres Proteinlevel von VE-Cadherin im Vergleich zur SD-Gruppe. Hierbei ließ sich im Gegensatz zu den Plazenten der weiblichen Feten zumindest für die HFD- und die WSD-Gruppe auch ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen. Auf Proteinebene deuten die Ergebnisse somit insgesamt auf eine Hochregulation von VE-Cadherin in der Plazenta unter dem Einfluss der verschiedenen Interventionsdiäten hin.

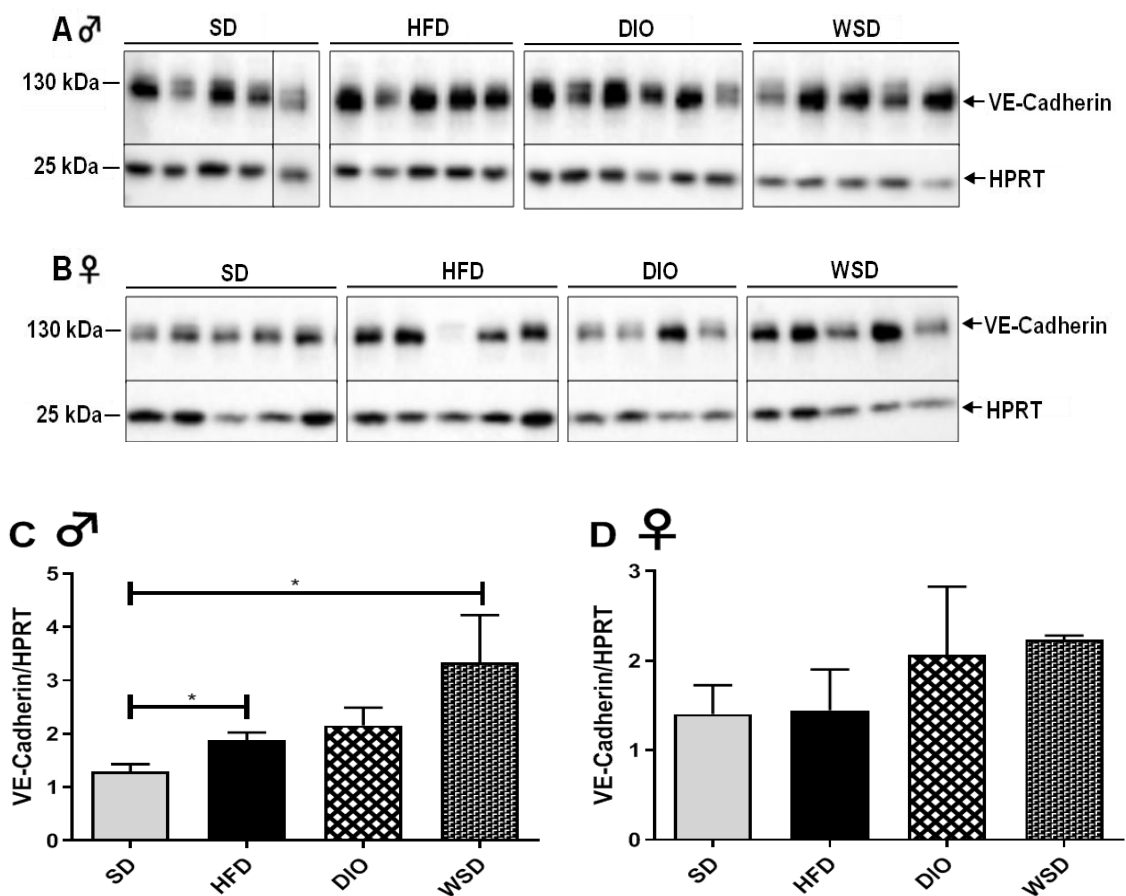


Abbildung 10: Proteinlevel von VE-Cadherin in den Plazenten der verschiedenen Futtergruppen

Ergebnisse der Western-Blot-Analyse des Proteinlevels von VE-Cadherin (115 kDa) mit HPRT (24 kDa) als Abgleich aus Plazentalysaten von A) Plazenten männlicher Feten und von B) Plazenten weiblicher Feten der verschiedenen Futtergruppen an Gestationstag 15,5. Zur besseren Übersicht erfolgte ein Zuschchnitt der digitalisierten Membranen, um die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse für die verschiedenen Futtergruppen in der gleichen Reihenfolge aufzuführen wie die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung. Analyse von n Plazenten jeweils unterschiedlicher Muttertiere pro Geschlechtergruppe: A) SD n = 5; HFD n = 5; DIO n = 6; WSD n = 5. B) SD n = 5; HFD n = 5; DIO n = 4; WSD n = 4. Die Graphen zeigen die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Western Blots für VE-Cadherin normalisiert auf HPRT für Plazenten C) männlicher Feten und für D) weiblicher Feten. Angabe der relativen densitometrischen Werte als Mittelwert \pm SEM. Signifikante Unterschiede wurden angenommen bei $p \leq 0.05$: * $p \leq 0.05$. HPRT, Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase; VE-Cadherin, Vascular Endothelial Cadherin.

4.4 Vergleich der beiden Kontrollgruppen

Die Control-Diät wurde laut Hersteller speziell als normokalorische Kontrolldiät zur WSD designed und hat im Vergleich zur bisher eingesetzten Standarddiät den Vorteil einer genauen gewichtsbezogenen Angabe der Inhaltsstoffe. Daher sollte evaluiert werden, ob die Control-Diät in ihrer Eigenschaft als Kontrolldiät als gleichwertig zur bewährten Standarddiät bewertet werden kann und damit in zukünftigen Versuchen die Standarddiät ersetzen könnte. Hierzu wurde als Bedingung definiert, dass sich im Versuch unter dem Einfluss der beiden Kontrolldiäten keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Auswirkungen auf Mütter, Feten und Plazenten zeigen sollten.

4.4.1 Mütterliche Nahrungs- und Wasseraufnahme während der Schwangerschaft

Von einigen Weibchen der beiden Kontrollgruppen, welche die Schwangerschaft austrugen, wurde repräsentativ für die jeweilige Kontrollgruppe die Wasser- und Nahrungsaufnahme über die gesamte Schwangerschaft hinweg erfasst. Hieraus wurden anschließend die über die gesamte Schwangerschaft gemittelten Werte für die tägliche Aufnahme von Wasser und Nahrung bzw. der einzelnen Nährstoffe berechnet.

Mittlere mütterliche Nahrungs- /Wasseraufnahme	SD	CO
Metabolisierbare Energie [kcal/Maus/Tag]	15,58 ± 0,56	12,41 ± 0,71 **
Nahrungsmenge [g/Maus/Tag]	4,83 ± 0,17	3,31 ± 0,19 ****
Fett [g/Maus/Tag]	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Proteine [g/Maus/Tag]	0,92 ± 0,03	0,57 ± 0,03 ****
Kohlenhydrate [g/Maus/Tag]	2,00 ± 0,07	2,11 ± 0,12
Zucker [g/Maus/Tag]	0,26 ± 0,01	0,36 ± 0,02 ****
Wasseraufnahme [ml/Maus/Tag]	5,12 ± 0,19	3,54 ± 0,18 ****

Tabelle 25: Mittlere mütterliche Nahrungs- und Wasseraufnahme pro Tag während der Schwangerschaft in den beiden Kontrollgruppen

Angabe der Daten als Mittelwert ± SEM von n unabhängigen Mäusen: SD n = 19; CO n = 20. Signifikante Unterschiede wurden angenommen bei $p \leq 0.05$: im Vergleich zur SD (fettgedruckt): ** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.0001$.

Für die Weibchen der CO-Gruppe ließ sich eine signifikant reduzierte mittlere Energie-, Nahrungs- und Proteinaufnahme sowie eine signifikant geringere mittlere Wasseraufnahme pro Tag im Vergleich zu den Weibchen der SD-Gruppe nachweisen (s. *Tabelle 25*). Im Gegensatz hierzu fand sich in der CO-Gruppe eine signifikant höhere mittlere Zuckeraufnahme pro Tag im Vergleich zur SD-Gruppe (s. *Tabelle 25*). Für die mittlere tägliche Fett- und Kohlenhydrataufnahme ließen sich dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen feststellen (s. *Tabelle 25*).

4.4.2 Phänotypische Daten der Muttertiere, Feten und Plazenten

In der CO-Gruppe zeigte sich eine signifikant längere Gestationsdauer als in der SD-Gruppe (s. *Tabelle 27* und *Abbildung 11*). Des Weiteren ließ sich an Gestationstag 15,5 in der CO-Gruppe ein deutlich geringeres placentares Gewicht als in der SD-Gruppe feststellen, jedoch konnte hierbei keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden (s. *Tabelle 27*). Während sich auch für das fetale Gewicht an Gestationstag 15,5 kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen zeigte, fand sich in der CO-Gruppe an P2 ein signifikant geringeres Körpergewicht der Nachkommen als in der SD-Gruppe (s. *Tabelle 27* und *Abbildung 11*).

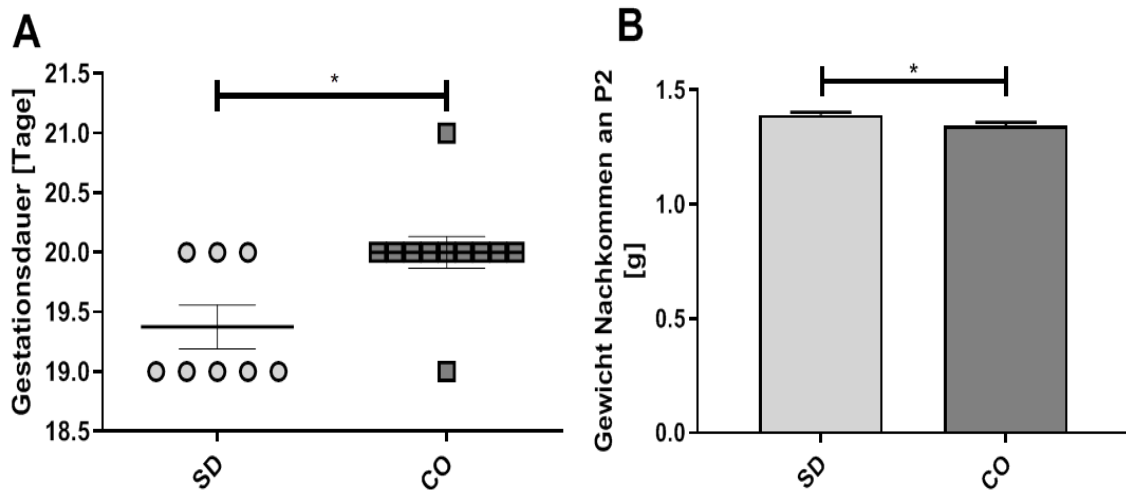


Abbildung 11: Gestationsdauer und Gewicht der Nachkommen an P2 unter dem Einfluss der beiden Kontrolldiäten

(A) Schwangerschaftsdauer in Tagen von n unabhängigen Weibchen pro Gruppe (1 Punkt repräsentiert 1 Weibchen): SD $n = 8$; CO $n = 11$. (B) Gewicht der Nachkommen an P2 in den beiden Kontrollgruppen. Daten von n Feten von n Müttern: SD $n = 51/8$; CO $n = 55/8$. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM. * $p \leq 0.05$. P, Postnataler Tag.

Besonders auffallend war zudem der Unterschied zwischen der Control-Diät und der Standarddiät bezüglich des Überlebens der Nachkommen (s. *Tabelle 26*). Hierbei zeigte sich unter dem Einfluss der CO-Diät ein deutlich reduzierter Anteil der lebenden Nachkommen am Tag der Geburt (P1).

Überleben der Nachkommen [%]	SD	CO
Anteil lebender Nachkommen an P1	98,73	89,47
Überlebensrate bis P2	97,44	95,59
Überlebensrate bis P21	100	95,38

Tabelle 26: Überleben der Nachkommen unter dem Einfluss der beiden Kontrolldiäten
Anteil lebender Nachkommen und Überlebensraten der Nachkommen der Weibchen aus den beiden Kontrollgruppen in Prozent. n als Gesamtanzahl Nachkommen bei Geburt von n Würfen jeweils verschiedener Muttertiere: SD n = 79/8; CO n = 76/10; P, Postnataler Tag.

Für die anderen phänotypischen Parameter der Muttertiere wie die Trächtigkeitsrate, das mütterliche Körpergewicht an Gestationstag 0,5 und 15,5 sowie den mütterlichen BMI an Gestationstag 15,5 zeigten sich dagegen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen (s. *Tabelle 27*). Gleiches ließ sich auch für die phänotypischen Aspekte der Feten wie die Wurfgröße, die Resorptionsrate und das Geschlechterverhältnis der Feten eines Wurfs feststellen (s. *Tabelle 27*). Bei etwa gleich hohem fetalen Gewicht, aber niedrigerem plazentaren Gewicht an Gestationstag 15,5, zeigte sich in der CO-Gruppe eine leicht höhere Plazentaeffizienz im Vergleich zur SD-Gruppe. Eine statistische Signifikanz ließ sich hierbei jedoch ebenfalls nicht nachweisen (s. *Tabelle 27*).

Phänotypische Daten	SD	CO
Mütterliches Körpergewicht an G0,5 [g]	21,72 ± 0,21 n = 12	21,15 ± 0,52 n = 5
Mütterliches Körpergewicht an G15,5 [g]	32,09 ± 0,38 n = 13	30,25 ± 1,39 n = 5
Mütterlicher BMI an G15,5 [(g/cm ²)*10]	3,25 ± 0,04 n = 12	3,17 ± 0,04 n = 5
Gestationsdauer [Tage]	19,38 ± 0,183 n = 8	20,00 ± 0,13 * n = 11
Trächtigkeitsrate [%]	29,21 n = 74	28,33 n = 27

Wurfgröße	7,7 ± 0,3 n = 13	7,2 ± 0,6 n = 5
Resorptionsrate [%]	6,34 ± 2,41 n = 13	8,21 ± 5,64 n = 5
Geschlechterverhältnis [Männchen pro Wurf in %]	50,48 ± 8,35 n = 78/10	42,57 ± 7,03 n = 36/5
Fetales Gewicht an G15,5 [g]	0,4526 ± 0,0090 n = 97/13	0,4367 ± 0,0142 n = 35/5
Gewicht Nachkommen an P2 [g]	1,39 ± 0,01 n = 51/8	1,34 ± 0,01 * n = 55/8
Plazentares Gewicht an G15,5 [g]	0,0979 ± 0,0038 n = 22/11	0,0872 ± 0,0022 n = 7/4
Plazentaeffizienz an G15,5	4,552 ± 0,292 n = 22/11	5,013 ± 0,358 n = 7/4

Tabelle 27: Phänotypische Daten von Muttertieren, Feten und Plazenten unter dem Einfluss der beiden Kontrolldiäten

Angabe der Daten als Mittelwert ± SEM bzw. für die Trächtigkeitsrate als absoluter Wert je Futtergruppe. Ausgenommen von der Resorptionsrate und der Wurfgröße war ein Einschlusskriterium für die Analyse eine Wurfgröße von ≥ 5 Feten. Berechnung der Plazentaeffizienz aus dem Quotienten fetales Gewicht/Plazentagewicht. Phänotypische Daten der Muttertiere, Wurfgröße und Resorptionsrate von n unabhängigen Weibchen. Fetales Gewicht, Gewicht Nachkommen an P2, plazentares Gewicht und Plazentaeffizienz als n Feten oder Plazenten von n Weibchen. Geschlechterverhältnis als n Feten von n Würfen jeweils unterschiedlicher Muttertiere. Signifikante Unterschiede wurden angenommen bei $p \leq 0.05$: im Vergleich zur SD (fettgedruckt): * $p \leq 0.05$. G, Gestationstag, P, Postnataler Tag.

