

**Der Einfluß einer  
pränatalen Glukokortikoidtherapie auf die fetale  
Hirndurchblutung und die zerebrale Autoregulation in  
unterschiedlichen Gestationsaltern**

- Eine Studie am chronisch instrumentierten Schaffetus in utero -

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich - Schiller - Universität Jena

von Matthias Löhle

geboren am 29.04.1977 in Jena

Gutachter:

1. PD Dr. Schwab, Jena
2. Prof. Dr. Seewald, Jena
3. Prof. Dr. Schröder, Hamburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 31.05.2005

---

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

---

CBF	Hirndurchblutung (cerebral blood flow)
COX-2	Zyklooxygenase 2
CVR	zerebrovaskulärer Widerstand (cerebrovascular resistance)
ECoG	Elektrokortikogramm
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
EMG	Elektromyogramm
ET	Endothelin
MABD	Mittlerer arterieller Blutdruck
MAP	Mikrotubulus-assoziierte Proteine
MW	Arithmetisches Mittel
NIH	National Institutes of Health
NNP	Natriumnitroprussid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Nitritoxidsynthetase
PE	Phenylephrin
PG	Prostaglandine
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PNMT	Phenylethanolamin-N-Methyltransferase
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
r	Maßkorrelationskoeffizient nach Pearson
RDS	Atemnotsyndrom (Respiratory Distress Syndrom)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSW	Schwangerschaftswoche
T <sub>3</sub>	Triiodthyronin

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

---

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Die klinische Bedeutung der pränatalen Glukokortikoidtherapie</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Der Einfluß des Gestationsalters auf das kardiovaskuläre System des Feten</b>	<b>4</b>
<b>2.3</b>	<b>Der Einfluß einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf das kardiovaskuläre System des Feten</b>	<b>5</b>
<b>2.4</b>	<b>Der Einfluß des Gestationsalters auf das zerebrovaskuläre System des Feten</b>	<b>6</b>
2.4.1	Der Einfluß des Gestationsalters auf den zerebrovaskulären Widerstand und die fetale Hirndurchblutung	6
2.4.2	Der Einfluß des Gestationsalters auf die zerebrale Autoregulation des Feten	6
<b>2.5</b>	<b>Der Einfluß einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf das zerebrovaskuläre System des Feten</b>	<b>8</b>
2.5.1	Der Einfluß einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf den zerebrovaskulären Widerstand und die fetale Hirndurchblutung	8
2.5.2	Mögliche Ursachen der zerebrovaskulären Glukokortikoideffekte	9
<b>3</b>	<b>ZIELE DER ARBEIT</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODE</b>	<b>14</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemeine Vorbemerkungen</b>	<b>14</b>
<b>4.2</b>	<b>Chirurgische Instrumentierung der Feten</b>	<b>14</b>
<b>4.3</b>	<b>Versuchsablauf</b>	<b>16</b>

---

<b>4.4</b>	<b>Beschreibung der einzelnen Versuchsteile</b>	<b>20</b>
4.4.1	Datenerfassung	20
4.4.2	Blutgasbestimmung	20
4.4.3	Blutdruckanalyse	20
4.4.4	Hirndurchblutungsmessung	21
4.4.4.1	Mikrosphärenmethode	21
4.4.4.2	Laser-Doppler-Methode	26
4.4.4.3	Hyperkapnie	29
<b>4.5</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>Methodische Voruntersuchungen zur Laser-Doppler-Methode</b>	<b>30</b>
5.1.1	Langzeitstabilität des Lasersignals	31
5.1.2	Vergleich von Laser-Doppler- und Mikrosphärenmethode	32
<b>5.2</b>	<b>Physiologische Variablen</b>	<b>34</b>
<b>5.3</b>	<b>Der Einfluß des Gestationsalters und einer pränatalen Glukokortikoid- therapie auf den fetalen Blutdruck</b>	<b>35</b>
5.3.1	Der Einfluß des Gestationsalters auf den fetalen Blutdruck	35
5.3.2	Glukokortikoideffekte auf den fetalen Blutdruck am 111. Trächtigkeitstag	35
5.3.3	Vergleich der Glukokortikoideffekte auf den fetalen Blutdruck am 111. und 128. Trächtigkeitstag	36
<b>5.4</b>	<b>Der Einfluß des Gestationsalters und einer pränatalen Glukokortikoid- therapie auf die fetale Hirndurchblutung und den zerebrovaskulären Widerstand</b>	<b>38</b>
5.4.1	Der Einfluß des Gestationsalters auf die fetale Hirndurchblutung und den zerebrovaskulären Widerstand	38
5.4.2	Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirndurchblutung am 111. Trächtigkeitstag	40

---

5.4.3	Glukokortikoideffekte auf den zerebrovaskulären Widerstand am 111. Trächtigkeitstag	42
5.4.4	Glukokortikoideffekte auf eine zerebrale Vasodilatation am 111. Trächtigkeitstag	44
5.4.4.1	Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirndurchblutung unter Vasodilatation	45
5.4.4.2	Glukokortikoideffekte auf den zerebrovaskulären Widerstand unter Vasodilatation	47
5.4.5	Vergleich der Glukokortikoideffekte am 111. und 128. Trächtigkeitstag	50
<b>5.5</b>	<b>Der Einfluß des Gestationsalters und einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf die zerebrale Autoregulation des Feten</b>	<b>52</b>
5.5.1	Der Einfluß des Gestationsalters auf die zerebrale Autoregulation des Feten	52
5.5.2	Der Einfluß einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf die zerebrale Autoregulation des Feten	54
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>56</b>
<b>6.1</b>	<b>Methodische Betrachtungen</b>	<b>56</b>
6.1.1	Der chronisch instrumentierte Schaffetus als tierexperimentelles Modell	56
6.1.2	Die Mikrosphärenmethode	57
6.1.3	Die Laser-Doppler-Durchblutungsmessung	57
6.1.4	Bestimmung der Autoregulationsgrenzen	60
<b>6.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>62</b>
6.2.1	Der Einfluß des Gestationsalters und einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf den fetalen Blutdruck	62
6.2.2	Der Einfluß des Gestationsalters auf das zerebrovaskuläre System des Feten	63
6.2.2.1	Die ontogenetische Entwicklung des zerebrovaskulären Widerstandes und der fetalen Hirndurchblutung	63
6.2.2.2	Die ontogenetische Entwicklung der zerebralen Autoregulation	64

---

6.2.3	Der Einfluß einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf das zerebrovaskuläre System des Feten	66
6.2.3.1	Glukokortikoideffekte auf den zerebrovaskulären Widerstand und die fetale Hirndurchblutung	66
6.2.3.2	Glukokortikoideffekte auf die zerebrale Vasodilatation	70
6.2.3.3	Glukokortikoideffekte auf die zerebrale Autoregulation	71
6.2.4	Die Folgen einer pränatalen Glukokortikoidtherapie für das fetale Gehirn	73
6.2.4.1	Die Folgen einer pränatalen Glukokortikoidtherapie für das normoxische Gehirn	73
6.2.4.2	Die Folgen einer pränatalen Glukokortikoidtherapie für das hypoxische Gehirn	75
<b>7</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>80</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>92</b>
<b>9.1</b>	<b>Danksagung</b>	<b>92</b>
<b>9.2.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>93</b>
<b>9.3</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>94</b>

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Die pränatale Glukokortikoidtherapie wird in der Klinik routinemäßig zur Lungenreifung bei ca. 60 % der von einer Frühgeburt bedrohten Feten durchgeführt. Diese Behandlung geht jedoch mit einer Reihe von extrapulmonalen Nebenwirkungen einher. So konnte beim fetalen Schaf, an dem diese Therapie entwickelt worden war, unter anderem eine Erhöhung des peripheren und zerebralen Gefäßwiderstandes nachgewiesen werden, die zu einem Anstieg des arteriellen Blutdruckes und zu einer Senkung der Hirndurchblutung führte.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, inwieweit die kardio- und zerebrovaskulären Nebenwirkungen vom Zeitpunkt der Glukokortikoidtherapie abhängen, da es im derzeit empfohlenen Anwendungszeitraum beim Feten zur Reifung der hypothalamo-hypophyso-adrenalen Achse sowie des kardio- und zerebrovaskulären Systems kommt. Desweiteren sollte überprüft werden, ob Glukokortikoide aufgrund der Erhöhung des zerebralen Gefäßwiderstandes die obere zerebrale Autoregulationsgrenze zu höheren Blutdruckwerten verschieben und dadurch ein protektiver Mechanismus gegenüber intraventrikulären Blutungen entsteht.

Die Untersuchungen fanden in utero am chronisch instrumentierten Schaffeten, dem Tiermodell für die menschliche Fetalperiode, statt. Die Feten befanden sich in einem Gestationsalter, das beim Menschen der 28. bis 29. SSW entspricht und das vor dem durch die Reifung der Nebennieren bedingten, physiologischen Kortisolanstieg am Ende der Schwangerschaft liegt. Nach abdominellem Median- und Uterusschnitt beim Muttertier wurden Gefäßkatheter sowie Lasersonden im zerebralen Kortex der Feten implantiert, um den Blutdruck und die Hirndurchblutung messen zu können. Nach Rückverlagerung der Feten und einer fünftägigen Erholungsphase wurden die Versuche begonnen. Zur diskontinuierlichen, quantitativen Messung der Hirndurchblutung wurden fluoreszierende Mikrosphären verwendet, die sowohl vor als auch 24 und 48 Stunden nach Beginn einer Betamethasoninfusion injiziert wurden. Die Hirndurchblutung wurde unter normoxischen und unter hyperkapnischen Bedingungen bestimmt, da Glukokortikoide im adulten Gehirn die zerebrale Vasodilatationskapazität beeinflussen. Die zerebralen Autoregulationsgrenzen wurden vor und 24 Stunden nach Infusionsbeginn während pharmakologisch induzierter, akuter Blutdruckänderungen gemessen. Zur exakten Bestimmung der Autoregulationsgrenzen ist eine kontinuierliche Aufzeichnung akuter Hirndurchblutungs-

änderungen notwendig. Daher wurde die Laser-Doppler-Durchblutungsmessung erstmals am sich frei in utero bewegenden Feten angewandt und zunächst methodisch validiert. Die Ergebnisse wurden mit Daten von Feten eines Alters verglichen, das beim Menschen der 34. SSW entspricht und in dem bereits höhere Kortisolspiegel vorliegen.

Die Betamethasoninfusion führte zu einem Anstieg des fetalen Mitteldruckes von 40 auf 50 mmHg ( $p < 0,01$ ). Im Vergleich zu den älteren Feten wurde deutlich, daß die jüngeren Feten nach dem Infusionsbeginn einen ausgeprägteren Blutdruckanstieg zeigten ( $p < 0,05$ ). Innerhalb von 24 Stunden Behandlung kam es ferner zu einer Verdopplung des zerebrovaskulären Widerstandes ( $p < 0,05$ ), der mit einem Abfall der fetalen Hirndurchblutung von ca. 40 % einherging ( $p < 0,05$ ). Desweiteren konnte zu diesem Zeitpunkt eine Verminderung der Vasodilatationskapazität unter Hyperkapnie nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ). 48 Stunden nach Beginn der Betamethasoninfusion waren diese Veränderungen rückläufig. Die zerebrovaskulären Glukokortikoideffekte zeigten im Gegensatz zu den kardiovaskulären Glukokortikoideffekten keine Abhängigkeit vom Gestationsalter. Die Validierung der Laser-Doppler-Durchblutungsmessung erbrachte eine gute Langzeitstabilität des Lasersignals sowie eine gute Korrelation zur etablierten Mikrosphärenmethode. Mit wachsendem Gestationsalter konnte ein Anstieg der oberen Autoregulationsgrenze von 50 auf über 100 mmHg festgestellt werden, aus dem eine deutliche Verbreiterung des Autoregulationsbereiches resultierte. Die Betamethasonbehandlung führte sowohl zur Erhöhung der unteren Autoregulationsgrenze von 35 auf 43 mmHg als auch zu einem Anstieg der oberen Autoregulationsgrenze von 50 auf über 80 mmHg ( $p < 0,05$ ).

Die glukokortikoidbedingte Verschiebung der oberen Autoregulationsgrenze schützt vermutlich vor allem während hypertoner Blutdruckphasen, wie sie im Rahmen einer postasphyktischen Hyperperfusion vorkommen, das unreife Gehirn vor intraventrikulären Blutungen. Andererseits muß aufgrund der gleichzeitigen Senkung der Hirndurchblutung und der Verschiebung der unteren Autoregulationsgrenze davon ausgegangen werden, daß es bei einem Blutdruckabfall, z.B. während einer perinatalen Asphyxie, von der etwa ein Drittel der Frühgeborenen betroffen sind, zu einer kritischen Verminderung der Hirnperfusion unter der Behandlung kommt. Tatsächlich gibt es aus Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe erste Hinweise dafür, daß Glukokortikoide zur Verstärkung der Hirnschäden unter einer Asphyxie führen. Die Entscheidung über eine zweifellos wichtige, pränatale Glukokortikoidtherapie sollte daher in jedem Fall kritisch und überlegt getroffen werden.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Die klinische Bedeutung der pränatalen Glukokortikoidtherapie

In den letzten 10 Jahren ist die Frühgeborenenrate in den westlichen Industriestaaten vor allem aufgrund zunehmender Mehrlingsschwangerschaften (Blondel et al., 2002) und eines gesellschaftlichen Trends zur späten Mutterschaft (Tough et al., 2002) kontinuierlich angestiegen (MacDorman et al., 2002) und beträgt heute in den USA laut aktueller epidemiologischer Studien ungefähr 12 Prozent (MacDorman et al., 2002; Dole et al., 2003). Das frühgeborene Kind weist durch die Unreife seiner Organsysteme ein spezifisches Risikospektrum für einige Krankheiten auf, die dessen perinatale Mortalität erhöhen und zu denen insbesondere das Respiratory Distress Syndrom (RDS) und intra-ventrikuläre Blutungen zählen.

Bereits im Jahre 1969 entdeckte Mount Liggins, daß eine pränatale Glukokortikoidbehandlung beim fetalen Schaf die Lungenreifung beschleunigt (Liggins, 1969). Drei Jahre später konnte er anhand der ersten randomisierten, kontrollierten Studie demonstrieren, daß sich die perinatale Sterblichkeit und die Inzidenz des Respiratory Distress Syndroms (RDS) durch eine pränatale Betamethasontherapie deutlich reduzieren lassen (Liggins & Howie, 1972). Seitdem haben viele klinische Studien stattgefunden, die protektive Eigenschaften von Glukokortikoiden gegenüber dem RDS (Übersichten in Ballard & Ballard, 1995; Crowley, 1995) und gegenüber intraventrikulären Blutungen (Leviton et al., 1993; Elimian et al., 1999) nachweisen konnten. Darauf aufbauend empfahlen 1994 die National Institutes of Health (NIH) in den USA den Einsatz von Glukokortikoiden bei von einer Frühgeburt bedrohten Schwangeren (National Institutes of Health Consensus Conference, 1995). Innerhalb eines kurzen Zeitraumes stieg nach dieser Empfehlung der Anteil der Mütter von Frühgeborenen, die mit Glukokortikoiden behandelt wurden, in den USA von 12-18 % auf 60 % (Elimian et al., 1999). Die aktuellen Richtlinien der NIH empfehlen eine pränatale Glukokortikoidbehandlung bei allen Frauen zwischen der 24. und der 34. Schwangerschaftswoche (SSW), bei denen innerhalb von 7 Tagen das Risiko einer Frühgeburt besteht (NIH Consensus Statement, 2000).

In zunehmendem Maße gibt es jedoch auch Hinweise für extrapulmonale Nebenwirkungen einer solchen Therapie. So führte im Tierversuch bereits die einmalige, mütterliche Gabe

von Glukokortikoiden bei Primaten- (Uno et al., 1994) bzw. Schaffeten (Jobe et al., 1998) zu Wachstumsretardierungen. Ferner konnte unsere Arbeitsgruppe sowohl bei reifen Schaffeten (Schwab et al., 2001) als auch bei unreifen Primatenfeten (Antonow-Schlorke et al., 2003a) einen Verlust Mikrotubulus-assoziiertes Proteins (MAP) nach einer Glukokortikoidbehandlung beobachten. Diese histologischen Veränderungen scheinen nach einer Glukokortikoidgabe im letzten Schwangerschaftsdrittel unabhängig vom Gestationsalter aufzutreten und werden offenbar nicht durch den physiologischen Kortisolanstieg beeinflusst (Antonow-Schlorke et al., 2002).

Bei menschlichen Feten konnten unter mütterlicher Betamethason- bzw. Dexamethasonbehandlung akute Verhaltensänderungen, wie z.B. eine Abnahme von Körper- und Atembewegungen sowie der Herzfrequenzvariabilität (Mulder et al., 1994; Derks et al., 1995; Senat et al., 1998) nachgewiesen werden. Ferner wurden bei frühgeborenen Babies eine Erhöhung des arteriellen Blutdruckes (Kari et al., 1994; Demarini et al., 1999) sowie eine Verzögerung der kognitiven und psychomotorischen Entwicklung (Esplin et al., 2000) nach der Therapie beobachtet.

## **2.2 Der Einfluß des Gestationsalters auf das kardiovaskuläre System des Feten**

Schon seit langem ist bekannt, daß der mittlere arterielle Blutdruck des Feten im letzten Schwangerschaftsdrittel zunimmt (Boddy et al., 1974; Dawes et al., 1980; Kitanaka et al., 1989), während gleichzeitig die Herzfrequenz abnimmt (Kitanaka et al., 1989). Eine hervorragende Studie über die Ontogenese des kardiovaskulären Systems findet sich in den Untersuchungen von Unno et al. (1999), die einen kontinuierlichen Blutdruckanstieg und eine sukzessive Herzfrequenzsenkung vom 120. bis zum 140. Trächtigkeitstag (Trächtigkeitdauer ca. 150 Tage) bei chronisch instrumentierten Schaffeten nachweisen konnten. Der ontogenetische Blutdruckanstieg wird vermutlich durch den Anstieg des Herzzeitvolumens und des peripheren vaskulären Widerstandes (Hanson, 1995) sowie durch den im letzten Schwangerschaftsdrittel zunehmenden Plasmaspiegel des Kortisols bedingt, das stimulierende Effekte auf das kardiovaskuläre System hat (Magyar et al., 1980; Norman & Challis, 1987). So ließ sich z.B. bei fetalen Schafen der physiologische Blutdruckanstieg durch beidseitige Adrenalektomie unterbrechen, konnte jedoch nach Kortisolsubstitution erneut beobachtet werden (Unno et al., 1999).

### **2.3 Der Einfluß einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf das kardiovaskuläre System des Feten**

Glukokortikoide verursachen aufgrund einer peripheren Vasokonstriktion eine unmittelbare Steigerung des arteriellen Blutdruckes beim Feten (Derks et al., 1997). Diese Blutdrucksteigerung konnte bislang sowohl bei unreifen (Tangalakakis et al., 1992) und reifen Schaffeten (Derks et al., 1997; Schwab et al., 2000; Roedel, 2002) als auch bei frühgeborenen Babies (Demarini et al., 1999; Kari et al., 1994) nachgewiesen werden. Darüberhinaus wurde nach einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung bei adulten Ratten (Levitt et al., 1996; Celsi et al., 1998) sowie beim adulten Schaf (Dodic et al., 1998) auch im späteren Leben eine arterielle Hypertonie beobachtet. Mütterliche Unterernährung und die damit einhergehenden erhöhten fetalen Glukokortikoidspiegel bewirken postnatal ebenfalls eine dauerhafte Erhöhung des arteriellen Blutdruckes (Gardner et al., 1997; Langley Evans et al., 1997; Hoet et al., 1999). Da pränatale Einflüsse auf das Herz-Kreislauf-System eine bedeutende Rolle bei der fetalen Programmierung späterer, kardiovaskulärer Erkrankungen spielen (Barker, 1998), können derzeit auch Langzeitfolgen einer Glukokortikoidbehandlung nicht ausgeschlossen werden.

Wie unsere Arbeitsgruppe zeigen konnte, beruht die während der Therapie auftretende Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes vermutlich zum Teil auf einer Änderung der Empfindlichkeit der fetalen Gefäße gegenüber vasoaktiven Mediatoren (Anwar et al., 1999). Bei Adulten konnten unter Glukokortikoiden ferner eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems, eine Vermehrung von Angiotensin-II-Typ-I-Rezeptoren und eine Hemmung vasodilatatorischer Mechanismen, wie z.B. des Kallikrein-Kinin-Systems und des Prostaglandinsystems, nachgewiesen werden (Übersicht in Saruta, 1996).

Ein weiterer in Frage kommender Mechanismus für die Blutdruckerhöhung unter der Therapie ist eine Aktivierung der Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (PNMT), die unter dem Einfluß von Glukokortikoiden sowohl im Nebennierenmark (Wurtman & Axelrod, 1966; Wong et al., 1985; Wan & Livett, 1989) als auch in extraadrenalem Gewebe (Ciaranello et al., 1973; Moore & Phillipson, 1975; Bohn et al., 1982; Kennedy et al., 1993) nachgewiesen werden konnte und zu einer Steigerung der Adrenalinsynthese führt. Während die einmalige, mütterliche Glukokortikoidgabe bei neugeborenen Kaninchen zum Anstieg des Katecholaminspiegels führte (Moftaquir Handaj et al., 1999),

konnte bei Schaffeten jedoch kein Anstieg des Katecholaminspiegels unter Glukokortikoiden beobachtet werden (Derks et al., 1997).

## **2.4 Der Einfluß des Gestationsalters auf das zerebrovaskuläre System des Feten**

### **2.4.1 Der Einfluß des Gestationsalters auf den zerebrovaskulären Widerstand und die fetale Hirndurchblutung**

Zur ontogenetischen Entwicklung des zerebrovaskulären Systems gibt es bislang nur wenige systematische Untersuchungen. So konnten einige Autoren beim fetalen Schaf eine Zunahme der fetalen Hirndurchblutung (Szymonowicz et al., 1988; Gleason et al., 1989; Helou et al., 1994; Northington et al., 1997) sowie eine Abnahme des zerebrovaskulären Widerstandes (Helou et al., 1994) im letzten Schwangerschaftsdrittel nachweisen. Desweiteren ist bekannt, daß sich die Distribution der zerebralen Durchblutung am Ende der Schwangerschaft in Vorbereitung auf das extrauterine Leben zugunsten des Kortex ändert (Szymonowicz et al., 1988).

Als Ursachen der Zunahme der fetalen Hirndurchblutung mit dem Gestationsalter kommen einerseits der Anstieg des Herzzeitvolumens und des mittleren arteriellen Blutdrucks und andererseits ein Abfall des zerebrovaskulären Widerstandes in Betracht. Die Abnahme des zerebrovaskulären Widerstandes kann dabei darauf zurückgeführt werden, daß einerseits die Bedeutung vasokonstriktiver, noradrenerger Mechanismen für die Steuerung der Hirndurchblutung mit wachsendem Alter des Feten schwindet (Wagerle et al., 1990) und andererseits vasodilatative Mediatoren, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandine, im letzten Schwangerschaftsdrittel in wachsendem Maße an Einfluß als Regulatoren des zerebralen Blutflusses gewinnen (Northington et al., 1997; van Bel et al., 1997; Hardy et al., 1999; Wright et al., 2001).

### **2.4.2 Der Einfluß des Gestationsalters auf die zerebrale Autoregulation des Feten**

Bislang liegen nur wenige Studien vor, in denen die Ontogenese der zerebralen Autoregulation beim Feten untersucht wurde. Die meisten Arbeitsgruppen verwendeten die Mikrosphärenmethode, um die Grenzen der zerebralen Autoregulation zu bestimmen (Tweed et al., 1983; Ashwal et al., 1984; Papile et al., 1985; Szymonowicz et al., 1990; Helou et al., 1994). Ein Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, daß eine

Bestimmung der Hirndurchblutung je nach Anzahl der zur Verfügung stehenden Farbstoffmarkierungen nur an maximal 7 Meßpunkten durchgeführt werden kann. Eine exakte Berechnung der Autoregulationsgrenzen ist somit bei Verwendung der Mikrosphärenmethode sehr schwierig, da für eine genaue Darstellung des Verhältnisses zwischen mittlerem arteriellen Blutdruck und der Hirndurchblutung viele Datenpaare benötigt werden (Jones et al., 1999). Ein weiterer Nachteil vieler Studien ist, daß zur Untersuchung der zerebralen Autoregulation verschiedene Verfahren zur Blutdrucksenkung bzw. -steigerung genutzt wurden. Ferner wurden häufig Gruppen aus Versuchstieren mit stark variierendem Gestationsalter gebildet, wodurch eine altersgerechte Bewertung ontogenetischer Veränderungen zusätzlich erschwert wird (Purves & James, 1969; Tweed et al., 1983; Ashwal et al., 1984; Szymonowicz et al., 1990). Es ist daher nicht überraschend, daß sich die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen zu diesem Thema zum Teil deutlich unterscheiden. So betrug beim fetalen Schaf der in den wichtigen Hirnregionen gemessene, autoregulierte Blutdruckbereich am 118.-122. Trächtigkeitstag 45-80 mmHg (Papile et al., 1985), am 124.-146. Trächtigkeitstag 30-78 mmHg (Ashwal et al., 1984), am 130.-140. Trächtigkeitstag 42-62 mmHg (Tweed et al., 1983) und in der grauen Substanz bei exteriorisierten, anästhesierten Schaffeten des 135.-150. Trächtigkeitstages 43-90 mmHg (Purves & James, 1969).

Beim fetalen Schaf konnte bereits am 92. Trächtigkeitstag (0,61 der Gestationsdauer) eine inkonstante, globale Autoregulation im gesamten Gehirn beobachtet werden (Helou et al., 1994), während eine stabile Autoregulation erstmals im Hirnstamm zwischen dem 90. und 100. Trächtigkeitstag nachgewiesen werden konnte (Szymonowicz et al., 1990). Eine stabile, globale Autoregulation fand sich beim Schaffeten dagegen erst am 118.-122. Trächtigkeitstag (Papile et al., 1985). Es ist daher wahrscheinlich, daß sich die zerebrale Autoregulation zuerst in den älteren zytoarchitektonischen Strukturen wie dem Hirnstamm und den subkortikalen Regionen entwickelt, ehe sie sich z.B. auch im Kortex manifestiert (Szymonowicz et al., 1990; Helou et al., 1994; Tuor & Grewal, 1994).

Eine alternative Methode zur Bestimmung der relativen Hirndurchblutung ist die Laser-Doppler-Durchblutungsmessung. Der Vorteil dieser Methode, die auf dem Doppler-Effekt beruht, besteht in der Möglichkeit zur kontinuierlichen Messung akuter Durchblutungsänderungen. Der Laser emittiert kohärentes, monochromatisches Licht im Infrarotbereich mit einer Wellenlänge von 780 nm, welches über ein Glasfaserkabel ins Gewebe

übertragen wird. Der Laserstrahl erreicht eine Eindringtiefe von ca. 1 mm (Stern et al., 1977; Haberl et al., 1989) und wird sowohl durch sich bewegende Erythrozyten als auch durch stationäres Zellgewebe reflektiert. Im Gegensatz zum reflektierten Licht der fixen Zellen weist das von den Erythrozyten reflektierte Licht eine Phasenverschiebung auf, die mit der Geschwindigkeit der Erythrozyten zunimmt. Die Berechnung des Blutflusses basiert auf dem linearen Verhältnis zwischen dem Anteil des phasenverschobenen, reflektierten Lichtes und dem Volumen bewegter roter Blutzellen. Diese relativ neue Methode wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um die zerebrale Autoregulation bei adulten Ratten (Dirnagl et al., 1989) sowie bei neugeborenen (Tuor & Grewal, 1994) und adulten Kaninchen (Florence & Seylaz, 1992; Tuor & Grewal, 1994) zu untersuchen. Dagegen konnte die Laser-Doppler-Methode bislang nicht zur Hirndurchblutungsmessung am Gehirn nicht anästhesierter Feten in utero verwendet werden, da es einerseits durch die fetalen Körperbewegungen und andererseits durch wachstumsbedingte Verschiebungen der Schädelknochen häufig zur Dislokation der Lasersonden kam. Unsere Arbeitsgruppe entwickelte daher Möglichkeiten zur Fixierung der Lasersonden am Schädelknochen des Feten, mit deren Hilfe sich die Empfindlichkeit des Lasersignals gegenüber Bewegungsartefakten erheblich reduzieren ließ (Müller et al., 2002). Nach den in dieser Arbeit vorgestellten methodischen Vorversuchen war es nunmehr mittels der Laser-Doppler-Durchblutungsmessung erstmals möglich, die Grenzen der zerebralen Autoregulation mit einer hohen zeitlichen Auflösung zu bestimmen.

## **2.5 Der Einfluß einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf das zerebrovaskuläre System des Feten**

### **2.5.1 Der Einfluß einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf den zerebrovaskulären Widerstand und die fetale Hirndurchblutung**

Für eine mögliche Beeinflussung der fetalen Hirndurchblutung durch Glukokortikoide gab es zunächst vor allem indirekte Hinweise. So konnte bei adulten Ratten nach Adrenalektomie und der damit einhergehenden Senkung des Glukokortikoidplasmaspiegels eine Zunahme der kortikalen und hippokampalen Durchblutung beobachtet werden (Endo et al. 1994). In einer späteren Studie zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, daß eine Langzeitbehandlung adulter Ratten mit Glukokortikoiden zu einer Senkung der Durchblutung im Hippokampus führt, die mit schweren histologischen Schäden einhergeht (Endo

et al., 1997). Unsere Arbeitsgruppe konnte dagegen erstmals direkte Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf das zerebrovaskuläre System des Feten in utero nachweisen (Schwab et al., 2000; Roedel, 2002). So wurde bei Schaffeten des 128. Trächtigkeitstages (0,87 der Trächtigkeitsdauer) nach 24 Stunden Betamethasoninfusion ein signifikanter Anstieg des zerebrovaskulären Widerstandes und eine Senkung der fetalen Hirndurchblutung beobachtet. Gleichzeitig kam unter der Glukokortikoidbehandlung zu einem Verlust Mikrotubulus-assoziiertes Proteins (MAP) und zu EEG-Veränderungen (Schwab et al., 2001; Roedel, 2002).

Für menschliche Feten liegen bislang nur uneinheitliche Erkenntnisse über mögliche Glukokortikoideffekte auf die Hirndurchblutung vor. So wurden z.B. mittels transkranieller Dopplersonographie bei beatmeten Frühgeborenen nach 24 Stunden Dexamethasonbehandlung unveränderte (Ohlsson et al., 1994) bzw. erhöhte Flußgeschwindigkeiten (Cabanas et al., 1997) in den großen Zerebralarterien gemessen. Da sich die Kreislaufregulation beatmeter Frühgeborener erheblich von der nicht sedierter Feten unterscheidet, haben diese Untersuchungen jedoch nur geringe Aussagekraft für die fetalen Verhältnisse in utero. Doch auch bei der dopplersonographischen Messung an Feten in utero wurden unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich zerebrovaskulärer Glukokortikoideffekte gewonnen. So konnten u.a. nach Dexamethasonbehandlung (Cohlen et al., 1996) bzw. nach Betamethasonbehandlung (Rotmensch et al., 1999) in den grossen fetalen Hirnarterien keine Veränderungen des Strömungsprofils und des Pulsatilitätsindex mittels Ultraschall-dopplersonographie nachgewiesen werden, während in einer aktuellen Studie signifikante Verminderungen des Pulsatilitätsindex in der fetalen Aorta und in der A. cerebri media nach mütterlicher Betamethasonbehandlung beobachtet wurden (Edwards et al., 2002). An dieser Stelle muß jedoch betont werden, daß mit der Dopplersonographie lediglich Flußgeschwindigkeiten in den großen zerebralen Arterien gemessen werden können und somit keine direkte Bestimmung der autoregulierten, regionalen Hirndurchblutung möglich ist.

### **2.5.2 Mögliche Ursachen der zerebrovaskulären Glukokortikoideffekte**

Eine Ursache für die unter der Glukokortikoidtherapie beobachtete Hirndurchblutungs-senkung läßt sich in einem direkt vasokonstriktorischem Effekt der Glukokortikoide auf den Gefäßtonus vermuten. So konnte unter einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung

eine Widerstandserhöhung sowohl an peripheren (Derks et al., 1997) als auch an zentralen Gefäßen (Schwab et al., 2000; Roedel, 2002) beobachtet werden (siehe auch 2.3).

Ein zweiter Mechanismus, über den die Glukokortikoide möglicherweise die fetale Hirndurchblutung zu senken vermögen, ist in deren Einfluß auf den Prostaglandinstoffwechsel zu suchen. Im Gegensatz zum adulten Gehirn zählen Prostaglandine beim Feten zu den wichtigsten, hormonellen Mediatoren bei der Regulierung des zerebrovaskulären Tonus (Leffler & Busija, 1987; Jones et al., 1993; Benders et al., 1995). Glukokortikoide hemmen die Prostaglandinsynthese in den meisten Geweben, so z.B. auch im Gefäßendothel (Blajchman et al., 1979; Crutchley et al., 1985; De Caterina & Weksler, 1986) und im Hirngewebe (Weidenfeld et al., 1987). Dieser Effekt ist einerseits auf eine gesteigerte Synthese von Lipocortin zurückzuführen, welches seinerseits die Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) hemmt und somit die Produktion von Arachidonsäure, der Muttersubstanz für die Prostaglandinsynthese, verhindert. Andererseits führen Glukokortikoide zu einer verminderten Expression der Zyklooxygenase 2 (COX-2) als induzierbarer Isoform der Zyklooxygenase und inhibieren daher im adulten Organismus aufgrund der spezifischen COX-2-Hemmung vor allem die stimulierte Prostaglandinsynthese (Übersichten in Russo Marie, 1990; Masferrer & Seibert, 1994; Goppelt-Struebe, 1997). Da jedoch im fetalen Gehirn die COX-2 eine wesentliche Rolle für die Prostaglandinproduktion spielt, ist beim Fetus auch eine Hemmung der basalen Prostaglandinsynthese durch Glukokortikoide zu erwarten (Peri et al., 1995; Leffler, 1997). Die inhibitorische Wirkung der Glukokortikoide auf die Prostaglandinsynthese konnte zudem bislang für das vasodilatatorisch aktive PGE<sub>2</sub> (Leffler & Busija, 1987; Sessa & Nasjletti, 1990; Wagerle et al., 1991), nicht jedoch für das vaso-konstriktive PGF<sub>2α</sub> nachgewiesen werden. Demnach hemmen Glukokortikoide vermutlich spezifisch die vasodilatatorischen Komponenten des Prostaglandinsystems.

Eine dritte, denkbare Ursache für die unter Glukokortikoiden auftretende Hirndurchblutungssenkung mag auf deren Wirkung auf den Stoffwechsel beruhen. Schon seit längerem sind katabole Glukokortikoideffekte auf den peripheren (Munck, 1971) und den zentralen Metabolismus (Landgraf et al., 1978) bekannt. So konnte sowohl im neonatalen (Tuor et al., 1997) als auch im adulten Rattenhirn (Doyle et al., 1994) eine Verminderung der lokalen, zerebralen Glukoseutilisation nach Glukokortikoidgabe beobachtet werden. Der Einfluß der Glukokortikoide auf den neuronalen Stoffwechsel konnte auch in weiteren Untersuchungen demonstriert werden, bei denen es nach Adrenalektomie und dem damit

einhergehenden Abfall des Glukokortikoidspiegels zu einer gesteigerten, zerebralen Glukoseutilisation im adulten Rattenhirn kam (Kadekaro et al., 1988). Da die zerebrale Perfusion eng an den zerebralen Stoffwechselbedarf gekoppelt ist (Iadecola, 1993), führt eine Verminderung der Glukoseutilisation möglicherweise zu einer sekundären Hirndurchblutungssenkung. Somit könnten auch die katabolen Stoffwechselwirkungen der Glukokortikoide einen Abfall der Hirndurchblutung unter der Behandlung bewirken.

