

Diplomarbeit

**MATERNO-FETALE LIPIDTRANSFERSTUDIEN MIT DER
DUALEN PERFUSION EINES HUMANEN PLAZENTA-
KOTYLEDONS**

eingereicht von

Sylvia Stöllinger

Matr.Nr.: 0433105

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

unter der Anleitung von Betreuer

Mag. Dr. rer. nat. Christian Wadsack

Graz, am 15.12.2009

Sylvia Stöllinger

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 15.12.2009

Sylvia Stöllinger

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Mag. Dr. Christian Wadsack für die Zeit seiner kompetenten, intensiven und liebenswürdigen Betreuung meiner Diplomarbeit und seiner Mitarbeiterin Susanne Kopp, die ihn beim Korrekturlesen unterstützte.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungen	6
Zusammenfassung	9
Abstract	10
A) Einführung.....	11
Die humane Plazenta.....	12
I) Entwicklung, anatomischer und histologischer Aufbau.....	12
II) Funktionen der Plazenta.....	14
1) Stoffaustausch	14
a) Diffusion	14
b) Erleichterte Diffusion	15
c) Aktiver Transport.....	15
d) Phago- und Pinozytose	15
e) Diapedese	15
2) Barrierefunktion.....	16
3) Stoffwechsel.....	16
4) Synthesefunktion	16
B) Methoden	17
C) Ergebnisse	20
I) Mögliche Untersuchungsmethoden der Plazenta	20
1) Die duale Perfusion der humanen Plazenta.....	20
a) Methode und Instrumentarium.....	21

b)	Einsatzgebiete.....	25
c)	Evaluationskriterien	26
d)	Grenzen und Limitationen	28
2)	Weitere In-vitro-Methoden	29
3)	In-vivo-Methoden	30
II)	Die duale Perfusion eines humanen Plazentakotyledons zur Untersuchung von (Lipid-) Austauschvorgängen.....	31
1)	Biochemische und physikalische Eigenschaften der Moleküle, die Einfluss auf deren Durchgängigkeit durch die Plazenta haben	31
2)	Mögliche Einflussgrößen auf den Transfer	33
a)	Flussrate.....	33
b)	Zirkulationssystem (offen/geschlossen)	35
c)	Shunts und unphysiologische Durchströmungsmuster.....	35
d)	Perfusionsdruck.....	35
e)	Perfusionsmedium.....	35
f)	Substanzen	36
g)	Sauerstoffkonzentration	36
h)	Perfusionsdauer	38
i)	Veränderungen der Plazentamorphologie.....	38
j)	Vaginalgeburt oder Sectio caesarea	39
k)	Metabolisierung einer Substanz in der Plazenta	39
3)	Lipidtransfer –Tabelle	40
D)	Diskussion.....	58
E)	Referenzen.....	68

Abbildungverzeichnis

Abbildung 1: Plazentakotyledon und materno-fetale Barriere.....	13
Abbildung 2: Mütterlicher und kindlicher Kreislauf	20
Abbildung 3: Umschlingen des fetalen Gefäßpaares.....	21
Abbildung 4: Kanülierung eines fetalen Gefäßes.....	22
Abbildung 5: Perfusionskammer.....	23
Abbildung 6: Einspannen des Präparats in die Perfusionskammer	23
Abbildung 7: Präparat in der Perfusionskammer fixiert.....	24
Abbildung 8: "Blasenfalle".....	25
Abbildung 9: Lipiddoppelschicht	31

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnis Literatursuche aus Pubmed und Web of Science	19
--	----