4.4.3 Morphologische Untersuchung der Plazenten

Bei der histologischen Untersuchung der Plazenten zeigte sich an Gestationstag 15,5 weder für das Gesamtvolumen der Plazenten noch für die absoluten Volumina der einzelnen plazentaren Zonen oder deren Volumenanteil am Gesamtvolumen der Plazenta ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen (Daten nicht gezeigt). Gleiches ließ sich auch für das Volumen der Glykogenzellnester der gesamten Plazenta sowie für deren Lokalisation innerhalb und außerhalb der Labyrinth-Zone feststellen (Daten nicht gezeigt). Dagegen ließen sich für die vaskulären Strukturen in der Labyrinth-Zone der Plazenta signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen nachweisen. Hierbei zeigte sich in den Plazenten der CO-Gruppe sowohl ein signifikant geringeres fetales Gefäßvolumen als auch eine signifikant geringere fetale Gefäßoberfläche im Vergleich zur SD-Gruppe (s. *Tabelle 28*). Auch der Volumenanteil der fetalen Kapillaren am Gesamtvolumen der Labyrinth-Zone zeigte sich in der CO-Gruppe reduziert im Vergleich zur SD-Gruppe, allerdings ließ sich hierbei keine statistische Signifikanz nachweisen. Für die maternalen

Blutsinusse ließen sich ähnliche Ergebnisse wie für die fetalen Kapillaren feststellen. So zeigte sich in den Plazenten der CO-Gruppe ebenfalls ein geringeres absolutes Volumen, ein reduzierter Volumenanteil am Gesamtvolumen der Labyrinth-Zone sowie eine geringere Oberfläche der maternalen Blutsinusse im Vergleich zur SD-Gruppe (s. *Tabelle 28*). Zwar ließ sich hierbei keine statistische Signifikanz nachweisen, jedoch konnte für das geringere maternale Gefäßvolumen in den Plazenten der CO-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe zumindest ein starker Trend festgestellt werden ($p = 0,0519$).

Bezüglich des Trophoblastengewebes in der Labyrinth-Zone der Plazenta zeigte sich in der CO-Gruppe zwar ein leicht geringeres absolutes Volumen, dagegen ließ sich jedoch ein deutlich höherer Volumenanteil am Gesamtvolumen der Labyrinth-Zone im Vergleich zur SD-Gruppe feststellen. Ein signifikanter Unterschied konnte hierbei jedoch nicht nachgewiesen werden (s. *Tabelle 28*).

	SD	CO
Volumen Kompartimente der LZ [mm³]	n = 6 (FK n = 5)	n = 5
Fetale Kapillaren	3,882 ± 0,105	3,057 ± 0,315 *
Maternale Blutsinusse	6,662 ± 0,625	4,681 ± 0,639
Trophoblastengewebe in LZ	6,925 ± 0,578	6,142 ± 0,341
Volumenanteil Kompartimente der LZ [%]	n = 6 (FK n = 5)	n = 5
Fetale Kapillaren	23,52 ± 0,57	22,13 ± 2,14
Maternale Blutsinusse	36,55 ± 2,40	33,15 ± 2,71
Trophoblastengewebe in LZ	38,63 ± 2,42	44,42 ± 1,43
Oberfläche Kompartimente der LZ [cm²]	n = 5	n = 5
Fetale Kapillaren	15,44 ± 0,59	12,59 ± 0,89 *
Maternale Blutsinusse	18,34 ± 1,30	16,19 ± 1,86

Tabelle 28: Ergebnisse der stereologischen Analyse der Plazenten: Volumen und Oberfläche der vaskulären Strukturen in der LZ unter dem Einfluss der beiden Kontrolldiäten
Angabe der Werte als Mittelwert ± SEM von n Plazenten jeweils verschiedener Muttertiere. Anteil Plazenten männlicher Feten pro Gruppe: SD = 50 %; CO = 40 %. Volumenanteil Kompartimente der LZ: Volumen Kompartiment/Gesamtvolumen LZ. Signifikante Unterschiede wurden angenommen bei $p \leq 0.05$: im Vergleich zur SD (fettgedruckt): * $p \leq 0.05$. LZ, Labyrinth-Zone; FK, Fetale Kapillaren

4.4.4 Molekularbiologische Untersuchung des fetalen Endothels

Im Gegensatz zu den wesentlichen morphologischen Unterschieden bezüglich des Volumens und der Oberfläche der plazentaren Gefäße, konnten auf molekularbiologischer Ebene für das fetale Endothel keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen nachgewiesen werden. So zeigten sich an Gestationstag 15,5 weder für die Endothelzellmarker noch für die Adhärenz Junction-Marker signifikante Unterschiede bezüglich der Genexpression bzw. der Proteinlevel zwischen den Plazenten der beiden Kontrollgruppen (Daten qRT-PCR nicht gezeigt). Für die Plazenten weiblichen Geschlechts ließ sich jedoch zumindest ein starker Trend ($p = 0,0635$) für ein geringeres Proteinlevel des Endothelzellmarkers CD-31 in der CO-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe feststellen (s. *Abbildung 12*, Daten Western Blot für die Expression von VE-Cadherin und CD-31 in den Plazenten männlicher Feten sowie Daten Western Blot für die Expression von VE-Cadherin in den Plazenten weiblicher Feten nicht gezeigt).

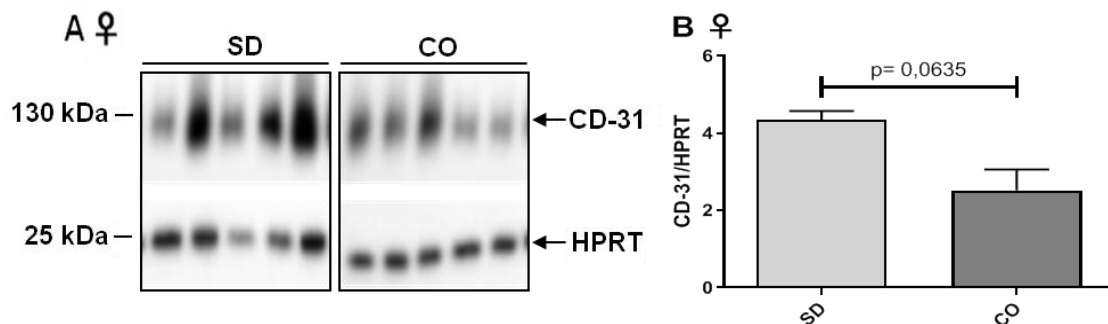


Abbildung 12: Proteinlevel von CD-31 in den Plazenten weiblicher Feten der beiden Kontrollgruppen

A) Ergebnisse der Western-Blot-Analyse des Proteinlevels von CD-31 (130-140 kDa) mit HPRT (24 kDa) als Abgleich aus Plazentalysaten weiblicher Feten der beiden Kontrollgruppen an Gestationstag 15,5. Zur besseren Übersicht erfolgte ein Zuschnitt der digitalisierten Membranen, um die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse für die beiden Kontrollgruppen in der gleichen Reihenfolge aufzuführen wie die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung. Analyse von n Plazenten jeweils unterschiedlicher Muttertiere: SD $n = 5$; CO $n = 4$.

B) Der Graph zeigt das Ergebnis der densitometrischen Auswertung der Western Blots für CD-31 normalisiert auf HPRT. Angabe der relativen densitometrischen Werte als Mittelwert \pm SEM. HPRT, Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase.

5. Diskussion

5.1 Induktion einer mütterlichen Adipositas durch die verschiedenen Interventionsdiäten

Im Versuch sollte im Mausmodell durch drei verschiedene hochkalorische Interventionsdiäten eine mütterliche Adipositas induziert werden, um deren Einfluss während der Schwangerschaft auf Mutter, Fetus und Plazenta zu untersuchen. Die Potenz zur Induktion einer mütterlichen Adipositas hatte sich für die HFD bereits in vorausgegangenen Versuchen dieser Arbeitsgruppe gezeigt und wurde in der Literatur auch für Hochfett-/Hochzuckerdiäten nachgewiesen [72, 75, 124]. Als Adipositas wurde im Versuch definiert, wenn die Weibchen bis zum Zeitpunkt der Verpaarung (G0,5) unter dem Einfluss der hochkalorischen Interventionsdiäten ein Körpergewicht von mindestens 23 g entwickelt hatten. Zwar wurde auch der mütterliche BMI an Gestationstag 15,5 erfasst, allerdings ist der BMI als indirektes Maß für die Körperfettmasse vor allem für den menschlichen Körper validiert. In der Literatur ist jedoch für den murinen Körper nur eine schwache Korrelation zwischen dem BMI und der Körperfettmasse beschrieben worden, was unter anderem auf die unterschiedliche Körperform von Maus und Mensch zurückzuführen sein könnte [125]. Trotz der Tatsache, dass sich bezüglich des mütterlichen BMIs im Versuch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Futtergruppen nachweisen ließ, sollte dies daher nicht per se zu der Annahme führen, dass im Versuch durch die hochkalorischen Interventionsdiäten keine mütterliche Adipositas induziert werden konnte.

Obwohl sich bezüglich der über die Schwangerschaft hinweg dokumentierten mittleren täglichen Energieaufnahme kein signifikanter Unterschied zwischen den Futtergruppen zeigte, fand sich im Mittel zu beiden Gestationszeitpunkten in allen drei Interventionsgruppen ein höheres mütterliches Körpergewicht im Vergleich zur SD-Gruppe. Eine statistische Signifikanz ließ sich an beiden Gestationszeitpunkten allerdings nur für die Weibchen der HFD-Gruppe nachweisen, wohingegen dies für die Weibchen der WSD-Gruppe nur an Gestationstag 0,5 und für die Weibchen der DIO-Gruppe nur an Gestationstag 15,5 der Fall war. Dies deutet somit darauf hin, dass die Gewichtszunahme nicht nur vom Energiegehalt, sondern auch deutlich von der Nährstoffzusammensetzung der verschiedenen Diäten abhängig zu sein scheint. Auch an anderer Stelle in der

Literatur ließ sich feststellen, dass Mäuse unter dem Einfluss einer Hochfett-/Hochzuckerdiät eine ähnliche mittlere tägliche Kalorienaufnahme während der Schwangerschaft wie die Mäuse der Kontrollgruppe zeigten und dennoch eine Adipositas entwickelten [75]. In der Literatur wird dabei insbesondere verschiedenen Fettsäuren eine unterschiedlich starke Potenz bezüglich der Induktion einer Gewichtszunahme zugeschrieben [93]. Zudem scheint auch generell die Höhe des Fettgehalts eine wichtige Rolle zu spielen. So werden in den meisten Versuchen in der Literatur Diäten mit einem Fettgehalt zwischen 40 - 60 kJ % eingesetzt, da sich gezeigt hat, dass sich hierunter effektiv eine Adipositas induzieren lässt [87, 90, 95].

Im Versuch fand sich für die Weibchen unter dem Einfluss der Hochfett-/Hochzuckerdiäten keine signifikant stärkere Gewichtszunahme im Vergleich zur HFD-Gruppe. Dies deutet darauf hin, dass im Gegensatz zu einem hohen Fettgehalt allein, durch den zusätzlichen hohen Zuckergehalt in den Hochfett-/Hochzuckerdiäten kein additiver Effekt bezüglich der Induktion einer Gewichtszunahme zu entstehen scheint.

Des Weiteren ließ sich bei Betrachtung der Weibchen im Einzelnen feststellen, dass in allen drei Interventionsgruppen ein jeweils unterschiedlich hoher Anteil der Weibchen zum Zeitpunkt der Verpaarung (G0,5) ein Körpergewicht unter 23 g aufwies. Somit zeigten diese als Non-Responder bezeichneten Weibchen keine adäquate Gewichtszunahme und erfüllten damit zum Zeitpunkt der Verpaarung nicht das im Versuch definierte Kriterium einer Adipositas. Dabei betrug der in die weiteren Analysen eingeflossene Anteil an Non-Respondern in den Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen 50 - 60 % und in der HFD-Gruppe 30 %. Für die Interpretation der weiteren Ergebnisse gilt es zu bedenken, dass in den beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen aufgrund einer ohnehin geringen n-Zahl von 5 - 6 Weibchen pro Gruppe von einem Ausschluss der Non-Responder aus den weiteren Versuchen und Analysen abgesehen wurde, da sich hierbei die n-Zahl noch weiter verringert hätte. Trotz einer höheren n-Zahl von 15 Weibchen in der HFD-Gruppe, wurden daher korrekterweise auch in dieser Gruppe die Non-Responder nicht aus den weiteren Analysen ausgeschlossen. Die in die weiteren Versuche und Analysen eingeflossenen Muttertiere standen somit zwar alle unter dem Einfluss einer der drei Interventionsdiäten, jedoch erfüllten nicht alle das Kriterium einer Adipositas. Es ist daher

kritisch zu betrachten, ob die im Versuch detektierten Auswirkungen tatsächlich als Folge einer durch die verschiedenen Interventionsdiäten induzierten mütterlichen Adipositas angesehen werden können. Vielmehr erscheint es sinnvoll, die beobachteten Effekte auf Mütter, Feten und Plazenten lediglich als Folge des für alle Weibchen sicher vorliegenden Einflussfaktors der hochkalorischen mütterlichen Interventionsdiäten zu betrachten. In der Literatur finden sich unterschiedliche Ergebnisse, inwiefern eine hochkalorische mütterliche Ernährung auch unabhängig vom Vorliegen einer mütterlichen Adipositas einen Einfluss auf die fetale Entwicklung hat. Einerseits ist an Ratten beschrieben worden, dass sowohl der isolierte Einfluss einer mütterlichen Hochfettdiät als auch einer mütterlichen Hochfett-/Hochzuckerdiät während der Schwangerschaft, ohne das bereits präkonzeptionelle Vorliegen einer mütterlichen Adipositas, nicht zu einer fetalen Wachstumsretardierung geführt hat, wohingegen dies unter dem Einfluss einer mütterlichen Adipositas der Fall war [124, 126]. Konkordant hierzu ließ sich auch in diesem Versuch in der HFD-Gruppe und, unter dem Vorbehalt einer geringen n-Zahl von lediglich 5 Muttertieren, auch in der WSD-Gruppe nur für die Feten der adipösen Muttertiere eine intrauterine Wachstumsretardierung feststellen (Daten nicht gezeigt). Andererseits wurde von unter anderem Janoschek et al. nachgewiesen, dass die mütterliche Ernährung während der Schwangerschaft einen größeren Einfluss auf das fetale Outcome zu haben scheint als eine mütterliche Adipositas [97, 98]. Bemerkenswerterweise zeigten sich auch im Versuch dieser Arbeit die stärksten negativen Auswirkungen auf das fetale Überleben in der WSD-Gruppe, obwohl in dieser Gruppe mit 60 % der höchste Anteil an Non-Responder-Muttertieren vorlag. Somit deuten die Ergebnisse dieses Versuchs darauf hin, dass die mütterliche Ernährung auch ohne das gleichzeitige Vorliegen einer mütterlichen Adipositas bedeutende Auswirkungen auf die fetale Entwicklung zu haben scheint.