### 3 ZIELE DER ARBEIT

Zu Beginn des letzten Schwangerschaftsdrittels kommt es beim Feten mit der Reifung der hypothalamo-hypophyso-adrenalen Achse zum physiologischen Kortisolanstieg (Challis & Brooks, 1989; Liggins, 1994) und gleichzeitig zur Reifung des kardio- und zerebrovaskulären Systems in Vorbereitung auf das extrauterine Leben (siehe 2.2 und 2.4). Nach den gegenwärtigen Richtlinien wird bei einer drohenden Frühgeburt zwischen der 24. und der 34. SSW eine pränatale Glukokortikoidtherapie zur Lungenreifung des Feten empfohlen (siehe 2.1). Es ist bislang noch nicht bekannt, inwiefern die kardio- und zerebrovaskulären Nebenwirkungen der hierzu verwendeten synthetischen Glukokortikoide durch die Reifung der hypothalamo-hypophyso-adrenalen Achse und des kardiovaskulären Systems beeinflußt werden und ob Glukokortikoide nicht nur die Hirndurchblutung sondern auch die zerebrale Autoregulation des Feten beeinträchtigen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand deshalb darin, den Einfluß einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf

1. den fetalen Blutdruck
  2. die fetale Hirndurchblutung und den zerebrovaskulären Widerstand sowie
  3. die Grenzen der zerebralen Autoregulation
- in Abhängigkeit vom Gestationsalter zu untersuchen.

Die Versuche wurden in utero an chronisch instrumentierten Schaffeten vom 111.-113. Trächtigkeitstag (Gestationsdauer insgesamt ca. 150 Tage) und somit vor dem physiologischen Kortisolanstieg durchgeführt. Die von mir gewonnenen Resultate wurden anschließend mit bereits veröffentlichten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe von Feten des 128.-130. Trächtigkeitstages (Schwab et al., 2000; Roedel, 2002) verglichen, bei denen bereits ein höherer Kortisolspiegel besteht.

Im ersten Teil der Arbeit sollte anhand des Blutdruckes untersucht werden, inwiefern eine pränatale Glukokortikoidtherapie das kardiovaskuläre System in Abhängigkeit vom Gestationsalter des Feten beeinflußt. Aus bisherigen Studien war bekannt, daß die fetale Entwicklung von einem Anstieg des Blutdruckes und einem Abfall der Herzfrequenz begleitet wird (siehe 2.2) und daß eine pränatale Glukokortikoidbehandlung nach dem Beginn des physiologischen Kortisolanstieges beim fetalen Schaf mit einer Blutdruck-erhöhung einhergeht (siehe 2.3). Bislang lagen jedoch noch keine Erkenntnisse darüber

vor, ob synthetische Glukokortikoide auch vor dem physiologischen Kortisolanstieg zu einer Erhöhung des fetalen Blutdruckes führen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob eine pränatale Glukokortikoidtherapie bereits vor dem physiologischen Kortisolanstieg zu Veränderungen der fetalen Hirndurchblutung und des zerebrovaskulären Widerstandes führt und inwieweit diese mit Glukokortikoideffekten vergleichbar sind, die bei älteren Feten gemessen wurden. Studien zu diesem Thema bezogen sich bislang nur auf das späte Gestationsalter. So kam es bei Schaffeten des 128. Trächtigkeitstages nach 24 Stunden Betamethasoninfusion zu einer signifikanten Hirndurchblutungssenkung und zu einem Anstieg des zerebrovaskulären Widerstandes (siehe 2.5.1). Zur Ermittlung der zerebrovaskulären Nebenwirkungen der pränatalen Glukokortikoidtherapie wurde die fetale Hirndurchblutung mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären sowohl unter Normalbedingungen als auch unter zerebraler Vasodilatation bestimmt, da Glukokortikoide zu einer Einschränkung der Vasodilatationskapazität der Hirngefäße führen, indem sie die Prostaglandinsynthese hemmen (siehe 2.5.2). Die zerebrale Vasodilatation wurde durch eine Hyperkapnie induziert.

Im dritten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die zerebrale Autoregulation des Feten im letzten Schwangerschaftsdrittel entwickelt und ob sie durch eine pränatale Glukokortikoidbehandlung beeinflusst wird. Die bisherigen Untersuchungen zur Ontogenese der zerebralen Autoregulation erbrachten aufgrund zahlreicher, methodischer Probleme widersprüchliche Ergebnisse (siehe 2.4.2). Um die Autoregulationsgrenzen exakt bestimmen zu können, wurde erstmals die Laser-Doppler-Methode zur kontinuierlichen Messung relativer Hirndurchblutungsänderungen in utero angewandt. Vor Beginn der Messungen wurden daher umfangreiche Tests durchgeführt, in denen die Langzeitstabilität des Lasersignals nachgewiesen und die Laser-Doppler-Durchblutungsmessung gegen die etablierte Mikrosphärenmethode validiert werden sollte. Da Glukokortikoide eine Vaskonstriktion der Hirngefäße beim Feten verursachen (siehe 2.5), waren unter der pränatalen Glukokortikoidbehandlung auch Änderungen bei der zerebralen Autoregulation zu erwarten. Im Mittelpunkt stand hierbei die Hypothese, daß der glukokortikoidbedingte, erhöhte Vasotonus zu einer Verschiebung der oberen Autoregulationsgrenze hin zu höheren Blutdruckwerten führt und so das unreife Gehirn vor intraventrikulären Blutungen während einer postasphyktischen Hyperperfusion schützt. Der Mechanismus für diesen protektiven Effekt der Glukokortikoide war bislang unbekannt.

## 4 MATERIAL UND METHODE

### 4.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Die Untersuchungen wurden durch die Tierschutzkommission des Landes Thüringen genehmigt und am Institut für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt. Für die chirurgische Instrumentierung wurden 3 sterile Mitarbeiter, 1 unsteriler Mitarbeiter und 1 weitere Person für die Anästhesie sowie für die Durchführung der Experimente jeweils 3 Mitarbeiter benötigt. Neben der Datenanalyse nahm ich an der chirurgischen Instrumentierung der Versuchstiere, den Experimenten und den darauffolgenden Sektionen teil und war ferner für die Organpräparation, die Probenverarbeitung und -messung verantwortlich.

Insgesamt 29 trächtige Schafe der Rasse Merino-Schwarzkopf (normale Trächtigkeitsdauer ca. 150 Tage) mit bekanntem Gestationsalter wurden mindestens 5 Tage vor dem chirurgischen Eingriff zur Akklimatisation in die Laborräume gebracht und dort unter kontrolliertem Hell-Dunkel-Rhythmus (12 h Licht, Dunkelheit von 18 Uhr bis 6 Uhr) mit Wasser und Futter ad libitum versorgt. Um eine adäquate Versorgung und Betreuung der Tiere garantieren zu können, standen während des gesamten Aufenthaltes ein Tierarzt sowie mehrere Tierpfleger zur Verfügung.

### 4.2 Chirurgische Instrumentierung der Feten

Die chirurgische Instrumentierung der Tiere erfolgte im Trächtigkeitsalter von  $106 \pm 0,5$  Tagen (jüngere Gruppe) bzw. von  $120 \pm 1$  Tagen (ältere Gruppe) (Mittelwert  $\pm$  SEM). Nach 24 Stunden Nahrungskarenz erhielten alle Tiere eine Prämedikation mit 1 g Ketamin i.m. (Ketamin 10, Atarost, Deutschland) und 0,04 mg/kg KG Atropinsulfat i.m. (Braun, Melsungen, Deutschland). Anschließend wurde eine Vollnarkose mit 4 % Halothan (Fluothane, Zeneca, Deutschland) eingeleitet und nach Intubation unter Beatmung mit 1,0-1,5 % Halothan in 100 % Sauerstoff aufrechterhalten.

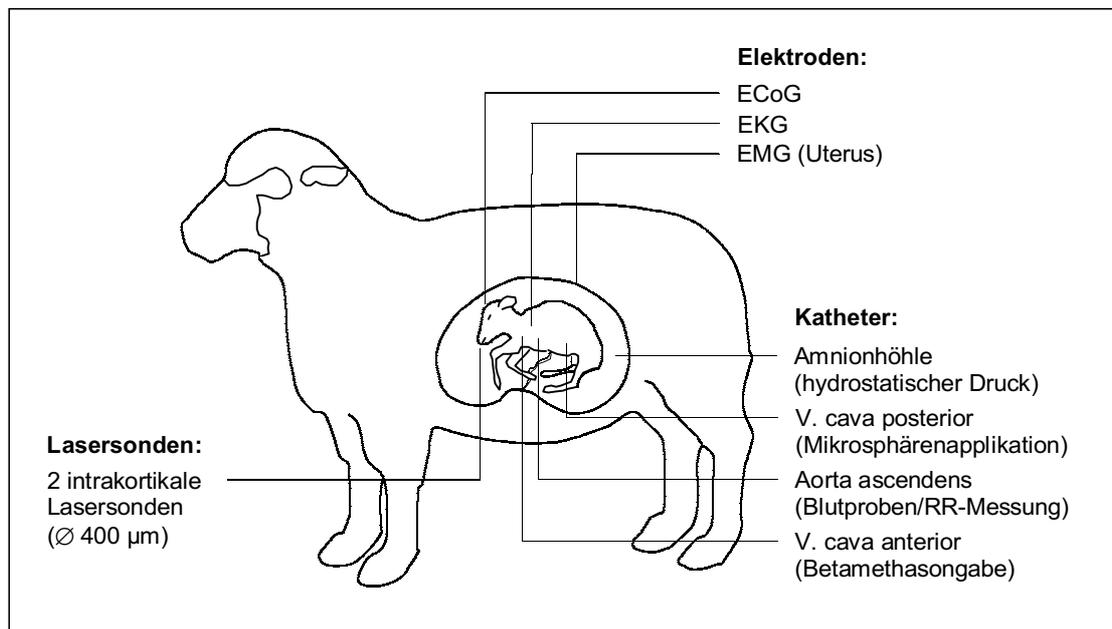
Zunächst wurden beim Muttertier die linke A. carotis zur Gewinnung von Blutproben und die linke V. jugularis externa zur postoperativen Verabreichung von Medikamenten katheterisiert (Polyvinyl-Katheter, Rüscheleit, Rüsche, Deutschland; 0,1 mm Innen- und 0,18 mm Außendurchmesser). Für die Hyperkapnieversuche wurde ferner ein Tracheal-

katheter zur CO<sub>2</sub>-Insufflation eingebracht (Gleed et al., 1986). Nach abdominellem Median- und anschließendem Uterusschnitt wurde der Fetus unter sorgsamer Schonung der Nabelschnur exkorporiert und mit insgesamt 4 Polyvinyl-Kathetern bestückt. Ein Katheter wurde über die linke A. carotis communis in die Aorta ascendens zur arteriellen Blutdruckmessung, zur Blutprobenentnahme sowie zur Referenzblutentnahme im Rahmen des Mikrosphärenversuchs vorgeschoben. Ferner wurden Katheter über die linke V. jugularis externa in der V. cava anterior (der humanen V. cava superior entsprechend) zur Betamethasongabe und über die V. saphena magna in der V. cava posterior (der humanen V. cava inferior entsprechend) zur Applikation der Mikrosphären plaziert. Um hydrostatisch bedingte Unterschiede des arteriell gemessenen Blutdruckes korrigieren zu können, wurde desweiteren zur Aufzeichnung des Amniondruckes ein auf Herzhöhe des Feten befestigter Katheter in der Amnionhöhle implantiert.

Zur Ableitung des Elektrokardiogramms wurden Edlestahlelektroden (LIFY, Metrofunk Kabel-Union, Berlin, Deutschland) in die supraskapuläre Muskulatur beider Schultern sowie in den Knorpel des Sternum eingenäht. Drei weitere Elektroden wurden in der Uterusmuskulatur befestigt, um eine Aufzeichnung von Uteruskontraktionen zu ermöglichen. Zur Ableitung des Elektrokortikogramms (ECoG, nicht Gegenstand meiner Untersuchungen) implantierten wir nach Freilegung der Schädelkalotte außerdem Messingschräubchenelektroden bifrontal und biparietal in den Schädelknochen und befestigten diese zusätzlich mit einem Kaltpolymerisat (Kallocryl, Laborchemie, Apolda, Deutschland).

Zusätzlich wurden bei einigen Tieren 2 intrakortikale Lasersonden (400 µm Durchmesser, Moor, Devon, UK) 8 mm in den rechten und linken parietalen Kortex durch Bohrlöcher vorgeschoben, die 16 mm lateral und 6 mm posterior des Bregma angelegt wurden. Um eine Lockerung der Sonden durch wachstumsbedingte Verschiebungen des Schädelknochens zu verhindern, wurden diese jeweils nur auf einem Schädelknochen fixiert und zusätzlich mit Kaltpolymerisat (Kallocryl, Laborchemie Apolda, Deutschland) gesichert.

Nach Rückverlagerung des Feten wurden alle Katheter, die Elektrodenkabel und die Glasfaserkabel vom Laser durch eine Inzision in der seitlichen Bauchwand nach außen geleitet und abschließend Uterus und Abdomen des Muttertieres wieder verschlossen. Eine Übersicht über die gesamte Instrumentierung des Feten findet sich in Abb. 1.



**Abb. 1** Übersicht über die Instrumentierung des Schaffeten

Um die Katheter offenzuhalten, wurden diese unmittelbar nach der Operation an Infusionspumpen angeschlossen und über den gesamten Versuchszeitraum mit heparinisierter 0,9%iger Kochsalzlösung (15 IU Heparin/ml) bei einer Infusionsrate von 0,5 ml/h gespült. In den ersten drei postoperativen Tagen erhielten alle Muttertiere und Feten zweimal täglich 0,5 g Ampicillin (Ampicillin, Ratiopharm, Deutschland) intravenös bzw. in die Amnionhöhle als Infektionsprophylaxe. Zur Analgesie wurden den Muttertieren für 3 Tage intravenös zusätzlich 30-50 mg/kg Metamizol (Arthropur, Atarost, Deutschland) verabreicht.

### 4.3 Versuchsablauf

Im gesamten postoperativen Verlauf bis zum Ende des Experimentes wurden täglich Blutgaskontrollen durchgeführt, um den mütterlichen und den fetalen Gesundheitszustand überwachen zu können. Um den Einfluß des operativen Traumas auf die Versuchsergebnisse zu minimieren, wurde allen Tieren eine mindestens fünftägige Erholungsphase eingeräumt. Anschließend erfolgte die randomisierte Zuteilung der Schafe in eine Kontrollgruppe und in eine mit Betamethason behandelte Gruppe.

Die Hirndurchblutung und die zerebrale Autoregulation wurden immer zur gleichen Tageszeit bestimmt, um Auswirkungen der zirkadianen Rhythmik der endogenen Kortisol-synthese (Schmidt & Thews, 1997), des kardiovaskulären Systems (Unno et al., 1999) und der Hirndurchblutung (Endo et al., 1990) auf die Versuchsergebnisse zu begrenzen. Die Experimente begannen daher stets um 8.00 Uhr morgens. Um kardio- und zerebrovaskuläre Effekte einer pränatalen Glukokortikoidtherapie in unterschiedlichen Gestationsaltern untersuchen zu können, wurden bereits veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe von reifen Feten des 128. Trächtigkeitstages (Roedel, 2002) verwandt und diese mit meinen Versuchsergebnissen zu den unreifen Schafen verglichen (Tab. 1).

Am  $110. \pm 0,5$  bzw.  $127. \pm 1$  Trächtigkeitstag wurde der Versuch zunächst mit einer 48 Stunden dauernden Kontrollphase gestartet, in der Blutdruck, Amniondruck, EKG, ECoG und Uterusaktivität kontinuierlich aufgezeichnet wurden. Am 2. Tag der Kontrollphase wurde die Hirndurchblutung mittels Laser-Doppler und Mikrosphärenmethode sowohl unter Normalbedingungen als auch unter induzierter Hyperkapnie gemessen. Danach schlossen sich die Versuche zur Bestimmung der Autoregulationsgrenzen an. Unmittelbar darauffolgend wurde mit der Infusion von 0,9%iger NaCl-Lösung bzw.  $3,3 \mu\text{g}$  Betamethason (Celestan, Essex Pharma, München, Deutschland) pro Stunde und kg fetales Körpergewicht über die fetale V. jugularis externa begonnen und diese für die nächsten 48 Stunden mit einer Rate von 1 ml/h aufrechterhalten. Das fetale Gewicht wurde hierbei aus Wachstumskurven unserer Arbeitsgruppe gewonnen. Durch die direkte Applikation des Betamethasons in den fetalen Kreislauf wurden mögliche Passageunterschiede

**Tab. 1** Stichprobenzahlen

Alter	Medikation	Blutdruck-analyse	Mikrosphären-versuch	Lasermethodik	Autoregulationsgrenzen
111. Tag	0,9% NaCl-Lösung	7	7	-	-
	Betamethason	8	8	-	-
	Gesamt	15	15	5	7
128. Tag	0,9% NaCl-Lösung	8*	8*	-	-
	Betamethason	8*	8*	-	-
	Gesamt	16*	16*	7	7

\*Diese Tiere stammen aus der Promotionsarbeit von Roedel (2002) und wurden von mir zum Vergleich von Blutdruck, Hirndurchblutung und zerebrovaskulärem Widerstand beider Gestationsalter verwendet.

zwischen oviner und humaner Plazenta umgangen. Desweiteren konnte durch die gewichtsadaptierte Dosis sichergestellt werden, daß im fetalen Blut Plasmakonzentrationen erreicht wurden, die denjenigen Wirkspiegeln entsprachen, die im Plasma der humanen Nabelschnur 24 Stunden nach mütterlicher Glukokortikoidbehandlung gemessen wurden (Petersen et al., 1980; Kream et al., 1983). Somit konnte den Empfehlungen der National Institutes of Health Consensus Conference von 2000 für die klinische Anwendung von Betamethason entsprochen werden.

Während der gesamten Infusionsphase wurde die in der Kontrollphase begonnene Überwachung der oben genannten fetalen Parameter fortgesetzt. 24 Stunden nach Beginn der NaCl- bzw. Betamethasoninfusion wurden alle Versuche wiederholt. Abschließend wurde nach 48 Stunden die Hirndurchblutung ohne erneuten Hyperkapnie-Versuch mittels Mikrosphärenapplikation bestimmt.

Glukokortikoide fördern in der ovinen Plazenta durch Stimulation der  $17\alpha$ -Hydroxylase die Östrogenbiosynthese aus Progesteron und können daher innerhalb von 24 Stunden nach Beendigung einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung zum Abort führen. Aus diesem Grund wurden die Muttertiere unmittelbar nach Abschluß der experimentellen Phase mit 4 % Halothan narkotisiert und die Feten nach Bauch- und Uterusschnitt entnommen. Die Feten wurden durch Exsanguination getötet, anschließend die fetalen Gehirne über einen Zugang in der A. carotis communis mit heparinisierte 0,9%iger Kochsalzlösung blutleer gespült und mit 2%iger Formaldehydlösung perfusionsfixiert. Nach Bestimmung des Körpergewichtes wurden zunächst die korrekte Lage der Katheter im Körper des Feten kontrolliert und anschließend Organproben zur weiteren Aufarbeitung entnommen. Die Muttertiere wurden mittels intravenöser Pentobarbitalapplikation (Narcoren, Aventis, Deutschland) getötet (siehe auch Schema über den gesamten Versuchsablauf in Tab. 2).

Während des gesamten Versuches legten wir sehr viel Wert darauf, den Tieren unnötiges Leiden sowie Schmerzen zu ersparen.

Tab. 2 Versuchsschema

Versuchsphase	Vorbereitungs- und Evaluierungsphase	Experimentelle Phase		Sektion
		Kontrollphase	Infusionsphase	
<b>Versuchsgruppen</b> -junge Tiere: -ältere Tiere:	100.-109.Tag* 115.-126.Tag*	110.Tag 127.Tag 111.Tag 128.Tag	112.Tag 129.Tag 113.Tag 130.Tag	113.Tag 130.Tag
<b>Inhalt der Versuchsphase</b>	mindestens fünftägige Akklimatisation der Versuchstiere in den Versuchsräumen chirurgische Instrumentierung der Feten am 106. bzw. 120.Trächtigkeitstag anschließend fünftägige Erholungsphase für Mutter und Fetus *bei insgesamt 12 Tieren methodische Vorversuche mit: - Langzeitaufzeichnung des Lasersignals über 5 Tage - Validierung gegenüber der Mikrosphärenmethode im Hyperkapnie-Versuch	Beginn der Überwachung von Blutdruck, Amniondruck, EKG, ECoG und Uterusaktivität - am 111./128.Tag: 1.Messung der Hirndurchblutung unter Normalbedingungen 2.Messung der Hirndurchblutung unter Hyperkapnie Bestimmung der Autoregulationsgrenzen anschließend Beginn der NaCl- bzw. Betamethason-Infusion	Fortsetzung der Überwachung von Blutdruck, Amniondruck, EKG, ECoG und Uterusaktivität - am 112./129.Tag: 3.Messung der Hirndurchblutung nach 24 Stunden Infusion 4.Messung der Hirndurchblutung unter Hyperkapnie Bestimmung der Autoregulationsgrenzen - am 113./130.Tag: 5.Messung der Hirndurchblutung nach 48 Stunden Infusion	Perfusionsfixierung des fetalen Gehirns mittels Formaldehyd Überprüfung der Katheterlage Probenentnahme Aufarbeitung der Organproben
Kontrolltiere:		1 ml 0,9% NaCl-Lösung / h		
behandelte Tiere:		3,3 µg Betamethason / kg KG / h		

#### **4.4 Beschreibung der einzelnen Versuchsteile**

##### **4.4.1 Datenerfassung**

Die abgeleiteten physiologischen Signale wurden mittels eines Physiographen (Gould Instruments, Valley View, OH, USA) verstärkt, gefiltert (Bandbreiten für EKG und Uterus-EMG 30-300 Hz, für ECoG 0,3-30 Hz) und anschließend über einen 16-Kanal A/D Wandler (DT2801F, Data Translation, Marlborough, MA, USA) digitalisiert. Die dabei verwendeten Abtastfrequenzen betragen für das EKG 1024 Hz, für Uterus-EMG und ECoG 128 Hz sowie 64 Hz für arteriellen Blutdruck und Amniondruck. Die Lasersignale wurden mittels eines Laser-Doppler-Monitors (DRT4, Moor Instruments, Devon, UK) mit der maximal möglichen, analogen Abtastrate von 40 Hz erfaßt und anschließend digitalisiert. Mit Hilfe eines am Institut für Pathophysiologie der Friedrich-Schiller-Universität entwickelten Meßprogrammes wurden die so gewonnenen Daten kontinuierlich auf einem PC aufgezeichnet und gleichzeitig mit einem Papierschreiber (TA11, Gould Instruments, Valley View, OH, USA) dokumentiert.

##### **4.4.2 Blutgasbestimmung**

Täglich um 8 Uhr wurden fetale und maternale Blutproben entnommen und mit Hilfe eines Blutgasanalysators (ABL600, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)  $p_aO_2$ ,  $p_aCO_2$  und pH bestimmt. Die Messung erfolgte dabei unter Anpassung an die vorher beim Muttertier rektal gemessene Körpertemperatur. Mehrfache Blutgasanalysen fanden insbesondere bei der Hirndurchblutungsmessung unter Hyperkapnie statt. Um die zum Zeitpunkt der Mikrosphärenapplikation herrschenden Verhältnisse am besten wiedergeben zu können, wurden die unmittelbar vor und nach der Applikation gemessenen Werte gemittelt.

##### **4.4.3 Blutdruckanalyse**

Zur Bestimmung des mittleren arteriellen Blutdrucks des Feten wurden die in der fetalen A. carotis bzw. in der Amnionhöhle plazierten Katheter mit Blutdruckwandlern (Braun, Melsungen, Deutschland) verbunden, die vor Beginn der Versuchsreihe kalibriert wurden. Die aufgezeichneten Signale wurden mittels der am Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der Friedrich-Schiller-Universität Jena entwickelten Signalverarbeitungssoftware ATISA für WINDOWS ausgewertet. Die zwischen Herzhöhe und Höhe der Blutdruckwandler resultierenden Druckdifferenzen konnten hierbei korri-

giert werden, indem der sich mit der Tierlage entsprechend ändernde Amniondruck vom arteriellen Blutdruck subtrahiert wurde. Aus den daraus resultierenden Druckwerten wurde mittels Rechteckfunktion unter gleichzeitiger Reduktion der Signalfrequenz von ursprünglich 64 Hz auf 0,0166 Hz (also 1 Blutdruckwert/Minute) der mittlere arterielle Blutdruck (MABD) gewonnen. Danach wurden die Minutenmittelwerte in eine selbst erstellte EXCEL-Maske übernommen und unter Zuhilfenahme der Protokollaufzeichnungen sowie der Aufnahmen des Papierschreibers korrigiert. Dabei wurden Werte, die nachweislich durch Manipulationen während der einzelnen Versuchsteile, wie z.B. Katheterspülungen, Gabe von kreislaufwirksamen Medikamenten etc., entstanden waren, aus der Darstellung des Blutdruckverlaufs ausgeschlossen. Gleiches galt für Signale, die während ausgeprägter Uteruskontraktionen aufgezeichnet wurden. Bei korrekturbedingtem Fehlen von Stundenmittelwerten wurde die entstandene Aufzeichnungslücke durch lineare Interpolation der angrenzenden Werte geschlossen.

#### **4.4.4 Hirndurchblutungsmessung**

##### **4.4.4.1 Mikrosphärenmethode**

Die Bestimmung der Hirndurchblutung mittels der Mikrosphärenmethode erfolgte unmittelbar vor, 24 Stunden und 48 Stunden nach Infusionsbeginn sowie während einer induzierten Hyperkapnie jeweils vor und 24 h nach Infusionsbeginn. Da Uteruskontraktionen mit Blutdruck- und Herzfrequenzänderungen, einem Abfall des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes sowie mit Änderungen der elektrokortikalen Aktivität einschließlich Schlafstadienänderungen einhergehen können (Nathanielsz et al., 1980; Shinozuka & Nathanielsz, 1998), wurden die Messungen nicht während myographisch nachweisbarer, verstärkter Uterusaktivität durchgeführt. Vor jeder Mikrosphärenapplikation wurden ferner der pH-Wert und die fetalen Blutgase bestimmt, um einheitliche Ausgangsbedingungen zu sichern.

Die Mikrosphärenmethode zur quantitativen Bestimmung der regionalen Hirndurchblutung ist am chronisch instrumentierten Schaffetus schon seit langem etabliert (Rudolph & Heymann, 1967). Demnach passieren beim Fetus in vivo in die V. cava posterior injizierte Mikrosphären nahezu vollständig das offene Foramen ovale und gelangen über den linken Vorhof und den linken Ventrikel in den oberen Kreislauf. Anschließend erfolgt eine flußproportionale Verteilung der Sphären auf die verschiedenen Organe. Entnimmt man

über einen in der Aorta ascendens plazierten Katheter bei konstantem Referenzfluß eine Blutprobe, so läßt sich aus dem Verhältnis zwischen der in den Organen und der in der Referenzblutprobe gefundenen Mikrosphärenzahl die regionale Durchblutung in Organen des oberen Kreislaufes wie folgt berechnen:

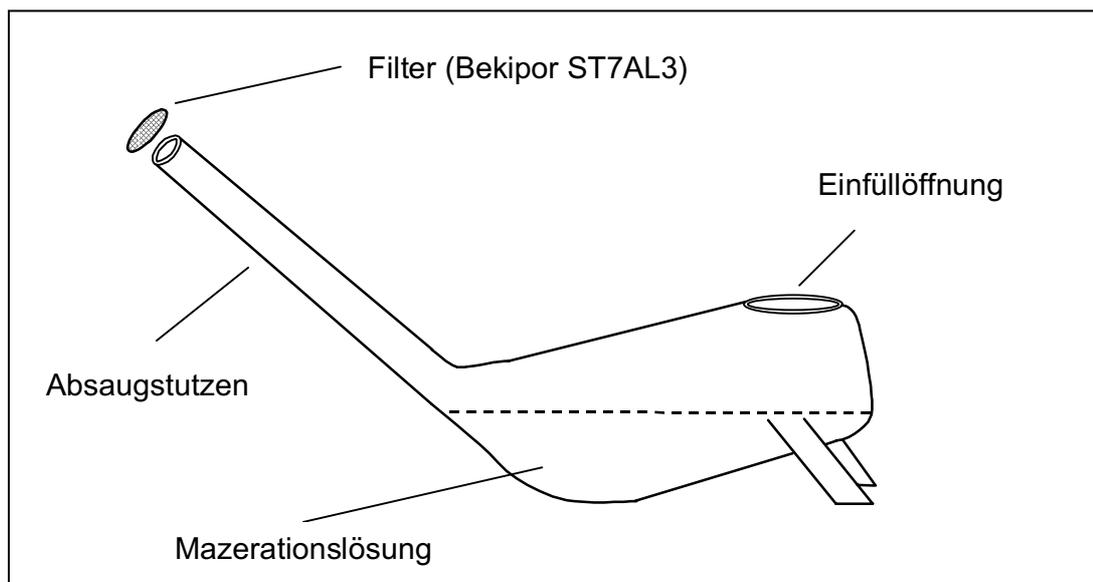
$$\text{Durchblutung}_{\text{Gewebe}} = \frac{\text{Mikrosphärenzahl}_{\text{Gewebe}} \times \text{Referenzfluß}}{\text{Mikrosphärenzahl}_{\text{Referenz}}} \quad (1)$$

Im Gegensatz zur Farbmikrosphärenmethode (Kowallik et al., 1991) wurden von mir fluoreszierende Polystyren-Mikrosphären (FluoSpheres<sup>®</sup>, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) mit einem Durchmesser von 10 µm verwendet. Von den seitens der Firma angebotenen 7 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffzubereitungen konnten 5 eingesetzt werden, ohne daß aufwendige Verrechnungen von Spektrenüberlagerungen durchgeführt werden mußten. Unter Einsatz der Farben blau, blaugrün, gelbgrün, orange und crimson war somit die quantitative regionale Mehrfachbestimmung der Durchblutung zu maximal 5 Zeitpunkten möglich. Die Aufarbeitung aller Proben erfolgte in enger Anlehnung an die detailliert beschriebenen Verfahrenstechniken von Dr. med. Ulf Emig, Georg-August-Universität Göttingen, der über langjährige Erfahrungen mit Fluoreszenzmikrosphären verfügt (Emig, 1996).

Vor Applikation wurden die Fluoreszenzmikrosphären zunächst in der vom Hersteller angebotenen Lösung (0,15 molare NaCl-Lösung mit 0,02-0,05 % Tween 20 und 0,02 % Thimerosal) im Ultraschallbad auf Körpertemperatur erwärmt und anschließend mit Hilfe eines Laborschüttlers homogen in der Trägerflüssigkeit verteilt. Dadurch lagen die Mikrosphären zum Injektionszeitpunkt in einer relativen Dichte vor, die der des fetalen Blutes entsprach (1,05 g/ml). Ca. 1,5 Millionen Mikrosphären wurden nach Kontrolle der fetalen Kreislaufparameter in eine sterile Spritze aufgezogen und sofort in etwa 20 Sekunden über den in der V.saphena magna liegenden Katheter in die V. cava posterior injiziert. Zur Gewinnung der Referenzblutprobe wurde bereits 15-25 Sekunden vor deren Applikation mit der Aspiration fetalen Blutes aus dem in der Aorta ascendens liegenden Katheter begonnen. Insgesamt wurden so mittels einer Infusionspumpe (sp200i, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) 6 ml Blut mit einer Rate von 2 ml/min in eine zuvor

heparinisierte 10-ml-Glasspritze (Model 1010 TLL w/slots, Gastight Syringes, Hamilton, Reno, NV, USA) abgezogen. Durch Verwendung der heparinisierten Glasspritze konnte zum einen das Anhaften von Mikrosphären an der Spritzenwandung und zum anderen das Gerinnen des Blutes in der Spritze vor der Umfüllung in das Mazerationsgefäß (Abb. 2) verhindert werden. Das dem Fetus entzogene Blutvolumen wurde durch mütterliches arterielles Blut ersetzt, um einem Volumenmangel vorzubeugen. Kreuzreaktionen aufgrund verschiedener Blutgruppen sind beim Schaf wesentlich seltener als beim Menschen und wurden bei den im Rahmen der Mikrosphärenversuche durchgeführten Transfusionen nicht beobachtet.

Nach Abschluß des Versuches und der Perfusionsfixierung der Gehirne wurden 0,3 bis 2 g schwere Gewebeproben in standardisierter Form aus insgesamt 11 verschiedenen Hirnregionen (Medulla oblongata und Pons, Zerebellum, Mesenzephalon, Thalamus, Hippokampus, Striatum, frontaler, medianer, parietotemporaler, parietookzipitaler sowie okzipitaler Kortex) gewonnen. Diese wurden jeweils der rechten Hemisphäre entnommen, während die linke Hemisphäre histologisch aufgearbeitet wurde. In Vorbereitung auf den nun folgenden, komplizierten Aufarbeitungsprozeß wurden die eingewogenen Proben ebenso wie die Referenzblutproben in spezielle Glasgefäße (Abb. 2) eingebracht, diese mit einer Mazerationslösung aus 4N KOH und 1 % Tween 80 (Sigma-Aldrich Chemicals,



**Abb. 2** Mazerationsgefäß

Deisenhofen, Deutschland) gefüllt und die Einfüllöffnung mit Laborfilm verschlossen. Der Zusatz von Tween verhinderte das Anhaften von Probenteilen an den Wänden der Gefäße.

Vor der Bestückung wurden alle Mazerationsgefäße mit einem speziellen Metallfasersieb (Porengröße 7 µm, Bekipor ST7 AL3, Bekaert Fibre Technologies, Belgien) versehen, das mit Hilfe von Silikonkautschuk (Elastosil E41, Wacker Chemie, München) sicher am Absaugstutzen befestigt werden konnte. Aufgrund der geringen Filterfläche (ca. 0,3 cm<sup>2</sup>) mußte eine ausreichend gründliche Verdauung der Organproben gewährleistet werden, um ein späteres Verstopfen des Filters zu vermeiden. Daher wurden die Glasgefäße zweimal für 4 Stunden auf etwa 50°C in einem Wärmeschrank erhitzt, um den Verdauungsprozeß zu optimieren. Hierbei wurde strengstens darauf geachtet, daß die Temperaturen 60°C nicht überschritten, um einerseits eine ausgeprägte Koagulation von Proteinen zu verhindern und um andererseits die vom Hersteller bis zu dieser Temperatur garantierte Stabilität der Fluoreszenzmikrosphären nicht zu gefährden. Die Gefäße mit den Blutproben wurden aufgrund deren erhöhter Agglutinationsneigung nicht erwärmt.