Abkürzungen

8-iso-PGF2 α : 8-Epimer des Prostaglandins F2 α

AA: Arachidonsäure

Az.: Anzahl der Plazenten in der Studie

art.: arteriell

Art.: Artikel

ATP: Adenosintriphosphat

BMI: body mass index

BSA: bovines Serumalbumin

BSP: Bromosulphthalein

CFI: Carboxyfluorescein

CO₂: Kohlendioxid

COX: Cyclooxygenase

CYP: Cytochrom P

DHA: Decosahexaensäure

DHEAS: Dehydroepiandrosteronsulfat

DM: Diabetes mellitus

DyLN: Dihomo- γ -Linolensäure

EPA: Eicosapentaensäure

Eq: Äquivalentgramm

ER: endoplasmatisches Retikulum

FABPs: fatty acid binding proteins

fet.: fetal

FS: Fettsäure

H₂O: Wasser

hCG: humanes Choriongonadotropin

HDL: high density lipoprotein

Hkt: Hämatokrit

hPL: humanes Plazentalaktogen

IDDM: insulin dependent diabetes mellitus

IgG-Ak: Immunglobulin G - Antikörper

IL: Interleukin

k.A.: keine Angaben
Konz.: Konzentration
Krl.: Kreislauf
LA: Linolsäure
LCPUFA: long-chain polyunsaturated fatty acids
LDL: Low density lipoprotein
L-NAME: N(G)-Nitro-Arginin-Methylester, ein NO-Synthasehemmer
LRP: LDL-receptor related protein
mat.: maternal
MP: Mikropartikel
MR: Magnetresonanz
M_r: Molekulargewicht
N: Anzahl
Na⁺: Natrium
NADPH: reduzierte Form von NADP=Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEFA: non-esterified fatty acids (unveresterte freie Fettsäuren)
NO: Stickstoffmonoxid
O₂: Sauerstoff
OA: Ölsäure
p22phox: Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase
PA: Palmitinsäure
PAPP-A: pregnancy associated plasma protein A
RAP: receptor related protein
ROS: reactive oxygen species
SA: Stearinsäure
SP₁: Schwangerschaft-spezifisches Protein 1
SS: Schwangerschaft
t-BHP: T-Butyl-Hydroperoxid
TG: Triglycerid
TLR-4: Toll-like receptor 4
TNF-α: Tumornekrosefaktor α
v/v: volume pro volume
VEGF: vascular endothelial growth factor

ven.: venös

VLDL: very low density lipoprotein

w/v: weight pro volume

X: Xanthin (Purinderivat; therapeutisch genutzt wird der stimulierende Effekt von Koffein, Theophyllin, Theobromin)

XO: Xanthinoxidase (katalysiert in Niere und Leber die Oxidation von Xanthin und Hypoxanthin zu Harnsäure) → X+XO erzeugen reaktive Sauerstoffspezies

Zit.: Zitiert (meint Anz. der Publikationen, in denen der Artikel zitiert wurde)

α_2 M: Alpha-2-Makroglobulin

α_2 MR/LRP: α_2 -Makroglobulin-Rezeptor/LDL-receptor related protein

α_2 M-T: Alpha-2-Makroglobulin-Trypsin-Komplex

α LN: α -Linolensäure

Zusammenfassung

Die Plazenta ist das Bindeglied zwischen dem mütterlichen und dem kindlichen Organismus und sichert als Schutzbarriere, als stoffwechselaktives Organ und als Ort des Stoffaustausches das Überleben des Fetus. Im Rahmen einer Literatursuche in den Datenbanken PubMed und Web of Science fasst diese Arbeit den aktuellen Wissenstand über Lipid- und Lipoproteintransferprozesse, die anhand der dualen *Ex-vivo*-Perfusionsmethode eines humanen Plazentakotyledons untersucht wurden, vergleichend zusammen.

Für die duale Plazentaperfusionsmethode etabliert man an einem Kotyledon der ausgestoßenen Plazenta einen maternalen und einen fetalen Perfusionskreislauf und kann somit besonders Transferprozesse, aber auch den Plazentametabolismus und Hormonproduktionsraten geeignet untersuchen.

Fettsäuren sind für die Entwicklung des Fetus von elementarer Wichtigkeit und werden von der humanen Plazenta selektiv und in quantitativ bedeutendem Ausmaß vom mütterlichen in den kindlichen Kreislauf transportiert. Die Selektivität des Transfers hängt von verschiedenen Faktoren ab: Biochemische Eigenschaften (z. B. Lipophilität bzw. Kohlenstoffkettenlänge, Anzahl der Doppelbindungen, Molekulargewicht und Ionisierung), die Konzentrationen der Fettsäuren im mütterlichen Blut, das Vorhandensein spezifischer Transportbindungsproteine, Hormone (z. B. Leptin), der Proteinstatus (besonders Albumin) von Mutter und Kind, mögliche Pathologien der Plazenta, exogene Einflüsse durch Xenobiotika und vieles andere bestimmen, in welchem Ausmaß der Transfer einer spezifischen Fettsäure stattfindet. Darüberhinaus beeinflussen die Flussrate, die Art des etablierten Zirkulationssystems (offen oder geschlossen), der Perfusionsdruck, das Perfusionsmedium, Shunts im Perfusionsgebiet, die Sauerstoffkonzentration, mit der die Perfusate equilibriert wurden, die Perfusionsdauer und mögliche Plazentapathologien den Transfer *ex-vivo*.