5.2 Effekte der mütterlichen Ernährung auf Schwangerschaft und Feten

Im Versuch zeigten sich unter dem Einfluss aller drei hochkalorischen Interventionsdiäten deutliche Effekte auf die Schwangerschaft und die Feten. Hierbei ließen sich die stärksten Auswirkungen in der WSD-Gruppe nachweisen, wohingegen sich in der DIO- und in der HFD-Gruppe etwas mildere und dabei im Vergleich untereinander ähnliche Veränderungen zeigten.

Aus humanen Studien ist bereits bekannt, dass sich eine mütterliche Adipositas negativ auf die Fruchtbarkeit beider Geschlechter auswirken kann [127]. Ähnliches wurde auch an Rattenweibchen festgestellt, wonach sich unter dem Einfluss einer mütterlichen Hochfettdiät und einer hierdurch induzierten mütterlichen Adipositas eine deutlich reduzierte Fertilität im Vergleich zu den Weibchen der Kontrollgruppe gezeigt hatte [87, 97]. Auch in diesem Versuch ließ sich insbesondere in der WSD-Gruppe eine starke Reduktion der Trächtigkeitsrate mit 18,48 % im Vergleich zu 29,21 % in der SD-Gruppe feststellen, wohingegen die Trächtigkeitsraten unter dem Einfluss der anderen beiden Interventionsdiäten zwar ebenfalls, aber deutlich milder reduziert waren.

Neben dem Einfluss der mütterlichen Ernährung auf die Trächtigkeitsrate fanden sich darüber hinaus deutliche Hinweise darauf, dass im Rahmen einer an Gestationstag 15,5 bestehenden Schwangerschaft in den Interventionsgruppen eine beeinträchtigte fetale Versorgung vorzuliegen scheint. So ließ sich im Versuch an Gestationstag 15,5 in allen Interventionsgruppen ein signifikant geringeres fetales Gewicht im Vergleich zur SD-Gruppe feststellen, wobei sich auch hierbei der stärkste Effekt in der WSD-Gruppe zeigte. Unter Berücksichtigung des mütterlichen Responder-Status fiel zudem auf, dass in der HFD-Gruppe an Gestationstag 15,5 nur die Feten der adipösen Muttertiere eine Wachstumsretardierung aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Unter dem Vorbehalt einer geringen n-Zahl von lediglich 5 - 6 Weibchen in den beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen ließ sich dies auch für die Feten der WSD-Gruppe feststellen, wohingegen die Feten der DIO-Gruppe an Gestationstag 15,5 unabhängig vom mütterlichen Responder-Status eine Wachstumsretardierung aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Passend hierzu hatte sich in einem vorausgegangenen Versuch von Appel et al., bei dem nur adipöse Weibchen in die Analyse der HFD-Gruppe eingeschlossen wurden, das fetale Gewicht an Gestationstag 15,5 mit

0,3786 ± 0,0044 g (SD: 0,4482 ± 0,0083 g) deutlich geringer gezeigt als in der HFD-Gruppe dieser Arbeit mit 0,4123 ± 0,0071 g (SD: 0,4526 ± 0,0090 g) [72]. Auch an anderer Stelle wird in der Literatur von Ratten unter dem Einfluss einer mütterlichen Hochfettdiät berichtet, dass sich an P21 lediglich für die Feten der Responder-Weibchen, welche unter dem Einfluss der Hochfettdiät eine mütterliche Adipositas entwickelt hatten, eine fetale Wachstumsrestriktion nachweisen ließ, nicht jedoch für die Feten der Non-Responder-Weibchen [126]. Insgesamt deuten diese Ergebnisse somit darauf hin, dass sich unter dem zusätzlichen Einfluss einer mütterlichen Adipositas stärkere Effekte auf das fetale Outcome zeigen, als unter einer mütterlichen Hochfettdiät allein.

Neben einer mütterlichen Adipositas kommen pathophysiologisch für die festgestellte fetale Wachstumsrestriktion an Gestationstag 15,5 auch noch weitere Erklärungsansätze in Betracht. Eine aus anderen Versuchen bekannte Ursache für eine fetale Wachstumsrestriktion ist beispielsweise eine diätetische Proteinrestriktion während der Schwangerschaft [89, 128]. Passend hierzu zeigten auch in diesem Versuch die Weibchen der Interventionsgruppen über die gesamte Schwangerschaft hinweg eine geringere tägliche Proteinaufnahme als die Weibchen der SD-Gruppe. Konkordante Ergebnisse bezüglich der täglichen Proteinaufnahme von Mäusen während der Schwangerschaft wurden auch an anderer Stelle unter dem Einfluss einer Hochfett-/Hochzuckerdiät im Vergleich zur Kontrollgruppe beschrieben und auch hierbei ließ sich unter dem Einfluss der Hochfett-/Hochzuckerdiät eine fetale Wachstumsrestriktion an Gestationstag 16 nachweisen [75]. Allerdings zeigten sich in Versuchen zur gezielten diätetischen Proteinrestriktion während der Schwangerschaft deutliche Unterschiede bezüglich des plazentaren Gewichts an Gestationstag 15,5 sowie bezüglich des fetalen Gewichts im zeitlichen Verlauf der Schwangerschaft im Vergleich zu den Ergebnissen für die Interventionsgruppen im Versuch dieser Arbeit [89, 128]. Des Weiteren zeigten auch die Weibchen der CO-Gruppe im Mittel eine etwa gleich geringe tägliche Proteinaufnahme wie die Weibchen in den Interventionsgruppen, allerdings ließ sich in dieser Gruppe keine fetale Wachstumsrestriktion an Gestationstag 15,5 nachweisen. In einem weiteren Versuch dieser Arbeitsgruppe hatte sich zudem gezeigt, dass eine fetale Wachstumsrestriktion an Gestationstag 15,5 auch dann auftrat, wenn die Weibchen lediglich präkonzeptionell die HFD, während der Schwangerschaft jedoch die SD

erhielten und damit keine verminderte Proteinaufnahme während der Schwangerschaft vorlag [data unpublished]. Diese Beobachtungen sprechen somit dafür, dass sich die signifikante Reduktion des fetalen Gewichts in den Interventionsgruppen nicht allein durch die geringere Proteinaufnahme während der Schwangerschaft erklären lässt.

An P2 ließ sich im Versuch für das Körpergewicht der Nachkommen kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Futtergruppen nachweisen. In einem vorausgegangenen Versuch dieser Arbeitsgruppe war das fetale Gewicht in der HFD-Gruppe und in der SD-Gruppe zusätzlich zu Gestationstag 15,5 auch an Gestationstag 18,5 erfasst worden. Hierbei zeigte sich ebenfalls, dass ein an Gestationstag 15,5 festgestellter signifikanter Gewichtsunterschied bereits an Gestationstag 18,5 nicht mehr nachgewiesen werden konnte [72]. Gleiche Beobachtungen bezüglich des fetalen Gewichts an Gestationstag 16 und 19 sind in der Literatur auch für Mäuse unter dem Einfluss einer mütterlichen Hochfett-/Hochzuckerdiät beschrieben worden [75]. Dies deutet somit darauf hin, dass zwischen Gestationstag 15,5 bzw. 16 und 18,5 bzw. 19 ein Aufholwachstum bzw. catch-up growth der Feten stattgefunden hat [72, 75]. Hieraus lässt sich ableiten, dass die fetale Versorgung insbesondere in den ersten zwei Wochen der Schwangerschaft unter dem Einfluss der Interventionsdiäten kompromittiert zu sein scheint. In den letzten Tagen der Schwangerschaft scheint die fetale Versorgung jedoch derart gesteigert werden zu können, dass die Feten ihr Nährstoffdefizit wieder aufholen und die zwischenzeitliche Wachstumsretardierung ausgleichen können. Hierbei wird vermutet, dass dieses Aufholwachstum durch eine verstärkte plazentare Glukosebereitstellung für den Feten ermöglicht wird. So hatte sich in den beiden zitierten Versuchen gezeigt, dass das fetale Aufholwachstum in den Interventionsgruppen von einer signifikant stärkeren Reduktion des plazentaren Glykogengehalts zwischen Gestationstag 15,5 bzw. 16 und 18,5 bzw. 19 begleitet wurde als in den Kontrollgruppen [72, 75]. Somit scheint die Plazenta zur Kompensation der unter dem Einfluss der Interventionsdiäten hervorgerufenen fetalen Mangelversorgung vermehrt Glykogen zu Glucose abzubauen und dem Feten als Energielieferant für das Aufholwachstum bereitzustellen [72].

Durch die erhöhte Zuckeraufnahme unter dem Einfluss der beiden Hochfett-/Hochzuckerdiäten wäre an Gestationstag 15,5 insbesondere in den Plazenten

dieser beiden Interventionsgruppen auch ein erhöhter Glykogengehalt in der Plazenta im Sinne eines größeren Energiedepots denkbar gewesen. So wurde auch in der Literatur an diabetischen Ratten eine positive Korrelation zwischen dem Schweregrad der Hyperglykämie während der Schwangerschaft und dem Glykogengehalt in der Plazenta beschrieben [129]. Allerdings ließ sich weder im aktuellen Versuch noch im zitierten Versuch an Gestationstag 15,5 bzw. 16 ein signifikanter Unterschied bezüglich des plazentaren Glykogengehalts bzw. des Volumens der Glykogenzellnester in der Plazenta zwischen den Interventionsgruppen und den Kontrollgruppen feststellen [75]. An Gestationstag 15,5 ergibt sich somit kein Hinweis darauf, dass der Glykogengehalt bzw. das Volumen der Glykogenzellnester in der Plazenta durch die Interventionsdiäten beeinflusst wird.

Mit der Theorie des fetalen Aufholwachstums nach Gestationstag 15,5 wäre auch vereinbar, dass sich im Versuch in allen drei Interventionsgruppen eine signifikant längere Gestationsdauer im Vergleich zur SD-Gruppe gezeigt hat. Dabei wurde die Tendenz zu einer längeren Gestationsdauer unter dem Einfluss einer mütterlichen HFD im Vergleich zur SD bereits in einem früheren Versuch von Appel et al. festgestellt [101]. Konkordant hierzu wurde an anderer Stelle in der Literatur auch für Ratten unter dem Einfluss einer Hochfettdiät eine signifikant längere Gestationsdauer im Vergleich zur Kontrollgruppe beschrieben [97]. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Feten der Interventionsgruppen die längere Schwangerschaftsdauer benötigen, um nach Gestationstag 15,5 ihr Versorgungsdefizit der ersten zwei Wochen der Schwangerschaft kompensieren zu können. Hierzu würde auch passen, dass sich in der WSD-Gruppe gleichzeitig das geringste fetale Gewicht an Gestationstag 15,5 und die längste Gestationsdauer im Vergleich zu den anderen Futtergruppen feststellen ließ.

Während sich im Versuch, konkordant zu den Ergebnissen in der Literatur, kein signifikanter Unterschied bezüglich der Wurfgröße zwischen den verschiedenen Futtergruppen nachweisen ließ, zeigte sich in den Interventionsgruppen eine deutlich erhöhte fetale Mortalität [75, 76]. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass unter dem Einfluss der Interventionsdiäten eine schwerwiegende fetale Entwicklungsstörung induziert wird, welche entweder noch in utero oder wenige Tage nach der Geburt zum Tod führt. Hierbei lässt sich die reduzierte Überlebensrate

der lebendgeborenen Nachkommen auch als starker Indikator für einen schlechten Gesundheitszustand der Nachkommen interpretieren [130]. Wie für die anderen genannten Aspekte, zeigten sich in der WSD-Gruppe mit der höchsten Resorptionsrate und der ausgeprägtesten Reduktion der Überlebensrate der Nachkommen die stärksten Auswirkungen auf die Feten. Konkordant hierzu ist auch in der Literatur an Mäusen unter dem Einfluss einer Hochfett-/Hochzuckerdiät eine reduzierte Überlebensrate der Nachkommen beschrieben worden [131]. Während sich in diesem Versuch in der HFD-Gruppe nur eine milde Erhöhung der fetalen Mortalität im Vergleich zur SD-Gruppe gezeigt hat, ist diesbezüglich in der Literatur an Ratten unter dem Einfluss einer mütterlichen Hochfett- und einer hierdurch induzierten mütterlichen Adipositas ein deutlich stärkerer Effekt beschrieben worden. So hatte sich hierbei eine fast dreifach erhöhte fetale Resorptionsrate, eine signifikant erhöhte Anzahl an Müttern mit Totgeburten sowie eine stark reduzierte Überlebensrate der lebendgeborenen Nachkommen auf 25 % bis P4 im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt [87]. Dies deutet somit ebenfalls daraufhin, dass eine zusätzliche mütterliche Adipositas stärkere Auswirkungen auf das fetale Outcome zu haben scheint, als eine mütterliche Hochfett- und Hochzuckerdiät allein.