Nach Abschluß des Mazerationsprozesses wurden die Gefäße so gekippt, daß die Filteröffnung senkrecht nach unten zeigte und die Flüssigkeit mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt werden konnte. Anschließend wurde das Gefäß zweimal mit 70%igem Ethanol gespült, um sicherzugehen, daß keine Sphären an den Wänden hängengeblieben waren. Nach erneutem Absaugen wurden die Gefäße in gleicher Position für etwa 24 Stunden getrocknet. Zur Herauslösung des Farbstoffes aus den nun an der Filterinnenfläche befindlichen Mikrosphären wurden 500 µl o-Xylol (Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland) verwendet, die in den Absaugstutzen pipettiert wurden. Das Auffangen des durch den Filter diffundierenden Xylols erfolgte mittels Glasküvetten (Innendurchmesser 1,0 cm, Abbott Laboratories, NC, USA), die auf die Absaugstutzen geschoben wurden. Nach 60 Minuten wurden 400 µl der Extraktionsflüssigkeit abpipettiert und aufgrund der hohen Flüchtigkeit des Xylols bis zur Messung bei -19°C gelagert.

Die Messungen wurden in einem Fluoreszenzspektrophotometer (LS 50B Luminescence Spectrometer, Perkin Elmer Instruments, Shelton, CT, USA) mit Hilfe spezieller Software (FL WinLab, Perkin Elmer Instruments, Shelton, CT, USA) durchgeführt. Hierfür wurden 150 µl der Extraktionsflüssigkeit in Quarzglas-Küvetten (Ultra-Mikro-Küvetten, Suprasil QS 105.200, Hellma, Müllheim, Deutschland) pipettiert und für alle fünf Farben die

**Tab. 3** Wellenlängen zur Auswertung der Emissionsspektren

Sphärenfarbe	blau	blaugrün	gelbgrün	orange	crimson
Wellenlänge	393 nm	452 nm	512 nm	559,5 nm	641 nm

Emissionsspektren bestimmt. Aus diesen Spektren wurden bei konstanten Wellenlängen die entsprechenden Intensitätswerte abgelesen (Tab. 3). Die vom Hersteller angegebene lineare Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität und Sphärenzahl wurde für einen Bereich bis mindestens 500 Intensitätseinheiten bereits bewiesen (Emig, 1996). Alle Proben, die höhere Emissionswerte zeigten, wurden daher stufenweise verdünnt, um einer etwaigen Eigenhemmung der Fluoreszenz zuvorzukommen.

Mit Hilfe der oben bereits beschriebenen Referenzprobenmethode (1) nach Rudolph und Heymann (1967) konnte bei linearer Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität und Mikrosphärenzahl die spezifische Organdurchblutung unter Ergänzung des Probengewichtes wie folgt berechnet werden:

$$\text{Durchblutung} = \frac{\text{Intensität}_{\text{Gewebe}} \times \text{Referenzfluß}[\text{ml}/\text{min}] \times 100 \times \text{Vf}_{\text{Gewebe}}}{\text{Intensität}_{\text{Referenz}} \times \text{Probengewicht}[\text{g}] \times \text{Vf}_{\text{Referenz}}} \left[ \frac{\text{ml}}{\text{min} \times 100 \text{ g}} \right] \quad (2)$$

*Vf* – Verdünnungsfaktor

Die durchschnittliche Durchblutung des Kortex wurde aus den fünf gemessenen kortikalen Regionen und die durchschnittliche Durchblutung des Hirnstamms aus den Werten von Mesenzephalon, Pons und Medulla berechnet. Die mittlere Durchblutung der subkortikalen Regionen wurden aus den Werten von Thalamus und Striatum ermittelt.

Der zerebrovaskuläre Widerstand wurde wie folgt bestimmt:

$$\text{Gefäßwiderstand} = \frac{\text{mittlerer arterieller Blutdruck} [\text{mmHg}]}{\text{Durchblutung} [\text{ml min}^{-1} 100\text{g}^{-1}]} \quad (3)$$

Der mittlere arterielle Blutdruck wurde hierbei aus dem Blutdruck der letzten zwei Minuten vor Beginn des Versuches berechnet, da dessen Aufzeichnung zum Zeitpunkt der Mikrosphärenapplikation aufgrund der gleichzeitigen Entnahme des Referenzblutes aus dem arteriellen Katheter nicht möglich war.

Im Gegensatz zu den von mir für die Messungen am 111. Trächtigkeitstag verwendeten fluoreszierenden Mikrosphären wurden die zum Vergleich genutzten Hirndurchblutungs-werte des 128. Trächtigkeitstages mittels steriler Polystyren-Farbmikrosphären (Dye-Trak, Triton Technology, San Diego, CA, USA) gewonnen (Roedel, 2002). Sowohl die Farb-mikrosphären als auch die fluoreszierenden Mikrosphären wurden gegenüber radioaktiv markierten Mikrosphären validiert (Walter et al., 1997; Van Oosterhout et al., 1998). Die von mir verwendeten fluoreszierenden Mikrosphären sind darüber hinaus bei Langzeit-experimenten den radioaktiv markierten Mikrosphären überlegen, da bei der Fluoreszenz im Gegensatz zu radioaktiven Isotopen kein Intensitätsabfall zu befürchten ist (Van Oosterhout et al., 1998).

#### **4.4.4.2 Laser-Doppler-Methode**

Um eine kontinuierliche Laser-Doppler-Durchblutungsmessung am sich frei bewegenden, nicht sedierten Feten in utero durchführen zu können, mußten spezielle Vorkehrungen getroffen werden. So wurden die intrakortikalen Lasersonden aufgrund ihrer Anfälligkeit gegenüber Bewegungsartefakten stets mit Kaltpolymerisat auf einem einzelnen Schädel-knochen fixiert, um einerseits wachstumsbedingte Verschiebungen und andererseits eine Dislokation durch fetale Körperbewegungen zu verhindern. Da intrakortikalen Laser-sonden besonders im wachsenden Gehirn Verletzungen und eine Gliose zur Folge haben können, wurden an deren Implantationsstellen histologische Kontrollen angefertigt, um etwaige Schäden dokumentieren zu können. Vor der Datenanalyse wurde das Lasersignal über 1 Sekunde gemittelt, um die Datenmenge zu reduzieren.

Die Versuche mit der Laser-Doppler-Methode gliederten sich zwei Teile:

##### **1. Methodische Voruntersuchungen zur Validierung der Laser-Doppler-Methode**

Da die Laser-Doppler-Durchblutungsmessung als innovative Methode zur Bestimmung relativer Hirndurchblutungsänderungen erstmals beim Feten in utero angewandt wurde,

wurden die Langzeitstabilität des Lasersignals sowie dessen Meßgenauigkeit im Vergleich zur lang etablierten Mikrosphärenmethode untersucht.

a) Nachweis der Langzeitstabilität des Signals intrakortikaler Lasersonden:

Um die Langzeitstabilität des Lasersignals validieren zu können, wurde bei insgesamt 12 Tieren aus beiden Gestationsaltern mit dessen Aufzeichnung bereits  $11 \pm 2$  Stunden nach der chirurgischen Instrumentierung der Feten begonnen und diese in den folgenden fünf Tagen bis zum Experiment fortgesetzt.

b) Validierung der Laser-Doppler-Durchblutungsmessung gegenüber der Mikrosphärenmethode:

Hierzu wurde bei 8 Tieren mittels einer durch maternale, intratracheale CO<sub>2</sub>-Insufflation induzierten Hyperkapnie die Hirndurchblutung erhöht und die durch die intrakortikalen Lasersonden gemessenen Durchblutungsänderungen mit den gleichzeitig durch die Mikrosphärenmethode gewonnenen Ergebnissen verglichen. Die Messung mit dem Laser fand hierbei im rechten parietalen Kortex statt, aus dem auch die Probe für die Mikrosphärenmessung nach Ende des Experimentes entnommen wurde. Ferner wurden die mittels des Lasers bestimmten relativen Änderungen der Hirndurchblutung mit den absoluten und relativen p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub>-Werten korreliert, zu deren Bestimmung vor und während der Hyperkapnie eine Blutgasmessung durchgeführt wurde.

2. Bestimmung der Grenzen der zerebralen Autoregulation in unterschiedlichen Gestationsaltern und deren Beeinflussung durch eine pränatale Glukokortikoidtherapie

Die Untersuchungen in diesem Versuchsteil fanden an 7 Tieren des 111. Trächtigkeitstages und 7 Tieren des 128. Trächtigkeitstages statt. Bei den jüngeren Tieren wurde der Autoregulationsversuch 24 Stunden nach Beginn der Betamethasoninfusion wiederholt, um Glukokortikoideffekte auf die zerebrale Autoregulation eruieren zu können.

Um die Grenzen der zerebralen Autoregulation beim Feten bestimmen zu können, wurden medikamentös Blutdruckänderungen induziert und die fetale Hirndurchblutung mit Hilfe des Laser-Doppler-Monitors kontinuierlich aufgezeichnet. Hierzu erfolgte eine schrittweise Infusion von Natriumnitroprussid (10 µg/ml Trägerlösung, Infusionsrate 0,2-0,8 ml/min) bzw. von Phenylephrin (25 µg/ml Trägerlösung, Infusionsrate 0,2-0,5 ml/min) über den in der V. cava anterior plazierten Katheter unter Verwendung einer Präzisionsinfusionspumpe

(sp200i, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland). Traten unter dem begleitenden EKG-Monitoring nach Steigerung der Infusionsraten stärkere Arrhythmien auf, wurde der Versuch beendet. Alle Autoregulationsversuche begannen stets mit der Blutdrucksenkung mittels Natriumnitroprussid, da dessen Wirkung unmittelbar nach Infusionsende abklang. Nach mindestens 15 Minuten Pause und Normalisierung der fetalen Kreislaufparameter wurde der Versuch unter Anwendung von Phenylephrin fortgesetzt. Zur Ermittlung der Ausgangswerte wurden jeweils vor der Infusion für 5 Minuten die obengenannten Signale unter Normalbedingungen aufgezeichnet.

Im Gegensatz zur Blutdruckanalyse, wo der Blutdruck jeweils über eine Minute gemittelt wurde, erfolgte die Auswertung des Blutdrucks während des Autoregulationsversuchs in Form von Sekundenmittelwerten. Im Anschluß an die Signalverarbeitung wurden Blutdruck und Laserdaten in Form von Wertepaaren in eine eigens zu diesem Zweck programmierte EXCEL-Maske übernommen. Die während der einzelnen Infusionsstufen gemessenen absoluten Blutdruckwerte wurden zunächst in Ränge im Abstand von jeweils  $2,5 \pm 1,25$  mmHg aufgeteilt. Aus den dazugehörigen Laserdaten wurde für jeden Rang ein Mittelwert berechnet. Somit konnte jedem Blutdruckwert unabhängig vom zeitlichen Verlauf des Autoregulationsversuchs ein Hirndurchblutungswert zugeordnet und dadurch der interindividuelle Vergleich der Ergebnisse erleichtert werden.

Als Autoregulationsgrenzen für die Gesamtkurve jeder Gruppe wurden diejenigen Blutdruckwerte betrachtet, nach denen sich die fetale Hirndurchblutung ausgehend vom Ruheblutdruck erstmals signifikant änderte. Die zur Berechnung des Mittelwertes für jede Gruppe notwendigen Einzelgrenzen wurden grafisch ermittelt. Hierbei wurden diejenigen Blutdruckwerte als Autoregulationsgrenzen festgelegt, nach denen ein stetiger Abfall der Hirndurchblutung von mehr als 10 Prozent beobachtet wurde.

Im Rahmen des Autoregulationsversuches konnten somit unter Einsatz der obengenannten Medikamente der mittlere arterielle Blutdruck der Feten schrittweise erhöht bzw. gesenkt, die dabei auftretenden Änderungen des zerebralen Blutflusses im Kortex mittels der intrakortikalen Lasersonden dokumentiert und die Grenzen der zerebralen Autoregulation in Abhängigkeit vom Gestationsalter sowie vor und 24 Stunden nach Beginn einer Betamethasonbehandlung am 111. Trächtigkeitstag bestimmt werden.

#### 4.4.4.3 Hyperkapnie

Um einerseits den Einfluß von Betamethason auf eine gesteigerte Hirndurchblutung untersuchen und andererseits Mikrosphären- und Lasermethode miteinander vergleichen zu können, wurde unmittelbar vor und 24 Stunden nach Infusionsbeginn eine Hyperkapnie induziert, die zur zerebralen Vasodilatation und damit zur Steigerung der Hirndurchblutung führte. Die Erhöhung des arteriellen  $p\text{CO}_2$  wurde durch Insufflation von ca. 13 l  $\text{CO}_2/\text{min}$  über den intratrachealen Katheter des Muttertieres erreicht. Unter wiederholten Blutgaskontrollen wurde die  $\text{CO}_2$ -Zufuhr angepaßt, bis  $p_a\text{CO}_2$ -Werte von 70-90 mmHg gemessen wurden. Unter fortlaufender Insufflation wurden sofort nach Erreichen dieser Werte die Mikrosphären appliziert und daraufhin der Hyperkapnieversuch beendet. Das Lasersignal wurde im Gegensatz dazu während des gesamten Versuchs aufgezeichnet.

Die mit beiden Methoden gemessenen Hirndurchblutungsänderungen wurden sowohl untereinander als auch mit den erreichten  $p_a\text{CO}_2$ -Änderungen korreliert. Die dafür verwendeten  $\text{CO}_2$ -Werte wurden berechnet, indem die unmittelbar vor und nach der Mikrosphärenapplikation gemessenen Blutgase gemittelt wurden.

#### 4.5 Statistische Auswertung

Da die Stichprobenumfänge zur Prüfung der Normalverteilung zu klein waren, wurden zur Untersuchung auf statistische Signifikanz nichtparametrische Tests verwendet. Der Nachweis von Signifikanzen innerhalb einer Gruppe wurde mittels des Wilcoxon-Tests geführt. Der Vergleich auf Mittelwertsunterschiede zwischen den einzelnen Behandlungs- und Altersgruppen erfolgte mit dem U-Test von Mann & Whitney. Um die Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu gewährleisten und das Ausmaß des linearen Zusammenhangs zwischen 2 Meßwerten besser einschätzen zu können, wurde zum Beweis von Korrelationen zwischen den Ergebnissen der Lasermethode, der Mikrosphärenmethode und den Änderungen des arteriellen  $\text{CO}_2$ -Partialdruckes während der Hyperkapnie der Maßkorrelationskoeffizient nach Pearson ( $r$ ) verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant betrachtet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes ( $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ) angegeben.

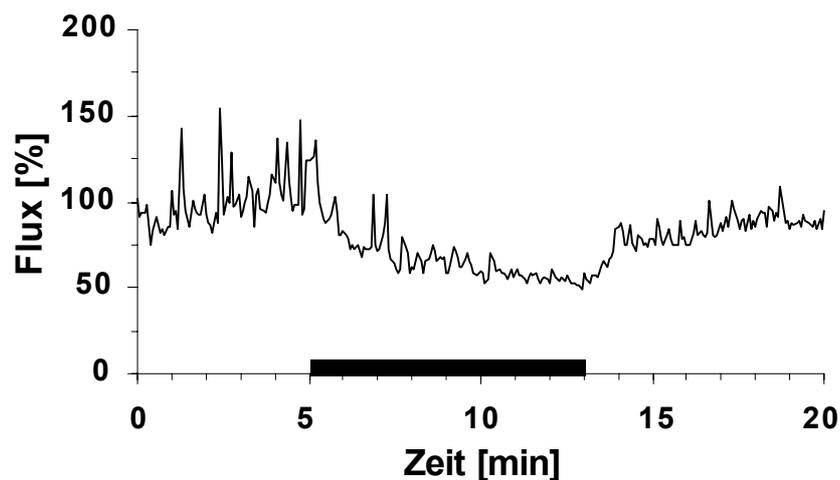
## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Methodische Voruntersuchungen zur Laser-Doppler-Methode

Das Grundrauschen bei nicht vorhandenem Blutfluß führt bei der Laser-Doppler-Durchblutungsmessung zu einem sogenannten „biological zero“, welches etwas über dem „electrical zero“ des Laser-Doppler-Messgerätes liegt. Eigene Vorversuche haben gezeigt, daß das „biological zero“ im Fall unserer Arbeitsgruppe etwa  $2,4 \pm 0,4$  % des Meßwertes beträgt. Dieser Wert wurde bei der Berechnung aller relativen Änderungen des zerebralen Blutflusses berücksichtigt.

Die bei der Verwendung intrakortikaler Lasersonden häufiger auftretenden Bewegungsartefakte konnten aufgrund ihrer charakteristischen, spitzen Form leicht erkannt und bei der anschließenden Datenauswertung manuell entfernt werden (Abb. 3).

Da der Laser von unserer Arbeitsgruppe erstmals zur Hirndurchblutungsmessung am chronisch instrumentierten Feten in utero angewandt wurde, waren weitere vorbereitende Untersuchungen notwendig, um einerseits die Langzeitstabilität des Lasersignals nachweisen und andererseits die Vergleichbarkeit zur Mikrosphärenmethode evaluieren zu können.



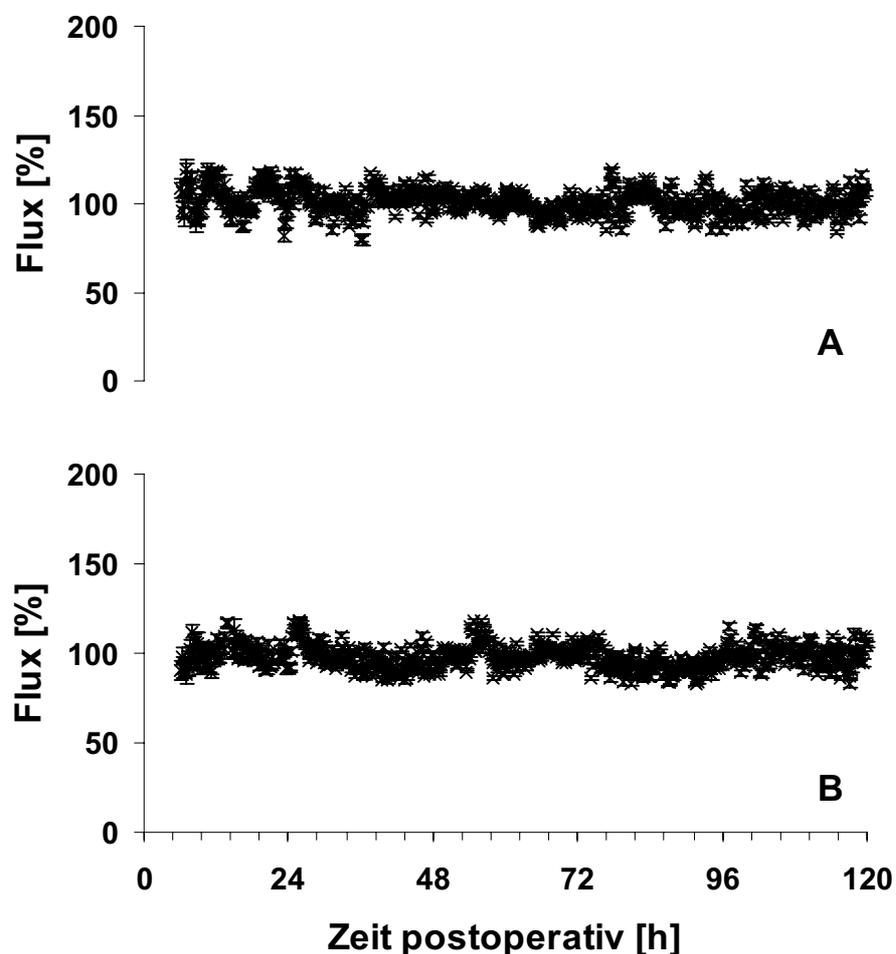
**Abb. 3** Repräsentatives Lasersignal mit Artefakten während einer medikamentös induzierten Blutdrucksenkung (schwarzer Balken) im Rahmen des Autoregulationsversuches.

Die Artefakte sind aufgrund ihrer spitzen Form leicht zu erkennen.

### 5.1.1 Langzeitstabilität des Lasersignals

Das Langzeitmonitoring der Hirndurchblutung mittels der Laser-Doppler-Durchblutungsmessung erbrachte unmittelbar nach der Operation stabile Signale bei allen zu diesem Zweck instrumentierten Feten (Abb. 4).

Während des postoperativen Beobachtungszeitraumes von insgesamt 120 Stunden betrug die Varianz des Lasersignals nicht mehr als 20 Prozent des Mittelwertes. Die Laser-Doppler-Durchblutungsmessung erbrachte somit eine ausreichende Langzeitstabilität als Voraussetzung für die Bestimmung akuter Änderungen der fetalen Hirndurchblutung.



**Abb. 4** Langzeitmonitoring der Hirndurchblutung im rechten parietalen Kortex des Fetus mittels intrakortikaler Lasersonden ab dem 106. Trächtigkeitstag (A) bzw. 120. Trächtigkeitstag (B).

MW±SEM; n=5 am 106. Trächtigkeitstag, n=7 am 120. Trächtigkeitstag. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus 10 Sekunden.

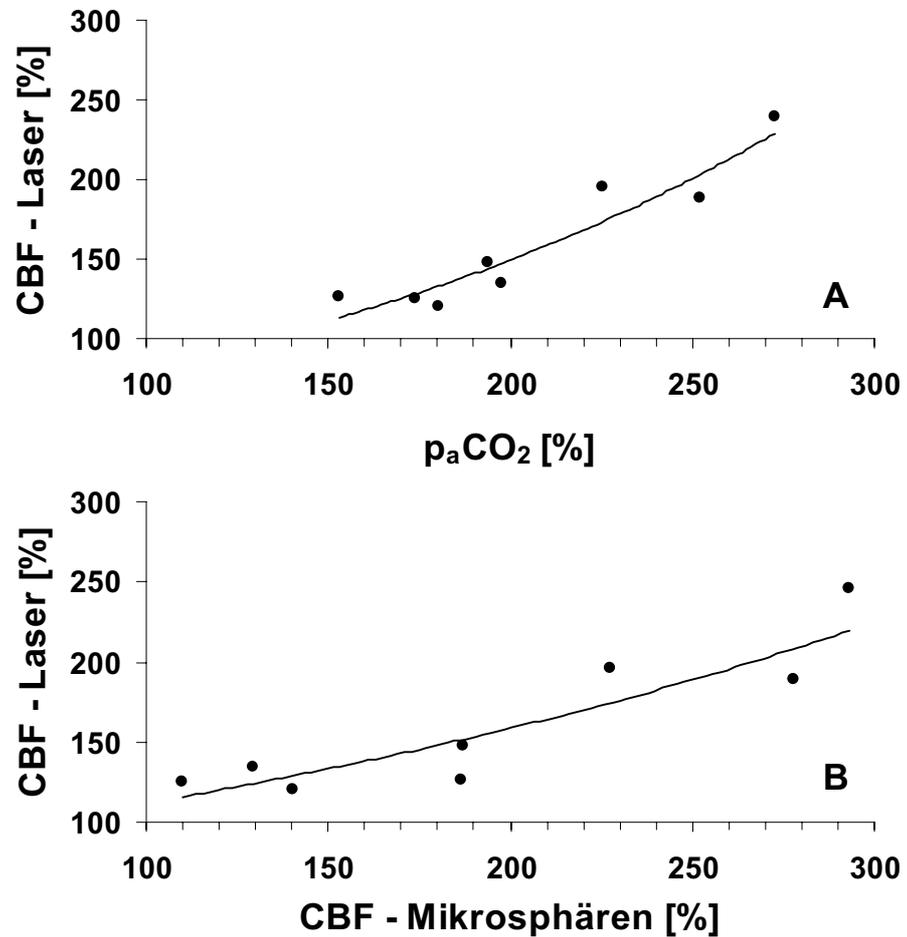
### 5.1.2 Vergleich von Laser-Doppler- und Mikrosphärenmethode

Um die Vergleichbarkeit dieser beiden zur Hirndurchblutungsmessung angewandten Methoden zu untersuchen, wurde bei 8 Versuchstieren durch maternale, intratracheale CO<sub>2</sub>-Insufflation eine Hyperkapnie induziert, aus der eine Erhöhung des fetalen arteriellen pCO<sub>2</sub> um 106 % von 42 ± 1 mmHg auf 85 ± 3 mmHg resultierte (p<0,05). Ferner wurde mit beiden Methoden vor und während der Hyperkapnie die Hirndurchblutung gemessen, um die durch die Vasodilatation der Hirngefäße induzierten akuten Änderungen der fetalen Hirndurchblutung vergleichend erfassen zu können. Die Laser-Doppler-Durchblutungsmessung mittels intrakortikaler Lasersonden erbrachte einen Anstieg der Hirndurchblutung auf 169 ± 17 % des Ausgangswertes (p<0,05), während sich mit der Mikrosphärenmethode eine Erhöhung von 77 ± 12 ml min<sup>-1</sup> (100 g)<sup>-1</sup> auf 134 ± 12 ml min<sup>-1</sup> (100 g)<sup>-1</sup> und somit auf 194 ± 24 % des Ausgangswertes feststellen ließ (p<0,05).

Der mittels der Laser-Doppler-Durchblutungsmessung gefundene Anstieg der Hirndurchblutung korrelierte sowohl mit den absoluten p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub>-Werten der Feten unter Hyperkapnie (r=0,90, p<0,05) als auch mit den relativen Erhöhungen der p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub>-Werte im Vergleich zum Ausgangswert (r=0,94, p<0,01; Abb. 5 A) gut.

Im Vergleich zwischen dem mit der Laser-Doppler-Durchblutungsmessung und dem mit Hilfe der fluoreszierenden Mikrosphären in derselben Region der rechten Hemisphäre bestimmten Anstieg der Hirndurchblutung ergaben sich ebenfalls signifikante Korrelationen (r=0,90, p<0,01; Abb. 5 B).

Aus der vergleichenden Betrachtung beider Methoden wurde deutlich, daß die gemessenen akuten Änderungen der Hirndurchblutung bei der Mikrosphärenmethode offenbar ausgeprägter ausfielen als bei Anwendung der Laser-Doppler-Durchblutungsmessung. Signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider Methoden waren jedoch nicht feststellbar, vielmehr sprach die gute Korrelation für die Vergleichbarkeit von Mikrosphären- und Laser-Doppler-Methode.



**Abb. 5** Korrelation der aus der Laser-Doppler-Durchblutungsmessung bestimmten Hirndurchblutung (CBF - Laser) mit dem arteriellen pCO<sub>2</sub> (p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub>, A) bzw. der mittels fluoreszierender Mikrosphären gemessenen Hirndurchblutung (CBF - Mikrosphären, B) während einer hyperkapnie-induzierten Vasodilatation im parietalen Kortex.

Es werden die relativen Änderungen während der Hyperkapnie bezogen auf den jeweiligen Ausgangswert (100 %) dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier. Bild A: n=8, r=0,94, p<0,01; Bild B: n=8, r=0,90, p<0,01.

## 5.2 Physiologische Variablen

Während des Beobachtungszeitraumes befanden sich alle von mir untersuchten Tiere in einem guten Allgemeinzustand. Weder klinisch noch elektromyographisch konnten Zeichen der Einleitung einer spontanen Geburt nachgewiesen werden. Hinsichtlich des fetalen Gewichtes waren zum Zeitpunkt der Sektion keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe ( $1,9 \pm 0,14$  kg) und der mit Betamethason behandelten Gruppe ( $1,7 \pm 0,37$  kg) festzustellen. Auch das Gestationsalter war in beiden Gruppen gleich ( $112 \pm 0,4$  Tage bei den Kontrolltieren versus  $111 \pm 0,8$  Tage bei den behandelten Tieren).

Die arteriellen Blutgase sowie der pH-Wert blieben während des gesamten Experimentes konstant. Zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe fanden sich keine Unterschiede (Tab. 4). Auf eine erneute Darstellung der physiologischen Variablen der von mir zum Vergleich verwandten Tiere des 128. Trächtigkeitstages, die sich ebenfalls im Normbereich befanden, möchte ich an dieser Stelle unter Verweis auf die dahingehend bereits veröffentlichten Daten verzichten (Roedel, 2002).

**Tab. 4** Physiologische Variablen vor, 24h und 48h nach Beginn der Kontroll- bzw. Betamethasoninfusion.

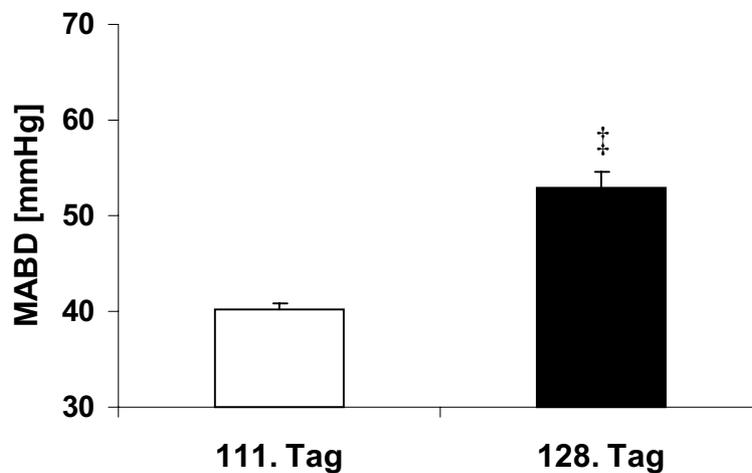
		pH	p <sub>a</sub> CO <sub>2</sub> [mmHg]	p <sub>a</sub> O <sub>2</sub> [mmHg]
Kontrolltiere	Ausgangswert	$7,32 \pm 0,02$	$42,0 \pm 2,4$	$24,9 \pm 2,5$
	24h Infusion	$7,34 \pm 0,02$	$44,1 \pm 2,7$	$26,6 \pm 2,6$
	48h Infusion	$7,32 \pm 0,02$	$43,1 \pm 3,2$	$24,6 \pm 1,5$
behandelte Tiere	Ausgangswert	$7,33 \pm 0,03$	$41,7 \pm 1,7$	$24,6 \pm 1,1$
	24h Infusion	$7,32 \pm 0,03$	$43,7 \pm 1,3$	$26,4 \pm 2,0$
	48h Infusion	$7,36 \pm 0,02$	$44,9 \pm 1,0$	$25,0 \pm 2,1$

MW  $\pm$  SEM; n=7 in der Kontrollgruppe, n=8 in der behandelten Gruppe.

### 5.3 Der Einfluß des Gestationsalters und einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf den fetalen Blutdruck

#### 5.3.1 Der Einfluß des Gestationsalters auf den fetalen Blutdruck

Im Vergleich beider Altersgruppen stieg der mittlere arterielle Blutdruck der Feten (MABD) von  $40 \pm 0,6$  mmHg am 111. Trächtigkeitstag auf  $53 \pm 1,7$  mmHg am 128. Trächtigkeitstag an ( $p < 0,01$ ; Abb. 6). Somit erfolgte in diesem Zeitraum eine altersbedingte Erhöhung des fetalen Blutdruckes um 32 Prozent.



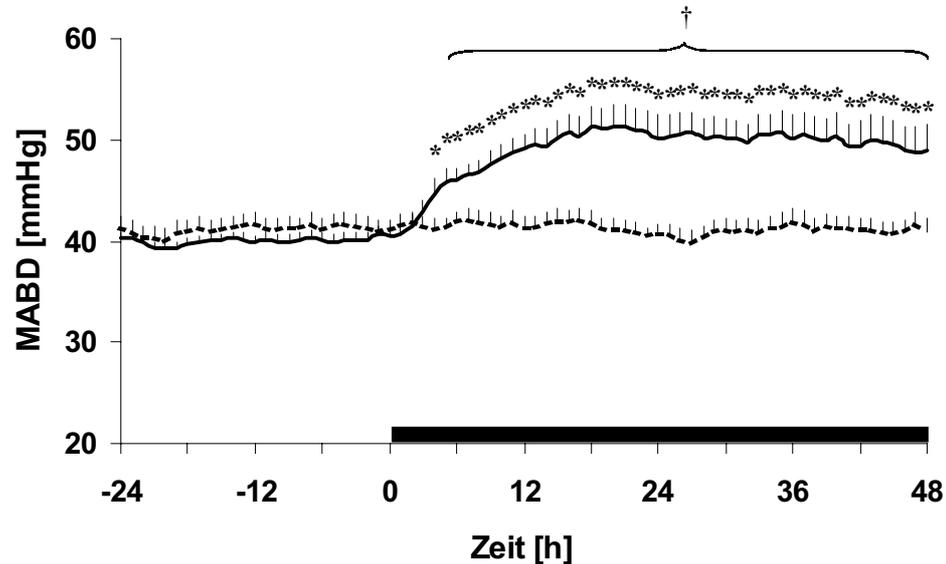
**Abb. 6** Fetaler mittlerer arterieller Blutdruck (MABD) am 111. und 128. Trächtigkeitstag.

MW+SEM; n=8 in jeder Gruppe; † $p < 0,01$  im Vergleich beider Gruppen.

#### 5.3.2 Glukokortikoideffekte auf den fetalen Blutdruck am 111. Trächtigkeitstag

Vor Beginn der Infusionsphase war der fetale mittlere arterielle Blutdruck (MABD) zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe nicht unterschiedlich (Abb. 7). Unter Kontrollinfusion konnten keine signifikanten Änderungen des MABD festgestellt werden ( $41 \pm 1,2$  mmHg vor bzw.  $41 \pm 1,1$  mmHg nach Infusionsbeginn). Dagegen kam es unter Betamethasoninfusion innerhalb von 4 h zu einem signifikanten Anstieg des MABD von  $40 \pm 0,6$  mmHg auf  $45 \pm 1,6$  mmHg ( $p < 0,01$ ), wobei das Maximum nach 20 h mit  $51 \pm 2,0$  mmHg erreicht wurde (Abb. 7). Nach seinem Anstieg betrug der MABD während der Infusionsphase im Durchschnitt  $50 \pm 1,7$  mmHg und war somit im Vergleich zu seinem Ausgangswert um 20 Prozent angestiegen.

Auch im Vergleich zu den Kontrolltieren fand sich ein signifikanter Blutdruckanstieg ab 5 Stunden nach Infusionsbeginn ( $p < 0,05$ ; Abb. 7).

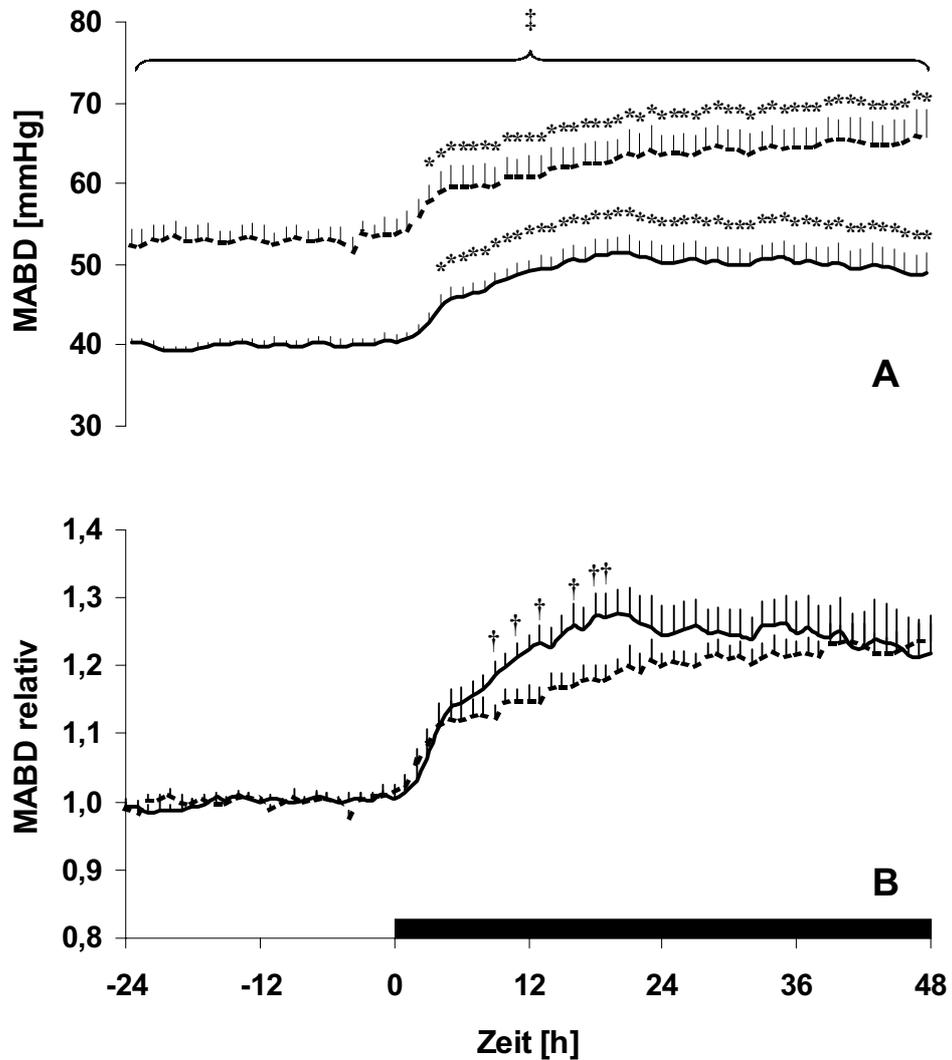


**Abb. 7** Mittlerer fetaler arterieller Blutdruck (MABD) bei Kontrollbehandlung (---) und Betamethasonbehandlung (—) vor und während der Infusionsphase (schwarzer Balken), 111.-113. Trächtigkeitstag.