Die Datenlage zu Lipid- und Lipoproteintransferprozessen durch die humane Plazenta ist sehr karg und die Studien variieren in ihrem technischen Aufbau stark. Trotzdem lässt sich eine klare Aussage über die Abhängigkeit der Selektivität des Fettsäuretransfers von der Konzentration der Fettsäuren im mütterlichen Blut sowie über den Einfluss von Albumin auf den Transfer treffen.

Abstract

The placenta is the link between the maternal and fetal organism and it guarantees fetal survival due to its functions as a protecting barrier, a metabolically active organ and as a place for transport processes. This work aims to represent the current knowledge about the topic of transport of lipids and lipoproteins across the human placenta gained by the method of dual perfusion of a human placental lobule. The literature treating this topic was obtained from the medical databases PubMed and Web of Science.

The establishment of maternal and fetal circulations in a placental lobule selected after delivery allows elucidating transfer mechanisms in particular and furthermore aspects of placental metabolism and hormone production.

Fatty acids are of major importance for the developing fetus and the human placenta is capable of a selective materno-fetal transfer of fatty acids to a considerable extent. The selectivity of this transfer depends on a number of different factors: Biochemical properties (e. g. lipophilicity and length of carbon chain, respectively, number of double bonds, molecular weight and ionization), the concentration of fatty acids in the maternal blood, the availability of specific transport proteins, hormones (e. g. leptin), the maternal and fetal concentration of plasma proteins (in particular albumin), pathologies of the placenta, exogenous influences of xenobiotics and many other factors determine the magnitude of transplacental transfer of a specific fatty acid. Additionally, flow rate, circulation system (open or closed circuit), perfusion pressure, perfusates, possible shunts within the perfused area, percentage of oxygen used for equilibration, experimental periods and possible placental pathologies influence *ex-vivo*-transfer.

In respect of transfer of lipids and lipoproteins only poor data is available. Besides, the designs of the studies vary to a great extent which hampers a direct comparison of the results. Nevertheless, the studies make some clear statements: The selectivity in transfer of fatty acids depends on the concentration of these fatty acids in maternal blood and the concentration of albumin in maternal and fetal blood has a direct and important impact on the amount of fatty acid transfer.

A) Einführung

Schon das griechische Wort *plakous*, die Wurzel des seit dem 16. Jh. gebräuchlichen Wortes *Plazenta*, beschreibt mit einem „flachen Kuchen“ die discoidale Form dieses einzigartigen Organs, das, von zwei Individuen gebildet, die Grundlage für das Überleben eines Kindes im Mutterleib ist (1).

Das Wissen und Verständnis um den Aufbau und die Funktion der Plazenta sind von grundlegender Bedeutung in der Medizin, da Eingriffe am mütterlichen Körper Folgen für das Kind haben können: Medikamente, Giftstoffe, Krankheitserreger oder mütterliche Stoffwechselprodukte treten möglicherweise in die fetale Zirkulation über. Welche Rolle die Plazenta in diesem Transfer spielt, ob sie Substanzen ungehindert passieren lässt, sie abpuffert, verstoffwechselt oder speichert, ist Gegenstand intensiver Forschung. Eine besondere Schwierigkeit in diesem Fachbereich besteht in der Auswahl einer geeigneten Untersuchungsmethode: Während Versuche „im Lebendigen“, *in vivo*, am Menschen ethisch in der Regel nicht akzeptabel sind, werden Tiermodellen durch vom Menschen stark abweichende anatomische und, daraus resultierend, funktionelle Gegebenheiten enge Grenzen aufgezeigt. Versuchsanordnungen „im Glas“, *in vitro*, gelingt es zwar, Teilaspekte zu analysieren, doch auch hier ist die Aussagekraft für das gesamte Organ als Mittler zwischen zwei Organismen oft stark begrenzt.