Insgesamt ließen sich unter dem Einfluss aller drei Interventionsdiäten ähnliche Auswirkungen auf die Schwangerschaft und die Feten feststellen, allerdings waren diese unter dem Einfluss der WSD deutlich stärker ausgeprägt als unter dem Einfluss der anderen beiden Interventionsdiäten. Da in der WSD-Gruppe der höchste Anteil an Non-Responder-Weibchen vorlag, deutet dies somit daraufhin, dass nicht nur der aggravierende Faktor einer mütterlichen Adipositas sondern auch die Nahrungszusammensetzung eine wesentliche Rolle für die Schwangerschaft und das fetale Outcome zu spielen scheint. Im Hinblick auf die diätetische Nährstoffzusammensetzung und die dokumentierte tägliche Nahrungsaufnahme während der Schwangerschaft sind zwar die Unterschiede zwischen der HFD-Gruppe und der WSD-Gruppe nicht sonderlich überraschend. Dagegen erscheinen die deutlich unterschiedlichen Effekte der beiden Hochfett-/Hochzuckerdiäten jedoch unerwartet. Beim Vergleich dieser beiden Diäten fällt unter anderem auf, dass die WSD mit 344 g/kg einen noch deutlich höheren Zuckergehalt als die DIO mit 211 g/kg aufweist und auch die dokumentierte Zuckeraufnahme pro Tag während der Schwangerschaft in der WSD-

Gruppe fast doppelt so hoch war wie in der DIO-Gruppe. Da sich in der DIO- und in der HFD-Gruppe ähnliche Ergebnisse feststellen ließen, deutet dies somit darauf hin, dass der diätetische Zuckergehalt erst ab einer gewissen Höhe zu einem additiven Effekt bezüglich der negativen Auswirkungen auf die weibliche Fertilität und das fetale Outcome zu führen scheint, als unter dem Einfluss eines hohen diätetischen Fettgehalts allein. In dieser Arbeit unberücksichtigt blieben zudem Unterschiede bezüglich des Mineralstoff- oder des Vitamingehalts der verschiedenen Interventionsdiäten. Auch dies könnte eine weitere mögliche Ursache für die unterschiedlichen Auswirkungen der verschiedenen Interventionsdiäten auf die Schwangerschaft und die Feten darstellen.

5.3 Pathophysiologische Rolle der Plazenta für das negative fetale Outcome unter dem Einfluss der Interventionsdiäten

Die beobachteten negativen Auswirkungen auf das Wachstum und die Entwicklung der Feten unter dem Einfluss der drei mütterlichen hochkalorischen Interventionsdiäten deuten auf eine kompromittierte intrauterine fetale Versorgung hin. Zur Untersuchung des hierbei zugrunde liegenden Pathomechanismus ist die Plazenta als essentielles Organ für den fetomaternalen Stoffaustausch von besonderem Interesse. Eine intrauterine fetale Wachstumsretardierung, wie sie sich im Versuch gezeigt hatte, geht auch beim Menschen mit verschiedenen schwangerschaftsassozierten Krankheitsbildern einher. Da hierbei als zugrunde liegender Pathomechanismus eine plazentare Dysfunktion nachgewiesen werden konnte, bestand die Hypothese, dass dies auch unter dem Einfluss der hochkalorischen Interventionsdiäten die Ursache für die kompromittierte fetale Versorgung sein könnte [58, 59]. Daher wurden im Versuch die Plazenten dahingehend untersucht, ob und inwiefern sich morphologische oder molekularbiologische Veränderungen unter dem Einfluss der hochkalorischen Interventionsdiäten zeigen, welche zu einer plazentaren Dysfunktion führen und damit Hinweise auf den zugrunde liegenden Pathomechanismus der fetalen Versorgungsstörung liefern könnten. Da in der Literatur auf molekularbiologischer Ebene ein geschlechterabhängiger Effekt einer mütterlichen Hochfettdiät auf die Plazenta diskutiert wird, erfolgte die molekularbiologische Analyse der Plazenten getrennt nach dem zugehörigen fetalen Geschlecht [132]. Bei der histologischen Analyse der Plazenten ließ sich dies aufgrund der technisch und zeitlich

aufwändigen Methode der Stereologie und der damit verbundenen geringen n-Zahl von lediglich 5 - 6 Plazenten pro Futtergruppe jedoch nicht realisieren. Um somit lediglich den Effekt der mütterlichen Diät zu untersuchen und einen möglichen Effekt des fetalen Geschlechts auszugleichen, wurde bei der histologischen Analyse in jeder Futtergruppe ein möglichst ausgeglichenes Verhältnis zwischen den Plazenten männlicher und weiblicher Feten angestrebt (Anteil Plazenten männlicher Feten pro Gruppe: SD = 50 %; HFD = 60 %; DIO = 66,66 %; WSD = 60 %). Auch bezüglich des plazentaren Gewichts wurde von einer nach dem fetalen Geschlecht getrennten Analyse abgesehen, da zu Beginn des Versuchs auch keine geschlechterabhängige Analyse des fetalen Gewichts vorgesehen war.

5.3.1 Einfluss der Interventionsdiäten auf das plazentare Gewicht und die plazentaren Zonen

Ein möglicher Erklärungsansatz für die im Versuch beobachtete fetale Wachstums- und Entwicklungsstörung stellt eine eingeschränkte Kapazität der Plazenta für die fetale Versorgung dar. Dabei wurden im Versuch als Parameter für die fetale Versorgungskapazität unter anderem das plazentare Gewicht, die Plazentaeffizienz sowie das Volumen der Plazenta und der einzelnen plazentaren Zonen untersucht.

Neben einer fetalen Wachstumsrestriktion ist in der Literatur für Mäuse unter dem Einfluss einer mütterlichen Hochfett-/Hochzuckerdiät an Gestationstag 16 ein signifikant reduziertes plazentares Gewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe beschrieben worden [75]. Gleiches ließ sich an Gestationstag 15,5 auch im Versuch dieser Arbeit für die Plazenten der DIO-Gruppe feststellen, nicht jedoch für die Plazenten der WSD-Gruppe, obwohl sich in der WSD-Gruppe die stärkste Reduktion des fetalen Gewichts beobachten ließ. Wie bereits auch an anderer Stelle von Appel et al. beschrieben, fand sich in der HFD-Gruppe zwar ebenfalls ein leicht reduziertes plazentares Gewicht im Vergleich zur SD-Gruppe, allerdings ließ sich hierbei keine statistische Signifikanz nachweisen [72]. Somit scheint ein reduziertes Gewicht der Plazenta die in diesem Versuch beobachtete fetale Wachstumsrestriktion entweder nicht ausreichend erklären zu können oder in der WSD-Gruppe liegt der fetalen Wachstumsrestriktion ein anderer Pathomechanismus als in der DIO- und in der HFD-Gruppe zugrunde. Auch für die Plazentaeffizienz wurde in der Literatur von Appel et al. für Mäuse

und an anderer Stelle auch für Ratten unter dem Einfluss einer mütterlichen Hochfettdiät von einer signifikant reduzierten Plazentaeffizienz an Gestationstag 15,5 bzw. 15 im Vergleich zur Kontrollgruppe berichtet [72, 87]. Während dabei Appel et al. auch ein signifikant reduziertes fetales Gewicht an Gestationstag 15,5 feststellten, wurde für die Ratten nur ein signifikant reduziertes Gewicht der Nachkommen an P1 beschrieben, wohingegen sich keine Angaben zum fetalen Gewicht an Gestationstag 15 fanden [72, 87]. Im Gegensatz dazu ließen sich im Versuch dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Plazentaeffizienz zwischen den Interventionsgruppen und der SD-Gruppe nachweisen. Lediglich für die WSD-Gruppe fand sich eine leicht reduzierte Plazentaeffizienz, wohingegen sich in der HFD- und in der DIO-Gruppe sogar eine leicht erhöhte Plazentaeffizienz im Vergleich zur SD-Gruppe zeigte. Somit scheint die fetale Wachstumsrestriktion in den Interventionsgruppen in diesem Versuch nicht auf eine reduzierte Plazentaeffizienz zurückzuführen zu sein.

Das Volumen der Labyrinth-Zone stellt als Ort des fetomaternalen Stoffaustausches einen der wichtigsten Parameter für die fetale Versorgungskapazität der Plazenta dar [25]. Somit ist das im Versuch festgestellte reduzierte Volumen der Labyrinth-Zone an Gestationstag 15,5 in den beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen als Ursache für die fetale Wachstumsrestriktion in diesen beiden Futtergruppen durchaus in Betracht zu ziehen. Eine statistische Signifikanz ließ sich hierbei jedoch nur für die WSD-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe nachweisen. Obwohl auch in der Literatur von einer fetalen Wachstumsrestriktion an Gestationstag 16 unter dem Einfluss einer Hochfett-/Hochzuckerdiät berichtet wurde, ließ sich hierbei jedoch keine signifikante Veränderung des Volumens der Labyrinth-Zone im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen [75]. Während sich im Versuch dieser Arbeit in den beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen zudem ein signifikant erhöhter Volumenanteil der Dezidua basalis am Gesamtvolumen der Plazenta zeigte, wird dagegen an dieser Stelle in der Literatur von einem signifikant verminderten absoluten Volumen der Dezidua basalis sowie von einem reduzierten Volumenanteil der Dezidua basalis am Gesamtvolumen der Plazenta berichtet [75]. Allerdings gilt es zu bedenken, dass die Dezidua basalis den Anteil der Plazenta darstellt, der mit der mütterlichen Uteruswand verwachsen ist und es daher im Rahmen der Präparation nicht immer sicher zu gewährleisten war, dass die Dezidua basalis komplett

intakt mitsamt einem kleinen Anteil der verbundenen Uteruswand asserviert wurde. Somit ist es kritisch zu betrachten, ob das Volumen der Dezidua basalis aus technischen Gründen verlässlich und reproduzierbar zu erfassen ist.

Im Gegensatz zu den Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen ließen sich für die HFD-Gruppe an Gestationstag 15,5 weder für die Volumina der plazentaren Zonen noch für das Gesamtvolumen der Plazenta signifikante Unterschiede im Vergleich zur SD-Gruppe nachweisen. Ebenfalls unter Verwendung stereologischer Methoden zeigte sich dagegen in der Analyse von Kretschmer et al. für die Plazenten der HFD-Gruppe an Gestationstag 15,5 ein signifikant erhöhtes Gesamtvolumen der Plazenta sowie ein signifikant reduzierter Volumenanteil der Labyrinth-Zone am Gesamtvolumen der Plazenta [74]. Während bei Kretschmer et al. nur Plazenten von adipösen Muttertieren in die Analyse einfließen und sich für deren Nachkommen eine fetale Wachstumsrestriktion an Gestationstag 15,5 nachweisen ließ, stammten im Versuch dieser Arbeit in der HFD-Gruppe 3 von insgesamt 5 histologisch analysierten Plazenten von Non-Responder-Weibchen, deren Feten keine fetale Wachstumsrestriktion an Gestationstag 15,5 zeigten [74]. Dies deutet somit darauf hin, dass eine durch die HFD induzierte mütterliche Adipositas einen Effekt auf die plazentaren Volumina zu haben scheint und hierbei insbesondere der reduzierte Volumenanteil der Labyrinth-Zone am Gesamtvolumen der Plazenta als Ursache für die fetale Wachstumsrestriktion an Gestationstag 15,5 in Betracht kommt. Dagegen scheint eine mütterliche HFD allein keinen wesentlichen Einfluss auf die plazentaren Volumina zu haben und passend hierzu scheint diese allein auch keine fetale Wachstumsrestriktion an Gestationstag 15,5 hervorzurufen.

5.3.2 Einfluss der Interventionsdiäten auf die vaskulären Strukturen der Plazenta

Als weiterer möglicher Erklärungsansatz für die im Versuch beobachtete fetale Wachstumsrestriktion kam eine gestörte Vaskularisation der Plazenta in Betracht, da die fetalen Kapillaren und maternalen Blutsinuse in der Labyrinth-Zone der Plazenta die zentralen Strukturen des fetomaternalen Stoffaustausches darstellen. Sowohl in humanen Studien als auch in Versuchen mit Mäusen und Ratten sind unter dem Einfluss einer mütterlichen Adipositas verschiedene morphologische und molekularbiologische Veränderungen der plazentaren Gefäße beschrieben worden [75-78, 87]. Als pathophysiologischer Mecha-

nismus wird hierbei davon ausgegangen, dass die mütterliche Adipositas eine vaskuläre Inflammation in der Plazenta auslöst, welche die Entwicklung, Struktur und Funktion der plazentaren Gefäße beeinträchtigt und damit zu einer plazentaren Dysfunktion führen kann [71, 73, 85, 86]. Wie bereits erwähnt muss jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse dieses Versuchs bedacht werden, dass ein hoher Anteil der untersuchten Plazenten von Muttertieren stammte, für die zum Zeitpunkt der Verpaarung keine Adipositas nachgewiesen werden konnte. Aus technischen Gründen konnten histologisch und molekularbiologisch nur 5 - 6 Plazenten pro Gruppe analysiert werden, wobei in der HFD-Gruppe und in der WSD-Gruppe 3 von 5 Plazenten, und in der DIO-Gruppe 3 von 6 Plazenten von Non-Responder-Muttertieren stammten. Es erscheint daher sinnvoll, auch die Ergebnisse bezüglich der plazentaren Gefäße hinsichtlich des für alle Weibchen sicher vorliegenden Einflussfaktors der mütterlichen Diäten zu interpretieren und den in der Literatur vielfach untersuchten, aber in diesem Versuch für nur wenige Weibchen vorliegenden Einflussfaktor einer mütterlichen Adipositas außen vor zu lassen.

5.3.2.1 Einfluss der Interventionsdiäten auf Oberfläche und Volumen der vaskulären Strukturen in der Labyrinth-Zone der Plazenta

Mit Hilfe stereologischer Methoden wurden im Versuch das Volumen und die Oberfläche der fetalen Kapillaren und der maternalen Blutsinuse in der Labyrinth-Zone der Plazenta an Gestationstag 15,5 analysiert. Beide Größen stellen dabei entscheidende Parameter für den fetomaternalen Stoffaustausch dar. So bedeutet eine große Gefäßoberfläche mehr Kapazität für aktive und passive Transportvorgänge, da mehr Fläche für den Einbau der entsprechenden Transportmoleküle zur Verfügung steht und da sich die Diffusionskapazität der Interhemal Membrane proportional zur Gefäßoberfläche verhält [25]. Zudem gilt für das Volumen, dass umso größer die Summe aller Gefäßvolumina in der Plazenta, desto mehr Blut kann in der Plazenta pro Zeiteinheit am fetomaternalen Stoffaustausch teilnehmen [25].

Signifikante Veränderungen beider Parameter im Vergleich zur Standarddiät ließen sich im Versuch ausschließlich unter dem Einfluss der beiden Hochfett-/Hochzuckerdiäten feststellen, nicht jedoch unter dem Einfluss der reinen Hochfett-diät. So zeigte sich im Versuch in den beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen das Volumen sowie der Volumenanteil der fetalen Kapillaren am

Gesamtvolumen der Labyrinth-Zone und das Volumen der maternalen Blutsinuse signifikant reduziert im Vergleich zu den Plazenten der SD- und der HFD-Gruppe. Im Gegensatz dazu fand sich in beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen ein signifikant erhöhter Volumenanteil des Trophoblastengewebes am Gesamtvolumen der Labyrinth-Zone ebenfalls sowohl im Vergleich zu den Plazenten der SD- als auch der HFD-Gruppe. Für die Oberfläche der fetalen Gefäße ließ sich dagegen nur für die DIO-Gruppe eine signifikante Reduktion im Vergleich zur SD- und zur HFD-Gruppe feststellen. Konkordant zu diesen Ergebnissen wurde auch in der Literatur für Mäuse unter dem Einfluss einer Hochfett-/Hochzuckerdiät an Gestationstag 16 eine signifikante Reduktion des Volumens der fetalen Kapillaren im Vergleich zu den Plazenten der Kontrollgruppe beschrieben. Allerdings ließen sich hierbei keine signifikanten Effekte auf das Volumen der maternalen Blutsinuse oder auf das Volumen des Trophoblastengewebes nachweisen [75].