MW+SEM; n=7 bei Kontrollen, n=8 bei Betamethasonbehandlung; \* $p < 0,01$  im Vergleich zum Ausgangswert; † $p < 0,05$  im Vergleich beider Gruppen.

### 5.3.3 Vergleich der Glukokortikoideffekte auf den fetalen Blutdruck am 111. und 128. Trächtigkeitstag

Im Vergleich zum 128. Trächtigkeitstag waren die Blutdruckwerte am 111. Trächtigkeitstag während des gesamten Versuches signifikant niedriger ( $p < 0,01$ ; Abb. 8 A). Läßt man den altersbedingten Blutdruckanstieg außer acht, so kann im relativen Vergleich beider Gruppen nachgewiesen werden, daß der Therapieeffekt auf den MABD bei den jüngeren Tieren in den ersten 24 Stunden etwas ausgeprägter war. Signifikante Unterschiede zeigten sich in einem Bereich zwischen 9 und 20 Stunden nach Infusionsbeginn, in dem der Blutdruck der jüngeren Feten unter der Behandlung bis zu 9 Prozent mehr anstieg als bei den älteren Feten ( $p < 0,05$ ; Abb. 8 B).



**Abb. 8** Mittlerer fetaler arterieller Blutdruck (MABD) absolut (A) und relativ (B) vor und während der Infusionsphase (schwarzer Balken) bei Betamethasonbehandlung, 111.-113. Trächtigkeitstag (—) und 128.-130. Trächtigkeitstag (---).

MW+SEM; n=8 am 111.-113. Trächtigkeitstag, n=8 am 128.-130. Trächtigkeitstag; \*p<0,01 im Vergleich zu den Ausgangswerten; †p<0,01 und ‡p<0,05 im Vergleich beider Gruppen.

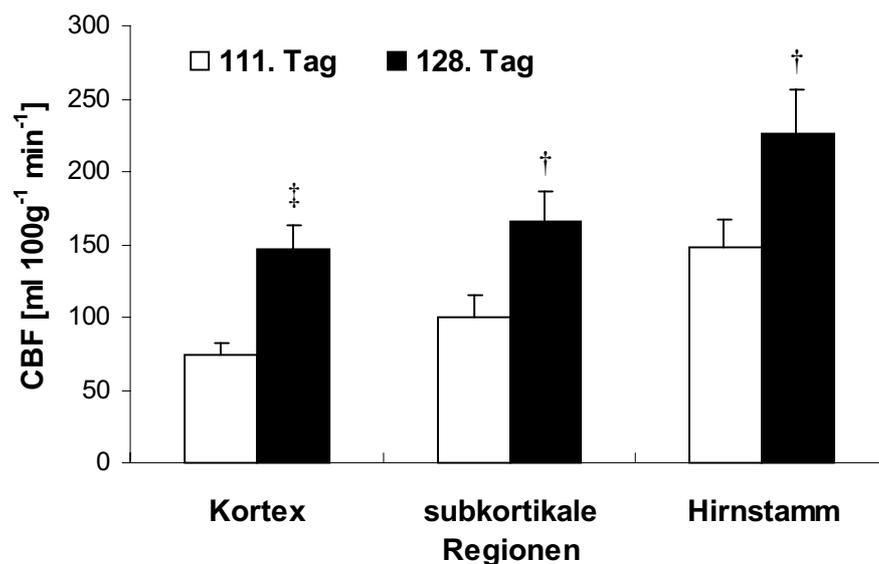
## 5.4 Der Einfluß des Gestationsalters und einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf die fetale Hirndurchblutung und den zerebrovaskulären Widerstand

### 5.4.1 Der Einfluß des Gestationsalters auf die fetale Hirndurchblutung und den zerebrovaskulären Widerstand

Am 111. Trächtigkeitstag zeigte sich in den untersuchten Hirnregionen bereits die für das adulte Gehirn typische Verteilung der Hirndurchblutung. So war die Durchblutung im Hirnstamm um 47 % höher als in den subkortikalen Regionen und um 102 % höher als in den kortikalen Regionen ( $p < 0,05$ ; Abb. 9; Signifikanzen nicht dargestellt).

Durch den Vergleich der von mir erhobenen Daten für den 111. Trächtigkeitstag mit bereits veröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe für den 128. Trächtigkeitstag (Roedel, 2002) war es möglich, die ontogenetische Entwicklung der Hirndurchblutung und des zerebrovaskulären Widerstandes darzustellen.

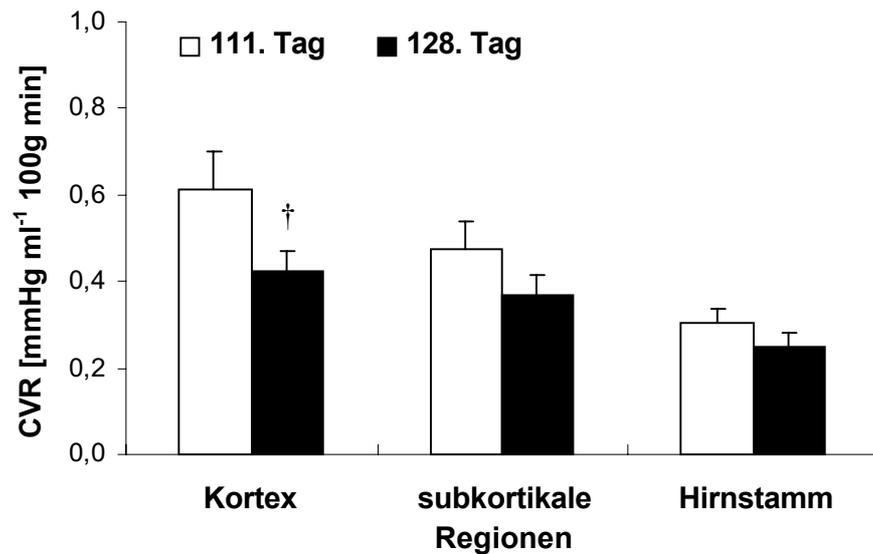
Mit wachsendem Gestationsalter fand sich eine Zunahme der fetalen Hirndurchblutung in allen untersuchten Hirnarealen. So stieg die Hirndurchblutung zwischen dem 111. und 128. Trächtigkeitstag im Kortex um 99 % ( $p < 0,01$ ), in den subkortikalen Regionen um 65 % und im Hirnstamm um 53 % an ( $p < 0,05$ ; Abb. 9).



**Abb. 9** Änderung der regionalen Hirndurchblutung (CBF) mit dem Gestationsalter.

MW+SEM; n=8 in beiden Gruppen; ‡ $p < 0,01$ , † $p < 0,05$  im Vergleich beider Gruppen.

Korrespondierend zum Anstieg der Hirndurchblutung fand sich zwischen dem 111. und 128. Trächtigkeitstag ein Abfall des zerebrovaskulären Widerstandes im Kortex um 31 % ( $p < 0,05$ ; Abb.10). In den subkortikalen Regionen und im Hirnstamm waren die Mittelwerte des zerebrovaskulären Widerstandes ebenfalls rückläufig.



**Abb. 10** Änderung des zerebrovaskulären Widerstandes (CVR) mit dem Gestationsalter.

MW+SEM; n=8 in beiden Gruppen; † $p < 0,05$  im Vergleich beider Gruppen.

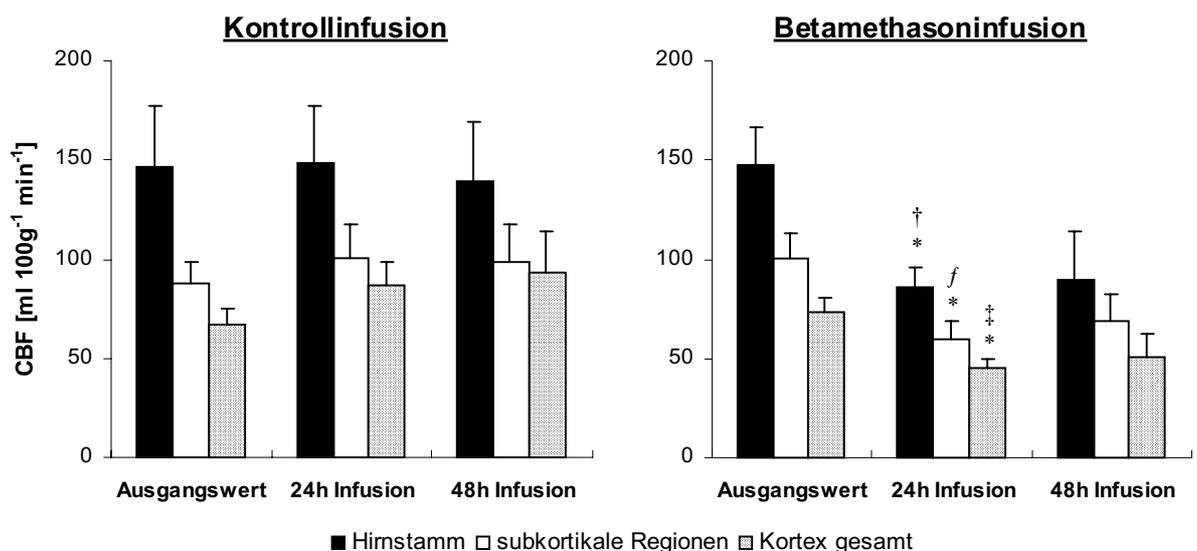
Damit wird deutlich, daß die ontogenetischen Unterschiede im Kortex besonders ausgeprägt waren, in dem sich nicht nur die Hirndurchblutung, sondern auch der zerebrovaskuläre Widerstand signifikant zwischen beiden Altersgruppen unterschied.

### 5.4.2 Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirndurchblutung am 111. Trächtigkeitstag

Die fetale Hirndurchblutung zeigte sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der behandelten Gruppe die für das adulte Gehirn typische Verteilung auf die einzelnen Hirnregionen mit der größten Durchblutung im Hirnstamm. So war die zerebrale Durchblutung des Hirnstammes im Durchschnitt beider Gruppen ca. 53 % höher als in den subkortikalen Regionen und ca. 105 % höher als in den kortikalen Regionen. Im Vergleich zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe fanden sich bei den Ausgangswerten keine signifikanten Unterschiede.

Bei den Kontrolltieren blieb die regionale Hirndurchblutung während der Infusionsphase gleich (Abb. 11).

Unter Betamethasonbehandlung kam es dagegen innerhalb von 24 Stunden zu einer ausgeprägten Reduktion der Hirndurchblutung in den getesteten Hirnarealen. Dabei sank die Hirndurchblutung im Hirnstamm um 38 %, in den subkortikalen Regionen um 39 % und im Kortex um 38 % im Verhältnis zum Ausgangswert vor Infusionsbeginn ab ( $p < 0,05$ ; Abb. 11).

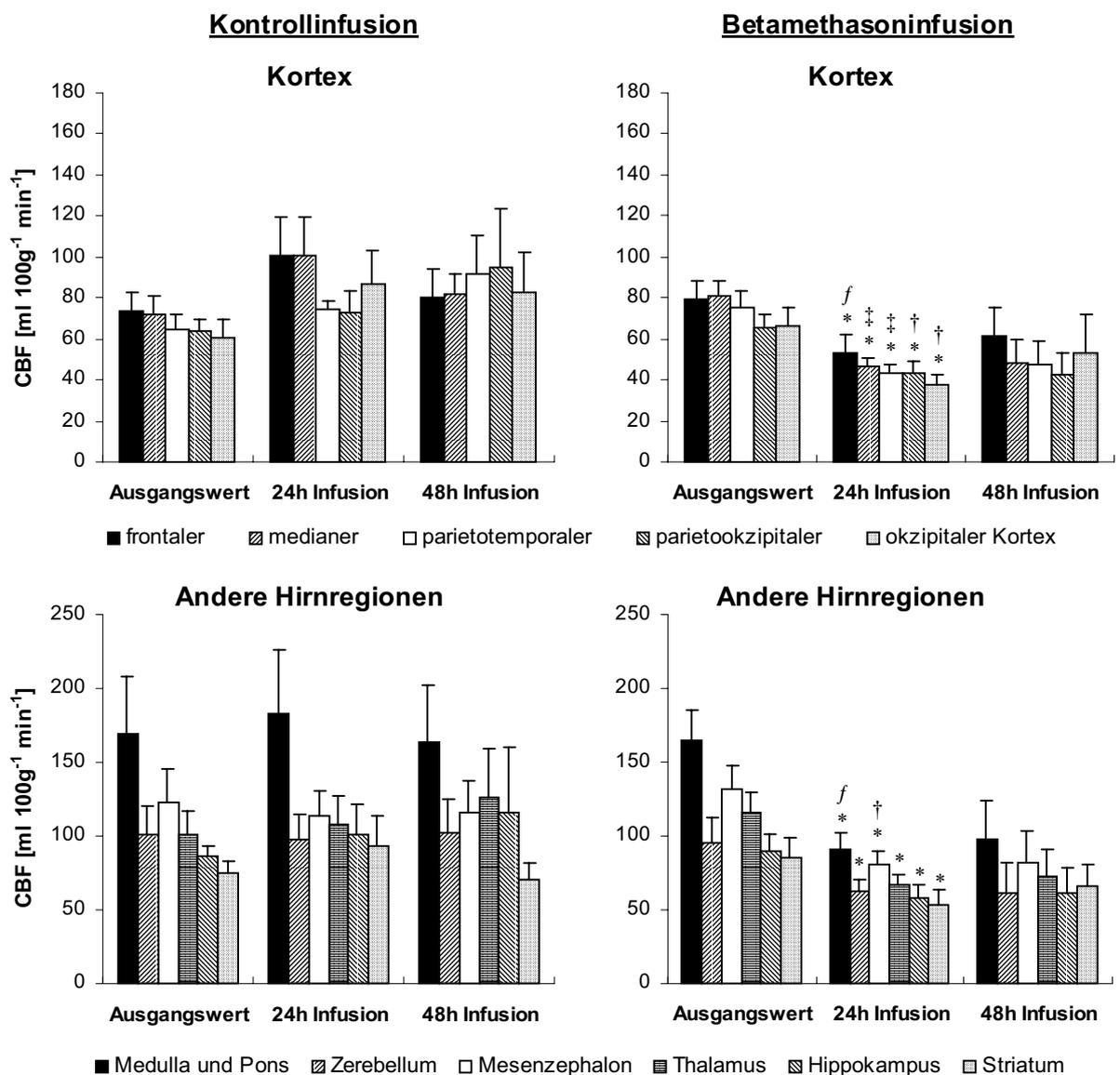


**Abb. 11** Änderungen der regionalen Hirndurchblutung (CBF) während einer pränatalen Betamethasonbehandlung vom 111.-113. Trächtigkeitstag im Überblick.

MW+SEM; n=7 in der Kontrollgruppe; n=8 in der behandelten Gruppe; \* $p < 0,05$  im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Infusionsbeginn; ‡ $p < 0,01$ , † $p < 0,05$ , † $p < 0,07$  im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Auch im Vergleich zu den Kontrolltieren konnte für den Hirnstamm ( $p < 0,05$ ) sowie für den Kortex ( $p < 0,01$ ) eine signifikante Senkung der Hirndurchblutung nach 24 Stunden Betamethasoninfusion festgestellt werden, bei den subkortikalen Regionen wurden die Signifikanzgrenzen knapp verfehlt ( $p < 0,07$ ; Abb. 11).

Die Reduktion der Hirndurchblutung blieb auch nach 48 Stunden Betamethasoninfusion bestehen und betrug im Hirnstamm 33 %, in den subkortikalen Regionen 32 % und im Kortex 37 %, erreichte zu diesem Zeitpunkt jedoch keine statistische Signifikanz mehr.



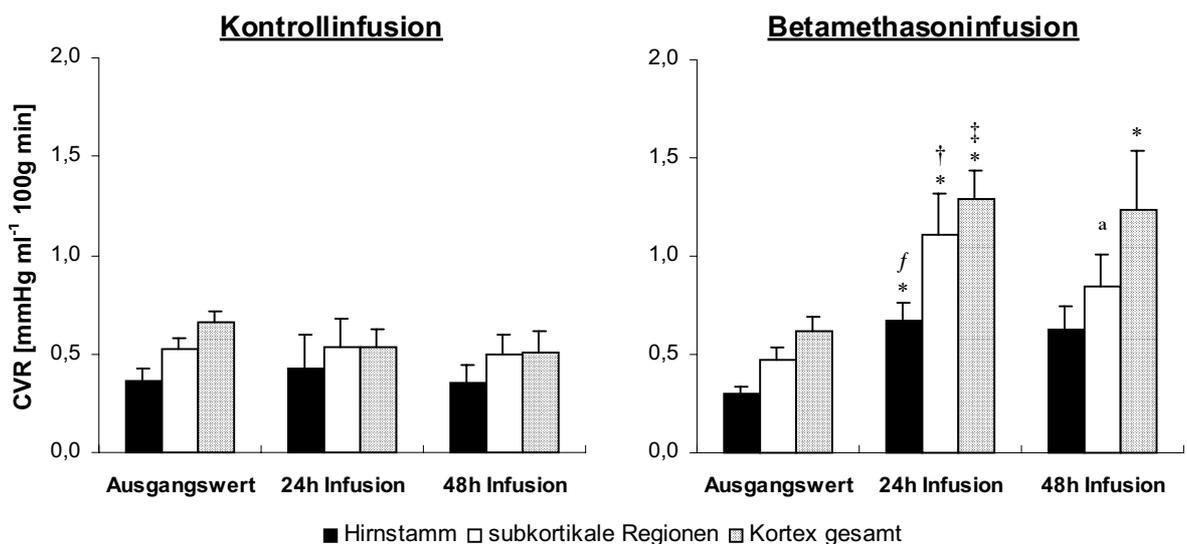
**Abb. 12** Änderungen der regionalen Hirndurchblutung (CBF) während einer pränatalen Betamethasonbehandlung vom 111.-113.Trächtigkeitstag, geordnet nach einzelnen Hirnregionen.

MW+SEM; n=7 in der Kontrollgruppe; n=8 in der behandelten Gruppe; \* $p < 0,05$  im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Infusionsbeginn; † $p < 0,01$ , ‡ $p < 0,05$ , § $p < 0,07$  im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Bei der Auswertung der einzelnen Hirnregionen zeigte sich der bereits im Überblick dargestellte Abfall der fetalen Hirndurchblutung nach 24 Stunden Betamethasoninfusion in allen Regionen ( $p < 0,05$ ; Abb. 12). Im Vergleich zu den Kontrolltieren konnten vor allem in den einzelnen Kortexprouben mit Ausnahme des frontalen Kortex ( $p < 0,07$ ) signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (medianer und parietotemporaler Kortex  $p < 0,01$ ; parietookzipitaler und okzipitaler Kortex  $p < 0,05$ ; Abb. 12). In den extrakortikalen Hirnregionen sank die Hirndurchblutung im Vergleich zu den Kontrolltieren zwar ebenfalls, jedoch blieb diese Reduktion mit Ausnahme des Mesenzephalons ( $p < 0,05$ ) unter dem Signifikanzniveau von 0,05. Nach 48 Stunden Betamethasoninfusion konnten trotz anhaltend erniedrigter Mittelwerte in den einzelnen Hirnregionen keine signifikanten Unterschiede mehr nachgewiesen werden.

#### 5.4.3 Glukokortikoideffekte auf den zerebrovaskulären Widerstand am 111. Trächtigkeitstag

Bei den Ausgangswerten war der zerebrovaskuläre Widerstand im Durchschnitt beider Gruppen im Hirnstamm um 34 % niedriger als in den subkortikalen und um 49 % niedriger als in den kortikalen Regionen. Signifikante Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den mit Betamethason behandelten Tieren bestanden vor Beginn der Infusionsphase nicht.



**Abb. 13** Änderungen des zerebrovaskulären Widerstandes (CVR) während einer pränatalen Betamethasonbehandlung vom 111.-113. Trächtigkeitstag im Überblick.

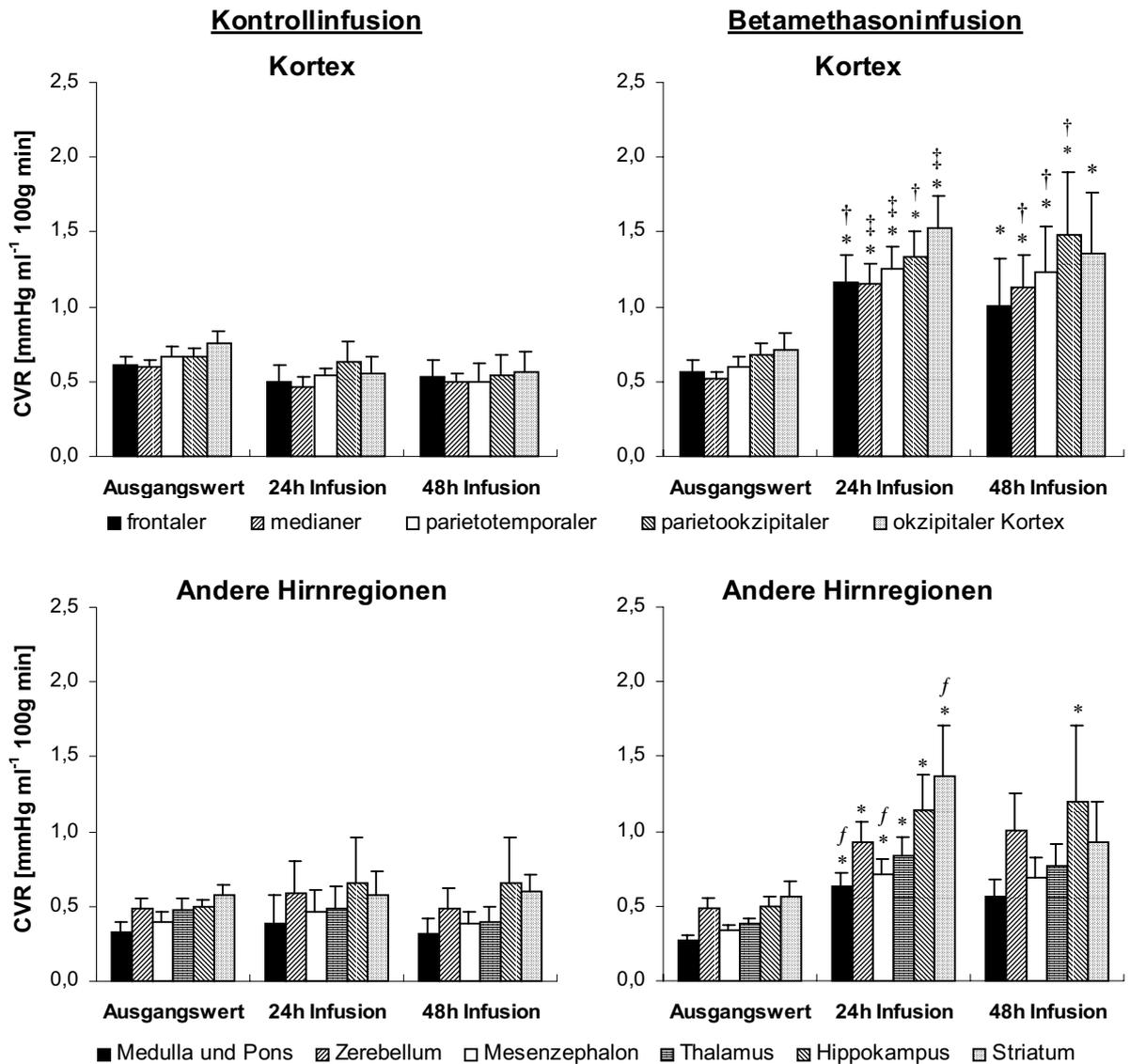
MW+SEM; n=7 in der Kontrollgruppe; n=8 in der behandelten Gruppe; \* $p < 0,05$ , <sup>a</sup> $p < 0,07$  im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Infusionsbeginn; <sup>†</sup> $p < 0,01$ , <sup>†</sup> $p < 0,05$ , <sup>f</sup> $p < 0,07$  im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Bei den Kontrolltieren waren keine Veränderungen des zerebrovaskulären Widerstandes während der Infusionsphase festzustellen (Abb. 13).

Nach 24 Stunden Betamethasoninfusion kam es dagegen zu einer signifikanten Erhöhung des zerebrovaskulären Widerstandes in den getesteten Hirnarealen. Hierbei stieg der zerebrovaskuläre Widerstand im Hirnstamm um 125 %, in den subkortikalen Regionen um 129 % und im Kortex um 111 % und hatte sich somit im Vergleich zu seinem Ausgangswert mehr als verdoppelt ( $p < 0,05$ ; Abb. 13). Auch im Vergleich zu den Kontrolltieren konnte mit Ausnahme des Hirnstamms ( $p < 0,07$ ) eine signifikante Steigerung des zerebrovaskulären Widerstandes in den subkortikalen ( $p < 0,05$ ) und in den kortikalen Regionen ( $p < 0,01$ ) nachgewiesen werden.

Nach 48 Stunden Betamethasoninfusion waren diese Veränderungen im Kortex im Gegensatz zur fetalen Hirndurchblutung statistisch weiterhin nachweisbar ( $p < 0,05$ ), im Hirnstamm und den subkortikalen Arealen hingegen nicht. Der zerebrovaskuläre Widerstand war zu diesem Zeitpunkt im Hirnstamm um 155 %, in den subkortikalen Regionen um 118 % und im Kortex um 125 % angestiegen.

Bei der Betrachtung der einzelnen Hirnregionen bestätigte sich der bereits in der Zusammenfassung gezeigte Anstieg des zerebrovaskulären Widerstandes nach 24 Stunden Betamethasoninfusion in allen Hirnregionen ( $p < 0,05$ ; Abb. 14). Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigten sich zu diesem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in den kortikalen Regionen (frontaler und parietookzipitaler Kortex  $p < 0,05$ ; medianer, parietotemporaler und okzipitaler Kortex  $p < 0,01$ ). Bei den extrakortikalen Hirnregionen konnten im Vergleich zu den Kontrolltieren keine Unterschiede nachgewiesen werden. 48 Stunden nach Infusionsbeginn war der Anstieg des zerebrovaskulären Widerstandes in allen kortikalen Regionen weiterhin nachweisbar ( $p < 0,05$ ), in den anderen Hirnregionen mit Ausnahme des Hippokampus ( $p < 0,05$ ) jedoch nicht.



**Abb. 14** Änderungen des zerebrovaskulären Widerstandes (CVR) während einer pränatalen Betamethasonbehandlung vom 111.-113.Trächtigkeitstag, geordnet nach einzelnen Hirnregionen.

MW+SEM; n=7 in der Kontrollgruppe; n=8 in der behandelten Gruppe; \*p<0,05 im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Infusionsbeginn; ‡p<0,01, †p<0,05, †p<0,07 im Vergleich zu den Kontrolltieren.

#### 5.4.4 Glukokortikoideffekte auf eine zerebrale Vasodilatation am 111. Trächtigkeitstag

Die zerebrale Vasodilatation wurde durch eine Hyperkapnie mittels maternalen, intra-trachealer CO<sub>2</sub>-Insufflation induziert, in deren Verlauf es zu einem Anstieg des fetalen arteriellen pCO<sub>2</sub> um ca. 35-40 mmHg kam (p<0,05, Tab. 5). Der Anstieg des p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> wurde von einer Zunahme des arteriellen pO<sub>2</sub> und einer Abnahme des pH-Wertes (p<0,05) begleitet. Die Änderungen des pH-Wertes und der arteriellen Blutgase unter der Hyper-

kapnie waren sowohl vor und 24 Stunden nach Beginn der Infusionsbehandlung als auch zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe gleich.

**Tab. 5** Änderungen des pH-Wertes und der arteriellen Blutgase während der Hyperkapnie vor und 24 Stunden nach Beginn der Kontroll- bzw. Betamethasoninfusion

		pH	p <sub>a</sub> CO <sub>2</sub> [mmHg]	p <sub>a</sub> O <sub>2</sub> [mmHg]
Kontrolltiere	Ausgangswert	7,32 ± 0,02	42,0 ± 2,4	24,9 ± 2,5
	1. Hyperkapnie	7,13 ± 0,01*	77,0 ± 5,1*	34,3 ± 3,0*
	24h Infusion	7,34 ± 0,02	44,1 ± 2,7	26,6 ± 2,6
	2. Hyperkapnie	7,11 ± 0,03*	77,6 ± 4,9*	37,3 ± 2,7*
behandelte Tiere	Ausgangswert	7,33 ± 0,03	41,7 ± 1,7	24,6 ± 1,1
	1. Hyperkapnie	7,13 ± 0,02*	81,0 ± 2,4*	36,9 ± 1,8*
	24h Infusion	7,32 ± 0,03	43,7 ± 1,3	26,4 ± 2,0
	2. Hyperkapnie	7,14 ± 0,02*	80,9 ± 4,7*	38,6 ± 1,8*

MW ± SEM; n=7 in der Kontrollgruppe, n=8 in der behandelten Gruppe; \*p<0,05 im Vergleich zum jeweiligen Ausgangswert vor Hyperkapnie.

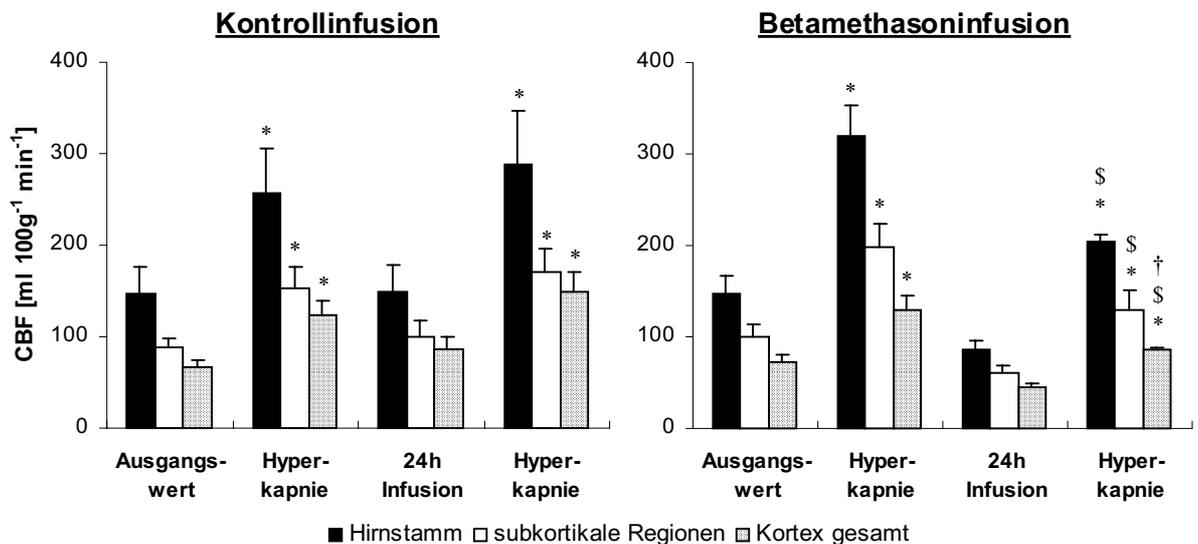
#### 5.4.4.1 Glukokortikoideffekte auf die fetale Hirndurchblutung unter Vasodilatation

Die Hyperkapnie vor Beginn der Infusionsphase führte in beiden Tiergruppen zu einem signifikanten Anstieg der Hirndurchblutung in nahezu allen Hirnregionen (p<0,05; Abb. 15 und Abb. 16). Ausnahmen bildeten Hippokampus und Striatum bei den Kontrolltieren sowie der Hippokampus bei den behandelten Tieren, die auf die Hyperkapnie schwächer reagierten (Abb. 16). Im Durchschnitt beider Gruppen betrug die Zunahme der Hirndurchblutung unter Vasodilatation im Hirnstamm 95 %, in den subkortikalen Regionen 87 % und im Kortex 80 %. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe bestanden vor Infusionsbeginn nicht.

Bei den Kontrolltieren ließ sich nach 24 Stunden NaCl-Infusion ein gleichwertiger Anstieg der Hirndurchblutung durch die Hyperkapnie provozieren (Abb. 15 und Abb. 16).