Die *duale Perfusion eines humanen Plazentakotyledons* als *Ex-vivo*-Methode, also „aus dem Lebenden“, ermöglicht es, besonders Austauschvorgänge an der Plazenta in bislang einzigartiger Weise zu studieren. Bei diesem Verfahren werden, wie später noch genauer dargestellt, Plazenten nach der Geburt unter kontrollierten Laborbedingungen weiter perfundiert, um damit transplazentare Transportvorgänge untersuchen zu können. Die vorliegende Arbeit soll einen Überblick über die bis dato in der Literatur beschriebenen Forschungsergebnisse dieser Untersuchungsmethode in Bezug auf Lipidtransferprozesse bieten. Im Besonderen soll auf folgende Fragestellungen eingegangen werden:

- 1.) Können Veränderungen des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels der Mutter Auswirkungen auf den fetalen Stoffwechsel haben bzw. welche Lipide und Lipoproteine sind dazu in der Lage, diesen zu beeinflussen?
- 2.) Welche Rolle spielt die Plazenta in der Beeinflussung des fetalen Stoffwechsels durch Lipide und Lipoproteine der Mutter?
- 3.) Welche Eigenschaften von Molekülen beeinflussen die Durchgängigkeit der Plazenta für diese Stoffe?
- 4.) Kann mit der Plazentaperfusionsmethode der materno-fetale Transfer gezeigt werden und welche Daten liegen darüber vor?

Die humane Plazenta

I) Entwicklung, anatomischer und histologischer Aufbau

Wenn die befruchtete Eizelle, die zu diesem Zeitpunkt bereits aus einer äußeren Zellschicht, den Trophoblasten, und einem inneren Zellknäuel, dem Embryoblasten besteht, sich in der Wand der Gebärmutter einzunisten beginnt, dringt ein Teil des embryonalen Gewebes, der mehrkernige Syncytiotrophoblast, in das Uterusbindegewebe ein. Er schiebt sich tiefer vor, stülpt sich fingerförmig aus und verzweigt sich. Cytotrophoblastenzellen drängen nach, embryonales Mesenchym und erste Blutgefäße entwickeln sich und füllen von innen her die Auswüchse. Zwischen diesen bilden sich Lakunen, ein Hohlraumsystem, das später, mit mütterlichem Blut gefüllt, als intervillöser Raum bezeichnet wird. Was entsteht, sind baumartige Strukturen, die sogenannten Zottenbäume, in denen das embryonale Blut pulsiert und die sich in einem See aus maternalem Blut befinden, der von den uterinen Spiralarterien gespeist und von Basalvenen drainiert wird. Jeder dieser Zottenbäume bildet eine Funktionseinheit der Plazenta, ein *Kotyledon*. Die reife Plazenta besteht aus 20 bis 40 je 2-4 cm großen Kotyledonen.

Der Stoffaustausch zwischen beiden Kreisläufen findet an der durch die vielfachen Ausstülpungen und Verästelungen beachtlich großen Oberfläche (10-15 m²) der Zotten statt. Die Barriere zwischen kindlichem und mütterlichem Blut, die Plazen-

taschranke, ist in ihrem endgültigen Entwicklungszustand dreischichtig, bestehend aus dem Syncytiotrophoblasten, einer Basalmembran und dem fetalen Endothel. Sie wird als *hämomonochorial* beschrieben, was besagt, dass der Trophoblast direkt von mütterlichem Blut („*häm*“) umgeben ist und dass es nur eine („*mono*chorial“) fetale Schichte gibt, den Syncytiotrophoblasten, aus der die Trophoblastenoberfläche besteht (2). Diese Anordnung findet sich nicht nur bei der Plazenta des Menschen, sondern als *hämomonochoriale* Barriere auch z. B. bei der Plazenta des Meerschweinchens, als *hämodichoriale* z. B. bei Bibern oder als *hämotrichoriale* z. B. bei Mäusen und Ratten. Wenn der Trophoblast nicht mit mütterlichem Blut, sondern mit mütterlichem Endothelgewebe in Verbindung steht, wie etwa beim Bären oder bei der Katze, so spricht man von *endothelio-chorial*. *Epithelio-choriale* Barrieren treten z. B. beim Schwein und *syndesmo-choriale* Barrieren z. B. beim Schaf auf (3).