Unter dem Einfluss der beiden Hochfett-/Hochzuckerdiäten könnte somit die festgestellte Reduktion von Oberfläche und Volumen der plazentaren Gefäße zu einer eingeschränkten fetalen Nährstoffversorgung geführt haben und damit eine Ursache für die fetale Wachstumsrestriktion darstellen.

Im Gegensatz dazu ließen sich für die Plazenten der HFD-Gruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Oberfläche oder der Volumina der vaskulären Strukturen in der Labyrinth-Zone im Vergleich zur SD-Gruppe nachweisen. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass in der HFD-Gruppe 3 von 5 der stereologisch analysierten Plazenten von Non-Responder-Weibchen stammten, sich eine Wachstumsretardierung an Gestationstag 15,5 allerdings nur für die Feten der adipösen Weibchen feststellen ließ (Daten nicht gezeigt). Kretschmer et al. konnten dagegen unter der Voraussetzung, dass nur Plazenten von adipösen Muttertieren in die Analyse eingeschlossen wurden, neben einer fetalen Wachstumsretardierung an Gestationstag 15,5 auch für die Plazenten der HFD-Gruppe eine signifikante Reduktion der Oberfläche der fetalen Kapillaren im Vergleich zur SD-Gruppe nachweisen [73]. Dies deutet somit darauf hin, dass der alimentäre Einfluss der Hochfettdiät allein keinen wesentlichen Effekt auf das Volumen oder die Oberfläche der vaskulären Strukturen in der Labyrinth-Zone zu haben scheint, sondern erst die dadurch induzierte mütterliche Adipositas zu einer Entwicklungsstörung insbesondere der fetalen Kapillaren führt und

hierdurch eine fetale Wachstumsretardierung hervorrufen könnte. Der alimentäre Einfluss der Hochfett-/Hochzuckerdiäten scheint dagegen auch ohne eine gleichzeitige mütterliche Adipositas auszureichen, um eine Entwicklungsstörung der fetalen und maternalen vaskulären Strukturen in der Labyrinth-Zone der Plazenta zu verursachen.

Bei der isolierten Betrachtung des Einflussfaktors der mütterlichen Ernährung zeigt sich somit, dass die Kombination eines hohen Fett- und Zuckergehalts einen deutlich schädlicheren Effekt auf die plazentaren Gefäße an Gestationstag 15,5 zu haben scheint, als ein hoher Fettgehalt allein. Unklar bleibt jedoch, warum sich in der WSD-Gruppe deutlich stärkere Auswirkungen auf die fetale Resorptionsrate und das Überleben der Nachkommen gezeigt haben als in der DIO-Gruppe, obwohl diese beiden Diäten ähnlich starke Effekte auf die plazentaren Gefäße zu haben scheinen. Dies deutet somit darauf hin, dass der kompromittierten fetalen Versorgung wohl noch andere Pathomechanismen als die beobachteten strukturellen Veränderungen der plazentaren Gefäße zugrunde liegen. Da der Anteil an Non-Responder-Weibchen in der WSD-Gruppe mit 60 % noch höher war als in der DIO-Gruppe mit 50 %, erscheint auch der aggravierende Einfluss einer mütterlichen Adipositas als Ursache für die unterschiedlichen Effekte in diesen beiden Interventionsgruppen unwahrscheinlich. Neben strukturellen Veränderungen der plazentaren Gefäße ist als weitere in der Literatur vielfach diskutierte Ursache einer plazentaren Dysfunktion auch eine Beeinträchtigung der mikrovaskulären Funktionen des Endothels in Betracht zu ziehen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass übergewichtige schwangere Frauen eine signifikant geringere Reaktion auf eine endotheliale vasodilatatorische Stimulation zeigen als normalgewichtige Schwangere [85]. Im Folgenden lag daher der Fokus der weiteren Untersuchungen auf den fetalen Endothelzellen.

5.3.2.2 Einfluss der Interventionsdiäten auf das fetale Endothel

Das fetale Endothel spielt als Teil der Interhemal Membrane eine wichtige Rolle für die Regulation des fetomaternalen Stoffaustausches und damit für die fetale Versorgung. Daher wurden im Versuch an Gestationstag 15,5 neben der Morphologie der plazentaren Gefäße auch die fetalen Endothelzellen untersucht. Insbesondere für die Gen-/mRNA-Expression und die Proteinlevel der Endothelzellmarker ließen sich dabei deutliche geschlechterabhängige Unterschiede

feststellen. Auch in der Literatur wird ein geschlechterabhängiger Effekt der mütterlichen Ernährung auf die Plazenta diskutiert, wonach die Plazenten weiblicher Feten sensitiver für Veränderungen des intrauterinen Umgebungsmilieus seien und daher stärkere plazentare Kompensationsmechanismen stattfinden, um die Feten vor den schädlichen mütterlichen Einflüssen zu schützen [132]. Diese Annahme gründet darauf, dass sich in den Plazenten weiblicher Feten von Mäusen, welche während der Schwangerschaft eine Hochfett-diät erhielten, eine Hochregulation von einer Vielzahl von Genen im Vergleich zu den Plazenten männlicher Feten gezeigt hatte [132]. Im Gegensatz hierzu fand sich jedoch in dieser Arbeit für das Zelladhäsionsmolekül VE-Cadherin auf Proteinebene für beide Geschlechter eine Hochregulation in allen drei Interventionsgruppen im Vergleich zur SD-Gruppe. Eine statistische Signifikanz ließ sich allerdings nur für die Plazenten männlicher Feten der HFD- und der WSD-Gruppe nachweisen. Auf mRNA-Ebene fanden sich dagegen für die Expression von VE-Cadherin für beide Geschlechter keine signifikanten Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen und der SD-Gruppe. Da VE-Cadherin eine essentielle Rolle für die Angiogenese in der Embryonalzeit sowie zytoprotektive und den Zellverband stabilisierende Eigenschaften zugeschrieben wird, wäre im Rahmen einer plazentaren Dysfunktion eher eine Herunterregulation von VE-Cadherin zu erwarten gewesen [49, 53]. In Anlehnung an den in der Literatur beschriebenen Erklärungsansatz für die geschlechterabhängigen Unterschiede, könnte die verstärkte Expression von VE-Cadherin jedoch auch auf eine kompensatorische Hochregulation zum Ausgleich eines anderen vaskulären Schädigungsmechanismus hindeuten. Insbesondere im Hinblick auf die festgestellten morphologischen Veränderungen der fetalen Kapillaren unter dem Einfluss der Hochfett-/Hochzuckerdiäten könnte die Hochregulation von VE-Cadherin von kompensatorischer Bedeutung sein.

Auch für den Endothelzellmarker CD-31 ließ sich auf Proteinebene eine Hochregulation detektieren, allerdings war dies im Gegensatz zur Hypothese aus der Literatur nur für die Plazenten männlicher Feten in den beiden Hochfett-/Hochzuckerinterventionsgruppen der Fall. Dagegen zeigte sich für die Plazenten männlicher Feten der HFD-Gruppe auf Proteinebene für CD-31 eine Herunterregulation. Entgegen den Veränderungen auf Proteinebene ließen sich auf mRNA-Ebene für die Plazenten männlicher Feten für die Expression von CD-31

und, bis auf eine Herunterregulation von Angpt-1 in der DIO-Gruppe, auch für die anderen Endothelzellmarker keine signifikanten Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen und der SD-Gruppe nachweisen.

Im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen Hypothese zeigte sich für die Plazenten weiblicher Feten auf mRNA-Ebene für die Endothelzellmarker Angpt-1, Angpt-2, TIE-2, Apelin und CD-31 in allen drei Interventionsgruppen eine Herunterregulation von jeweils einem bis mehreren der genannten Endothelzellmarker. Konkordant zu den Ergebnissen auf mRNA-Ebene ließ sich die Herunterregulation von CD-31 in den Plazenten weiblicher Feten der DIO-Gruppe auch auf Proteinebene nachweisen. Zusätzlich deutete sich auch für die Plazenten weiblicher Feten der HFD-Gruppe auf Proteinebene eine Herunterregulation von CD-31 an, ein statistisch signifikanter Unterschied ließ sich dabei jedoch, wie auf mRNA-Ebene, auch auf Proteinebene nicht nachweisen. Wie für einige der genannten Endothelzellmarker ließ sich auch für Beta-Catenin eine signifikant geringere Expression in den Plazenten weiblicher Feten der DIO-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe feststellen. Während allen genannten Endothelzellmarkern unter anderem eine wichtige Rolle für die Angiogenese während der Embryonalzeit zugesprochen wird, spielt Beta-Catenin eine wichtige Rolle für die Stabilisierung der Adherens Junctions [41, 46, 49, 123]. Zudem fungiert Beta-Catenin auch als Transkriptionsfaktor und kann hierüber eine Induktion des Zellwachstums, eine Modulation der Zelldifferenzierung sowie eine Inhibition der zellulären Apoptose vermitteln [49, 52]. Eine Herunterregulation von Beta-Catenin und der untersuchten Endothelzellmarker könnte somit zu einer Entwicklungsstörung der fetalen Kapillaren führen. Zudem könnte eine geringere Expression von Beta-Catenin durch einen verminderten interzellulären Zusammenhalt negative Auswirkungen auf die Integrität des fetalen Endothels haben. Die Herunterregulation von Beta-Catenin und der verschiedenen Endothelzellmarker in den Plazenten weiblicher Feten, insbesondere der DIO-Gruppe, unterstützen somit zwar nicht die in der Literatur beschriebene Hypothese eines stärkeren placentaren Kompensationsmechanismus der weiblichen Feten. Unter dem Vorbehalt eines überwiegend ausgeglichenen Geschlechterverhältnisses der histologisch analysierten Plazenten würde es jedoch insgesamt in Einklang mit dem festgestellten reduzierten Volumen sowie der reduzierten Oberfläche der fetalen Kapillaren in den Hochfett-/Hoch-

zuckerinterventionsgruppen stehen.

Während sich für die Plazenten weiblicher Feten die Ergebnisse bezüglich der Genexpression von CD-31 und VE-Cadherin in den verschiedenen Futtergruppen überwiegend konkordant zu den Ergebnissen auf Proteinebene zeigten, ließ sich für die Plazenten männlicher Feten diesbezüglich für beide Proteine eine deutliche Diskrepanz feststellen. Dies deutet daraufhin, dass insbesondere für die Plazenten männlicher Feten weitere posttranskriptionelle Faktoren eine Rolle zu spielen scheinen, die die Proteinlevel der Endothelzellmarker und der Adherens Junction-Marker beeinflussen.

Insgesamt bleibt letztlich unklar, inwiefern die Unterschiede bezüglich der Genexpression und der Proteinlevel der Endothelzellmarker und der Adherens Junction-Marker in den Plazenten der Interventionsgruppen im Vergleich zur SD-Gruppe eine pathophysiologische Rolle für die placentare Dysfunktion spielen. Einerseits könnte die Herunterregulation der Endothelzellmarker und von Beta-Catenin insbesondere für das weibliche Geschlecht zur Entstehung einer placentaren Dysfunktion beitragen, andererseits könnte die Hochregulation von VE-Cadherin als Kompensationsmechanismus gegenüber dem negativen Einfluss der mütterlichen Ernährung interpretiert werden.

Um zu klären, ob sich ein geschlechterabhängiger Effekt auch im Hinblick auf die morphologischen Aspekte der Plazenten und das fetale Outcome feststellen lässt, erscheint es sinnvoll auch diese Analysen zukünftig nach Geschlechtern getrennt durchzuführen. In der Literatur wurde bezüglich eines geschlechterabhängigen Effekts der mütterlichen Ernährung auf das fetale Outcome beschrieben, dass die männlichen Nachkommen eine höhere Suszeptibilität gegenüber dem Einflussfaktor einer mütterlichen Hochfettdiät und einer hierdurch induzierten mütterlichen Adipositas zu haben scheinen als die weiblichen Nachkommen. So ließen sich im Alter von zwölf Wochen für die männlichen Nachkommen von Mäusen unter dem Einfluss einer sowohl mütterlichen als auch postnatalen Hochfettdiät stärkere negative Auswirkungen auf den Glukosestoffwechsel, höhere systolische Blutdruckwerte sowie höhere Serumlevel der proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha und Interleukin-6 nachweisen, obwohl die weiblichen Nachkommen im Alter von zwölf Wochen insgesamt eine höhere Körperfettmasse aufwiesen [133]. Als Ursache wurde hierbei eine ungünstige Fettverteilung im Sinne einer signifikant größeren intraabdominellen

Fettmasse der männlichen Nachkommen diskutiert [133]. Passend hierzu konnte auch an Menschen eine stärkere Korrelation zwischen dem Auftreten eines metabolischen Syndroms und der Fläche des viszeralen Fettgewebes im Gegensatz zum BMI oder dem Gesamtkörperfettanteil nachgewiesen werden [134]. Im Gegensatz hierzu ließen sich jedoch in diesem Versuch im Nachgang bezüglich des fetalen Outcomes zumindest für das fetale Gewicht an Gestationstag 15,5 keine wesentlichen geschlechterabhängigen Unterschiede feststellen (Daten nicht gezeigt). So zeigte sich für beide Geschlechter in allen drei Interventionsgruppen ein reduziertes fetales Gewicht im Vergleich zur SD-Gruppe und es ließen sich innerhalb der einzelnen Futtergruppen keine wesentlichen geschlechterabhängigen Unterschiede bezüglich des mittleren fetalen Gewichts feststellen. Als einziger nennenswerter Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern ließ sich für das reduzierte fetale Gewicht in der HFD-Gruppe nur für das weibliche Geschlecht eine statistische Signifikanz im Vergleich zur SD-Gruppe nachweisen (Daten nicht gezeigt). Insgesamt deutet dies somit daraufhin, dass in diesem Versuch der auf molekularbiologischer Ebene beobachtete geschlechterabhängige Effekt bezüglich des fetalen Gewichts an Gestationstag 15,5 im Wesentlichen nicht zum Tragen kommt.

Aufgrund der zeitlich und technisch aufwändigen Methode der Stereologie ließ sich eine geschlechtergetrennte histologische Analyse der Plazenten in diesem Versuch nicht realisieren. Da in jeder Futtergruppe ein überwiegend ausgeglichenes Geschlechterverhältnis der zu den Plazenten zugehörigen Feten vorlag, lässt sich somit an dieser Stelle keine abschließende Aussage bezüglich eines geschlechterabhängigen Effekts auf die untersuchten morphologischen Aspekte der Plazenten treffen.