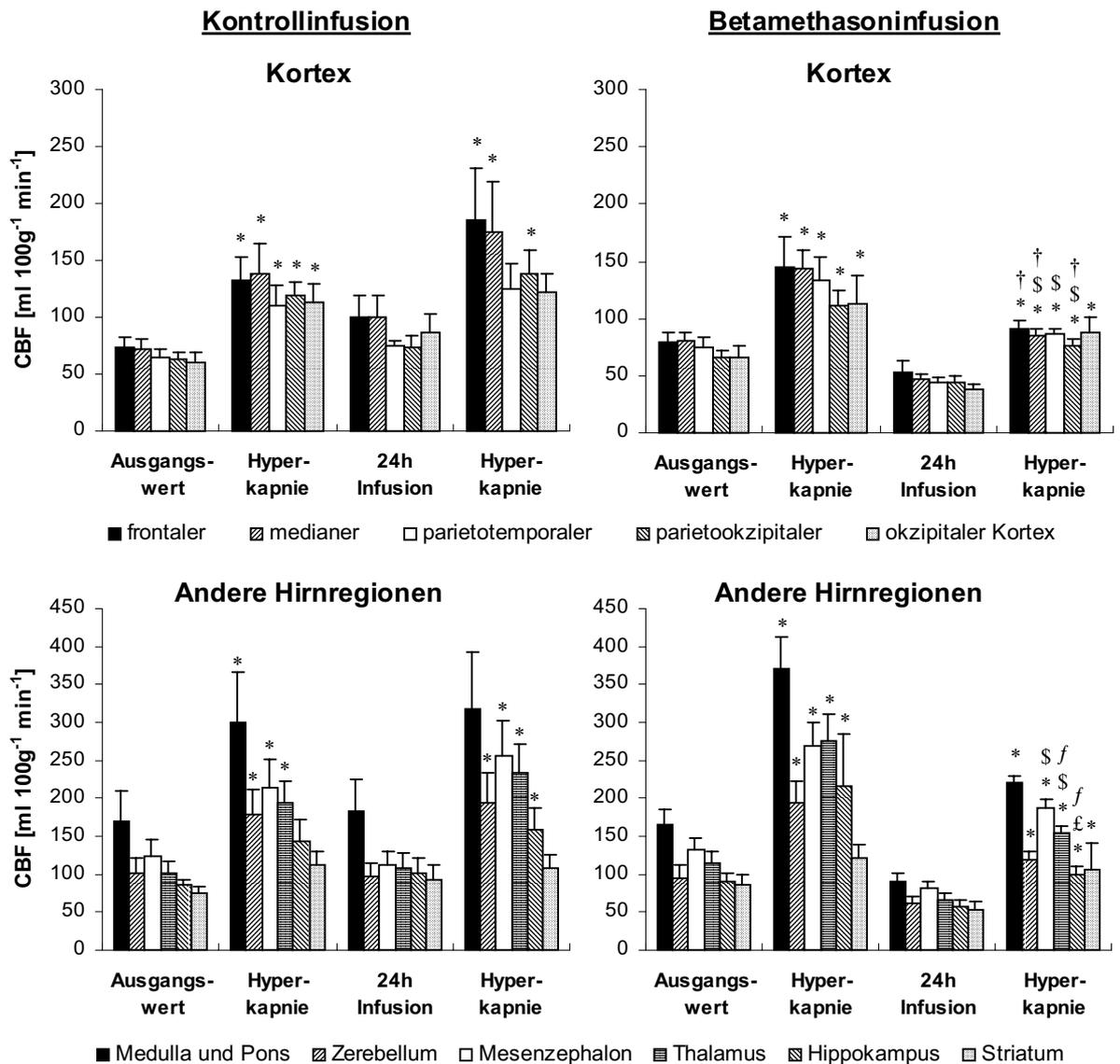
Dagegen konnte nach 24 Stunden Betamethasoninfusion ein deutlich schwächerer Anstieg der Hirndurchblutung unter der Hyperkapnie beobachtet werden. Zwar ließen sich mit einigen Ausnahmen (parietotemporaler und okzipitaler Kortex, Medulla und Hippokampus bei den Kontrolltieren bzw. Hippokampus bei den behandelten Tieren) in den meisten Hirnregionen erneut signifikante Steigerungen der Hirndurchblutung nachweisen ( $p < 0,05$ ), diese fielen jedoch bei den mit Betamethason behandelten Tieren sowohl im Hirnstamm als auch in den subkortikalen und kortikalen Regionen im Vergleich zur ersten Hyperkapnie deutlich schwächer aus ( $p < 0,05$ ; Abb. 15 und Abb. 16).

Signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren fanden sich vor allem in den kortikalen Regionen (frontaler, medianer und parietookzipitaler Kortex  $p < 0,05$ ; Abb. 16).



**Abb. 15** Effekt der pränatalen Betamethasonbehandlung auf die regionale Hirndurchblutung (CBF) während einer durch Hyperkapnie induzierten Vasodilatation am 111. bzw. 112. Trächtigkeitstag im Überblick.

MW+SEM; n=7 in der Kontrollgruppe; n=8 in der behandelten Gruppe; \* $p < 0,05$  im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten vor der Hyperkapnie; <sup>§</sup> $p < 0,05$  im Vergleich zur 1.Hyperkapnie; <sup>†</sup> $p < 0,05$  im Vergleich zu den Kontrolltieren.



**Abb. 16** Effekt der pränatalen Betamethasonbehandlung auf die regionale Hirndurchblutung (CBF) während einer durch Hyperkapnie induzierten Vasodilatation am 111. bzw. 112. Trächtigkeitstag, geordnet nach einzelnen Hirnregionen.

MW+SEM; n=7 in der Kontrollgruppe; n=8 in der behandelten Gruppe; \*p<0,05 im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten vor der Hyperkapnie; §p<0,05, £p<0,07 im Vergleich zur 1.Hyperkapnie; †p<0,05, ‡p<0,07 im Vergleich zu den Kontrolltieren.

#### 5.4.4.2 Glukokortikoideffekte auf den zerebrovaskulären Widerstand unter Vasodilatation

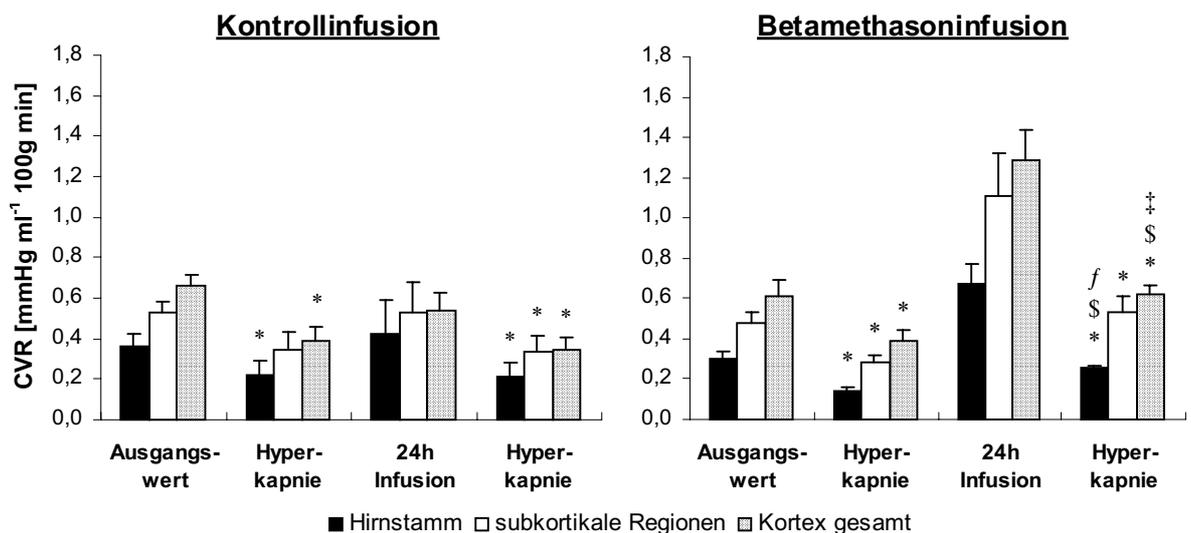
Entsprechend des Anstieges bei der Hirndurchblutung fiel der zerebrovaskuläre Widerstand während der Hyperkapnie vor Beginn der Infusionsphase bei beiden Tiergruppen in den meisten Hirnarealen ab (p<0,05; Abb. 17 und Abb. 18). Ausnahmen bildeten dabei bei den Kontrolltieren die subkortikalen Regionen, Medulla, Hippokampus und Striatum sowie

bei den behandelten Tieren parietotemporaler und okzipitaler Kortex sowie erneut der Hippokampus. Die Abnahme des zerebrovaskulären Widerstandes unter der Hyperkapnie betrug im Durchschnitt beider Gruppen im Hirnstamm 42 % , in den subkortikalen Regionen 34 % und im Kortex 36 %. Signifikante Unterschiede zwischen den beider Gruppen waren während der 1. Hyperkapnie nicht feststellbar.

24 Stunden nach Beginn der Infusionsphase konnte mit wenigen Ausnahmen bei den Kontrolltieren (parietotemporaler und okzipitaler Kortex, Medulla und Striatum) in nahezu allen Hirnregionen ein erneuter signifikanter, gleichwertiger Abfall des zerebrovaskulären Widerstandes durch die Hyperkapnie induziert werden ( $p < 0,05$ ; Abb. 17 und Abb. 18).

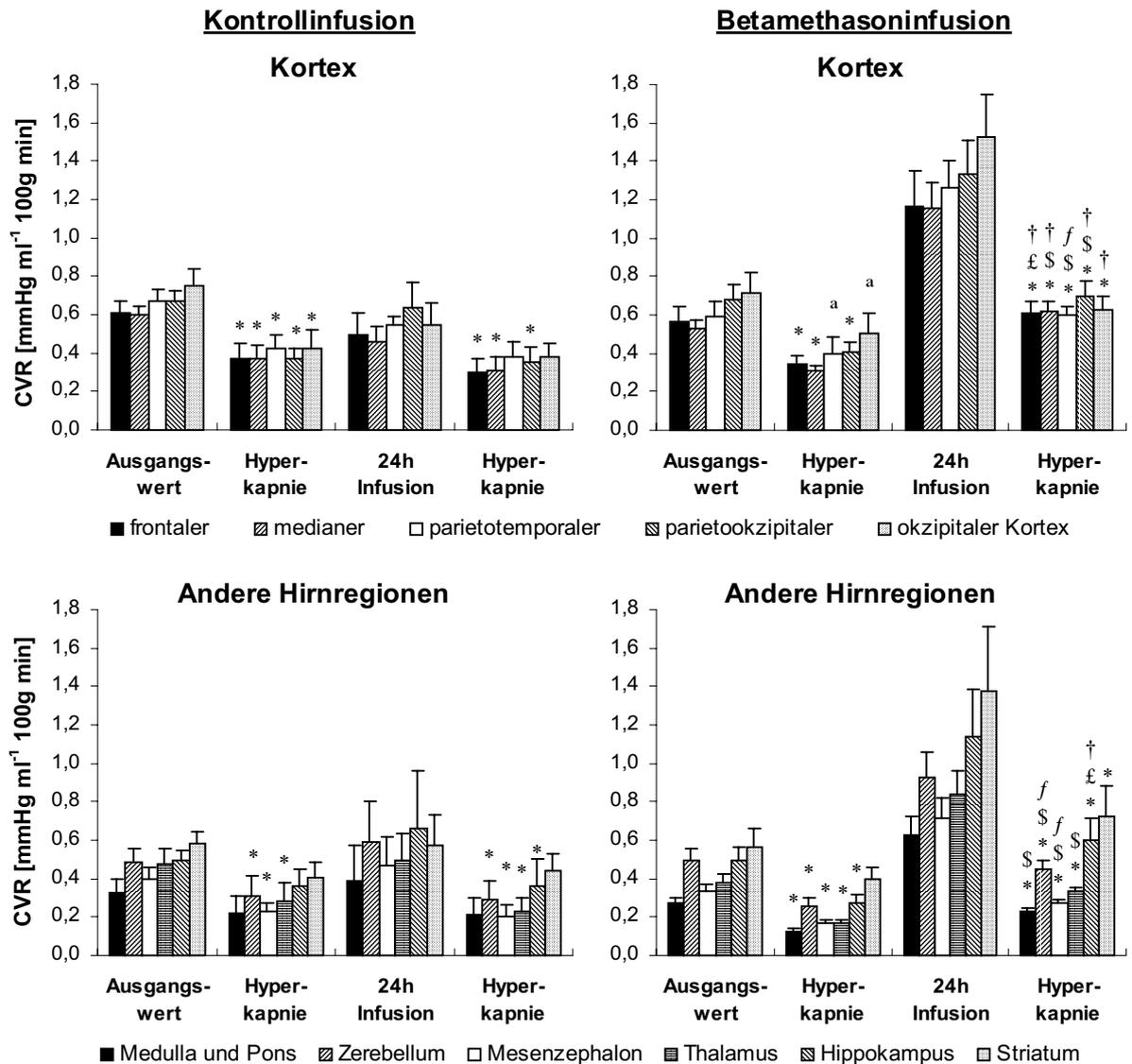
Dagegen erlangte die Senkung des zerebrovaskulären Widerstandes unter Hyperkapnie nach 24 Stunden Betamethasonbehandlung zwar erneute Signifikanz in allen Hirnregionen, erreichte jedoch im Hirnstamm und im Kortex nicht wieder das Niveau der Hyperkapnie vor Infusionsbeginn ( $p < 0,05$ ; Abb. 17).

Im Vergleich zu den Kontrolltieren ließen sich diese Unterschiede vor allem in den kortikalen Regionen statistisch verifizieren (parietotemporaler Kortex  $p < 0,07$ , alle anderen Kortexregionen sowie Hippokampus  $p < 0,05$ ; Abb. 18).



**Abb. 17** Effekt der pränatalen Betamethasonbehandlung auf den zerebrovaskulären Widerstand (CVR) während einer durch Hyperkapnie induzierten Vasodilatation am 111. bzw. 112. Trächtigkeitstag im Überblick.

MW+SEM; n=7 in der Kontrollgruppe; n=8 in der behandelten Gruppe; \* $p < 0,05$  im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten vor der Hyperkapnie; <sup>§</sup> $p < 0,05$  im Vergleich zur 1. Hyperkapnie; <sup>‡</sup> $p < 0,01$ , <sup>f</sup> $p < 0,07$  im Vergleich zu den Kontrolltieren.



**Abb. 18** Effekt der pränatalen Betamethasonbehandlung auf den zerebrovaskulären Widerstand (CVR) während einer durch Hyperkapnie induzierten Vasodilatation am 111. bzw. 112. Trächtigkeitstag, geordnet nach einzelnen Hirnregionen.

MW+SEM; n=7 in der Kontrollgruppe; n=8 in der behandelten Gruppe; \*p<0,05, <sup>a</sup>p<0,07 im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten vor der Hyperkapnie; <sup>\$</sup>p<0,05, <sup>£</sup>p<0,07 im Vergleich zur 1.Hyperkapnie; <sup>†</sup>p<0,05, <sup>f</sup>p<0,07 im Vergleich zu den Kontrolltieren.

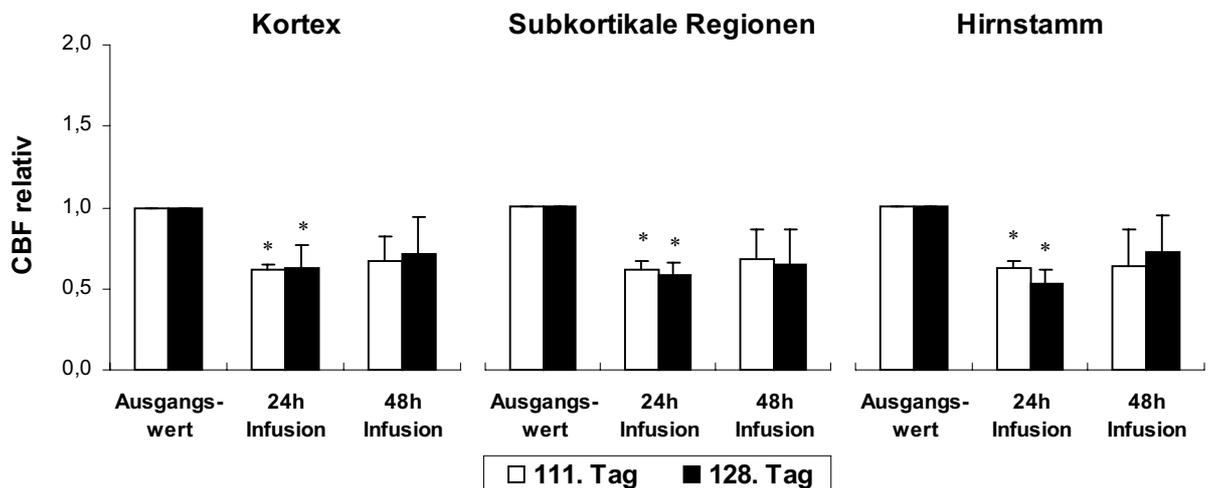
In der Zusammenfassung der aus der Hyperkapnie gewonnenen Ergebnisse läßt sich somit konstatieren, daß nach 24 Stunden Betamethasoninfusion die fetale Hirndurchblutung weniger stieg und der zerebrovaskuläre Widerstand weniger abfiel, als es unter Normalbedingungen zu erwarten gewesen wäre. Es ist somit von einer eingeschränkten vasodilatatorischen Kapazität der Hirngefäße unter einer Betamethasonbehandlung auszugehen.

#### 5.4.5 Vergleich der Glukokortikoideffekte am 111. und 128. Trächtigkeitstag

Im Vergleich zum 128. Trächtigkeitstag konnten am 111. Trächtigkeitstag zu keinem Zeitpunkt Unterschiede hinsichtlich des Glukokortikoideffektes auf die fetale Hirndurchblutung festgestellt werden.

Nach 24 Stunden Betamethasonbehandlung kam es in beiden Gestationsaltern zu einem signifikanten Abfall der fetalen Hirndurchblutung im Vergleich zum Ausgangswert vor Infusionsbeginn ( $p < 0,05$ ; Abb. 19). Die Hirndurchblutung sank im Kortex auf  $62 \pm 3 \%$  ( $63 \pm 14 \%$ ), in den subkortikalen Regionen auf  $61 \pm 6 \%$  ( $57 \pm 8 \%$ ) und im Hirnstamm auf  $62 \pm 4 \%$  ( $52 \pm 9 \%$ ) ihres Ausgangswertes (Werte in Klammern vom 128. Trächtigkeitstag).

Auch 48 Stunden nach Beginn der Betamethasoninfusion war die Hirndurchblutung in beiden Gestationsaltern noch deutlich erniedrigt, allerdings konnten zu diesem Zeitpunkt keine Signifikanzen mehr nachgewiesen werden (Abb. 19). Die fetale Hirndurchblutung betrug im Kortex noch  $67 \pm 15 \%$  ( $72 \pm 23 \%$ ), in den subkortikalen Regionen  $68 \pm 18 \%$  ( $65 \pm 21 \%$ ) und im Hirnstamm  $63 \pm 23 \%$  ( $72 \pm 22 \%$ ) ihres Ausgangswertes.



**Abb. 19** Relative Änderungen der regionalen Hirndurchblutung (CBF) während einer pränatalen Betamethasonbehandlung am 111. Trächtigkeitstag (weiße Balken) bzw. 128. Trächtigkeitstag (schwarze Balken).

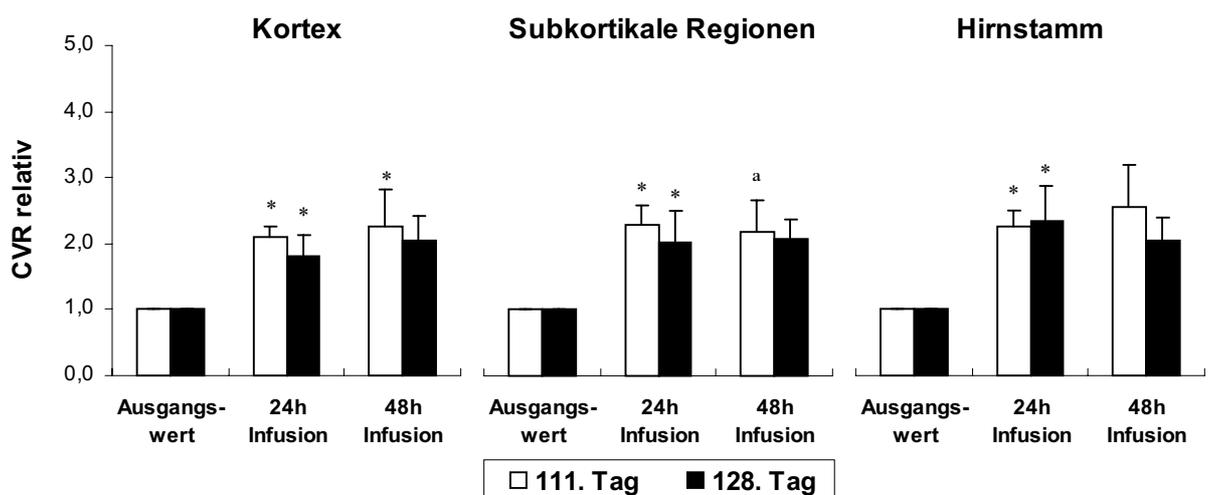
MW+SEM; n=8 in beiden Gruppen; \* $p < 0,05$  im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Behandlung.

Auch bezüglich des Glukokortikoideffektes auf den zerebrovaskulären Widerstand konnten am 111. Trächtigkeitstag keine Unterschiede im Vergleich zum 128. Trächtigkeitstag nachgewiesen werden.

Korrespondierend zum Abfall der Hirndurchblutung erhöhte sich der zerebrovaskuläre Widerstand nach 24 Stunden Betamethasonbehandlung in beiden Gestationsaltern ( $p < 0,05$ ; Abb. 20) und stieg im Kortex auf  $211 \pm 16 \%$  ( $180 \pm 34 \%$ ), in den subkortikalen Regionen auf  $229 \pm 29 \%$  ( $202 \pm 47 \%$ ) und im Hirnstamm auf  $225 \pm 24 \%$  ( $234 \pm 53 \%$ ) seines Ausgangswertes vor Infusionsbeginn an (Werte in Klammern entsprechen erneut dem 128. Trächtigkeitstag).

Nach 48 Stunden Betamethasoninfusion lag der zerebrovaskuläre Widerstand noch immer deutlich über seinem Ausgangswert, allerdings war dieser Anstieg lediglich im Kortex bei den jüngeren Tieren statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ; Abb. 20). Zu diesem Zeitpunkt war der zerebrovaskuläre Widerstand im Kortex auf  $225 \pm 56 \%$  ( $204 \pm 39 \%$ ), in den subkortikalen Regionen auf  $218 \pm 47 \%$  ( $207 \pm 30 \%$ ) und im Hirnstamm auf  $255 \pm 63 \%$  ( $205 \pm 35 \%$ ) angestiegen.

Die zerebrovaskulären Glukokortikoideffekte waren somit unabhängig vom Gestationsalter der untersuchten Feten.



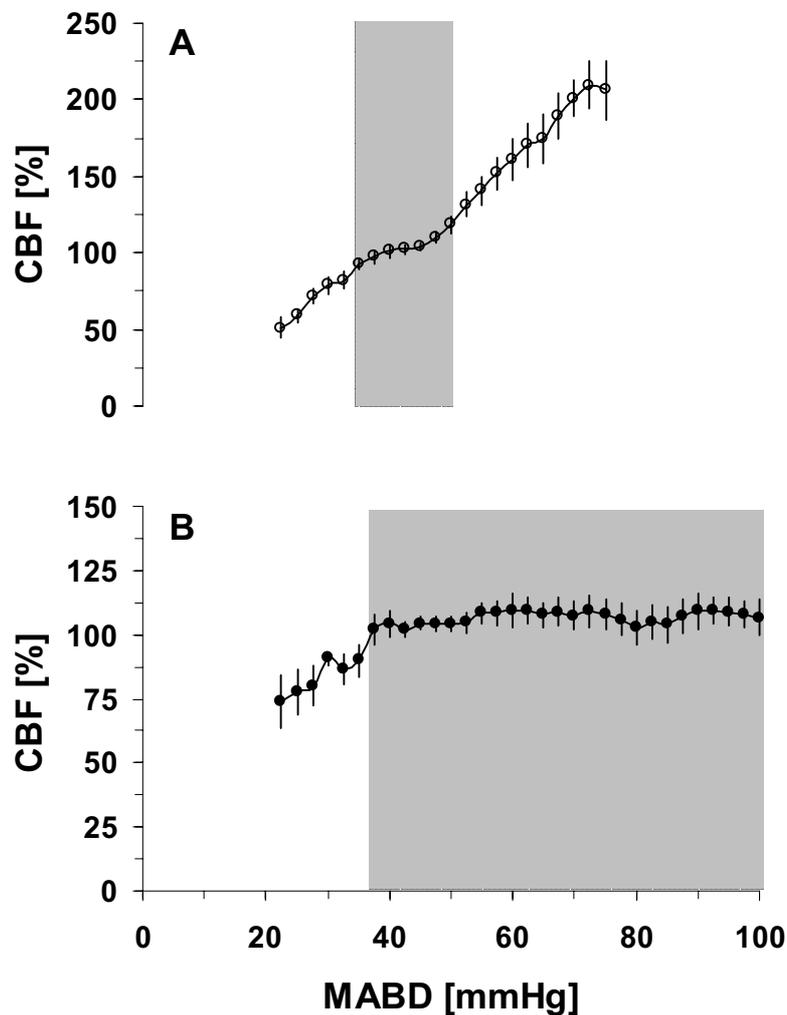
**Abb. 20** Relative Änderungen des zerebralen Gefäßwiderstandes (CVR) während einer pränatalen Betamethasonbehandlung am 111. Trächtigkeitstag (weiße Balken) bzw. 128. Trächtigkeitstag (schwarze Balken).

MW+SEM; n=8 in beiden Gruppen; \* $p < 0,05$ , <sup>a</sup> $p < 0,07$  im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Behandlung.

## 5.5 Der Einfluß des Gestationsalters und einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf die zerebrale Autoregulation des Feten

### 5.5.1 Der Einfluß des Gestationsalters auf die zerebrale Autoregulation des Feten

Am 111. Trächtigkeitstag konnte im parietalen Kortex des Schaffeten ein autoregulierter Blutdruckbereich beobachtet werden, in dem die fetale Hirndurchblutung unter Blutdruckänderungen konstant gehalten wurde und dessen Breite ca. 15 mmHg betrug (Abb. 21 A).



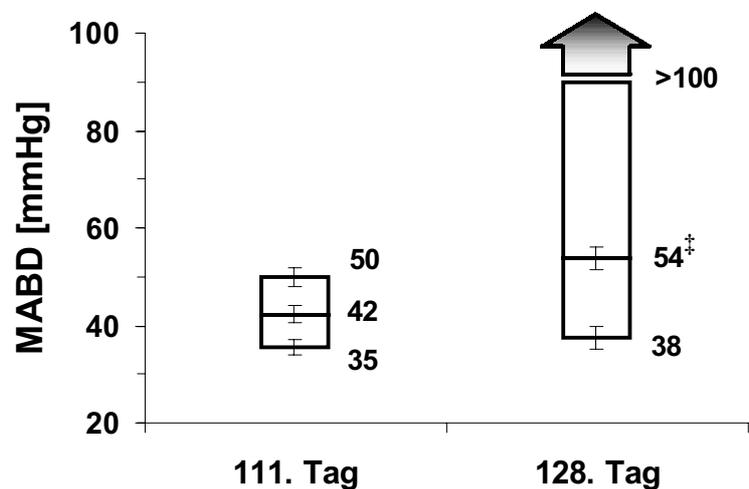
**Abb. 21** Ontogenetische Entwicklung der zerebralen Autoregulation (grau markierter Bereich) im parietalen Kortex des fetalen Schafes zwischen dem 111. Trächtigkeitstag (A) und dem 128. Trächtigkeitstag (B).

MW  $\pm$  SEM; n=7 in beiden Gruppen. Das grau markierte Feld kennzeichnet den Bereich des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABD), in dem zerebrale Autoregulation beobachtet wurde. Als Autoregulationsgrenze wurde derjenige Blutdruckwert betrachtet, ab dem eine signifikante Änderung der Hirndurchblutung (CBF) festgestellt werden konnte.

Außerhalb des Autoregulationsbereiches erfolgte ein steiler Abfall bzw. Anstieg der Hirndurchblutung.

Im Vergleich dazu konnte am 128. Trächtigkeitstag zerebrale Autoregulation über einen wesentlich größeren Blutdruckbereich nachgewiesen werden (Abb. 21 B).

Die untere Grenze der zerebralen Autoregulation veränderte sich im Vergleich beider Altersgruppen nicht ( $35 \pm 1,5$  mmHg am 111. Trächtigkeitstag versus  $38 \pm 2,4$  mmHg am 128. Trächtigkeitstag; Abb. 22). Dagegen erhöhte sich der mittlere arterielle Blutdruck der untersuchten Feten von  $42 \pm 1,6$  mmHg auf  $54 \pm 2,4$  mmHg ( $p < 0,01$ ; Abb. 22), so daß sich der Abstand zwischen unterer Autoregulationsgrenze und mittlerem arteriellen Blutdruck von 7 mmHg auf 16 mmHg vergrößerte. Die obere Autoregulationsgrenze lag am 111. Trächtigkeitstag bei  $50 \pm 1,9$  mmHg und befand sich am 128. Trächtigkeitstag bereits in einem Blutdruckbereich über 100 mmHg, der durch die experimentelle Blutdrucksteigerung mit Phenylephrin nicht mehr erreicht werden konnte (Abb. 22).

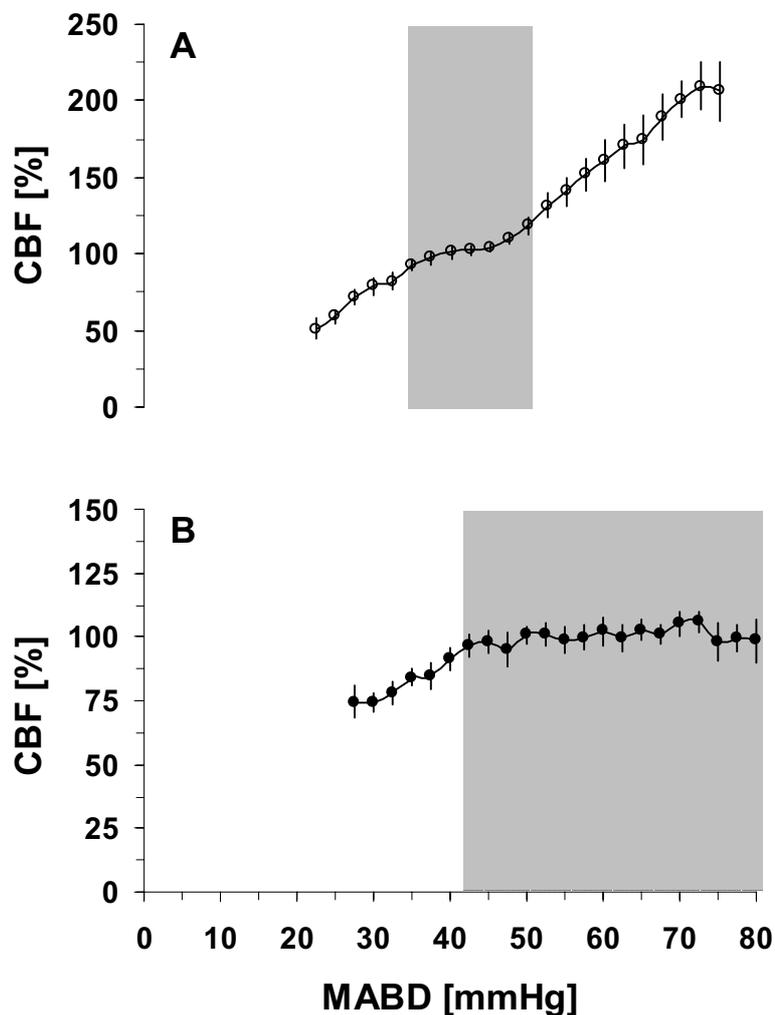


**Abb. 22** Ontogenetische Entwicklung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABD, mittlerer Balken) sowie der unteren und oberen Autoregulationsgrenze zwischen dem 111. und 128. Trächtigkeitstag.

MW  $\pm$  SEM; n=7 in beiden Gruppen; <sup>†</sup>p<0,01 im Vergleich beider Gruppen.

### 5.5.2 Der Einfluß einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf die zerebrale Autoregulation des Feten

Vor Beginn der Betamethasonbehandlung am 111. Trächtigkeitstag konnte wie bereits beschrieben ein relativ enger Blutdruckbereich von ca. 15 mmHg gefunden werden, in dem die fetale Hirndurchblutung trotz akuter Blutdruckänderungen konstant gehalten wurde (Abb. 23 A).

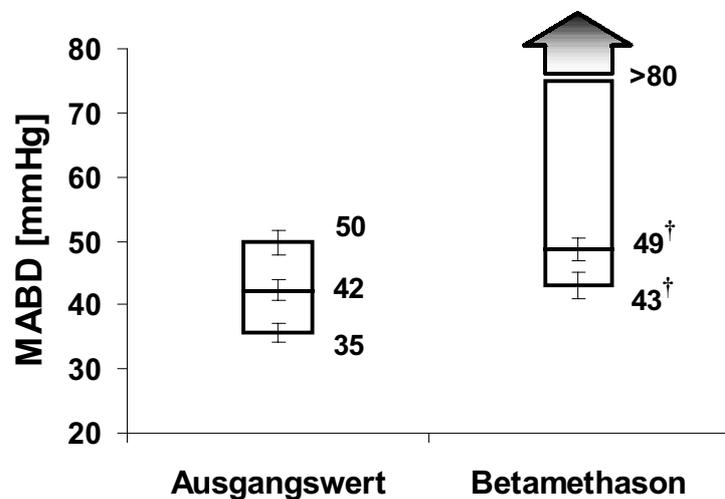


**Abb. 23** Darstellung des Autoregulationsbereiches (grau markiert) im parietalen Kortex des fetalen Schafes vor (A) und 24 Stunden nach Beginn einer Betamethasonbehandlung (B) am 111. Trächtigkeitstag.

MW  $\pm$  SEM; n=7 in beiden Gruppen. Das grau markierte Feld kennzeichnet den Bereich des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABD), in dem zerebrale Autoregulation beobachtet wurde. Als Autoregulationsgrenze wurde derjenige Blutdruckwert betrachtet, ab dem eine signifikante Änderung der Hirndurchblutung (CBF) festgestellt werden konnte.

Nach 24 Stunden Betamethasoninfusion konnte neben dem Anstieg der unteren Autoregulationsgrenze eine deutliche Verbreiterung des Autoregulationsbereiches im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet werden (Abb. 23 B).

Sowohl die Grenzen der zerebralen Autoregulation als auch der mittlere arterielle Blutdruck des Feten änderten sich unter der Betamethasonbehandlung. Während die untere Autoregulationsgrenze von  $35 \pm 1,5$  mmHg auf  $43 \pm 2,2$  mmHg anstieg ( $p < 0,05$ ; Abb. 24), erhöhte sich der mittlere arterielle Blutdruck bei den untersuchten Feten von  $42 \pm 1,6$  auf  $49 \pm 1,8$  mmHg ( $p < 0,05$ ; Abb. 24). Der Abstand zwischen der unteren Autoregulationsgrenze und dem mittlerem arteriellen Blutdruck blieb konstant (7 mmHg vor bzw. 6 mmHg nach 24 Stunden Betamethasonbehandlung). Die obere Autoregulationsgrenze stieg von  $50 \pm 1,9$  mmHg auf einen Wert außerhalb des untersuchten Blutdruckbereiches an (Abb. 24).



**Abb. 24** Darstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABD, mittlerer Balken) sowie der unteren und oberen Autoregulationsgrenze vor und 24 Stunden nach Beginn einer Betamethasonbehandlung am 111. Trächtigkeitstag.

MW  $\pm$  SEM; n=7 in beiden Gruppen; <sup>†</sup>  $p < 0,05$  im Vergleich beider Gruppen.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Methodische Betrachtungen

#### 6.1.1 Der chronisch instrumentierte Schaffetus als tierexperimentelles Modell

Bereits die ersten Beobachtungen von Mount Liggins über die Effekte einer pränatalen Glukokortikoidtherapie beim frühgeborenen Fetus aus dem Jahre 1969 gingen auf die Verwendung des fetalen Schafes als tierexperimentelles Modell zurück, ehe diese Erkenntnisse 1972 erstmals in einer randomisierten kontrollierten Studie in Neuseeland klinisch evaluiert wurden (Liggins, 1969; Liggins & Howie, 1972). Seit mehr als 30 Jahren wird dieses tierexperimentelle Modell zur Untersuchung zahlreicher physiologischer und pathophysiologischer Fragestellungen hinsichtlich der menschlichen Fetalperiode eingesetzt, so daß mittlerweile ein umfangreiches Wissen in der Literatur vorliegt. Ein Vorteil dieses Modells besteht z.B. darin, daß sich intrauterine Entwicklung von Schaf und Mensch gleichen, auch wenn das Gehirn des Schafes zum Zeitpunkt der Geburt einen etwas höheren Reifegrad als das menschliche Gehirn aufweist (Astrom, 1967; Dobbing & Sands, 1979). Ferner erlauben Größe und Konstitution der Feten eine umfangreiche Instrumentierung und der operative Eingriff wird von den Muttertieren in der Regel gut toleriert.

Zum Nachweis der Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung in unterschiedlichen Gestationsaltern wurde trotz des erheblichen experimentellen Aufwandes ein fetales Modell *in vivo* gewählt, da sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede zwischen den Glukokortikoideffekten bei Feten und Adulten bestehen. So führen beispielsweise Glukokortikoide bei Schaffeten zu einer Steigerung des T<sub>3</sub>-Plasmaspiegels, während es bei Adulten zu einer Senkung der Plasmakonzentration kommt (Thomas et al., 1978; Fraser & Liggins, 1989). Im Gegensatz zum Adulten hat eine Betamethasonbehandlung in der hier verwendeten Dosierung bei Schaffeten ferner keine Verstärkung der vasokonstriktiven Eigenschaften von Noradrenalin in den peripheren Widerstandsgefäßen zur Folge (Anwar et al., 1999).

Während des gesamten Experimentes wurden zahlreiche Vorkehrungen getroffen, um den direkten Einfluß einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirndurchblutung und die Autoregulation der Hirngefäße untersuchen zu können (siehe Kapitel 4).

### 6.1.2 Die Mikrosphärenmethode

Die Referenzprobenmethode mit radioaktiven Mikrosphären wird schon seit langem als Verfahren zur Bestimmung der Hirndurchblutung beim chronisch instrumentierten Schaf-feten angewandt (Rudolph & Heymann, 1967). In den letzten Jahren wurden alternative, nichtradioaktive Nachweisverfahren entwickelt, zu denen die Farbmikrosphärenmethode (Kowallik et al., 1991; Hakkinen et al., 1995) und die Fluoreszenzmikrosphärenmethode (Hale et al., 1986; Jasper et al., 1990; Glenny et al., 1993; Prinzen & Glenny, 1994) zählen.

Sowohl für die von mir zur Hirndurchblutungsmessung am 111. Trächtigkeitstag eingesetzten, fluoreszierenden Mikrosphären als auch für die am 128. Trächtigkeitstag verwendeten Farbmikrosphären (Roedel, 2002) konnten sehr gute Korrelationen im Vergleich zur radioaktiven Standardmethode nachgewiesen werden (Glenny et al., 1993 [r=0,95-0,99]; Van Oosterhout et al., 1995 [r=0,985]; Walter et al., 1997 [r=0,995-0,999]; Gervais et al., 1999 [r=0,99]; Hubler et al., 1999 [r=0,987-0,991]). Fluoreszierende Mikrosphären sind darüber hinaus bei Langzeitexperimenten den radioaktiven Mikrosphären überlegen, da sich radioaktive Marker mit zunehmender Verweildauer im Organismus von den Mikrosphären ablösen und sich anschließend selektiv in einigen Organen anreichern können, so daß es zur Unter- bzw. Überschätzung der realen Durchblutungswerte kommt (Van Oosterhout et al., 1998).

Während der Mikrosphärenapplikation konnten keine kardiovaskulären Nebenwirkungen aufgrund eines embolischen Verschlusses des Kapillarnetzes festgestellt werden. Die Menge der infundierten Mikrosphären genügte, um auch in kleinen Gewebeproben eine ausreichende Sphärenzahl (>400) sicherzustellen und somit den systematischen Fehler im 95. Konfidenzintervall auf ca. 10 % zu begrenzen (Buckberg et al., 1971).

### 6.1.3 Die Laser-Doppler-Durchblutungsmessung

Die Laser-Doppler-Durchblutungsmessung ist beim Adulten als Methode zur Bestimmung der zerebralen Autoregulationsgrenzen schon seit längerem etabliert. So existieren bislang zum Beispiel Studien sowohl an Gehirnen adulter Ratten (Dirnagl et al., 1989), als auch an Gehirnen neugeborener (Tuor & Grewal, 1994) und adulter Kaninchen (Florence & Seylaz, 1992; Tuor & Grewal, 1994). Dagegen bestanden für die Langzeitanwendung des Lasers am Gehirn des unanästhesierten Feten in utero einige methodische Probleme, die

zunächst gelöst werden mußten. Parallel zu unserer Arbeitsgruppe entwickelten auch Lan et al. (2000) Möglichkeiten für die Fixation von Lasersonden am Schädelknochen der Feten, mit denen die Empfindlichkeit des Lasersignals gegenüber Bewegungsartefakten minimiert werden konnte. Da außerdem keine Arbeiten vorlagen, die die Eignung der Laser-Doppler-Durchblutungsmessung als Methode zur Bestimmung der Hirndurchblutung am sich frei bewegenden Feten in utero validierten, wurden zunächst methodische Vorversuche durchgeführt, um einerseits die Langzeitstabilität des Signals intrakortikaler Lasersonden zu evaluieren und um andererseits die mittels der Lasermethode und der seit langem verwendeten Mikrosphärenmethode gemessenen akuten Änderungen der Hirndurchblutung zu vergleichen.

Ein Vorteil intrakortikaler Lasersonden besteht darin, daß diese in nahezu allen Hirnregionen implantiert werden können. Obwohl diese Lasersonden Hirnverletzungen induzieren, hat die daraus resultierende Umgebungsgliose nach den Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe keinen Einfluß auf die gemessenen Durchblutungswerte (Müller et al., 2002). Dazu trägt vermutlich auch die geschätzte Eindringtiefe des Lasers von ca. 1 mm bei (Stern et al., 1977; Haberl et al., 1989), die die von uns beobachtete Gliose (ca. 0,35 mm) um das Dreifache übertrifft (Müller et al., 2002). Mit dem SONDENDURCHMESSER von 400 µm konnte ferner ein guter Kompromiß zwischen histologischem Schaden und ausreichender Meßgenauigkeit gefunden werden, da sich bei einem kleinerem SONDENDURCHMESSER zwar das Ausmaß der Gliose vermindert, gleichzeitig aber auch die Eindringtiefe des Lasers abnimmt (Jakobson & Nilsson, 1993) und somit die Gliose insgesamt einen größeren Einfluß auf die Messungen hat. Außerdem ist das Signal der 400-µm-Sonden deutlich rauschärmer als das dünnerer Lasersonden (eigene Beobachtungen).

In den vorliegenden Untersuchungen konnten in beiden Gestationsaltern mittels der intrakortikalen Lasersonden bereits wenige Stunden nach der Instrumentierung stabile Lasersignale gewonnen werden, die über den gesamten Beobachtungszeitraum von 120 Stunden auf konstantem Niveau blieben und um weniger als 20 Prozent des Mittelwertes variierten. Somit konnte von einer ausreichenden Stabilität des Lasersignals als Voraussetzung für den Langzeiteinsatz der Laser-Doppler-Methode zur Messung akuter Änderungen der fetalen Hirndurchblutung ausgegangen werden.

Die im Experiment ermittelte Korrelation von 0,90 zwischen den mittels Laser und Mikrosphären während der Hyperkapnie gemessenen, akuten Durchblutungsänderungen ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Autoren, die den Laser gegen die Wasserstoffclearance im adulten Hirn der Katze (Haberl et al., 1989) und der Ratte (Skarphedinsson et al., 1988) sowie gegen die [ $^{14}\text{C}$ ]-Iodoantipyrene Autoradiographie im adulten Rattenhirn (Dirnagl et al., 1989) validierten. Die Genauigkeit der Laser-Doppler-Durchblutungsmessung konnte am adulten Gehirn ferner im Vergleich zur Mikrosphärenmethode (Eyre et al., 1988) und im Vergleich zur mikroskopischen Bestimmung des pialen Arterioldurchmessers (Haberl et al., 1989) demonstriert werden.

Trotz der guten Korrelation zwischen beiden Methoden lagen die in unserem Experiment mit der Laser-Doppler-Methode gemessenen Durchblutungsänderungen unter den Ergebnissen der Mikrosphärenmethode. Auch Bishai et al. (2003) fanden in ihren Untersuchungen mit der Laser-Doppler-Methode niedrigere Durchblutungswerte im Vergleich zur Messung mit fluoreszierenden Mikrosphären. Im Gegensatz dazu berichteten andere Autoren von einer Überschätzung der mittels des Laser-Dopplers am adulten Rattengehirn bestimmten Durchblutung im Vergleich zur [ $^{14}\text{C}$ ]-Iodoantipyrene Autoradiographie (Fabricius & Lauritzen, 1996). Nach Meinung dieser Autoren führt eine Erhöhung der Hirndurchblutung zur Zunahme von Größe und Geschwindigkeit der Erythrozyten sowie zur Dilatation und Öffnung zusätzlicher Kapillaren. Da sich somit der vom Laser detektierte Erythrozytenfluß stärker als der Plasmafluß erhöht, kommt es zur Überschätzung der realen Hirndurchblutung mit dem Laser (Fabricius & Lauritzen, 1996). Der Vergleich von Laser- und Mikrosphärenmethode ist dagegen eine adäquate Möglichkeit der Validierung, da sich Mikrosphären und Erythrozyten im Gefäßsystem gleichmäßig verteilen. Dennoch konnten auch andere Studien trotz guter Korrelation beider Methoden keine hundertprozentige Übereinstimmung der Meßwerte zeigen (Lindsberg et al., 1989; Colditz et al., 1993). Diese systematischen Abweichungen der vom Laser gemessenen Durchblutungswerte scheinen vor allem bei einer Erhöhung der Hirndurchblutung aufzutreten, während bei Erniedrigung der Hirndurchblutung im adulten Rattenhirn der Anstieg der Regressionsgerade im Vergleich zwischen Laser-Doppler-Durchblutungsmessung und [ $^{14}\text{C}$ ]-Iodoantipyrene Autoradiographie (Dirnagl et al., 1989) bzw. der Wasserstoffclearance (Skarphedinsson et al., 1988; Haberl et al., 1989) etwa 0,9 betrug. Eine Validierung des Lasers unter Senkung der Hirndurchblutung wurde in unserem

Experiment jedoch nicht durchgeführt, da die Abnahme einer Referenzblutprobe für die Mikrosphärenmessung bei einer Senkung des Blutdruckes unter die untere Grenze der zerebralen Autoregulation das Leben des Fetus gefährdet hätte.

Es muß desweiteren betont werden, daß der Laser-Doppler ein Gewebsvolumen von ca. 1 mm<sup>3</sup> erfaßt (Stern et al., 1977; Haberl et al., 1989), welches somit deutlich kleiner als das mittels der Mikrosphären vermessene Probenvolumen ist. Auch wenn der im Experiment ermittelte Anstieg der Regressionsgerade nicht 1,0 betrug, ist die gute Korrelation zwischen beiden Methoden doch ein sicheres Zeichen für die Eignung der Laser-Doppler-Durchblutungsmessung als Methode zur Bestimmung der Hirndurchblutung am fetalen Schaf in utero.

Zusammenfassend betrachtet stellen Mikrosphären- und Laser-Doppler-Methode weniger konkurrierende als vielmehr einander ergänzende Möglichkeiten zur Hirndurchblutungsmessung dar, da beide Methoden mit Vor- und Nachteilen behaftet sind. Der Vorteil des Einsatzes von Mikrosphären besteht vor allem darin, daß die Durchblutung in allen Hirnregionen simultan und absolut bestimmt werden kann. Die Anzahl möglicher Meßpunkte ist allerdings limitiert. Die Laser-Doppler-Durchblutungsmessung ermöglicht dagegen eine kontinuierliche Aufzeichnung relativer Änderungen der zerebralen Durchblutung in hoher zeitlicher Auflösung. Die Hirndurchblutung kann aufgrund der unbekanntenen optischen Eigenschaften des Gewebes nur in Form von Relativwerten bestimmt werden. Wegen des geringen erfaßten Gewebsvolumens (ca. 1 mm<sup>3</sup>) kann zudem nur die lokale Durchblutung in einem kleinen Hirnareal gemessen werden.

#### **6.1.4 Bestimmung der Autoregulationsgrenzen**

Für die Bestimmung der Autoregulationsgrenzen wurden in den vorliegenden Untersuchungen die vasoaktiven Substanzen Natriumnitroprussid (NNP) und Phenylephrin (PE) verwendet, um den Blutdruck schrittweise zu senken bzw. zu steigern und simultan das Verhalten der Hirndurchblutung zu beobachten. Die Anwendung dieser vasoaktiven Substanzen setzt jedoch voraus, daß die eingesetzten Stoffe den zerebrovaskulären Tonus nicht direkt beeinflussen. Studien am neugeborenen Schaf konnten bereits zeigen, daß Phenylephrin in der hier verwendeten Dosierung keinen Einfluß auf die Autoregulation hat (Ong et al., 1986). Untersuchungen zum Einfluß von Stickstoffmonoxid (NO) auf die zerebrale Autoregulation kamen hingegen zu unterschiedlichen Ergebnissen. In mehreren

Studien an verschiedenen Spezies konnte mit NO-Synthetase-Inhibitoren gezeigt werden, daß NO keinen wesentlichen Beitrag zur Autoregulation während ausgeprägter Blutdrucksenkungen leistet (Wang et al., 1992; Buchanan & Phillis, 1993; Meadow et al., 1994; Saito et al., 1994). Andere Untersuchungen am adulten Gehirn erachteten NO dagegen als einen der Mediatoren der Vasodilatation an der unteren Autoregulationsgrenze, nachdem im Gehirn ein Anstieg der unteren Autoregulationsgrenze nach Hemmung der NO-Synthetase (Jones et al., 1999) bzw. deren Erniedrigung nach Infusion von NNP als NO-Donator (Stange et al., 1991; Tsutsui et al., 1995) beobachtet worden war.

Um einen potentiellen, direkten Effekt von NO auf die zerebralen Gefäße ausschliessen zu können, wurde daher bereits in Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe der Einfluß einer Gabe von NNP auf die zerebrale Autoregulation untersucht (Müller et al., 2002). Die direkte Infusion von NNP in die A. carotis in der doppelten Menge, die im Experiment bei intravenöser Applikation verwendet wurde, verursachte jedoch keine Veränderungen der zerebralen Durchblutung (Müller et al., 2002). Diese Beobachtung stimmt mit einer Untersuchung an neugeborenen Schafen überein, in der die Hirngefäße mit NNP in einer zehnfach höheren als der im Experiment verwendeten Konzentration perfundiert wurden (Ong et al., 1986). Ein Grund für diese im Vergleich zu den Studien am adulten Gehirn kontroversen Ergebnisse liegt vermutlich darin, daß die Hirndurchblutung bei Schaffeten im von mir untersuchten Gestationsalter im wesentlichen durch Prostaglandine gesteuert wird (Chemtob et al., 1990; Meadow et al., 1994) und daß NO erst in der späteren Entwicklung an Bedeutung für die zerebrale Autoregulation gewinnt (Armstead et al., 1994; Zuckerman et al., 1996; Willis & Leffler, 1999). Ferner waren die NNP-Dosierungen, die die untere Autoregulationsgrenze bei anästhesierten jungen Schweinen (Stange et al., 1991) bzw. adulten Ratten (Tsutsui et al., 1995) erniedrigten, um ein Vielfaches höher als die im Experiment verwendeten NNP-Dosen. Auch speziesbedingte Unterschiede zwischen Schaffeten und Ferkeln bzw. adulten Ratten sind als Ursache für die oben genannten, kontroversen Untersuchungsergebnisse denkbar.

Es kann also geschlossen werden, daß der Einsatz von vasoaktiven Substanzen zur experimentellen Blutdrucksenkung und -steigerung beim Feten mit großer Wahrscheinlichkeit keinen Einfluß auf die Versuchsergebnisse zur zerebralen Autoregulation hatte.

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

### 6.2.1 Der Einfluß des Gestationsalters und einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf den fetalen Blutdruck

Die vorliegenden Untersuchungen erbrachten einen Anstieg des fetalen mittleren arteriellen Blutdruckes zwischen dem 111. und 128. Trächtigkeitstag um 13 mmHg. Unter der Betamethasoninfusion erhöhte sich der fetale Blutdruck am 111. Trächtigkeitstag um etwa 9 mmHg. Im relativen Vergleich zum 128. Trächtigkeitstag war der glukokortikoid-induzierte Blutdruckanstieg bei den Tieren jüngeren Gestationsalters somit stärker.

Als Mechanismen für den Anstieg des fetalen Blutdruckes mit dem Gestationsalter können eine wachstumsbedingte Erhöhung des Herzzeitvolumens und des peripheren Gefäßwiderstandes diskutiert werden (Hanson, 1995). Ferner kommt es zwischen dem 111. und 128. Trächtigkeitstag zum physiologischen Anstieg des Plasmaspiegels von Kortisol (Challis & Brooks, 1989; Liggins, 1994), das stimulierende Effekte auf das kardiovaskuläre System hat (Wood et al., 1987; Tangalakis et al., 1992; Dodic & Wintour, 1994).

Die Ursachen für die während der Betamethasonbehandlung beobachtete, akute Blutdruck-erhöhung liegen vorwiegend in einem Anstieg des peripheren Gefäßwiderstandes (Derks et al., 1997), der nach Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe auf einer lokal gestörten Gefäßreagibilität beruht (Anwar et al., 1999; siehe auch 6.2.3.1). Ferner wurden beim fetalen Schaf ein Anstieg des Herzzeitvolumens (Padbury et al., 1995), ein Reifungseffekt auf das sympathische Nervensystem und eine Senkung der Barorezeptorsensitivität unter Glukokortikoiden (Segar et al., 1998) nachgewiesen, die ebenfalls zu der beobachteten Blutdrucksteigerung beitragen könnten.

Durch den Vergleich beider Gestationsalter konnte gezeigt werden, daß die bei einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auftretenden Blutdruckeffekte mit wachsendem Alter des Feten abnehmen. Diese Ergebnisse gehen konform mit Beobachtungen anderer Autoren, die eine Altersabhängigkeit für durch Kortisol induzierte Blutdrucksteigerungen feststellen konnten (Tangalakis et al., 1992; Dodic & Wintour, 1994). So führte eine Kortisolinfusion von 4 µg/min bei Schaffeten des 103.-120. Trächtigkeitstages zu einem Blutdruckanstieg von bis zu 48 Stunden Dauer, bei Feten zwischen dem 130. und 137. Trächtigkeitstag hingegen nicht (Tangalakis et al., 1992; Dodic & Wintour, 1994).

Bei der Behandlung unreifer Feten ist somit ein stärkerer Blutdruckanstieg nach exogener Glukokortikoidzufuhr zu erwarten als bei reifen Feten.

## **6.2.2 Der Einfluß des Gestationsalters auf das zerebrovaskuläre System des Feten**

### **6.2.2.1 Die ontogenetische Entwicklung des zerebrovaskulären Widerstandes und der fetalen Hirndurchblutung**

In der vergleichenden Betrachtung beider Gestationsalter konnte ein entwicklungsbedingter Abfall des zerebrovaskulären Widerstandes von 20-30 % zwischen dem 111. und 128. Trächtigkeitstag nachgewiesen werden, der mit einem Anstieg der fetalen Hirndurchblutung von 50-100 % einherging.

Im Unterschied zum Adulten spielt das sympathische Nervensystem vor allem beim unreifen Feten noch eine bedeutende Rolle zur Regulierung des zerebrovaskulären Widerstandes und fördert Wachstum und Entwicklung zerebraler Arterien (Bevan & Tsuru, 1981; Baumbach & Heistad, 1983; Bevan et al., 1983; Wagerle et al., 1990). So zeigten z.B. Wagerle et al. (1990) in vergleichenden Untersuchungen an anästhesierten, fetalen Schafen unterschiedlichen Alters, daß die Reagibilität der zerebralen Arteriolen gegenüber Noradrenalin und die Bedeutung noradrenerger Mechanismen für die Steuerung der Hirndurchblutung mit dem Gestationsalter abnehmen. Andererseits konnte bei Schaffeten nachgewiesen werden, daß es mit zunehmendem Entwicklungsalter zu einer Reifung des NO-Systems kommt, die zu einem Anstieg der fetalen Hirndurchblutung führt (Northington et al., 1997). Es spricht also vieles dafür, daß der Abfall des zerebrovaskulären Widerstandes und der Anstieg der fetalen Hirndurchblutung mit einer Abnahme noradrenerger Einflüsse und mit einer Zunahme der NOS-Aktivität im Verlauf des letzten Schwangerschaftsdrittels assoziiert sind. Von einer genauen Kenntnis der komplexen Mechanismen, die die Ontogenese des zerebrovaskulären Systems bedingen, ist man jedoch noch weit entfernt.

Die oben genannten Resultate stimmen mit den wenigen bislang verfügbaren Ergebnissen zur intrauterinen Ontogenese des zerebrovaskulären Systems überein, die vor allem beim fetalen Schaf gewonnen worden (Szymonowicz et al., 1988; Gleason et al., 1989; Helou et al., 1994). Die entwicklungsbedingten, zerebrovaskulären Veränderungen waren am deutlichsten im zerebralen Kortex nachweisbar, in dem sich die Hirndurchblutung innerhalb des untersuchten Zeitraumes verdoppelte und der zerebrovaskuläre Widerstand

um ca. 30 % fiel. Diese Beobachtungen sind wahrscheinlich auf das überproportionale Wachstum des zerebralen Kortex im letzten Schwangerschaftsdrittel zurückzuführen (McIntosh et al., 1979). Die Ergebnisse sprechen somit für einen Wandel der Hierarchie der regionalen Hirndurchblutung zwischen intra- und extrauterinem Leben, der am Ende der Schwangerschaft im fetalen Gehirn zu einer Verschiebung der Distribution der Hirndurchblutung zugunsten des Kortex führt (Szymonowicz et al., 1988).

### 6.2.2.2 Die ontogenetische Entwicklung der zerebralen Autoregulation

Der Einsatz der Laser-Doppler-Durchblutungsmessung zur kontinuierlichen Überwachung von relativen Änderungen der lokalen Hirndurchblutung ermöglichte in den vorliegenden Untersuchungen erstmals eine exakte Bestimmung der Autoregulationsgrenzen und deren ontogenetischer Veränderungen am fetalen, nicht anästhesierten Schaf in utero. Es konnte gezeigt werden, daß beim fetalen Schaf die zerebrale Autoregulation im parietalen Kortex bereits am 111. Trächtigkeitstag effektiv auf akute Blutdruckänderungen anspricht. Durch den Vergleich mit dem 128. Trächtigkeitstag konnte die ontogenetische Entwicklung des Blutdruckbereiches verfolgt werden, über den die kortikale Durchblutung autoreguliert wird. Die obere Autoregulationsgrenze stieg mit dem Gestationsalter im Gegensatz zur unteren Grenze deutlich an, wodurch sich der autoregulierte Blutdruckbereich erheblich vergrößerte. Die Verbreiterung des Autoregulationsbereiches ging mit einem entwicklungsbedingten Blutdruckanstieg einher.

**Tab. 6** Übersicht über die bisherigen Ergebnisse zur zerebralen Autoregulation beim fetalen Schaf

Autoren	Meßmethode	Alter der Feten	Autoregulationsgrenzen	
			untere	obere
Ashwal et al., 1984	Mikrosphären	124.-146. Tag	30 mmHg	78 mmHg
Helou et al., 1994	Mikrosphären	92. Tag	inkonst. Autoregulation	
Papile et al., 1985	Mikrosphären	118.-122. Tag	45 mmHg	80 mmHg
Purves & James, 1969	<sup>133</sup> Xe-Clearance	135.-150. Tag	43 mmHg	90 mmHg
Szymonowicz et al., 1990	Mikrosphären	125.-136. Tag	45 mmHg	∅
Tweed et al., 1983	Mikrosphären	130.-140. Tag	(42 mmHg)*	(62 mmHg)*

\*Tweed et al. konnten eine zerebrale Autoregulation im Blutdruckbereich zwischen 42 und 62 mmHg nachweisen, bestimmten jedoch nicht deren Grenzen.

Bisherige Studien am fetalen Schaf bestimmten die Grenzen der zerebralen Autoregulation vor allem mit Hilfe der Mikrosphärenmethode (Tab. 6). Die von den einzelnen Autoren gemessenen Autoregulationsgrenzen variieren jedoch erheblich, da bei Einsatz der Mikrosphärenmethode die Anzahl der Messungen beschränkt und somit eine exakte Bestimmung der Autoregulationsgrenzen schwierig ist. Desweiteren verwendeten die Arbeitsgruppen verschiedene Methoden, um beim Feten Änderungen der Hirndurchblutung zu induzieren. So wurde beim Feten z.B. Blut entnommen bzw. transfundiert (Tweed et al., 1983; Ashwal et al., 1984; Szymonowicz et al., 1990), die Aorta bzw. der Truncus brachiocephalicus komprimiert (Papile et al., 1985), künstlicher Liquor intraventrikulär infundiert (Helou et al., 1994) oder die Hirndurchblutung unter hyperkapnischen Bedingungen bzw. während einer Katecholamininfusion gemessen (Purves & James, 1969).

Einige Autoren untersuchten die zerebrale Autoregulation der Feten unter Anästhesie mit Halothan (Papile et al., 1985; Helou et al., 1994), welches die Hirndurchblutung im postnatalen Gehirn erhöht (Anderson et al., 1980; Bazin et al., 1997) und außerdem die vaskuläre Reaktivität und die Autoregulation verändert (Drummond et al., 1987; Ipsiroglu et al., 2000). Ferner wurden häufig Ergebnisse von Versuchstieren verschiedenen Gestationsalters gemittelt und somit eine altersgerechte Darstellung der Entwicklung der zerebralen Autoregulation zusätzlich erschwert. Zudem erfaßte keine der oben genannten Studien den Zeitraum zwischen dem 111. und 118. Trächtigkeitstag, in dem sich die zerebrale Autoregulation noch in Reifung befindet.

Am 90.-100. Trächtigkeitstag fanden Szymonowicz et al. unter hämorrhagischer Hypotension lediglich im Hirnstamm eine autoregulatorische Reaktion (Szymonowicz et al., 1990). Die untere Grenze der Autoregulation im Hirnstamm lag in dieser Studie bei 39 mmHg und war somit bereits höher als die von mir im parietalen Kortex gefundene Untergrenze am 111. Trächtigkeitstag. Dieser Umstand legt die Vermutung nahe, daß sich die zerebrale Autoregulation zuerst in den älteren zytoarchitektonischen Strukturen wie dem Hirnstamm und den subkortikalen Regionen entwickelt (Szymonowicz et al., 1990; Helou et al., 1994; Tuor & Grewal, 1994).

Mit den vorliegenden Ergebnissen läßt sich desweiteren die hohe Vulnerabilität des unreifen Gehirns gegenüber Blutdruckschwankungen erklären. So existierte trotz eines nachweisbaren Autoregulationsbereiches am 111. Trächtigkeitstag lediglich ein kleiner

Pufferbereich von 7 bzw. 8 mmHg zwischen dem Ruheblutdruck und der unteren bzw. oberen Autoregulationsgrenze. Bei einem Blutdruckabfall kann die daraus resultierende, geringe Autoregulationskapazität zur zerebralen Hypotension führen und somit das Risiko für Schäden in den arteriellen „Wasserscheiden“ der periventrikulären Zonen des unreifen, fetalen Gehirns erhöhen (Lou, 1994; Reddy et al., 1998). Andererseits kann eine unreife Autoregulation während hypertoner Blutdruckphasen die Vulnerabilität des fetalen Gehirn gegenüber zerebralen Blutungen steigern (Reynolds et al., 1979; Lou, 1993), da die Hirndurchblutung über der oberen Autoregulationsgrenze proportional mit dem Blutdruck ansteigt. Die Prädisposition des Frühgeborenen gegenüber der periventrikulären Leukomalazie und intraventrikulären Blutungen (Volpe, 1997) ist somit auch auf den engen Blutdruckbereich zurückzuführen, in dem das unreife, fetale Gehirn die Hirndurchblutung bei akuten Blutdruckänderungen konstant zu halten vermag.

Im Vergleich dazu konnte am 128. Trächtigkeitstag neben der Verbreiterung des Autoregulationsbereiches auch eine Vergrößerung des Abstandes zwischen dem Ruheblutdruck und den Autoregulationsgrenzen beobachtet werden, die für eine Ausreifung sowohl vasodilatativer als auch vasokonstriktiver Mechanismen mit dem Gestationsalter spricht. Das reife Gehirns kann somit Blutdruckschwankungen besser kompensieren und ist daher weniger anfällig für Ischämien und Blutungen.

### **6.2.3 Der Einfluß einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf das zerebrovaskuläre System des Feten**

#### **6.2.3.1 Glukokortikoideffekte auf den zerebrovaskulären Widerstand und die fetale Hirndurchblutung**

Nach 24 Stunden Betamethasoninfusion kam es am 111. Trächtigkeitstag zu einem Anstieg des zerebrovaskulären Widerstandes um 100-130 %, der in den untersuchten Hirnregionen mit einer Senkung der fetalen Hirndurchblutung um 40 % einherging. Auch 48 Stunden nach Infusionsbeginn waren diese Veränderungen tendenziell noch nachweisbar. Die am 111. Trächtigkeitstag gemessenen Therapieeffekte waren mit den von unserer Arbeitsgruppe am 128. Trächtigkeitstag gewonnenen Betamethasoneffekten (Schwab et al., 2000; Roedel, 2002) vergleichbar und traten somit im Untersuchungszeitraum, dem auch der Zeitraum der Betamethasongabe in der Klinik entspricht, unabhängig vom Alter der Feten auf.

Die Ursachen für die nachgewiesene Senkung der fetalen Hirndurchblutung unter der Glukokortikoidbehandlung sind im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht worden, da hierzu spezifisch ausgerichtete Studien notwendig sind. Wie unten ausführlich diskutiert sind einerseits Glukokortikoideffekte auf den zerebralen Gefäßtonus denkbar, die zu einer Dysregulation im zerebrovaskulären System des Feten und dadurch zu einem Abfall der Hirndurchblutung führen. Andererseits lassen sich aber auch katabole Glukokortikoideffekte auf den zerebralen Stoffwechsel als Ursache für die durch Betamethason ausgelöste Hirndurchblutungssenkung vermuten, die in diesem Fall lediglich Ausdruck einer physiologischen Anpassungsreaktion im Sinne einer Kopplung von Metabolismus und Hirndurchblutung wäre.

### **1. Glukokortikoideffekte auf den zerebralen Gefäßtonus**

Glukokortikoide können über verschiedenene Angriffspunkte den zerebralen Gefäßtonus und damit die Hirndurchblutung im fetalen Gehirn beeinflussen:

#### Prostaglandine (PG)

Prostaglandine sind beim Feten die bedeutendsten hormonellen Mediatoren zur Regulierung des zerebralen Gefäßtonus (Leffler & Busija, 1987; Jones et al., 1993; Benders et al., 1995). Im sich entwickelnden Gehirn und den fetalen Hirngefäßen ist dabei die Zyklooxygenase 2 (COX-2) wesentlich an der basalen Prostaglandinsynthese beteiligt, während im adulten Hirn die COX-2 nur unter Stimulationsbedingungen, wie z.B. einer gesteigerten Hirndurchblutung, exprimiert wird (Peri et al., 1995; Leffler, 1997). Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, daß Betamethason im Hirnstamm und im zerebralen Kortex von Schaffeten zu einer Verminderung der COX-2-Expression führt (Wood et al., 2003). Figueroa et al. (1999) konnten zeigen, daß es unter einer fünftägigen Kortisolbehandlung zur Hemmung der COX-2-Expression im zerebralen Kortex und im Hippokampus bei Schaffeten kommt. Ferner wurde an adulten Ratten demonstriert, daß eine Hemmung der Prostaglandinsynthese mittels Indometacin zu einer Senkung der Hirndurchblutung um ca. 50 % führt (Dahlgren et al., 1981). Da Glukokortikoide demnach inhibitorisch in die Prostaglandinsynthese eingreifen, sind somit indirekte Glukokortikoideffekte auf den Tonus der zerebralen Gefäße denkbar.

Eine Hemmung der COX-2 und die damit verbundenen, niedrigen Prostaglandinspiegel induzieren beim neugeborenen Schwein eine „upregulation“ von Prostaglandinrezeptoren und eine Zunahme von deren Dichte in kleinen zerebralen Gefäßen (Li et al., 1995; Chemtob et al., 1996). Die Zunahme der Prostaglandinrezeptoren und die steigende Empfindlichkeit der Hirngefäße gegenüber Prostaglandinen könnten eine Ursache dafür sein, daß 48 Stunden nach Beginn der Betamethasonbehandlung in beiden Gestationsaltern zwar noch eine Senkung der Hirndurchblutung nachweisbar war, diese jedoch keine Signifikanz mehr erreichte.

#### Stickstoffmonoxid (NO)

Neben den Prostaglandinen ist die Regulierung des zerebrovaskulären Tonus im sich entwickelnden Gehirn auch von Stickstoffmonoxid (NO) abhängig (Northington et al., 1997). So geht die Reifung des zerebrovaskulären Systems bei Schaffeten mit einer Reifung der Nitritoxidsynthetase (NOS) einher (siehe 6.2.2.1). Glukokortikoide können die NOS direkt (Wallerath et al., 1999; Whitworth et al., 2002) und auch indirekt über das Prostaglandinsystem hemmen, weil die Aktivität der endothelialen (eNOS) und der neuronalen Nitritoxidsynthetase (nNOS) im zerebralen Gefäßbett durch PGE<sub>2</sub> über EP3-Rezeptoren positiv reguliert wird (Dumont et al., 1998; Dumont et al., 1999). Da eNOS und nNOS neben dem PGE<sub>2</sub> mit zunehmender Hirnreifung eine wesentliche Rolle für die zerebrale Autoregulation des Feten spielen (Hardy et al., 1999), könnten somit auch Glukokortikoideffekte auf das NO-System am Zustandekommen des Anstieges des zerebralen Gefäßtonus unter der Betamethasonbehandlung beteiligt sein.

#### Endothelin 1 (ET-1)

Endothelin 1 (ET-1) wird vom Gefäßendothel, der Gefäßmuskulatur und auch von Astrozyten und Nervenzellen freigesetzt und ist als Vasokonstriktor von großer Bedeutung für den basalen Gefäßtonus im adulten Organismus (Rubanyi & Botelho, 1991). Unter hypoxischen Bedingungen kommt es auch in der Perinatalperiode zu einer starken Induktion der ET-1-Expression (Tsang et al., 2001). ET-1 bindet an Rezeptoren der Gefäßmuskulatur, die zu einer Steigerung des Ca<sup>++</sup>-Einstroms in die Zelle, zur Aktivierung von Proteinkinasen und der Phosphorylierung von Myosin führen (Karimova & Pinsky, 2001). Glukokortikoide modulieren die Bindung an ET-1 Rezeptoren (Provencher et al., 1995) und induzieren bei der adulten Ratte die Freisetzung von ET-1 aus Gefäßmuskulatur.

zellen (Kansen et al., 1991). Beim fetalen Schaf kommt es durch Glukokortikoide aufgrund einer gesteigerten ET-1 Bindung an ETA-Rezeptoren zu einer Verstärkung der Empfindlichkeit zerebraler Arteriolen gegenüber ET-1 (Docherty et al., 2001). Da Hirnarterien im Vergleich zu Arterien aus anderen Gefäßgebieten besonders empfindlich auf ET-1 (Docherty et al., 2001) reagieren, kann der während der Betamethasoninfusion beobachtete Anstieg des zerebrovaskulären Widerstandes eventuell auch auf eine gesteigerte Empfindlichkeit zerebraler Arteriolen gegenüber ET-1 zurückgeführt werden.