5.4 Bewertung der Control-Diät bezüglich der Eigenschaft als Kontrolldiät

Im Versuch sollte evaluiert werden, ob die Control-Diät in ihrer Eigenschaft als Kontrolldiät als gleichwertige Alternative zur Standarddiät bewertet werden kann und diese somit in zukünftigen Versuchen ersetzen könnte.

Erstaunlicherweise zeigte sich in der CO-Gruppe eine erhöhte fetale Mortalität in Form eines deutlich reduzierten Anteils lebender Nachkommen an P1, was in der Literatur häufig als Indikator für einen mangelhaften Gesundheitszustand der Nachkommen gewertet wird [130]. Zusätzlich ließ sich auch ein signifikant

reduziertes Körpergewicht der Nachkommen an P2 feststellen. Im Gegensatz dazu ließ sich an Gestationstag 15,5 weder ein signifikanter Unterschied bezüglich des fetalen Gewichts noch bezüglich der fetalen Resorptionsrate nachweisen. Dies deutet somit darauf hin, dass es unter dem Einfluss der CO-Diät insbesondere gegen Ende der Schwangerschaft zu negativen Auswirkungen auf das fetale Wachstum und die fetale Entwicklung zu kommen scheint. Auch die signifikant längere Gestationsdauer in der CO-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe könnte dabei Ausdruck davon sein, dass die Feten aufgrund einer Störung von Wachstum und Entwicklung unter dem Einfluss der CO-Diät mehr Zeit benötigen, um die Geburtsreife zu erlangen.

Für Totgeburten und ein erniedrigtes Geburtsgewicht hatte sich in humanen Studien gezeigt, dass diese pathophysiologisch häufig auf eine plazentare Dysfunktion auf dem Boden einer gestörten Plazentaentwicklung zurückzuführen sind [58, 60, 61]. Passend hierzu deuteten auch die Ergebnisse im Versuch an Gestationstag 15,5 auf ein vermindertes plazentares Gewicht sowie auf eine gestörte Vaskularisation der Plazenta unter dem Einfluss der CO-Diät hin. Während sich für das deutlich geringere plazentare Gewicht in der CO-Gruppe im Vergleich zur SD-Gruppe keine statistische Signifikanz nachweisen ließ, zeigte sich dafür eine signifikante Reduktion des Volumens sowie der Oberfläche der fetalen Kapillaren in der Labyrinth-Zone der Plazenten der CO-Gruppe. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für die mütterlichen Blutsinusse, allerdings ließ sich hierbei keine statistische Signifikanz nachweisen. Für die fetalen Endothelzellen ließen sich dagegen weder bezüglich der Genexpression noch bezüglich der Proteinlevel wesentliche Unterschiede zwischen den Plazenten der CO- und der SD-Gruppe feststellen. Lediglich für die Plazenten der weiblichen Feten der CO-Gruppe zeigte sich an Gestationstag 15,5 ein Trend für ein reduziertes Proteinlevel des Endothelzellmarkers CD-31 im Vergleich zur SD-Gruppe. Dies würde auch in Einklang zu den beschriebenen morphologischen Veränderungen der plazentaren Gefäße in den Plazenten der CO-Gruppe stehen.

Somit fanden sich insbesondere auf morphologischer Ebene deutliche Hinweise auf eine Entwicklungsstörung insbesondere der fetalen Kapillaren unter dem Einfluss der CO-Diät. Da die plazentaren Gefäße die zentralen Strukturen für den fetomaternalen Stoffaustausch darstellen, könnten diese vaskulären Ver-

änderungen in utero zu einer kompromittierten fetalen Versorgung und damit zu einem mangelhaften Gesundheitszustand der Nachkommen geführt haben. Dies könnte einen möglichen Erklärungsansatz für die erhöhte fetale Mortalität und das reduzierte Gewicht an P2 unter dem Einfluss der CO-Diät darstellen. Das unterschiedliche fetale Outcome in den beiden Kontrollgruppen führte zu der Frage, welcher Unterschied zwischen den beiden Kontrolldiäten dies erklären könnte. Da die CO-Diät durch einen fast doppelt so hohen Zuckergehalt wie die Standarddiät gekennzeichnet ist, zeigten die Weibchen der CO-Gruppe während der Schwangerschaft eine signifikant höhere mittlere Zuckeraufnahme pro Tag im Vergleich zu den Weibchen der SD-Gruppe. In der Literatur ist jedoch für Ratten unter dem Einfluss einer hohen Zuckerzufuhr während der Schwangerschaft in Form von fruktosereichem Wasser ein erhöhtes Gewicht der Nachkommen an P2 beschrieben worden und es ließ sich keine erhöhte Mortalität der Nachkommen feststellen [135]. Auch wenn sich aus den Herstellerangaben der CO-Diät nicht eruieren ließ, aus welchen unterschiedlichen Mono- und Disacchariden sich der Gesamtzuckergehalt der Diät zusammensetzt, erscheint es somit eher unwahrscheinlich, dass das schlechtere fetale Outcome unter dem Einfluss der CO-Diät tatsächlich auf den höheren Zuckergehalt zurückzuführen ist. Des Weiteren fiel in der CO-Gruppe eine deutlich geringere mittlere tägliche Proteinaufnahme der Weibchen während der Schwangerschaft im Vergleich zur SD-Gruppe auf. Obwohl beide Kontrolldiäten einen ähnlichen Proteingehalt aufweisen, entstand dieser Unterschied durch die signifikant höhere aufgenommene Nahrungsmenge pro Tag in der SD-Gruppe im Vergleich zur CO-Gruppe. Allerdings ist in der Literatur an Mäusen, welche während der Schwangerschaft einer diätetischen Proteinrestriktion unterzogen wurden, auch an Gestationstag 14,5 und 18,5 eine signifikante Reduktion des fetalen Gewichts beschrieben worden, wohingegen sich nur an Gestationstag 18,5 eine signifikante Reduktion des plazentaren Gewichts, nicht jedoch an Gestationstag 14,5 gezeigt hatte [89]. Auch hierbei wurde die fetale Wachstumsrestriktion unter anderem auf eine gestörte Vaskularisation der Plazenta zurückgeführt [89]. Es gilt jedoch zu bedenken, dass die geringere tägliche Proteinaufnahme der Weibchen unter dem Einfluss der CO-Diät nur einer milden Proteinrestriktion entspricht, wohingegen sich im zitierten Versuch die fetale Wachstumsrestriktion unter einer deutlich stärkeren Proteinrestriktion gezeigt hatte [89]. Dagegen

ließ sich in Versuchen zum Einfluss einer milden Proteinrestriktion während der Schwangerschaft kein signifikanter Effekt auf das fetale Gewicht und sogar ein erhöhtes plazentares Gewicht an Gestationstag 16 und 19 nachweisen [128]. Daher ist fraglich, ob das schlechtere fetale Outcome unter dem Einfluss der CO-Diät tatsächlich auf die geringere Proteinaufnahme während der Schwangerschaft zurückzuführen ist.

Des Weiteren zeigten die Weibchen der CO-Gruppe während der Schwangerschaft eine im Schnitt um circa 20 % reduzierte Kalorienaufnahme pro Tag im Vergleich zur SD-Gruppe. Konkordant zu den Ergebnissen im Versuch konnte in der Literatur an Mäusen unter einer 20 %-igen Kalorienrestriktion während der Schwangerschaft eine signifikante Reduktion des fetalen Gewichts an Gestationstag 19 und bei Geburt, nicht jedoch an Gestationstag 16 nachgewiesen werden [88]. Zudem hatte sich, wie unter dem Einfluss der CO-Diät, an Gestationstag 16 ein reduziertes plazentares Gewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt und es ließ sich ebenfalls eine gestörte Vaskularisation der Plazenta feststellen [88]. Allerdings konnte ein signifikant geringeres Volumen der fetalen Kapillaren und der maternalen Blutsinuse in der Labyrinth-Zone der Plazenta im Vergleich zur Kontrollgruppe erst an Gestationstag 19, nicht jedoch wie unter dem Einfluss der CO-Diät an Gestationstag 16 nachgewiesen werden [88].

Beim Vergleich mit den Ergebnissen aus der Literatur käme somit als Ursache für das schlechtere fetale Outcome unter dem Einfluss der Control-Diät am ehesten die reduzierte Kalorienaufnahme während der Schwangerschaft in Betracht, jedoch ist eine abschließende Klärung der Ursache an dieser Stelle nicht möglich. Das schlechtere fetale Outcome unter dem Einfluss der Control-Diät führte jedoch zu dem Schluss, dass die Control-Diät im Vergleich zur Standarddiät nicht als gleichwertige Kontrolldiät bewertet werden konnte und somit von einer weiteren Verwendung in nachfolgenden Versuchen abgesehen wurde.

5.5 Übertragbarkeit auf den Menschen

Abschließend bleibt zu diskutieren, inwiefern sich die gewonnenen Erkenntnisse aus dem Versuch auf den Menschen übertragen lassen. Da die Plazenta die essentielle Verbindung zwischen Mutter und Kind darstellt, liegt die Vermutung nahe, dass ein Großteil der negativen Auswirkungen einer mütterlichen Adipositas bzw. einer ungünstigen mütterlichen Ernährung auf den Fetus durch die Plazenta vermittelt werden. Obwohl sich die humane und die murine Plazenta im Detail in ihrem histologischen Aufbau und ihrer endokrinen Funktion voneinander unterscheiden, konnte nachgewiesen werden, dass sich die Entwicklungsvorgänge und die molekularen Mechanismen doch bedeutend ähnlich sind [24]. Auf diese Ähnlichkeit stützt sich die Annahme, dass eine mütterliche Adipositas bzw. eine ungünstige mütterliche Ernährung in der humanen Plazenta zu ähnlichen pathologischen Effekten wie in der murinen Plazenta führen könnte und damit den negativen fetalen Auswirkungen bei Maus und Mensch ähnliche Pathomechanismen zugrunde liegen könnten.

Während in humanen Studien in der Regel der Einfluss einer mütterlichen Adipositas untersucht wird, konnten die Ergebnisse im Versuch lediglich hinsichtlich des Einflussfaktors der mütterlichen Ernährung interpretiert werden. Trotzdem zeigten sich im Versuch unter dem Einfluss der Interventionsdiäten ähnliche Auswirkungen auf Schwangerschaft und Feten wie am Menschen unter dem Einfluss einer mütterlichen Adipositas. So konnte eine reduzierte Fertilität und eine erhöhte fetale Mortalität in Form einer erhöhten Rate an Aborten, Totgeburten sowie einer erhöhten Sterberate innerhalb der Säuglingsperiode sowohl in humanen Studien als auch in diesem Mausmodell festgestellt werden [19, 127]. Bezüglich der im Versuch beobachteten längeren Gestationsdauer unter dem Einfluss der Interventionsdiäten ist am Menschen unter dem Einfluss einer mütterlichen Adipositas zwar ebenfalls ein erhöhtes Risiko für eine Übertragung, aber auch ein erhöhtes Risiko für eine Frühgeburtlichkeit beschrieben worden [15]. Der im Versuch nachgewiesenen fetalen Wachstumsrestriktion steht allerdings die in humanen Studien unter dem Einfluss einer mütterlichen Adipositas sehr viel häufiger beobachtete fetale Makrosomie entgegen [20, 90]. Zwar ließ sich in einigen Fällen einer hochgradigen mütterlichen Adipositas auch eine intrauterine Wachstumsretardierung feststellen, dies ist jedoch sehr viel seltener der Fall [21]. Jedoch zeigen sich auch in den verschiedenen Tier-

versuchen in der Literatur sehr heterogene Ergebnisse bezüglich der Auswirkungen einer mütterlichen Adipositas bzw. der mütterlichen Diät auf das fetale Gewicht [90]. So ist neben einer fetalen Wachstumsretardierung mit kompensatorischem Aufholwachstum bis zur Geburt sowohl ein signifikant reduziertes als auch ein signifikant erhöhtes Geburtsgewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe beschrieben worden [72, 75, 98, 131]. Dies deutet somit darauf hin, dass die teilweise unterschiedlichen Auswirkungen einer ungünstigen mütterlichen Ernährung bzw. einer mütterlichen Adipositas bei Maus und Mensch nicht nur auf die unterschiedlichen Spezies zurückzuführen sind. So scheinen diese auch stark von den jeweiligen Versuchsbedingungen abhängig zu sein, wie beispielsweise von der Nährstoffkomposition der eingesetzten Diäten oder der Zeitdauer der bereits präkonzeptionellen Fütterung der jeweiligen Diät sowie vom Schweregrad der induzierten mütterlichen Adipositas [68, 69, 90]. Insbesondere um den Einflussfaktor der mütterlichen Diät im Mausmodell der menschlichen Realität noch ähnlicher zu gestalten, wurden im Versuch neben einer reinen Hochfettdiät auch zwei Hochfett-/Hochzuckerdiäten eingesetzt, die den weltweit zunehmenden westlichen Ernährungsstil der Menschen besser imitieren sollten.

Auch wenn schließlich die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Mausmodell auf den Menschen aufgrund der unterschiedlichen Spezies offensichtlich limitiert ist, können im Mausmodell wichtige Einblicke in pathophysiologische Prozesse gewonnen werden, welche auch für humane Studien Anstöße zu neuen Forschungsansätzen sein können.

6. Literaturverzeichnis

1. Herold G. *Adipositas*. In: Innere Medizin 2020: eine vorlesungsorientierte Darstellung. Köln: Gerd Herold Verlag; 2019: 717-720.
2. World Health Organisation. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO consultation*. Genf: World Health Organization Technical Report Series 894:i-xii, 2000.
3. World Health Organisation. *Fact sheet: Obesity and overweight*. 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (zuletzt abgerufen am 11.07.2020).
4. Chen C XX, Yan Y. *Estimated global overweight and obesity burden in pregnant women based on panel data model*. PLoS ONE 2018; 13(8): e0202183.
5. Holler A. *Evolution der Adipositas*. Adipositas - Ursachen, Folgeerkrankungen, Therapie 2012; 06(04): 230-235.
6. Popkin BM, Gordon-Larsen P. *The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants*. International Journal of Obesity 2004; 28(3): S2-S9.
7. Popkin BM. *An overview on the nutrition transition and its health implications: the Bellagio meeting*. Public Health Nutrition 2002; 5(1a): 93-103.
8. Popkin BM. *The Nutrition Transition in Low-Income Countries: An Emerging Crisis*. Nutrition Reviews 1994; 52(9): 285-298.
9. Olshansky SJ, Ault AB. *The Fourth Stage of the Epidemiologic Transition: The Age of Delayed Degenerative Diseases*. The Milbank Quarterly 1986; 64(3): 355-391.
10. World Health Organisation. *Fact sheet: Noncommunicable disease*. 2018. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases> (zuletzt abgerufen am 11.07.2020).
11. Marchi J, Berg M, Dencker A, Olander EK, Begley C. *Risks associated with obesity in pregnancy, for the mother and baby: a systematic review of reviews*. Obesity Reviews 2015; 16(8): 621-638.
12. Wang Z, Wang P, Liu H, He X, Zhang J, Yan H, Xu D, Wang B. *Maternal adiposity as an independent risk factor for pre-eclampsia: a meta-analysis of prospective cohort studies*. Obes Rev 2013; 14(6): 508-21.
13. Anderson V, Chaboyer W, Gillespie B. *The relationship between obesity and surgical site infections in women undergoing caesarean sections: An integrative review*. Midwifery 2013; 29(12): 1331-1338.
14. Heslehurst N, Simpson H, Ells LJ, Rankin J, Wilkinson J, Lang R, Brown TJ, Summerbell CD. *The impact of maternal BMI status on pregnancy outcomes with immediate short-term obstetric resource implications: a meta-analysis*. Obes Rev 2008; 9(6): 635-83.
15. Rode L, Nilas L, Wøjdemann K, Tabor A. *Obesity-related complications in Danish single cephalic term pregnancies*. Obstetrics and gynecology 2005; 105(3): 537-542.
16. Cedergren MI. *Maternal Morbid Obesity and the Risk of Adverse Pregnancy Outcome*. Obstetrics & Gynecology 2004; 103(2): 219-224.
17. Sheiner E, Levy A, Menes TS, Silverberg D, Katz M, Mazor M. *Maternal obesity as an independent risk factor for caesarean delivery*. Paediatr Perinat Epidemiol 2004; 18(3): 196-201.