#### Empfindlichkeit der HirngefäÙe gegenüber vasoaktiven Substanzen

Glukokortikoide führen vermutlich auch zu einer veränderten Empfindlichkeit zerebraler GefäÙe gegenüber anderen, vasokonstriktiven Substanzen. Unsere Arbeitsgruppe konnte an peripheren WiderstandsgefäÙen von mit Betamethason behandelten Feten in vitro eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber depolarisierenden und damit vasokonstriktorisch wirkenden  $K^+$ -Ionen und eine verminderte Reaktion gegenüber den vasodilatatorischen Substanzen Bradykinin und Forskolin nachweisen (Anwar et al., 1999). Am ausgeprägtesten stieg dabei die Sensitivität der GefäÙe gegenüber depolarisierenden  $K^+$ -Ionen in vitro an (Anwar et al. 1999). Als Ursache für die gesteigerte Empfindlichkeit der GefäÙe gegenüber  $K^+$ -Ionen kommt am ehesten eine Störung der elektromechanischen Ankopplung in Betracht, die auf einer Modifizierung der intrazellulären  $Ca^{++}$ -Speicherung bzw. Freisetzung, auf einer Beeinflussung spannungsabhängiger  $Ca^{++}$ -Kanäle oder auf einer Sensitivitätsänderung der kontraktilen Proteine beruhen könnte.

#### Sympathisches Nervensystem

Betamethasoneffekte auf das sympathische Nervensystem sind als Ursache für die beobachtete Senkung der fetalen Hirndurchblutung eher unwahrscheinlich, da einerseits im Gegensatz zu anderen Gefäßgebieten eine sympathische Stimulation nur große zerebrale GefäÙe beeinflusst (Baumbach & Heistad, 1983) und andererseits die Durchblutung der kleinen WiderstandsgefäÙe einer Autoregulation unterliegt (Übersicht in Paulson et al., 1990). Zudem wurden im Experiment keine Unterschiede zwischen den Glukokortikoideffekten auf die Hirndurchblutung in beiden Gestationsaltern beobachtet, was bei einer erheblichen Bedeutung des autonomen Nervensystems für das Zustandekommen dieses Effektes jedoch zu erwarten gewesen wäre, da die Empfindlichkeit zerebraler Arteriolen

gegenüber Noradrenalin und die Bedeutung noradrenerger Mechanismen für die Steuerung der Hirndurchblutung mit dem Gestationsalter abnehmen (Wagerle et al., 1990).

## **2. Glukokortikoideffekte auf den zerebralen Stoffwechsel**

Seit längerer Zeit ist bekannt, daß Glukokortikoide über katabole Wirkungen auf den peripheren (Munck, 1971) und zentralen Metabolismus (Landgraf et al., 1978) verfügen. So verminderten Glukokortikoide z.B. die lokale zerebrale Glukoseutilisation im adulten (Doyle et al., 1994) und im neonatalen Rattenhirn (Tuor et al., 1997) möglicherweise aufgrund eines erniedrigten Energiebedarfes durch Hemmung der neuronalen Aktivität. Ferner konnte nach Adrenalectomie eine gesteigerte Glukoseutilisation im adulten Rattenhirn nachgewiesen werden (Kadekaro et al., 1988). Da die zerebrale Perfusion eng an den Stoffwechselbedarf des Gehirns gekoppelt ist, könnten katabole Glukokortikoideffekte somit durchaus zu einer Reduktion der Hirndurchblutung führen (Iadecola, 1993).

### **6.2.3.2 Glukokortikoideffekte auf die zerebrale Vasodilatation**

Die Zunahme des zerebrovaskulären Widerstandes ging am 111. Trächtigkeitstag mit einer signifikanten Abschwächung der Vasodilatationskapazität nach 24 Stunden Betamethasonbehandlung einher. Diese Beobachtung stimmt mit Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe für den 128. Trächtigkeitstag überein, in denen eine Abschwächung der Vasodilatation unter Hyperkapnie nach 48 Stunden Betamethasoninfusion nachgewiesen werden konnte (Schwab et al., 2000; Roedel, 2002).

Verschiedene Faktoren, wie z.B. Stickstoffmonoxid, Adenosin und die Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen, sind an der Vasodilatation der Hirngefäße beteiligt, die eine Hyperkapnie begleitet (Übersicht in Faraci & Heistad, 1998). Vor allem Prostaglandine spielen bei der Vermittlung der Vasodilatation im unreifen Gehirn eine bedeutende Rolle, wie an neugeborenen Schweinen gezeigt werden konnte (Wagerle & Mishra, 1988; Leffler et al., 1994). Dahlgren et al. (1981) konnten ferner nachweisen, daß eine Hemmung der Prostaglandinsynthese mittels Indometacin bei adulten Ratten zu einer Abnahme des hyperkapniebedingten Hirndurchblutungsanstieges führt. Im Gegensatz zum adulten Gehirn wird die Zyklooxygenase 2 (COX-2) im fetalen Gehirn konstitutiv exprimiert und ist an der basalen Prostaglandinsynthese beteiligt (Peri et al., 1995; Leffler, 1997). Da Glukokortikoide die Prostaglandinsynthese durch Verminderung der COX-2-Expression

supprimieren (Übersichten in Russo Marie, 1990; Masferrer & Seibert, 1994; Goppelt-Strube, 1997), ist es durchaus denkbar, daß eine Betamethasonbehandlung über diesen Mechanismus eine Einschränkung der Vasodilatationskapazität im fetalen Gehirn bewirkt. Diese Vermutung legt auch eine weitere Untersuchung nahe, in der bei neugeborenen Schweinen aufgrund einer verminderten PGE<sub>2</sub>-Synthese nach Dexamethasonbehandlung eine geringere vasodilatatorische Reaktion pialer Arteriolen auf CO<sub>2</sub> beobachtet werden konnte (Wagerle et al., 1991).

### **6.2.3.3 Glukokortikoideffekte auf die zerebrale Autoregulation**

Bislang existierten keinerlei Studien über die Effekte einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf die zerebrale Autoregulationskapazität. Mit den vorliegenden Untersuchungen konnte nun mittels der Laser-Doppler-Durchblutungsmessung erstmals gezeigt werden, daß eine Betamethasonbehandlung in der klinisch verwendeten Dosierung zu erheblichen Änderungen in der Reaktion der Hirngefäße auf akute Blutdruckänderungen führt. So verschoben sich der mittlere arterielle Blutdruck und die untere Autoregulationsgrenze zu höheren Blutdruckwerten, während eine obere Autoregulationsgrenze nicht mehr nachgewiesen werden konnte und die Hirndurchblutung somit selbst bei exzessiven Blutdrucksteigerungen noch konstant blieb.

Da die Betamethasoneffekte auf die zerebrale Autoregulation den mit zunehmendem Alter auftretenden Veränderungen ähneln, läßt sich eine Reifungsbeschleunigung durch die pränatale Glukokortikoidtherapie diskutieren. Der wesentliche Unterschied zur normalen ontogenetischen Entwicklung besteht jedoch darin, daß unter Betamethason auch eine Erhöhung der unteren Autoregulationsgrenze beobachtet werden konnte.

Die Verschiebung der Autoregulationsgrenzen zu höheren Blutdruckwerten läßt auf eine Vasokonstriktion der Hirngefäße unter der Betamethasontherapie schliessen. Mögliche Mechanismen für die unter Glukokortikoiden beobachtete Erhöhung des zerebrovaskulären Widerstandes sind bereits diskutiert worden (siehe 6.2.3.1). Vor allem das Prostaglandinsystem stellt einen möglichen Angriffspunkt für eine Beeinflussung der zerebralen Autoregulation durch Glukokortikoide dar, da Prostaglandine eine wesentliche Rolle für die zerebrale Autoregulation des Feten spielen (Chemtob et al., 1990; Meadow et al., 1994).

Wie bereits beschrieben wird die pränatale Betamethasontherapie häufig bei einer drohenden Frühgeburt durchgeführt. Gerade Frühgeborene haben ein hohes Risiko eine perinatale Asphyxie zu erleiden und sind damit besonders anfällig für hypoxisch-ischämische Hirnschäden (Vannucci, 1995). Kommt es unter einer Betamethasonbehandlung zu einem Anstieg der unteren Autoregulationsgrenze, so muß beim Feten ein hoher Blutdruck aufrechterhalten werden, um eine ausreichende Hirndurchblutung sicherstellen zu können. Der Anstieg der unteren Autoregulationsgrenze hat somit potentiell negative Folgen für das unreife Gehirn des Frühgeborenen, da es während hypotoner Blutdruckphasen zu einer Verminderung der zerebralen Durchblutung kommt und sich dadurch das Risiko für das Auftreten einer periventrikulären Leukomalazie erhöht (Lou, 1994; Reddy et al., 1998). Es sind daher weitere Studien notwendig, um zu klären, ob eine pränatale Glukokortikoidtherapie bei hypotonen Blutdruckwerten noch protektiv gegenüber periventrikulären Infarkten wirkt oder ob es vielmehr unter dieser Voraussetzung zu iatrogenen Schäden durch die Behandlung kommt.

Im Gegensatz dazu führt der Anstieg der oberen Autoregulationsgrenze unter der Betamethasontherapie dazu, daß die fetale Hirndurchblutung auch bei extrem hohen Blutdruckwerten konstant bleibt. Diese Beobachtung bietet neben dem bereits beschriebenen glukokortikoidinduzierten Anstieg des zerebrovaskulären Widerstandes eine plausible Erklärung dafür, warum es unter einer Betamethasontherapie trotz des ansteigenden arteriellen Blutdruckes zu einem protektiven Effekt gegenüber Hirnblutungen kommt (Leviton et al., 1993; Elimian et al., 1999). Glukokortikoide reduzieren demnach wahrscheinlich gerade in den kritischen, mit Blutdruckanstiegen einhergehenden Phasen des fetalen Lebens, wie z.B. Hypoxien und Nabelschnurokklusionen, die Anfälligkeit des unreifen Gehirns gegenüber zerebralen Blutungen (Reynolds et al., 1979; Lou, 1993).

Neben den zugrundeliegenden Mechanismen sollten zukünftige Studien untersuchen, wie lange die durch Betamethason induzierten Änderungen der zerebralen Autoregulation nach dem Therapieende anhalten. Diese Frage ist von entscheidender Bedeutung, da der fetale Blutdruck nach Ende einer Glukokortikoidtherapie wieder abnimmt (Derks et al., 1997) und somit bei prolongiertem Bestehen einer erhöhten unteren Autoregulationsgrenze ein kritischer Abfall der Hirndurchblutung am Therapieende zu befürchten wäre.

## **6.2.4 Die Folgen einer pränatalen Glukokortikoidtherapie für das fetale Gehirn**

### **6.2.4.1 Die Folgen einer pränatalen Glukokortikoidtherapie für das normoxische Gehirn**

Neben den von mir untersuchten zerebrovaskulären Nebenwirkungen konnte unsere Arbeitsgruppe an den gleichen Schaffeten zeigen, daß eine Betamethasonbehandlung im letzten Schwangerschaftsdrittel zu neurotoxischen Schäden im fetalen Gehirn führt (Antonow-Schlorke et al., 2002). Ferner konnten unter dem Glukokortikoideinfluß Veränderungen in der elektrischen Hirnfunktion nachgewiesen werden (Schwab et al., 2001; Roedel, 2002). Im Mittelpunkt der immunhistochemischen Untersuchungen stand die Beurteilung von Betamethasoneffekten auf Mikrotubulus-assoziierte Proteine (MAP) als bedeutenden Bestandteilen des neuronalen Zytoskeletts sowie auf Synaptophysin als Marker für die Synapsendichte (Masliah, 1990). Auch wenn diese Untersuchungen nicht Gegenstand meiner Arbeit waren, möchte ich an dieser Stelle auf die histologischen Folgen der Betamethasonbehandlung eingehen, da sie potentielle Konsequenzen der von mir gefundenen Hirndurchblutungssenkung darstellen.

Mikrotubulus-assoziierte Proteine (MAP) sind Zytoskelettproteine und kommen in den Zellen aller Vertebraten einschließlich des Menschen vor (Viereck et al., 1988; Arnold & Trojanowski, 1996). Sie erfüllen wichtige Funktionen für die Regulation der neuronalen Morphogenese (Tucker, 1990; Johnson & Jope, 1992) sowie für die neuronale Integrität durch Aufrechterhaltung der Nervenzellform und des intrazellulären Transportes (Bershadsky & Vasiliev, 1989). Synaptophysin ist ein kalziumbindendes Glykoprotein (Rehm et al., 1986), das unabhängig vom Transmitter in den präsynaptischen Terminals von mehr als 95 % aller neokortikalen Synapsen lokalisiert ist (Navone et al., 1986). Die Expression von Synaptophysin als struktureller Bestandteil der Synapsen korreliert mit der Synaptogenese (Knaus et al., 1986).

Die histologischen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an den Gehirnen Betamethason-behandelter Schaffeten konnten eine deutliche Abnahme des immunreaktiven MAP1B und MAP2c nachweisen, die mit der gleichzeitigen Senkung der Hirndurchblutung assoziiert war (Schwab et al., 2001). Der MAP1B- und MAP2c-Verlust konnte auch bei nichtmenschlichen Primatenfeten reproduziert werden, die sich in einem vergleichbaren

Alter wie die von mir untersuchten Schaffeten befanden (Antonow-Schlorke et al., 2003a). Eine Schädigung von Mikrotubulus-assoziierten Proteinen gilt bereits im sich entwickelnden Gehirn als ein frühes intrazelluläres strukturelles Zeichen für eine ischämische Hirnschädigung (Blomgren et al., 1995; Malinak & Silverstein, 1996; Ota et al., 1997). Sowohl beim fetalen Schaf (Antonow-Schlorke et al., 2000) als auch beim Primatenfeten (Antonow-Schlorke et al., 2003a) ging der MAP-Verlust unter der Glukokortikoidtherapie ferner mit einer signifikanten Abnahme des immunreaktiven Synaptophysins einher, dessen verringerte Expression auf eine gestörte Synaptogenese schliessen läßt (Knaus et al., 1986).

Wie auch die von mir beobachtete Hirndurchblutungssenkung traten die neurotoxischen Nebenwirkungen der Betamethasonbehandlung während des letzten Schwangerschaftsdrittels unabhängig vom Anwendungszeitpunkt auf und waren in ihrer Ausprägung zwischen unterschiedlichen Altersgruppen vergleichbar (Schwab et al., 2001; Antonow-Schlorke et al., 2002). Da die glukokortikoidinduzierten Schäden nicht nur beim fetalen Schaf, sondern auch im Gehirn von nicht instrumentierten Primatenfeten nachgewiesen werden konnten (Antonow-Schlorke et al., 2003a), sind gleichartige Veränderungen ebenfalls bei menschlichen Feten zu befürchten.

Tatsächlich gibt es auch beim Menschen erste Hinweise für negative Auswirkungen der pränatalen Glukokortikoidtherapie auf die Hirnentwicklung. So konnten retrospektive Untersuchungen zeigen, daß insbesondere eine wiederholte, pränatale Gabe von Glukokortikoiden zu einer verzögerten Hirnreifung führt (Modi et al., 2001) und möglicherweise mit langfristigen kognitiven und psychomotorischen Defiziten einhergeht (Esplin et al., 2000). In einer Pilotstudie wurde darüber hinaus bei Kleinkindern, deren Mütter in der Schwangerschaft aufgrund einer drohenden, kongenitalen adrenalen Hyperplasie mit Dexamethason behandelt worden waren, häufiger ein ängstlich-vermeidenes Verhalten beobachtet als bei nicht exponierten Kindern (Trautman et al., 1995). Da die wiederholte Gabe von Glukokortikoiden bei einer drohenden Frühgeburt offenbar keinen zusätzlichen Nutzen für die fetale Lungenreifung bringt (Banks et al., 1999) und in zunehmendem Maße Kenntnisse über die Nebenwirkungen einer pränatalen Glukokortikoidtherapie bestehen, wird in den aktuellen Therapierichtlinien der National Institutes of Health nur noch die einmalige Glukokortikoidgabe bei einer drohenden Frühgeburt empfohlen (NIH Consensus Statement, 2000).

#### **6.2.4.2 Die Folgen einer pränatalen Glukokortikoidtherapie für das hypoxische Gehirn**

Trotz erheblicher Fortschritte in der Neonatalmedizin und der damit einhergehenden Senkung der perinatalen Mortalität ist die Inzidenz bleibender neurologischer Folgen bei Frühgeborenen unverändert hoch, da der Hauptanteil schwerer neurologischer Schäden bereits pränatal entsteht (Blair & Stanley, 1988). So treten bei etwa 20-30 % der Kinder, die vor der 35. SSW geboren werden, zerebrovaskuläre Komplikationen auf. Besonders Frühgeborene mit geringem Geburtsgewicht (<1500g) erleiden häufig schwere motorische Schäden (5-15 %) sowie spätere intellektuelle Defizite (25-50 %) (Yager & Thornhill, 1997).

Ein Großteil dieser pränatalen, neurologischen Schäden wird durch intraventrikuläre Blutungen und vor allem durch die periventrikuläre Leukomalazie (PVL) verursacht (Volpe, 1997), deren Auftreten besonders häufig mit langfristigen, neurologischen Beeinträchtigungen bei den betroffenen Kindern einhergeht (Jorch, 1993; Piecuch et al., 1997). Im Rahmen einer intrauterinen Asphyxie, die häufig durch Nabelschnurokklusionen verursacht wird, kommt es bei der periventrikulären Leukomalazie zur arteriellen Hypotension und einer gestörten Regulation der zerebralen Durchblutung, die zu einer Ischämie in der periventrikulären, weißen Substanz des fetalen Gehirns führen. Die PVL tritt bei etwa 10 % der Frühgeborenen auf, die vor der 32. SSW geboren werden (Jorch, 1997). Da mittlerweile etwa 60 % der Frühgeborenen pränatal mit Glukokortikoiden behandelt werden (Elimian et al., 1999), ist es von großer Bedeutung zu untersuchen, welchen Einfluß Glukokortikoide auf das hypoxische Gehirn und damit auf die oben genannten Erkrankungen haben.

Einerseits lassen sich positive Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung vermuten. So schützt die Verschiebung der oberen Autoregulationsgrenze unter der Glukokortikoidbehandlung das fetale Gehirn möglicherweise gegenüber hypoxiebedingten, intraventrikulären Blutungen, indem sie einen proportionalen Anstieg der Hirndurchblutung bei einem hypoxieinduzierten Blutdruckanstieg verhindert. Dies könnte begründen, warum die Glukokortikoidtherapie beim Frühgeborenen zu einer Abnahme der Inzidenz intraventrikulärer Blutungen führt (Leviton et al., 1993; Elimian et al., 1999), wofür bislang keine befriedigenden Erklärungen bestanden. Desweiteren ist die während der Behandlung beobachtete Hirndurchblutungssenkung möglicherweise Folge eines katabolen Gluko-

kortikoideffektes (siehe 6.2.3.1), der zu einer erniedrigten lokalen Glukoseutilisation im fetalen Gehirn und somit zu einer langsameren Abnahme der Energiereserven im fetalen Gehirn bei einer perinatalen Asphyxie führen kann. Dies würde protektive Effekte von Glukokortikoiden gegenüber hypoxisch-ischämischen Belastungen erklären, die bei neonatalen Ratten nachgewiesen werden konnten (Tuor, 1997). Der Anstieg des fetalen Blutdruckes während einer Glukokortikoidtherapie könnte zudem einer arteriellen Hypotension entgegenwirken, die eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese der periventrikulären Leukomalazie spielt (Jorch, 1993; Bauder et al., 2000). Die Annahme protektiver Glukokortikoideffekte wird auch durch Erfahrungen aus klinischen Studien gestützt, nach denen eine pränatale Glukokortikoidbehandlung bei Frühgeborenen zu einer deutlichen Abnahme der Inzidenz intraventrikulärer Blutungen und der periventrikulären Leukomalazie führt (Baud et al., 1999; Elimian et al., 1999; Canterino et al., 2001). Diese retrospektiven Studien haben allerdings den großen Nachteil, daß oft geburtshilfliche Notfälle, bei denen eine pränatale Glukokortikoidtherapie aufgrund eines Zeitmangels nicht mehr möglich war, der unbehandelten Kontrollgruppe zugeordnet werden und somit eine Verzerrung der Studienergebnisse durch das unterschiedliche Risikoprofil in Kontroll- und behandelter Gruppe nicht ausgeschlossen werden kann (Bauder et al., 2000). Ferner wird bei pränatal unbehandelten Babies häufig eine postnatale Glukokortikoidtherapie durchgeführt, die jedoch mit einer deutlichen Verschlechterung der neurologischen Entwicklung des Kindes einherzugehen scheint (Barrington, 2001).

Bei einer primären Senkung der Hirndurchblutung durch zerebrale Vasokonstriktion lassen sich andererseits auch potentiell negative Effekte einer Glukokortikoidbehandlung vermuten. Da aufgrund der Verschiebung der unteren Autoregulationsgrenze ein höherer Blutdruck für eine ausreichende Versorgung des fetalen Gehirns notwendig ist, könnte die Glukokortikoidbehandlung in hypotonen Blutdruckphasen zu einer Abnahme der Hirndurchblutung und einer Einschränkung des O<sub>2</sub>-Angebotes im fetalen Gehirn führen und somit das Ausmaß zerebraler Schäden vor allem während perinataler Asphyxien verstärken. Zudem ist unter hypoxischen Bedingungen eine Abnahme des protektiven Effektes einer CO<sub>2</sub>-Erhöhung gegenüber hypoxisch-ischämischen Hirnschäden (Vannucci et al., 1995) zu befürchten, da durch die Glukokortikoidtherapie auch die Vasodilatationskapazität der Hirngefäße eingeschränkt wird. Tatsächlich konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, daß es bei fetalen Schafen unter einer pränatalen Betamethasonbehandlung zu einer deutlichen Zunahme der neuronalen Schäden im Hippokampus nach einer intra-

uterinen Asphyxie kommt (Antonow-Schlorke et al., 2003*b*). Solche Schäden können zu kognitiven Defiziten beitragen, die bei Frühgeborenen nach einer wiederholten, pränatalen Glukokortikoidgabe bereits beobachtet wurden (Esplin et al., 2000).

Zusammenfassend können somit aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen über die zerebrovaskulären Folgen einer Betamethasonbehandlung sowohl positive als auch negative Effekte für das fetale Gehirn unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen abgeleitet werden. Um zu einer sinnvollen Abwägung von Risiko und Nutzen einer pränatalen Glukokortikoidtherapie gelangen zu können, sind weitere Studien notwendig, die vor allem Glukokortikoideffekte während perinataler Asphyxien untersuchen sollten.

## 7 SCHLUSSFOLGERUNGEN

In den vorliegenden Untersuchungen wurde anhand chronisch instrumentierter Schaffeten der Einfluß einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die fetale Hirndurchblutung und die zerebrale Autoregulation in unterschiedlichen Gestationsaltern untersucht.

Während der ontogenetischen Entwicklung im letzten Schwangerschaftsdrittel kommt es beim Schaffetus zu einem Abfall des zerebrovaskulären Widerstandes, der mit einem Anstieg der Hirndurchblutung einhergeht. Desweiteren führt eine Verschiebung der oberen Autoregulationsgrenze mit zunehmendem Alter zu einer Erhöhung der zerebralen Autoregulationskapazität. Im Vergleich zu reifen Feten ist der autoregulierte Blutdruckbereich, über den die zerebralen Gefäße die Hirndurchblutung konstant zu halten vermögen, bei unreifen Feten sehr schmal. Die geringe, zerebrale Autoregulationskapazität bietet eine Erklärung für die hohe Anfälligkeit des unreifen Gehirns von Frühgeborenen gegenüber zerebralen Blutungen (Reynolds et al., 1979; Lou, 1993) und der periventrikulären Leukomalazie (Lou, 1994; Reddy et al., 1998).

Eine Betamethasonbehandlung in der klinisch zur Beschleunigung der Lungenreifung bei menschlichen Feten verwendeten Dosierung ist beim Schaffetus mit einer Erhöhung des peripheren und des zerebralen Gefäßwiderstandes verbunden, die zu einem Blutdruckanstieg sowie zu einem Abfall der Hirndurchblutung und einer Einschränkung der Vasodilatationskapazität der Hirngefäße führt. Ferner kommt es unter Betamethason zu einer Verschiebung der oberen und der unteren Grenze der zerebralen Autoregulation zu höheren Blutdruckwerten.

Die Erhöhung der oberen Autoregulationsgrenze stellt vermutlich einen wichtigen positiven Therapieeffekt dar, der das unreife Gehirn des von einer Frühgeburt bedrohten Feten vor intraventrikulären Blutungen schützt (Leviton et al., 1993; Elimian et al., 1999), da der erhöhte zerebrale Gefäßtonus hypertensiven Blutungen entgegenwirkt. Andererseits führen die Senkung der Hirndurchblutung und der Anstieg der unteren Autoregulationsgrenze während der pränatalen Betamethasonbehandlung möglicherweise zu einer kritischen Einschränkung der zerebralen Blutversorgung und sind damit vermutlich bedeutende Mechanismen für den verstärkten, neuronalen Zelluntergang im unreifen Gehirn des Feten während einer perinatalen Asphyxie, den unsere Arbeitsgruppe bei

fetalen Schafen nachweisen konnte (Antonow-Schlorke et al., 2003b). Desweiteren ist aufgrund der verminderten Vasodilatationskapazität unter der Therapie eine Abschwächung des vasodilatativen und damit neuroprotektiven Effektes von Kohlenstoffdioxid erhöhungen (Vannucci et al., 1995) in hypoxischen Phasen zu befürchten.

Die Glukokortikoideffekte auf das zerebrovaskuläre System treten im letzten Schwangerschaftsdrittel unabhängig vom Gestationsalter auf und werden offenbar weder qualitativ noch quantitativ von der Reifung der hypothalamo-hypophyso-adrenalen Achse beeinflusst. Die während der Betamethasonbehandlung beobachtete Abnahme der fetalen Hirndurchblutung korreliert darüber hinaus mit einem Verlust Mikrotubulus-assoziiierter Proteine (MAP), der ebenfalls altersunabhängig unter der Therapie aufzutreten scheint (Schwab et al., 2001; Antonow-Schlorke et al., 2002), und geht mit Veränderungen der elektrischen Hirnaktivität einher (Schwab, 2001; Roedel, 2002).

Die vorliegenden Untersuchungen erklären den lebensrettenden, protektiven Effekt einer pränatalen Glukokortikoidtherapie gegenüber intraventrikulären Blutungen (Leviton et al., 1993; Elimian et al., 1999), durch den Glukokortikoide neben ihrem positiven Einfluß auf die fetale Lungenreifung (Ballard & Ballard, 1995; Crowley et al., 1995) zu einem unverzichtbaren, therapeutischen Bestandteil der Perinatalmedizin geworden sind. Die erheblichen, negativen Nebenwirkungen der pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf das zerebrovaskuläre System und die neuronale Integrität des Feten sollten jedoch zu einer engen Indikationsstellung in der Klinik führen bis:

1. Langzeitfolgen einer solchen Behandlung für das Frühgeborene anhand prospektiver, longitudinaler Studien ausgeschlossen werden können,
2. die zugrundeliegenden Mechanismen für die glukokortikoidinduzierte Senkung der Hirndurchblutung und deren Folgen für das unreife, fetale Gehirn unter einer perinatalen Asphyxie hinreichend untersucht sind und somit
3. Nutzen und Risiko einer pränatalen Glukokortikoidtherapie für das Frühgeborene sinnvoll abgewogen werden können.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

**Anderson RE, Michenfelder JD, Sundt TM** (1980). Brain intracellular pH, blood flow, and blood-brain barrier differences with barbiturate and halothane anesthesia in the cat. *Anesthesiology* 52(3): 201-6.

**Antonow-Schlorke I, Kühn B, Müller T, Schubert H, Nathanielsz PW, Walter B, Schwab M** (2000). Effect of betamethasone treatment on microtubule association proteins MAP2 and MAP1B and myelinisation in fetal sheep. *J Soc Gynecol Invest* 7 (Suppl.): 109.

**Antonow-Schlorke I, Müller T, Schubert H, Wicher C, Schwab M** (2002). Betamethasone related acute alterations of brain microtubule associated proteins in the fetal sheep brain are independent of baseline plasma cortisol level. *Cesk Gynecol* 67(Suppl. 3): 3.

**Antonow-Schlorke I, Schwab M, Li C, Nathanielsz PW** (2003a). Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J Physiol* 547(Pt 1): 117-23.

**Antonow-Schlorke I, Herrmann A, Müller T, Anwar MA, Schubert H, Witte O, Schwab M** (2003b). Betamethasone (BM) exposure increases hippocampal neuronal necrosis after repeated umbilical cord occlusion (UCO) in fetal sheep. in *28th Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society*. Banff, Canada.

**Anwar MA, Schwab M, Poston L, Nathanielsz PW** (1999). Betamethasone-mediated vascular dysfunction and changes in hematological profile in the ovine fetus. *Am J Physiol* 276(4 Pt 2): H1137-43.

**Armstead WM, Zuckerman SL, Shibata M, Parfenova H, Leffler CW** (1994). Different pial arteriolar responses to acetylcholine in the newborn and juvenile pig. *J Cereb Blood Flow Metab* 14(6): 1088-95.

**Arnold SE & Trojanowski JQ** (1996). Human fetal hippocampal development: II. The neuronal cytoskeleton. *J Comp Neurol* 367(2): 293-307.

**Ashwal S, Dale PS, Longo LD** (1984). Regional cerebral blood flow: studies in the fetal lamb during hypoxia, hypercapnia, acidosis, and hypotension. *Pediatr Res* 18(12): 1309-16.

**Astrom KE** (1967). On the early development of the isocortex in fetal sheep. *Prog Brain Res* 26: 1-59.

**Ballard PL & Ballard RA** (1995). Scientific basis and therapeutic regimens for use of antenatal glucocorticoids. *Am J Obstet Gynecol* 173(1): 254-62.

**Banks BA, Cnaan A, Morgan MA, Parer JT, Merrill JD, Ballard PL, Ballard RA** (1999). Multiple courses of antenatal corticosteroids and outcome of premature neonates. North American Thyrotropin-Releasing Hormone Study Group. *Am J Obstet Gynecol* 181(3): 709-17.

**Barker DJ** (1998). In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 95(2): 115-28.

**Barrington KJ** (2001). The adverse neuro-developmental effects of postnatal steroids in the preterm infant: a systematic review of RCTs. *BMC Pediatr* 1(1): 1.

**Baud O, Foix-L'Heliass L, Kaminski M, Audibert F, Jarreau PH, Papiernik E, Huon C, Lepercq J, Dehan M, Lacaze-Masmonteil T** (1999). Antenatal glucocorticoid treatment and cystic periventricular leukomalacia in very premature infants. *N Engl J Med* 341(16): 1190-6.

**Bauder FH, von Siebenthal K, Bucher HU** (2000). [Ultrasonically established cystic periventricular leukomalacia (PVL): incidence and associated factors in Switzerland 1995-1997]. *Z Geburtshilfe Neonatol* 204(2): 68-73.

- Baumbach GL & Heistad DD** (1983). Effects of sympathetic stimulation and changes in arterial pressure on segmental resistance of cerebral vessels in rabbits and cats. *Circ Res* 52(5): 527-33.
- Bazin JE** (1997). Effects of anesthetic agents on intracranial pressure. *Ann Fr Anesth Reanim* 16(4): 445-52.
- Benders MJ, Dorrepaal CA, van de Bor M, van Bel F** (1995). Acute effects of indomethacin on cerebral hemodynamics and oxygenation. *Biol Neonate* 68(2): 91-9.
- Bershady AD & Vasiliev JM** (1989). *Cytoskeleton*. Plenum Press, New York
- Bevan RD & Tsuru H** (1981). Functional and structural changes in the rabbit ear artery after sympathetic denervation. *Circ Res* 49(2): 478-85.
- Bevan RD, Tsuru H, Bevan JA** (1983). Cerebral artery mass in the rabbit is reduced by chronic sympathetic denervation. *Stroke* 14(3): 393-6.
- Bishai JM, Blood AB, Hunter CJ, Longo LD, Power GG** (2003). Fetal lamb cerebral blood flow (CBF) and oxygen tensions during hypoxia: a comparison of laser Doppler and microsphere measurements of CBF. *J Physiol* 546(Pt 3): 869-78.
- Blair E & Stanley FJ** (1988). Intrapartum asphyxia: a rare cause of cerebral palsy. *J Pediatr* 112(4): 515-9.
- Blajchman MA, Senyi AF, Hirsh J, Surya Y, Buchanan M, Mustard JF** (1979). Shortening of the bleeding time in rabbits by hydrocortisone caused by inhibition of prostacyclin generation by the vessel wall. *J Clin Invest* 63(5): 1026-35.
- Blomgren K, McRae A, Bona E, Saido TC, Karlsson JO, Hagberg H** (1995). Degradation of fodrin and MAP 2 after neonatal cerebral hypoxic-ischemia. *Brain Res* 684(2): 136-42.
- Blondel B, Kogan MD, Alexander GR, Dattani N, Kramer MS, Macfarlane A, Wen SW** (2002). The impact of the increasing number of multiple births on the rates of preterm birth and low birthweight: an international study. *Am J Public Health* 92(8): 1323-30.
- Boddy K, Dawes GS, Fisher R, Pinter S, Robinson JS** (1974). Foetal respiratory movements, electrocortical and cardiovascular responses to hypoxaemia and hypercapnia in sheep. *J Physiol Lond* 243(3): 599-618.
- Bohn MC, Goldstein M, Black IB** (1982). Expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in rat sympathetic ganglia and extra-adrenal chromaffin tissue. *Dev Biol* 89(2): 299-308.
- Buchanan JE & Phillis JW** (1993). The role of nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow. *Brain Res* 610(2): 248-55.
- Buckberg GD, Luck JC, Payne DB, Hoffman JI, Archie JP, Fixler DE** (1971). Some sources of error in measuring regional blood flow with radioactive microspheres. *J Appl Physiol* 31(4): 598-604.
- Cabanas F, Pellicer A, Garcia Alix A, Quero J, Stiris TA** (1997). Effect of dexamethasone therapy on cerebral and ocular blood flow velocity in premature infants studied by colour Doppler flow imaging. *Eur J Pediatr* 156(1): 41-6.
- Canterino JC, Verma U, Visintainer PF, Elimian A, Klein SA, Tejani N** (2001). Antenatal steroids and neonatal periventricular leukomalacia. *Obstet Gynecol* 97(1): 135-9.
- Celsi G, Kistner A, Aizman R, Eklof AC, Ceccatelli S, de Santiago A, Jacobson SH** (1998). Prenatal dexamethasone causes oligonephronia, sodium retention, and higher blood pressure in the offspring. *Pediatr Res* 44(3): 317-22.
- Challis JR & Brooks AN** (1989). Maturation and activation of hypothalamic-pituitary adrenal function in fetal sheep. *Endocr Rev* 10(2): 182-204.