18. Callaway LK, Prins JB, Chang AM, McIntyre HD. *The prevalence and impact of overweight and obesity in an Australian obstetric population.* Med J Aust 2006; 184(2): 56-9.
19. Aune D, Saugstad OD, Henriksen T, Tonstad S. *Maternal Body Mass Index and the Risk of Fetal Death, Stillbirth, and Infant Death: A Systematic Review and Meta-analysis.* JAMA 2014; 311(15): 1536-1546.
20. Yu Z, Han S, Zhu J, Sun X, Ji C, Guo X. *Pre-Pregnancy Body Mass Index in Relation to Infant Birth Weight and Offspring Overweight/Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis.* PLOS ONE 2013; 8(4): e61627.
21. Radulescu L, Munteanu O, Popa F, Cirstoiu M. *The implications and consequences of maternal obesity on fetal intrauterine growth restriction.* Journal of medicine and life 2013; 6(3): 292-298.
22. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. *Metabolic Syndrome in Childhood: Association With Birth Weight, Maternal Obesity, and Gestational Diabetes Mellitus.* Pediatrics 2005; 115(3): e290-e296.
23. Watson ED, Cross JC. *Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta.* Physiology 2005; 20(3): 180-193.
24. Rossant J, Cross JC. *Placental development: Lessons from mouse mutants.* Nature Reviews Genetics 2001; 2(7): 538-548.
25. Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. *Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology.* Biol Reprod 2004; 70(6): 1806-13.
26. Malassiné A, Frenzo JL, Evain-Brion D. *A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model.* Hum Reprod Update 2003; 9(6): 531-9.
27. Coan PM, Conroy N, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. *Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta.* Developmental Dynamics 2006; 235(12): 3280-3294.
28. Guillemot F, Caspary T, Tilghman SM, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Anderson DJ, Joyner AL, Rossant J, Nagy A. *Genomic imprinting of Mash2, a mouse gene required for trophoblast development.* Nature Genetics 1995; 9(3): 235-242.
29. Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. *Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae.* Placenta 2002; 23(1): 3-19.
30. Barash V, Shafrir E. *Mobilization of placental glycogen in diabetic rats.* Placenta 1990; 11(6): 515-521.
31. Simmons DG, Natale DR, Begay V, Hughes M, Leutz A, Cross JC. *Early patterning of the chorion leads to the trilaminar trophoblast cell structure in the placental labyrinth.* Development 2008; 135(12): 2083-91.
32. Simmons DG, Fortier AL, Cross JC. *Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta.* Developmental Biology 2007; 304(2): 567-578.
33. Simmons DG, Cross JC. *Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta.* Developmental Biology 2005; 284(1): 12-24.
34. Jollie WP. *Fine structural changes in placental labyrinth of the rat with increasing gestational age.* Journal of Ultrastructure Research 1964; 10(1): 27-47.

35. Jones N, Master Z, Jones J, Bouchard D, Gunji Y, Sasaki H, Daly R, Alitalo K, Dumont DJ. *Identification of Tek/Tie2 binding partners. Binding to a multifunctional docking site mediates cell survival and migration.* J Biol Chem 1999; 274(43): 30896-905.
36. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. *Leakage-Resistant Blood Vessels in Mice Transgenically Overexpressing Angiopoietin-1.* Science 1999; 286(5449): 2511-2514.
37. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. *Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, during Embryonic Angiogenesis.* Cell 1996; 87(7): 1171-1180.
38. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis.* Science 1997; 277(5322): 55-60.
39. Jones N, Ijijn K, Dumont DJ, Alitalo K. *Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses.* Nature Reviews Molecular Cell Biology 2001; 2(4): 257-267.
40. Seegar TCM, Eller B, Tzvetkova-Robev D, Kolev MV, Henderson SC, Nikolov DB, Barton WA. *Tie1-Tie2 interactions mediate functional differences between angiopoietin ligands.* Molecular cell 2010; 37(5): 643-655.
41. Kälin RE, Kretz MP, Meyer AM, Kispert A, Heppner FL, Brändli AW. *Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis.* Developmental Biology 2007; 305(2): 599-614.
42. Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, Osmond DH, George SR, O'Dowd BF. *Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor.* J Neurochem 2000; 74(1): 34-41.
43. Kleinz MJ, Davenport AP. *Emerging roles of apelin in biology and medicine.* Pharmacology & Therapeutics 2005; 107(2): 198-211.
44. Ruggeri ZM. *Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation.* Best Practice & Research Clinical Haematology 2001; 14(2): 257-279.
45. Stockinger H, Gadd SJ, Eher R, Majdic O, Schreiber W, Kasinrerker W, Strass B, Schnabl E, Knapp W. *Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31.* The Journal of Immunology 1990; 145(11): 3889-3897.
46. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. *Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31).* Current opinion in hematology 2016; 23(3): 253-259.
47. Osawa M, Masuda M, Kusano K-i, Fujiwara K. *Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule?* The Journal of cell biology 2002; 158(4): 773-785.
48. Privratsky JR, Newman DK, Newman PJ. *PECAM-1: Conflicts of interest in inflammation.* Life Sciences 2010; 87(3): 69-82.
49. Dejana E. *Endothelial cell-cell junctions: happy together.* Nature Reviews Molecular Cell Biology 2004; 5(4): 261-270.

50. Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. *Vascular Endothelial (VE)-Cadherin: Only an Intercellular Glue?* Experimental Cell Research 1999; 252(1): 13-19.
51. Bazzoni G, Dejana E. *Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis.* Physiological Reviews 2004; 84(3): 869-901.
52. Cavallaro U, Dejana E. *Adhesion molecule signalling: not always a sticky business.* Nat Rev Mol Cell Biol 2011; 12(3): 189-97.
53. Carmeliet P, Lampugnani M-G, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert J-M, Collen D, Dejana E. *Targeted Deficiency or Cytosolic Truncation of the VE-cadherin Gene in Mice Impairs VEGF-Mediated Endothelial Survival and Angiogenesis.* Cell 1999; 98(2): 147-157.
54. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. *The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability.* Journal of Cell Science 2008; 121(13): 2115-2122.
55. Shay-Salit A, Shushy M, Wolfovitz E, Yahav H, Breviario F, Dejana E, Resnick N. *VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002; 99(14): 9462-9467.
56. Lampugnani MG, Zanetti A, Breviario F, Balconi G, Orsenigo F, Corada M, Spagnuolo R, Betson M, Braga V, Dejana E. *VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam.* Molecular biology of the cell 2002; 13(4): 1175-1189.
57. Simmons R. *Perinatal programming of obesity.* Seminars in perinatology 2008; 32(5): 371-374.
58. Salafia CM, Vogel CA, Bantham KF, Vintzileos AM, Pezzullo J, Silberman L. *Preterm delivery: correlations of fetal growth and placental pathology.* Am J Perinatol 1992; 9(3): 190-3.
59. Roberts DJ, Post MD. *The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction.* J Clin Pathol 2008; 61(12): 1254-60.
60. Kidron D, Bernheim J, Aviram R. *Placental findings contributing to fetal death, a study of 120 stillbirths between 23 and 40 weeks gestation.* Placenta 2009; 30(8): 700-4.
61. Amir H, Weintraub A, Aricha-Tamir B, Apel-Sarid L, Holcberg G, Sheiner E. *A piece in the puzzle of intrauterine fetal death: pathological findings in placentas from term and preterm intrauterine fetal death pregnancies.* J Matern Fetal Neonatal Med 2009; 22(9): 759-64.
62. Barker DJ, Osmond C. *Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales.* Lancet 1986; 1(8489): 1077-81.
63. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. *Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64.* Bmj 1991; 303(6809): 1019-22.
64. Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. *Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life.* Bmj 1990; 301(6746): 259-62.
65. Barker DJP, Hales CN, Fall CHD, Osmond C, Phipps K, Clark PMS. *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and*

- hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth.* Diabetologia 1993; 36(1): 62-67.
66. Heindel JJ, Balbus J, Birnbaum L, Brune-Drisse MN, Grandjean P, Gray K, Landrigan PJ, Sly PD, Suk W, Cory Slechta D, Thompson C, Hanson M. *Developmental Origins of Health and Disease: Integrating Environmental Influences.* Endocrinology 2015; 156(10): 3416-3421.
67. Wadhwa PD, Buss C, Entringer S, Swanson JM. *Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms.* Semin Reprod Med 2009; 27(5): 358-68.
68. Sferruzzi-Perri AN, Camm EJ. *The Programming Power of the Placenta.* Front Physiol 2016; 7: 33.
69. Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. *Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals?* The Journal of physiology 2004; 561(Pt 2): 355-377.
70. Woods L, Perez-Garcia V, Hemberger M. *Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth—New Insights From Mouse Models.* Frontiers in Endocrinology 2018; 9(570).
71. Denison FC, Roberts KA, Barr SM, Norman JE. *Obesity, pregnancy, inflammation, and vascular function.* Reproduction 2010; 140(3): 373-85.
72. Appel S, Grothe J, Storck S, Janoschek R, Bae-Gartz I, Wohlfarth M, Handwerk M, Hucklenbruch-Rother E, Gellhaus A, Dötsch J. *A Potential Role for GSK3 β in Glucose-Driven Intrauterine Catch-Up Growth in Maternal Obesity.* Endocrinology 2018; 160(2): 377-386.
73. Kretschmer T, Schulze-Edinghausen M, Turnwald E-M, Janoschek R, Bae-Gartz I, Zentis P, Handwerk M, Wohlfarth M, Schauss A, Hucklenbruch-Rother E, Dötsch J, Appel S. *Effect of Maternal Obesity in Mice on IL-6 Levels and Placental Endothelial Cell Homeostasis.* Nutrients 2020; 12(2): 296.
74. Kretschmer T, Turnwald EM, Janoschek R, Zentis P, Bae-Gartz I, Beers T, Handwerk M, Wohlfarth M, Ghilav M, Bloch W, Hucklenbruch-Rother E, Dötsch J, Appel S. *Maternal high fat diet-induced obesity affects trophoblast differentiation and placental function in mice.* Biol Reprod 2020; 103(6): 1260-1274.
75. Sferruzzi-Perri AN, Vaughan OR, Haro M, Cooper WN, Musial B, Charalambous M, Pestana D, Ayyar S, Ferguson-Smith AC, Burton GJ, Constancia M, Fowden AL. *An obesogenic diet during mouse pregnancy modifies maternal nutrient partitioning and the fetal growth trajectory.* Faseb j 2013; 27(10): 3928-37.
76. Kim DW, Young SL, Grattan DR, Jasoni CL. *Obesity During Pregnancy Disrupts Placental Morphology, Cell Proliferation, and Inflammation in a Sex-Specific Manner Across Gestation in the Mouse¹.* Biology of Reproduction 2014; 90(6).
77. Huang L, Liu J, Feng L, Chen Y, Zhang J, Wang W. *Maternal prepregnancy obesity is associated with higher risk of placental pathological lesions.* Placenta 2014; 35(8): 563-569.
78. Kovo M, Zion-Saukhanov E, Schreiber L, Mevorach N, Divon M, Ben-Haroush A, Bar J. *The Effect of Maternal Obesity on Pregnancy Outcome in Correlation With Placental Pathology.* Reprod Sci 2015; 22(12): 1643-8.

79. Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, Tarca AL, Kusanovic JP, Than NG, Chaiworapongsa T, Dong Z, Hassan SS, Romero R. *Characterization of Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Transcriptome and Biological Pathways in Pregnant and Non-Pregnant Women: Evidence for Pregnancy-Related Regional-Specific Differences in Adipose Tissue*. PLOS ONE 2015; 10(12): e0143779.
80. Funcke JB, Scherer PE. *Beyond adiponectin and leptin: adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication*. J Lipid Res 2019; 60(10): 1648-1684.
81. Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T. *Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss*. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83(8): 2907-10.
82. Challier JC, Basu S, Bintein T, Minium J, Hotmire K, Catalano PM, Hauguel-de Mouzon S. *Obesity in Pregnancy Stimulates Macrophage Accumulation and Inflammation in the Placenta*. Placenta 2008; 29(3): 274-281.
83. Sacks GP, Seyani L, Lavery S, Trew G. *Maternal C-reactive protein levels are raised at 4 weeks gestation*. Human Reproduction 2004; 19(4): 1025-1030.
84. Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M. *The Placenta Cytokine Network and Inflammatory Signals*. Placenta 2006; 27(8): 794-798.
85. Ramsay JE, Ferrell WR, Crawford L, Wallace AM, Greer IA, Sattar N. *Maternal Obesity Is Associated with Dysregulation of Metabolic, Vascular, and Inflammatory Pathways*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2002; 87(9): 4231-4237.
86. Walsh SW. *Obesity: a risk factor for preeclampsia*. Trends in Endocrinology & Metabolism 2007; 18(10): 365-370.
87. Hayes EK, Lechowicz A, Petrik JJ, Storozhuk Y, Paez-Parent S, Dai Q, Samjoo IA, Mansell M, Gruslin A, Holloway AC, Raha S. *Adverse Fetal and Neonatal Outcomes Associated with a Life-Long High Fat Diet: Role of Altered Development of the Placental Vasculature*. PLOS ONE 2012; 7(3): e33370.
88. Coan PM, Vaughan OR, Sekita Y, Finn SL, Burton GJ, Constancia M, Fowden AL. *Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice*. The Journal of physiology 2010; 588(Pt 3): 527-538.
89. Rutland CS, Latunde-Dada AO, Thorpe A, Plant R, Langley-Evans S, Leach L. *Effect of Gestational Nutrition on Vascular Integrity in the Murine Placenta*. Placenta 2007; 28(7): 734-742.
90. Christians JK, Lennie KI, Wild LK, Garcha R. *Effects of high-fat diets on fetal growth in rodents: a systematic review*. Reprod Biol Endocrinol 2019; 17(1): 39.
91. Bellisario V, Panetta P, Balsevich G, Baumann V, Noble J, Raggi C, Nathan O, Berry A, Seckl J, Schmidt M, Holmes M, Cirulli F. *Maternal high-fat diet acts as a stressor increasing maternal glucocorticoids' signaling to the fetus and disrupting maternal behavior and brain activation in C57BL/6J mice*. Psychoneuroendocrinology 2015; 60: 138-150.
92. Mazzucco MB, Higa R, Capobianco E, Kurtz M, Jawerbaum A, White V. *Saturated fat-rich diet increases fetal lipids and modulates LPL and leptin*

- receptor expression in rat placentas*. Journal of Endocrinology 2013; 217(3): 303-315.
93. Sales RC, Medeiros PC, Spreafico F, de Velasco PC, Gonçalves FKA, Martín-Hernández R, Mantilla-Escalante DC, Gil-Zamorano J, Peres WAF, de Souza SAL, Dávalos A, Tavares do Carmo MG. *Olive Oil, Palm Oil, and Hybrid Palm Oil Distinctly Modulate Liver Transcriptome and Induce NAFLD in Mice Fed a High-Fat Diet*. International journal of molecular sciences 2018; 20(1): 8.
94. Qiao L, Guo Z, Bosco C, Guidotti S, Wang Y, Wang M, Parast M, Schaack J, Hay WW, Jr., Moore TR, Shao J. *Maternal High-Fat Feeding Increases Placental Lipoprotein Lipase Activity by Reducing SIRT1 Expression in Mice*. Diabetes 2015; 64(9): 3111-3120.
95. Mark PJ, Sisala C, Connor K, Patel R, Lewis JL, Vickers MH, Waddell BJ, Sloboda DM. *A maternal high-fat diet in rat pregnancy reduces growth of the fetus and the placental junctional zone, but not placental labyrinth zone growth*. Journal of Developmental Origins of Health and Disease 2011; 2(1): 63-70.
96. Gallou-Kabani C, Gabory A, Tost J, Karimi M, Mayeur S, Lesage J, Boudadi E, Gross M-S, Taurelle J, Vigé A, Breton C, Reusens B, Remacle C, Vieau D, Ekström TJ, Jais J-P, Junien C. *Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet*. PloS one 2010; 5(12): e14398-e14398.
97. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. *Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet*. The Journal of physiology 2009; 587(Pt 4): 905-915.
98. Janoschek R, Bae-Gartz I, Vohlen C, Alcázar MA, Dinger K, Appel S, Dötsch J, Hucklenbruch-Rother E. *Dietary intervention in obese dams protects male offspring from WAT induction of TRPV4, adiposity, and hyperinsulinemia*. Obesity (Silver Spring) 2016; 24(6): 1266-73.
99. Appel S, Turnwald EM, Alejandre-Alcazar MA, Ankerne J, Rother E, Janoschek R, Wohlfarth M, Vohlen C, Schnare M, Meißner U, Dötsch J. *Leptin does not induce an inflammatory response in the murine placenta*. Horm Metab Res 2014; 46(6): 384-9.
100. Food and Agriculture Organisation/ World Health Organisation. *Carbohydrates in human nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation*. FAO Food Nutr Pap, 1998.
101. Appel S, Schulze-Edinghausen M, Kretschmer T, Storck S, Janoschek R, Bae-Gartz I, Handwerk M, Wohlfarth M, Nüsken K-D, Hucklenbruch-Rother E, Heykants M, Mahabir E, Dötsch J. *Maternal obesity attenuates predelivery inflammatory reaction in C57BL/6N mice*. Journal of Reproductive Immunology 2017; 122: 10-13.
102. Howard CV, Reed M. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. Second ed. Liverpool: QTB Publications; 2010.
103. Baddeley A, Jensen EBV. *Stereology for Statisticians*. First ed. Boca Raton: CRC Press; 2004.
104. Avwioro G. *Histochemical uses of haematoxylin—a review*. Jpcs 2011; 1(5): 24-34.
105. Lüllmann-Rauch R. *Methoden*. In: Taschenlehrbuch Histologie. Second ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006: 594-596.

106. McManus JFA. *Histological and Histochemical Uses of Periodic Acid*. Stain Technology 1948; 23(3): 99-108.
107. Hauk A. *Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) in der Immunhistochemie*. Biologie in unserer Zeit 2015; 45(1): 15-15.
108. Wang Z, Storm DR. *Extraction of DNA from mouse tails*. Biotechniques 2006; 41(4): 410, 412.
109. Ramesh R, Munshi A, Panda SK. *Polymerase chain reaction*. Natl Med J India 1992; 5(3): 115-9.
110. Lorenz TC. *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies*. J Vis Exp 2012; (63): e3998.
111. Voytas D. *Agarose gel electrophoresis*. Curr Protoc Immunol 2001; Chapter 10: Unit 10.4.
112. Chomczynski P, Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Analytical Biochemistry 1987; 162(1): 156-159.
113. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR*. Nat Protoc 2006; 1(3): 1559-82.
114. Kuang J, Yan X, Genders AJ, Granata C, Bishop DJ. *An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research*. PloS one 2018; 13(5): e0196438-e0196438.
115. Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, McCaughan GW, Eris JM, Bishop GA. *Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I*. Immunol Cell Biol 2001; 79(3): 213-21.
116. Appel S, Turnwald EM, Ankerne J, Wohlfarth M, Appel J, Rother E, Janoschek R, Alejandro Alcazar MA, Schnare M, Meißner U, Dötsch J. *Hypoxia-Mediated Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase 1 Increase Is Not Attenuated in Interleukin 6-Deficient Mice*. Reprod Sci 2015; 22(6): 735-42.
117. Bajar BT, Wang ES, Zhang S, Lin MZ, Chu J. *A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs*. Sensors (Basel, Switzerland) 2016; 16(9): 1488.
118. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. *Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets*. Cancer Research 2004; 64(15): 5245-5250.
119. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical Biochemistry 1985; 150(1): 76-85.
120. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton PJ. *An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research*. Scandinavian journal of medicine & science in sports 2017; 27(1): 4-25.
121. Mahmood T, Yang PC. *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. N Am J Med Sci 2012; 4(9): 429-34.
122. Tovey ER, Baldo BA. *Comparison of semi-dry and conventional tank-buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes*. ELECTROPHORESIS 1987; 8(9): 384-387.

123. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML. *Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo*. Genes Dev 1994; 8(16): 1897-909.
124. Akyol A, Langley-Evans SC, McMullen S. *Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat*. British Journal of Nutrition 2009; 102(11): 1601-1610.
125. Gargiulo S, Gramanzini M, Megna R, Greco A, Albanese S, Manfredi C, Brunetti A. *Evaluation of growth patterns and body composition in C57Bl/6J mice using dual energy X-ray absorptiometry*. BioMed research international 2014; 2014: 253067-253067.
126. Ye K, Li L, Zhang D, Li Y, Wang HQ, Lai HL, Hu CL. *Effect of Maternal Obesity on Fetal Growth and Expression of Placental Fatty Acid Transporters*. J Clin Res Pediatr Endocrinol 2017; 9(4): 300-307.
127. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA, Bonde JP, Sørensen TIA, Olsen J. *Subfecundity in overweight and obese couples*. Human Reproduction 2007; 22(6): 1634-1637.
128. Coan PM, Vaughan OR, McCarthy J, Mactier C, Burton GJ, Constância M, Fowden AL. *Dietary composition programmes placental phenotype in mice*. The Journal of physiology 2011; 589(Pt 14): 3659-3670.
129. Shafrir E, Barash V. *Placental glycogen metabolism in diabetic pregnancy*. Isr J Med Sci 1991; 27(8-9): 449-61.
130. Johnson JR, Makaji E, Ho S, Boya X, Crankshaw DJ, Holloway AC. *Effect of maternal raspberry leaf consumption in rats on pregnancy outcome and the fertility of the female offspring*. Reprod Sci 2009; 16(6): 605-9.
131. Perez PA, DiPatrizio NV. *Impact of maternal western diet-induced obesity on offspring mortality and peripheral endocannabinoid system in mice*. PLoS One 2018; 13(10): e0205021.
132. Mao J, Zhang X, Sieli PT, Falduto MT, Torres KE, Rosenfeld CS. *Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010; 107(12): 5557-5562.
133. Ornellas F, Mello VS, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. *Sexual dimorphism in fat distribution and metabolic profile in mice offspring from diet-induced obese mothers*. Life Sciences 2013; 93(12): 454-463.
134. Von Eyben F, Mouritsen E, Holm J, Montvilas P, Dimcevski G, Suciú G, Helleberg I, Kristensen L, von Eyben R. *Intra-abdominal obesity and metabolic risk factors: A study of young adults*. International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity 2003; 27: 941-9.
135. Vickers MH, Clayton ZE, Yap C, Sloboda DM. *Maternal fructose intake during pregnancy and lactation alters placental growth and leads to sex-specific changes in fetal and neonatal endocrine function*. Endocrinology 2011; 152(4): 1378-87.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Zell-Zell-Kontakte zwischen Endothelzellen	20
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Tierversuchs	43
Abbildung 3: Mütterliche Nahrungsaufnahme während der Schwangerschaft	73
Abbildung 4: Gestationsdauer der Weibchen unter dem Einfluss der verschiedenen mütterlichen Diäten	76
Abbildung 5: Fetales Outcome unter dem Einfluss der verschiedenen mütterlichen Diäten	77
Abbildung 6: Repräsentatives Bild eines histologischen Schnitts für die stereologische Analyse der placentaren Zonen	81
Abbildung 7: Repräsentatives Bild eines histologischen Schnitts für die stereologische Analyse des Volumens der Glykogenzellnester in der Plazenta	83
Abbildung 8: Repräsentativer Bildausschnitt eines histologischen Schnitts für die stereologische Analyse der vaskulären Strukturen in der placentaren Labyrinth-Zone	85
Abbildung 9: Proteinlevel von CD-31 in den Plazenten der verschiedenen Futtergruppen.....	92
Abbildung 10: Proteinlevel von VE-Cadherin in den Plazenten der verschiedenen Futtergruppen	94
Abbildung 11: Gestationsdauer und Gewicht der Nachkommen an P2 unter dem Einfluss der beiden Kontrolldiäten.....	96
Abbildung 12: Proteinlevel von CD-31 in den Plazenten weiblicher Feten der beiden Kontrollgruppen	100

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Enzyme	31
Tabelle 2: Puffer und Stammlösungen	32
Tabelle 3: Primer Sex PCR	33
Tabelle 4: Primer und Sonden Taqman RT-qPCR.....	33
Tabelle 5: Primer SYBR Green RT-qPCR	34
Tabelle 6: Primer und Sonden für Abgleichgene von Taqman und SYBR Green RT-qPCR	34
Tabelle 7: Erst- und Zweitantikörper	35
Tabelle 8: Geräte	37
Tabelle 9: Software	38
Tabelle 10: Nährwerte der verschiedenen Futterdiäten	39
Tabelle 11: PCR Master Mix	52
Tabelle 12: PCR-Bedingungen.....	52
Tabelle 13: PCR-Ansatz Taqman qRT-PCR.....	58
Tabelle 14: Taqman qRT-PCR-Bedingungen	58
Tabelle 15: PCR-Ansatz SYBR Green qRT-PCR	58
Tabelle 16: SYBR Green qRT-PCR-Bedingungen.....	58
Tabelle 17: Zusammensetzung Gele für SDS-PAGE	62
Tabelle 18: Mittlere mütterliche Nahrungs- und Wasseraufnahme pro Tag während der Schwangerschaft in den verschiedenen Futtergruppen.....	73
Tabelle 19: Überleben der Nachkommen unter dem Einfluss der verschiedenen mütterlichen Diäten	78
Tabelle 20: Phänotypische Daten von Muttertieren, Feten und Plazenten.....	79
Tabelle 21: Ergebnisse der stereologischen Analyse der Plazenten: Volumina plazentarer Zonen und der Glykogenzellnester	84
Tabelle 22: Ergebnisse der stereologischen Analyse der Plazenten: Volumen und Oberfläche der vaskulären Strukturen in der Labyrinth-Zone.....	88
Tabelle 23: Genexpression von Endothelzellmarkern in den Plazenten der verschiedenen Futtergruppen.....	90
Tabelle 24: Genexpression von Adherens Junction-Markern in den Plazenten der verschiedenen Futtergruppen	93
Tabelle 25: Mittlere mütterliche Nahrungs- und Wasseraufnahme pro Tag während der Schwangerschaft in den beiden Kontrollgruppen.....	95
Tabelle 26: Überleben der Nachkommen unter dem Einfluss der beiden Kontrolldiäten	97
Tabelle 27: Phänotypische Daten von Muttertieren, Feten und Plazenten unter dem Einfluss der beiden Kontrolldiäten.....	98
Tabelle 28: Ergebnisse der stereologischen Analyse der Plazenten: Volumen und Oberfläche der vaskulären Strukturen in der LZ unter dem Einfluss der beiden Kontrolldiäten.....	99

7.3 Lizenzen

WOLTERS KLUWER HEALTH, INC. LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 29, 2021

This Agreement between Simone Jauch ("You") and Wolters Kluwer Health, Inc. ("Wolters Kluwer Health, Inc.") consists of your license details and the terms and conditions provided by Wolters Kluwer Health, Inc. and Copyright Clearance Center.

License Number	5101991092043
License date	Jul 04, 2021
Licensed Content Publisher	Wolters Kluwer Health, Inc.
Licensed Content Publication	Current Opinion in Hematology
Licensed Content Title	Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)
Licensed Content Author	Panida Lertkiatmongkol, Danying Liao, Heng Mei, et al
Licensed Content Date	May 1, 2016
Licensed Content Volume	23
Licensed Content Issue	3
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/College
Format	Print and electronic
Title	Morphologische und molekularbiologische Charakterisierung der murinen Plazenta unter dem Einfluss von Hochfett- sowie Hochfett-/Hochzucker-Diäten
Institution name	University of Cologne
Order reference number	doi: 10.1097/MOH.0000000000000239
PortionsFigure 2	"Adhesive molecules of the endothelial cell-cell junction"

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 29, 2021

This Agreement between Simone Jauch ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5106510637101
License date	Jul 12, 2021
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Reviews Molecular Cell Biology
Licensed Content Title	Endothelial cell–cell junctions: happy together
Licensed Content Author	Elisabetta Dejana
Licensed Content Date	Apr 1, 2004
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Title	Morphologische und molekularbiologische Charakterisierung der murinen Plazenta unter dem Einfluss von Hochfett- sowie Hochfett- / Hochzucker-Diäten
Institution name	University of Cologne
Order reference number	DOI: 10.1038/nrm1357
Portions	Figure 1.a