- Chemtob S, Beharry K, Rex J, Varma DR, Aranda JV** (1990). Prostanoids determine the range of cerebral blood flow autoregulation of newborn piglets. *Stroke* 21(5): 777-84.
- Chemtob S, Li DY, Abran D, Peri KG, Varma DR** (1996). Regulation of cerebrovascular prostaglandin E2 (PGE2) and PGF2 alpha receptors and their functions during development. *Semin Perinatol* 20(3): 164-72.
- Ciaranello RD, Jacobowitz D, Axelrod J** (1973). Effect of dexamethasone on phenylethanolamine N-methyltransferase in chromaffin tissue of the neonatal rat. *J Neurochem* 20(3): 799-805.
- Cohlen BJ, Stigter RH, Derks JB, Mulder EJ, Visser GH** (1996). Absence of significant hemodynamic changes in the fetus following maternal betamethasone administration. *Ultrasound Obstet Gynecol* 8(4): 252-5.
- Colditz PB, Bartholomew PH, Sinclair JI, Murphy D, Rolfe P, Wilkinson AR** (1993). Electrical impedance plethysmography: its use in studying the cerebral circulation of the rabbit. *Med Biol Eng Comput* 31(1): 39-42.
- Crowley P** (1995). Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials, 1972-1994. *Am J Obstet Gynecol* 173: 322-335.
- Crutchley DJ, Ryan US, Ryan JW** (1985). Glucocorticoid modulation of prostacyclin production in cultured bovine pulmonary endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 233(3): 650-5.
- Dahlgren N, Nilsson B, Sakabe T, Siesjo BK** (1981). The effect of indomethacin on cerebral blood flow and oxygen consumption in the rat at normal and increased carbon dioxide tensions. *Acta Physiol Scand* 111(4): 475-85.
- Dawes GS, Johnston BM, Walker DW** (1980). Relationship of arterial pressure and heart rate in fetal, new-born and adult sheep. *J Physiol* 309: 405-17.
- De Caterina R & Weksler BB** (1986). Modulation of arachidonic acid metabolism in human endothelial cells by glucocorticoids. *Thromb Haemost* 55(3): 369-74.
- Demarini S, Dollberg S, Hoath SB, Ho M, Donovan EF** (1999). Effects of antenatal corticosteroids on blood pressure in very low birth weight infants during the first 24 hours of life. *J Perinatol* 19(6): 419-25.
- Derks JB, Mulder EJ, Visser GH** (1995). The effects of maternal betamethasone administration on the fetus. *Br J Obstet Gynaecol* 102(1): 40-6.
- Derks JB, Giussani DA, Jenkins SL, Wentworth RA, Visser GH, Padbury JF, Nathanielsz PW** (1997). A comparative study of cardiovascular, endocrine and behavioural effects of betamethasone and dexamethasone administration to fetal sheep. *J Physiol Lond* 499(Pt 1): 217-26.
- Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, Pulsinelli W** (1989). Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by Laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 589-596.
- Dobbing J & Sands J** (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3(1): 79-83.
- Docherty CC, Kalmar-Nagy J, Engelen M, Nathanielsz PW** (2001). Development of fetal vascular responses to endothelin-1 and acetylcholine in the sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280(2): R554-62.
- Dodic M & Wintour EM** (1994). Effects of prolonged (48 h) infusion of cortisol on blood pressure, renal function and fetal fluids in the immature ovine foetus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21(12): 971-80.
- Dodic M, May CN, Wintour EM, Coghlan JP** (1998). An early prenatal exposure to excess glucocorticoid leads to hypertensive offspring in sheep. *Clin Sci* 94 (2): 149-155.

- Dole N, Savitz DA, Hertz-Picciotto I, Siega-Riz AM, McMahon MJ, Buekens P** (2003). Maternal stress and preterm birth. *Am J Epidemiol* 157(1): 14-24.
- Doyle P, Guillaume Gentil C, Rohner Jeanrenaud F, Jeanrenaud B** (1994). Effects of corticosterone administration on local cerebral glucose utilization of rats. *Brain Res* 645(1-2): 225-30.
- Drummond JC, Scheller MS, Todd MM** (1987). The effect of nitrous oxide on cortical cerebral blood flow during anesthesia with halothane and isoflurane, with and without morphine, in the rabbit. *Anesth Analg* 66(11): 1083-9.
- Dumont I, Peri KG, Hardy P, Hou X, Martinez-Bermudez AK, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S** (1998). PGE<sub>2</sub>, via EP<sub>3</sub> receptors, regulates brain nitric oxide synthase in the perinatal period. *Am J Physiol* 275(6 Pt 2): R1812-21.
- Dumont I, Hou X, Hardy P, Peri KG, Beauchamp M, Najarian T, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S** (1999). Developmental regulation of endothelial nitric oxide synthase in cerebral vessels of newborn pig by prostaglandin E<sub>2</sub>. *J Pharmacol Exp Ther* 291(2): 627-33.
- Edwards A, Baker LS, Wallace EM** (2002). Changes in fetoplacental vessel flow velocity waveforms following maternal administration of betamethasone. *Ultrasound Obstet Gynecol* 20(3): 240-4.
- Elimian A, Verma U, Canterino J, Shah J, Visintainer P, Tejani N** (1999). Effectiveness of antenatal steroids in obstetric subgroups. *Obstet Gynecol* 93(2): 174-9.
- Emig U** (1996). Einfluß einer Myoglobinämie auf die Durchblutung verschiedener Organe unter hämorrhagischer Hypotension: eine Untersuchung an der narkotisierten Ratte mit Hilfe fluochrommarkierter Mikrosphären. *Dissertationsschrift*. Georg-August-Universität, Göttingen.
- Endo Y, Jinnai K, Endo M, Fujita K, Kimura F** (1990). Diurnal variation of cerebral blood flow in rat hippocampus. *Stroke* 21(10): 1464-9.
- Endo Y, Nishimura J, Kimura F** (1994). Adrenalectomy increases local cerebral blood flow in the rat hippocampus. *Pflugers Arch* 426(3-4): 183-8.
- Endo Y, Nishimura JI, Kobayashi S, Kimura F** (1997). Long-term glucocorticoid treatments decrease local cerebral blood flow in the rat hippocampus, in association with histological damage. *Neuroscience* 79(3): 745-52.
- Esplin MS, Fausett MB, Smith S, Oshiro BT, Porter TF, Branch DW, Varner MW** (2000). Multiple courses of antenatal steroids are associated with a delay in long-term psychomotor development in children with birth weights  $\leq 1,500$  grams. *Am J Obstet Gynecol* 182: S24.
- Eyre JT, Essex TJH, Flecknell PA, Bartholomew PH, Sinclair JI** (1988). A comparison of measurements of cerebral blood flow in the rabbit using laser-Dopplerspectroscopy and radionuclide labeled microspheres. *Clin Phys Physiol Meas* 9: 65-74.
- Fabricius M & Lauritzen M** (1996). Laser-Doppler evaluation of rat brain microcirculation: comparison with the [<sup>14</sup>C]-iodoantipyrine method suggests discordance during cerebral blood flow increases. *J Cereb Blood Flow Metab* 16(1): 156-61.
- Faraci FM & Heistad DD** (1998). Regulation of the cerebral circulation: Role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev* 78 (1): 53-97.
- Figuroa JP, Zhang J, Green J, Rose JC, Massmann GA** (1999). Regional differences on the effects of chronic cortisol administration on PGHS-2 in fetal sheep brain. *J Gynecol Inv* 6(Suppl.): 181A.
- Florence G & Seylaz J** (1992). Rapid autoregulation of cerebral blood flow: A Laser-Doppler Flowmetry study. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 674-680.

- Fraser M & Liggins GC** (1989). The effect of cortisol on thyroid hormone kinetics in the ovine fetus. *J Dev Physiol* 11(4): 207-11.
- Gardner DS, Jackson AA, Langley Evans SC** (1997). Maintenance of maternal diet-induced hypertension in the rat is dependent on glucocorticoids. *Hypertension* 30(6): 1525-30.
- Gervais R, Durkin TP, Levy F, Gervais M** (1999). Systemic and regional hemodynamics assessment in rats with fluorescent microspheres. *Behav Neurosci* 113(1): 136-42.
- Gleason CA, Hamm C, Jones MD, Jr.** (1989). Cerebral blood flow, oxygenation, and carbohydrate metabolism in immature fetal sheep in utero. *Am J Physiol* 256(6 Pt 2): R1264-8.
- Glenny RW, Bernard S, Brinkley M** (1993). Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol* 74(5): 2585-97.
- Goppelt-Strube M** (1997). Molecular mechanisms involved in the regulation of prostaglandin biosynthesis by glucocorticoids. *Biochem Pharmacol* 53(10): 1389-95.
- Haberl RL, Heizer ML, Marmarou A, Ellis EF** (1989). Laser-Doppler assessment of brain microcirculation: effect of systemic alterations. *Am J Physiol* 256(4 Pt 2): H1247-54.
- Hakkinen JP, Miller MW, Smith AH, Knight DR** (1995). Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat. *Cardiovasc Res* 29(1): 74-9.
- Hale SL, Vivaldi MT, Kloner RA** (1986). Fluorescent microspheres: a new tool for visualization of ischemic myocardium in rats. *Am J Physiol* 251(4 Pt 2): H863-8.
- Hanson MA** (1995). The control of heart rate and blood pressure in the fetus: theoretical considerations. in: *Fetus and Neonate, Physiology and Clinical Applications*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1-22.
- Hardy P, Nuyt AM, Dumont II, Peri KG, Hou X, Varma DR, Chemtob S** (1999). Developmentally increased cerebrovascular NO in newborn pigs curtails cerebral blood flow autoregulation. *Pediatr Res* 46(4): 375-82.
- Helou S, Koehler R, Gleason C, Jones DM, Traystman RJ** (1994). Cerebrovascular autoregulation during fetal development in sheep. *Am J Physiol* 266: H1069-H1074.
- Hoet JJ & Hanson MA** (1999). Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol Lond* 514(Pt 3): 617-27.
- Hubler M, Souders JE, Shade ED, Hlastala MP, Polissar NL, Glenny RW** (1999). Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of relative blood flow in severely injured lungs. *J Appl Physiol* 87(6): 2381-5.
- Iadecola C** (1993). Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci* 16(6): 206-14.
- Ipsiroglu OS, Kohler J, Meger B, Pumberger W, Grabner C, Semsroth M** (2000). Orthostasis in halothane anesthesia. A model situation for studying cerebrovascular autoregulation in infants. *Anaesthesist* 49(6): 511-5.
- Jakobsson A & Nilsson GE** (1993). Prediction of sampling depth and photon pathlength in laser Doppler flowmetry. *Med Biol Eng Comput* 31(3): 301-7.
- Jasper MS, McDermott P, Gann DS, Engeland WC** (1990). Measurement of blood flow to the adrenal capsule, cortex and medulla in dogs after hemorrhage by fluorescent microspheres. *J Auton Nerv Syst* 30(2): 159-67.
- Jobe AH, Wada N, Berry LM, Ikegami M, Ervin MG** (1998). Single and repetitive maternal glucocorticoid exposures reduce fetal growth in sheep. *Am J Obstet Gynecol* 178(5): 880-5.
- Johnson GV & Jope RS** (1992). The role of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in neuronal growth, plasticity and degeneration. *J Neurosci Res* 33: 505-512.

- Jones SA, Adamson SL, Bishai I, Lees J, Engelberts D, Coceani F** (1993). Eicosanoids in third ventricular cerebrospinal fluid of fetal and newborn sheep. *Am J Physiol* 264(1 Pt 2): R135-42.
- Jones SC, Radinsky CR, Furlan AJ, Chyatte D, Perez Trepichio AD** (1999). Cortical NOS inhibition raises the lower limit of cerebral blood flow-arterial pressure autoregulation. *Am J Physiol* 276(4 Pt 2): 0002-9513.
- Jorch G** (1993). [Periventricular leukomalacia]. *Monatsschr Kinderheilkd* 141(7): 567-72.
- Kadekaro M, Ito M, Gross PM** (1988). Local cerebral glucose utilization is increased in acutely adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology* 47(4): 329-34.
- Kansen M, van Gageldonk PG, van den Berghe N, Galjaard H, Bijman J, de Jonge HR, Kanse SM** (1991). Production of endothelin by vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 266(4): 2036-40.
- Kari MA, Hallman M, Eronen M, Teramo K, Virtanen M, Koivisto M, Ikonen RS** (1994). Prenatal dexamethasone treatment in conjunction with rescue therapy of human surfactant: a randomized placebo-controlled multicenter study. *Pediatrics* 93(5): 730-6.
- Karimova A & Pinsky DJ** (2001). The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications. *Intensive Care Med* 27(1): 19-31.
- Kennedy B, Elayan H, Ziegler MG** (1993). Glucocorticoid hypertension and nonadrenal phenylethanolamine N-methyltransferase. *Hypertension* 21(4): 415-9.
- Kitanaka T, Alonso JG, Gilbert RD, Siu BL, Clemons GK, Longo LD** (1989). Fetal responses to long-term hypoxemia in sheep. *Am J Physiol* 256(6 Pt 2): R1348-54.
- Knaus P, Betz H, Rehm H** (1986). Expression of synaptophysin during postnatal development of the mouse brain. *J Neurochem* 47(4): 1302-4.
- Kowallik P, Schulz R, Guth BD, Schade A, Paffhausen W, Gross R, Heusch G** (1991). Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres. *Circulation* 83(3): 974-82.
- Kream J, Mulay S, Fukushima DK, Solomon S** (1983). Determination of plasma dexamethasone in the mother and the newborn after administration of the hormone in a clinical trial. *J Clin Endocrinol Metabol* 56: 127-133.
- Lan J, Hunter CJ, Murata T, Power GG** (2000). Adaptation of laser-Doppler flowmetry to measure cerebral blood flow in the fetal sheep. *J Appl Physiol* 89: 1065-1071.
- Landgraf R, Mitro A, Hess J** (1978). Regional net uptake of <sup>14</sup>C-glucose by rat brain under the influence of corticosterone. *Endocrinol Exp* 12(2): 119-29.
- Langley Evans SC** (1997). Intrauterine programming of hypertension by glucocorticoids. *Life Sci* 60(15): 1213-21.
- Leffler CW & Busija DW** (1987). Arachidonic acid metabolites and perinatal cerebral hemodynamics. *Semin Perinatol* 11(1): 31-42.
- Leffler CW, Mirro R, Pharris LJ, Shibata M** (1994). Permissive role of prostacyclin in cerebral vasodilation to hypercapnia in newborn pigs. *Am J Physiol* 267(1 Pt 2): H285-91.
- Leffler CW** (1997). Prostanoids: Intrinsic modulators of cerebral circulation. *News Physiol Sci*. 12: 72-77.
- Leviton A, Kuban KC, Pagano M, Allred EN, Van Marter L** (1993). Antenatal corticosteroids appear to reduce the risk of postnatal germinal matrix hemorrhage in intubated low birth weight newborns. *Pediatrics* 91(6): 1083-8.

- Levitt NS, Lindsay RS, Holmes MC, Seckl JR** (1996). Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology* 64(6): 412-8.
- Li DY, Varma DR, Chemtob S** (1995). Up-regulation of brain PGE2 and PGF2 alpha receptors and receptor-coupled second messengers by cyclooxygenase inhibition in newborn pigs. *J Pharmacol Exp Ther* 272(1): 15-9.
- Liggins GC** (1969). Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol* 45(4): 515-23.
- Liggins GC & Howie RN** (1972). A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 50(4): 515-25.
- Liggins GC** (1994). The role of cortisol in preparing the fetus for birth. *Reprod Fertil Dev* 6(2): 141-50.
- Lindsberg PJ, Hallenbeck JM, Feuerstein GZ** (1989). Validation of laser-Doppler flowmetry in measurement of spinal cord blood flow. *J Cereb Blood Flow Metabol* 9(6): 902-5.
- Lou HC** (1993). On the pathogenesis of germinal layer hemorrhage in the neonate. *APMIS Suppl.* 40: 97-102.
- Lou HC** (1994). Hypoxic-hemodynamic pathogenesis of brain lesions in the newborn. *Brain Dev* 16: 423-431.
- MacDorman MF, Minino AM, Strobino DM, Guyer B** (2002). Annual summary of vital statistics--2001. *Pediatrics* 110(6): 1037-52.
- Magyar DM, Fridshal D, Elsner CW, Glatz T, Eliot J, Klein AH, Lowe KC, Buster JE, Nathanielsz PW** (1980). Time-trend analysis of plasma cortisol concentrations in the fetal sheep in relation to parturition. *Endocrinology* 107(1): 155-9.
- Malinak C & Silverstein FS** (1996). Hypoxic-ischemic injury acutely disrupts microtubule-associated protein 2 immunostaining in neonatal rat brain. *Biol Neonate* 69(4): 257-67.
- Masferrer JL & Seibert K** (1994). Regulation of prostaglandin synthesis by glucocorticoids. *Receptor* 4(1): 25-30.
- Masliah E, Terry RD, Alford M, DeTeresa R** (1990). Quantitative immunohistochemistry of synaptophysin in human neocortex: an alternative method to estimate density of presynaptic terminals in paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 38(6): 837-44.
- McIntosh GH, Baghurst KI, Potter BJ, Hetzel BS** (1979). Foetal brain development in the sheep. *Neuropathol Appl Neurobiol* 5(2): 103-14.
- Meadow W, Rudinsky B, Bell A, Lozon M, Randle C, Hips R** (1994). The role of prostaglandins and endothelium-derived relaxation factor in the regulation of cerebral blood flow and cerebral oxygen utilization in the piglet: operationalizing the concept of an essential circulation. *Pediatr Res* 35(6): 649-56.
- Modi N, Lewis H, Al-Naqeeb N, Ajayi-Obe M, Dore CJ, Rutherford M** (2001). The effects of repeated antenatal glucocorticoid therapy on the developing brain. *Pediatr Res* 50(5): 581-5.
- Moftaquir Handaj A, Jafari S, Boutroy MJ** (1999). Neonatal catecholamine content of adrenal and extra-adrenal chromaffin tissue after prenatal exposure to dexamethasone. *Pediatr Res* 45(1): 60-5.
- Moore KE & Phillipson OT** (1975). Effects of dexamethasone on phenylethanolamine N-methyltransferase and adrenaline in the brains and superior cervical ganglia of adult and neonatal rats. *J Neurochem* 25(3): 289-94.

**Mulder EJ, Derks JB, Zonneveld MF, Bruinse HW, Visser GH** (1994). Transient reduction in fetal activity and heart rate variation after maternal betamethasone administration. *Early Hum Dev* 36(1): 49-60.

**Munck A** (1971). Glucocorticoid inhibition of glucose uptake by peripheral tissues: old and new evidence, molecular mechanisms, and physiological significance. *Perspect Biol Med* 14(2): 265-9.

**Müller T, Löhle M, Schubert H, Bauer R, Wicher C, Antonow-Schlorke I, Sliwka U, Nathanielsz PW, Schwab M** (2002). Developmental changes in cerebral autoregulatory capacity in the fetal sheep parietal cortex. *J Physiol (London)* 539(3): 957-967.

**Nathanielsz PW, Bailey A, Poore ER, Thorburn GD, Harding R** (1980). The relationship between myometrial activity and sleep state and breathing in fetal sheep throughout the last third of gestation. *Am J Obstet Gynecol* 138: 653-59.

**Navone F, Jahn R, Di Gioia G, Stukenbrok H, Greengard P, De Camilli P** (1986). Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J Cell Biol* 103(6 Pt 1): 2511-27.

**NIH** (1995). Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. NIH Consensus Development Panel on the Effect of Corticosteroids for Fetal Maturation on Perinatal Outcomes. *JAMA* 273: 413-8.

**NIH** (2000). Antenatal corticosteroids revisited: repeat courses. *NIH Consens Statement* 17(2): 1-18.

**Norman LJ & Challis JR** (1987). Synergism between systemic corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin release in vivo varies as a function of gestational age in the ovine fetus. *Endocrinology* 120(3): 1052-8.

**Northington FJ, Tobin JR, Harris AP, Traystman RJ, Koehler RC** (1997). Developmental and regional differences in nitric oxide synthase activity and blood flow in the sheep brain. *J Cereb Blood Flow Metabol* 17(1): 109-15.

**Ohlsson A, Bottu J, Govan J, Ryan ML, Myhr T, Fong K** (1994). The effect of dexamethasone on time averaged mean velocity in the middle cerebral artery in very low birth weight infants. *Eur J Pediatr* 153(5): 363-6.

**Ong BY, MacIntyre C, Bose D, Palahniuk RJ** (1986). Comparison of two methods of altering blood pressures for assessing neonatal cerebral blood flow autoregulation. *Can J Physiol Pharmacol* 64(7): 1023-6.

**Ota A, Ikeda T, Ikenoue T, Toshimori K** (1997). Sequence of neuronal responses assessed by immunohistochemistry in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia. *Am J Obstet Gynecol* 177(3): 519-26.

**Padbury JF, Polk DH, Ervin MG, Berry LM, Ikegami M, Jobe AH** (1995). Postnatal cardiovascular and metabolic responses to a single intramuscular dose of betamethasone in fetal sheep born prematurely by cesarean section. *Pediatr Res* 38(5): 709-15.

**Papile LA, Rudolph AM, Heymann MA** (1985). Autoregulation of cerebral blood flow in the preterm fetal lamb. *Pediatr Res* 19(2): 159-61.

**Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L** (1990). Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 2(2): 161-92.

**Peri KG, Hardy P, Li DY, Varma DR, Chemtob S** (1995). Prostaglandin G/H synthase-2 is a major contributor of brain prostaglandins in the newborn. *J Biol Chem* 270(41): 24615-20.

**Petersen MC, Nation RL, Asheley JJ, McBride WG** (1980). The placental transfer of betamethasone. *Eur J Clin Pharmacol* 18: 245-247.

- Piecuch RE, Leonard CH, Cooper BA, Sehring SA** (1997). Outcome of extremely low birth weight infants (500 to 999 grams) over a 12-year period. *Pediatrics* 100(4): 633-9.
- Prinzen FW & Glenny RW** (1994). Developments in non-radioactive microsphere techniques for blood flow measurement. *Cardiovasc Res* 28(10): 1467-75.
- Provencher PH, Saltis J, Funder JW** (1995). Glucocorticoids but not mineralocorticoids modulate endothelin-1 and angiotensin II binding in SHR vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52(3): 219-25.
- Purves MJ & James IM** (1969). Observations on the control of cerebral blood flow in the sheep fetus and newborn lamb. *Circ Res* 25(6): 651-67.
- Reddy K, Mallard C, Guan J, Marks K, Bennet L, Gunning M, Gunn A, Gluckman P, Williams C** (1998). Maturation change in the cortical response to hypoperfusion injury in the fetal sheep. *Pediatr Res* 43(5): 674-82.
- Rehm H, Wiedenmann B, Betz H** (1986). Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO J* 5(3): 535-41.
- Reynolds ML, Evans CA, Reynolds EO, Saunders NR, Durbin GM, Wigglesworth JS** (1979). Intracranial haemorrhage in the preterm sheep fetus. *Early Hum Dev* 3(2): 163-86.
- Roedel M** (2002). Akute Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die Hirndurchblutung und die elektrokortikale Hirnfunktion beim fetalen Schaf in utero. *Dissertationsschrift*. Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Rotmensch S, Liberati M, Celentano C, Efrat Z, Bar-Hava I, Kovo M, Golan A, Moravski G, Ben-Rafael Z** (1999). The effect of betamethasone on fetal biophysical activities and Doppler velocimetry of umbilical and middle cerebral arteries. *Acta Obstet Gynecol Scand* 78(9): 768-73.
- Rubanyi GM & Botelho LH** (1991). Endothelins. *FASEB J* 5(12): 2713-20.
- Rudolph AM & Heymann MA** (1967). The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ Res* 21(2): 163-84.
- Russo Marie F** (1990). Glucocorticoid control of eicosanoid synthesis. *Semin Nephrol* 10(4): 421-9.
- Saito S, Wilson DA, Hanley DF, Traystman RJ** (1994). Nitric oxide synthase does not contribute to cerebral autoregulatory phenomenon in anesthetized dogs. *J Auton Nerv Syst* 49(6): S73-6.
- Saruta T** (1996). Mechanism of glucocorticoid-induced hypertension. *Hypertens Res* 19(1): 1-8.
- Schmidt R & Thews G** (1997). Kortisolspiegelschwankungen. in: *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York. 393-4.
- Schwab M, Roedel M, Anwar MA, Müller T, Schubert H, Buchwalder LF, Walter B, Nathanielsz PW** (2000). Effects of betamethasone administration to the fetal sheep in late gestation on fetal cerebral blood flow. *J Physiol (London)* 528(3): 619-632.
- Schwab M, Antonow-Schlorke I, Kühn B, Müller T, Schubert H, Walter B, Sliwka U, Nathanielsz PW** (2001). Effect of antenatal betamethasone treatment on microtubule associated proteins MAP1B and MAP2 in fetal sheep. *J Physiol (London)* 530(3): 497-506.
- Schwab M, Schmidt K, Roedel M, Müller T, Schubert H, Anwar MA, Nathanielsz PW** (2001). Non-linear changes of electrocortical activity after antenatal betamethasone treatment in fetal sheep. *J Physiol (London)* 531(2): 535-543.
- Segar JL, Lumbers ER, Nuyt AM, OJ SM, Robillard JE** (1998). Effect of antenatal glucocorticoids on sympathetic nerve activity at birth in preterm sheep. *Am J Physiol* 43 (1): R160-R167.

- Senat MV, Minoui S, Multon O, Fernandez H, Frydman R, Ville Y** (1998). Effect of dexamethasone and betamethasone on fetal heart rate variability in preterm labour: a randomised study. *Br J Obstet Gynaecol* 105(7): 749-55.
- Sessa WC & Nasjletti A** (1990). Dexamethasone selectively attenuates prostanoid-induced vasoconstrictor responses in vitro. *Circ Res* 66(2): 383-8.
- Shinozuka N & Nathanielsz PW** (1998). Electrocardiac activity in fetal sheep in the last seven days of gestation. *J Physiol (Lond)* 513(Pt 1): 273-81.
- Skarphedinsson JO, Harding H, Thoren P** (1988). Repeated measurements of cerebral blood flow in rats. Comparisons between the hydrogen clearance method and Laser Doppler flowmetry. *Acta Physiol Scand* 134: 133-142.
- Stange K, Lagerkranser M, Sollevi A** (1991). Nitroprusside-induced hypotension and cerebrovascular autoregulation in the anesthetized pig. *Anesth Analg* 73(6): 745-52.
- Stern MD, Lappe DL, Bowen PD, Chimosky JE, al. e** (1977). Continuous measurement of tissue blood flow by Laser-Doppler spectroscopy. *Am J Physiol* 232(4): H441-H448.
- Szymonowicz W, Walker AM, Cussen L, Cannata J, Yu VY** (1988). Developmental changes in regional cerebral blood flow in fetal and newborn lambs. *Am J Physiol* 254(1 Pt 2): H52-8.
- Szymonowicz W, Walker AM, Yu VY, Stewart ML, Cannata J, Cussen L** (1990). Regional cerebral blood flow after hemorrhagic hypotension in the preterm, near-term, and newborn lamb. *Pediatr Res* 28(4): 361-6.
- Tangalakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoles MK, Wintour EM** (1992). Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Exp Physiol* 77(5): 709-17.
- Thomas AL, Krane EJ, Nathanielsz PW** (1978). Changes in the fetal thyroid axis after induction of premature parturition by low dose continuous intravascular cortisol infusion to the fetal sheep at 130 days of gestation. *Endocrinology* 103(1): 17-23.
- Tough SC, Newburn-Cook C, Johnston DW, Svenson LW, Rose S, Belik J** (2002). Delayed childbearing and its impact on population rate changes in lower birth weight, multiple birth, and preterm delivery. *Pediatrics* 109(3): 399-403.
- Trautman PD, Meyer Bahlburg HF, Postelnek J, New MI** (1995). Effects of early prenatal dexamethasone on the cognitive and behavioral development of young children: results of a pilot study. *Psychoneuroendocrinology* 20(4): 439-49.
- Tsang MC, Lo AC, Cheung PT, Chung SS, Chung SK** (2001). Perinatal hypoxia-/ischemia-induced endothelin-1 mRNA in astrocyte-like and endothelial cells. *Neuroreport* 12(10): 2265-70.
- Tsutsui T, Maekawa T, Goodchild C, Jones JG** (1995). Cerebral blood flow distribution during induced hypotension with haemorrhage, trimetaphan or nitroprusside in rats. *Br J Anaesth* 74(6): 686-90.
- Tucker RP** (1990). The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Reviews* 15: 101-120.
- Tuor UI & Grewal D** (1994). Autoregulation of cerebral blood flow: influence of local brain development and postnatal age. *Am J Physiol* 267(6 Pt 2): H2220-8.
- Tuor UI, Yager JY, Bascaramurty S, DelBigio MR** (1997). Dexamethasone prevents hypoxia/ischemia-induced reductions in cerebral glucose utilization and high-energy phosphate metabolites in immature brain. *J Neurochem* 69: 1954-1963.
- Tweed WA, Cote J, Pash M, Lou H** (1983). Arterial oxygenation determines autoregulation of cerebral blood flow in the fetal lamb. *Pediatr Res* 17: 246-249.

- Unno N, Wong CH, Jenkins SL, Wentworth RA, Ding XY, Li C, Robertson SS, Smotherman WP, Nathanielsz PW** (1999). Blood pressure and heart rate in the ovine fetus: ontogenic changes and effects of fetal adrenalectomy. *Am J Physiol* 276(1 Pt 2): 0002-9513.
- Uno H, Eisele S, Sakai A, Shelton S, Baker E, DeJesus O, Holden J** (1994). Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm Behav* 28(4): 336-48.
- van Bel F, Sola A, Roman C, Rudolph AM** (1997). Perinatal regulation of the cerebral circulation: role of nitric oxide and prostaglandins. *Pediatr Res* 42(3): 299-304.
- Van Oosterhout MF, Willigers HM, Reneman RS, Prinzen FW** (1995). Fluorescent microspheres to measure organ perfusion: validation of a simplified sample processing technique. *Am J Physiol* 269(2 Pt 2): H725-33.
- Van Oosterhout MF, Prinzen FW, Sakurada S, Glenn RW, Hales JR** (1998). Fluorescent microspheres are superior to radioactive microspheres in chronic blood flow measurements. *Am J Physiol* 275(1 Pt 2): H110-5.
- Vannucci RC** (1995). Perinatal hypoxic/ischemic encephalopathy. *Neurologist* 1: 35-52.
- Vannucci RC, Towfighi J, Heitjan DF, Brucklacher RM** (1995). Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxic-ischemic damage: an experimental study in the immature rat. *Pediatrics* 95(6): 868-74.
- Viereck C, Tucker RP, Binder LI, Matus A** (1988). Phylogenetic conservation of brain microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *Neuroscience* 26(3): 893-904.
- Volpe JJ** (1997). Brain injury in the premature infant--from pathogenesis to prevention. *Brain Dev* 19(8): 519-34.
- Wagerle LC & Mishra OP** (1988). Mechanism of CO<sub>2</sub> response in cerebral arteries of the newborn pig: role of phospholipase, cyclooxygenase, and lipoxygenase pathways. *Circ Res* 62(5): 1019-26.
- Wagerle LC, Kurth CD, Roth RA** (1990). Sympathetic reactivity of cerebral arteries in developing fetal lamb and adult sheep. *Am J Physiol* 258(5 Pt 2): 0002-9513.
- Wagerle LC, DeGiulio PA, Mishra OP, Delivoria Papadopoulos M** (1991). Effect of dexamethasone on cerebral prostanoid formation and pial arteriolar reactivity to CO<sub>2</sub> in newborn pigs. *Am J Physiol* 260(4 Pt 2): H1313-8.
- Wallerath T, Witte K, Schafer SC, Schwarz PM, Prellwitz W, Wohlfart P, Kleinert H, Lehr HA, Lemmer B, Forstermann U** (1999). Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(23): 13357-62.
- Walter B, Bauer R, Gaser E, Zwiener U** (1997). Validation of the multiple colored microsphere technique for regional blood flow measurements in newborn piglets. *Basic Res Cardiol* 92(3): 191-200.
- Wan DC & Livett BG** (1989). Induction of phenylethanolamine N-methyltransferase mRNA expression by glucocorticoids in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Eur J Pharmacol* 172(2): 107-15.
- Wang Q, Paulson OB, Lassen NA** (1992). Is autoregulation of cerebral blood flow in rats influenced by nitro-L-arginine, a blocker of the synthesis of nitric oxide? *Acta Physiol Scand* 145: 297-298.
- Weidenfeld J, Lysy J, Shohami E** (1987). Effect of dexamethasone on prostaglandin synthesis in various areas of the rat brain. *J Neurochem* 48(5): 1351-4.
- Whitworth JA, Schyvens CG, Zhang Y, Andrews MC, Mangos GJ, Kelly JJ** (2002). The nitric oxide system in glucocorticoid-induced hypertension. *J Hypertens* 20(6): 1035-43.

- Willis AP & Leffler CW** (1999). NO and prostanoids: age dependence of hypercapnia and histamine-induced dilations of pig pial arterioles. *Am J Physiol* 277(1 Pt 2): 0002-9513.
- Wong DL, Hayashi RJ, Ciaranello RD** (1985). Regulation of biogenic amine methyltransferases by glucocorticoids via S-adenosylmethionine and its metabolizing enzymes, methionine adenosyltransferase and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Brain Res* 330(2): 209-16.
- Wood CE, Cheung CY, Brace RA** (1987). Fetal heart rate, arterial pressure and blood volume responses to cortisol infusion. *Am J Physiol* 253(6 Pt 2): R904-9.
- Wood C, Schwab M, Coksaygen T, Nathanielsz P** (2003). Downregulation of prostaglandin endoperoxide synthase-2 gene expression by betamethasone in ovine fetal brain stem and cortex. *J Soc Gynecol Invest* 10 Suppl.: 764.
- Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad A, Fouron JC, Vazquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, Chemtob S** (1999). Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. *Clin Lab Med* 19(3): 675-90.
- Wurtman RJ & Axelrod J** (1966). Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. *J Biol Chem* 241(10): 2301-5.
- Yager JY & Thornhill JA** (1997). The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci Biobehav Rev* 21(2): 167-74.
- Zuckerman SL, Armstead WM, Hsu P, Shibata M, Leffler CW** (1996). Age dependence of cerebrovascular response mechanisms in domestic pigs. *Am J Physiol* 271(2 Pt 2): H535-40.

## **9 ANHANG**

### **9.1 Danksagung**

Besonderen Dank schulde ich meinem betreuenden Hochschullehrer, Herrn PD Dr. med. Matthias Schwab, der mir mit seinem Wissen und seiner Erfahrung stets hilfreich zur Seite stand.

Stellvertretend für die Mitarbeiter des Institutes für Versuchstierkunde der FSU Jena möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Harald Schubert und Herrn Dr. med. vet. Thomas Müller bedanken, ohne deren Hilfe die Durchführung der Versuche nicht möglich gewesen wäre.

Diese Arbeit wäre nicht zustande gekommen ohne den Zuspruch und die Unterstützung meiner Familie, der ich ebenfalls vom ganzen Herzen danke.

Jena, den 31.07.2003

Matthias Löhle

## 9.2 Lebenslauf

Name: Löhle, Matthias

Geburtsdatum: 29.04.1977

Geburtsort: Jena

Familienstand: ledig

Ausbildung:

1983-1984 Grundschule „Emil-Höllein“ Jena

1984-1989 POS „Emil Wölk“ Jena-Lobeda

1989-1991 Oberschule „Erich Weinert“ Jena

1991-1995 Angergymnasium Jena

1995 Abitur

1995-2002 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität,  
Jena

berufliche Tätigkeit:

ab 08/2003 Forschungstätigkeit an der University of Wyoming, Laramie, USA  
im Auftrag des Department of Obstetrics and Gynaecology der  
New York University School of Medicine

Jena, den 31.07.2003

Matthias Löhle

### 9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

daß ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

daß mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. med. habil. Matthias Schwab, Klinik für Neurologie, FSU Jena; Dr. med. vet. Thomas Müller, Institut für Versuchstierkunde, FSU Jena,

daß die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

daß ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 31.07.2003

Matthias Löhle