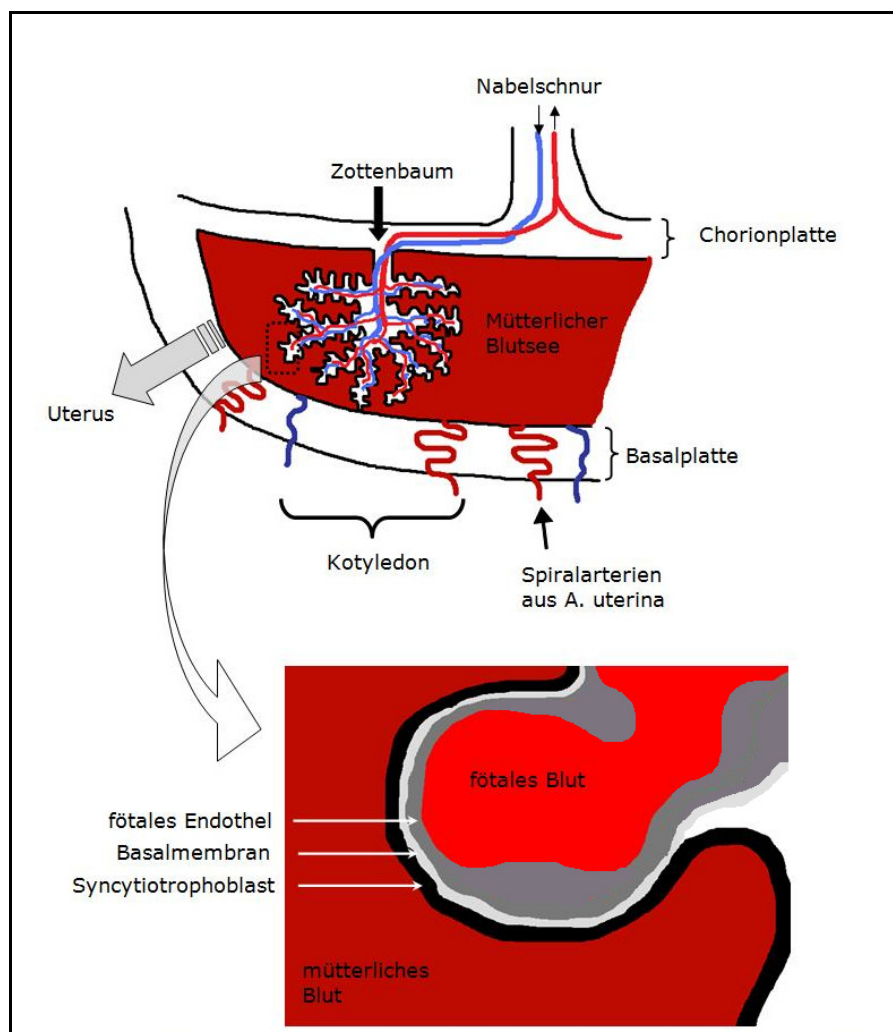


Abbildung 1: Plazentakotyledon und materno-fetale Barriere

Die reife Plazenta ist zum Zeitpunkt der Geburt ein ca. 500 g schweres und in situ ca. 4,5 cm, spontan entblutet ca. 2,5 cm dickes Organ mit ca. 20 cm Durchmesser. Sie hat eine *discoide* Form, die materno-fetale Verzahnung ist *villös* – dieser Begriff bezieht sich auf die Zotten (=Villi), also die baumartigen Verzweigungen des Trophoblasten –, und die materno-fetale Barriere wird wie erläutert als *hämo-monochorial* beschrieben. Diese drei Charakteristika unterscheiden die humane Plazenta von den Plazenten der meisten anderen Säugetiere und somit erklärt sich auch die begrenzte Aussagekraft von Tiermodellen in diesem Bereich.

II) Funktionen der Plazenta

1) Stoffaustausch

Der Stoffaustausch, der über die Plazentaschranke stattfindet, ist diejenige Plazentafunktion, die mit der dualen Perfusionsmethode gut untersucht werden kann. Prinzipiell gibt es fünf verschiedene Transportmöglichkeiten:

a) Diffusion

Diffusion ist ein passiver Vorgang, der keine Energie verbraucht und von allen Austauschprozessen in der Plazenta am häufigsten zum Tragen kommt (4). Eine Vielzahl von Substanzen, wie zum Beispiel Medikamente, O₂, CO₂, H₂O oder Harnstoff, passieren auf diese Weise die dreischichtige Barriere entlang eines Konzentrationsgradienten. Der Vorgang wird durch das Fick'sche Gesetz beschrieben, das besagt, dass ein Stoff umso schneller diffundiert (V_{diff} = Diffusionsgeschwindigkeit), je größer der Diffusionskoeffizient (D), je größer die der Diffusion zur Verfügung stehende Fläche (A), je größer der Konzentrationsunterschied zu beiden Seiten der Membran (ΔC) und je geringer die Dicke derselben (d) ist:

$$V_{\text{diff}} = \frac{D \times A \times \Delta C}{d}.$$

Wichtige Einflussgrößen auf die Diffusionsrate sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften eines Stoffes sowie das Ausmaß seiner Proteinbindung, worauf später noch detaillierter eingegangen wird [vergl. B) II) 1)].

b) Erleichterte Diffusion

Auch dieser Prozess geht ohne Energieverbrauch und entlang eines Konzentrationsgradienten vonstatten. Allerdings wird hier der Transfer von Substanzen, in der Plazenta vornehmlich Glucose und Laktat, durch das Vorhandensein von stoffspezifischen Carriern gefördert.

c) Aktiver Transport

Aktiver Transport verlangt Energie. Deshalb bedient sich dieser entweder direkt des ATPs oder sekundär eines elektrochemischen Gradienten, entlang dessen der Transfer erfolgen kann. Es existiert eine Vielzahl an aktiven Transportern, die entweder an der fetalen oder an der mütterlichen Seite der Membran lokalisiert sind und folglich einen Stoffaustausch in beide Richtungen ermöglichen können. Durch sie werden Nährstoffe wie beispielsweise Aminosäuren, Vitamine oder Glucose transportiert, aber unter anderem auch solche Medikamente, deren chemische Strukturen denen der körpereigenen Substrate dieser Carrier ähnlich sind. Ein Beispiel für einen Transporter auf der mütterlichen Seite der Membran, der Na⁺-abhängig Biotin und Pantothenat, aber auch die Pharmaka Carbamazepin und Primidon in den kindlichen Kreislauf überführt, ist der Natrium/Multivitamintransporter. Umgekehrt wirken z. B. die Multidrug-resistance-protein1, 2 und 3-Transporter vermutlich fetoprotektiv, indem sie Metabolite und Endprodukte sowie verschiedene Medikamente, beispielsweise Methotrexat, Ampicillin, Paracetamol oder Vincristin, aus dem fetalen Kreislauf entfernen (4).

d) Phago- und Pinozytose

Über das „Zellfressen und –trinken“ werden Proteine, Eisen und Fette transportiert. Von besonderer Bedeutung ist die Endozytose von mütterlichen Antikörpern, den IgG-Ak, die selektiv die Plazentaschranke passieren können und dem Kind den wichtigen Immunschutz gewähren (5). Für Medikamente spielt dieser Transportmechanismus keine Rolle, da er zu langsam abläuft (6).

e) Diapedese

Die Diapedese, das „Durchtreten durch eine unverletzte Gefäßwand“, wird bei Viren und Bakterien beobachtet und kann im Rahmen der Untersuchungen am dual perfundierten Plazentakotyledon vernachlässigt werden.

2) Barrierefunktion

Da es sich bei Mutter und Kind um zwei biologische Individuen handelt, ist eine Trennung grundsätzlich erforderlich.

Darüber hinaus spielt die Plazentabariere aber auch für den Schutz des Fetus vor Infektionen und schädigenden Substanzen im mütterlichen Körper eine wichtige Rolle, da viele Krankheitserreger und Giftstoffe die Plazenta nicht passieren können.

3) Stoffwechsel

Ähnlich wie in Leber und Niere findet auch in der Plazenta ein Metabolismus statt, der sich um die Entgiftung möglicher schädigender Substanzen bemüht. Dieser als Biotransformation bezeichnete Prozess läuft in zwei Phasen ab: In der Phase I verändern sich z. B. durch Oxidation, Methylierung oder hydrolytische Spaltung die funktionellen Gruppen des auszuscheidenden Stoffes. In der anschließenden Phase II werden polare Substanzen durch Glucuronidierung, Sulfatierung, Konjugation mit Acetat oder Glutathion u. v. a. m. an den Stoff gekoppelt. Dadurch wird das ursprünglich lipophile Substrat hydrophil und kann in inaktiviertem bzw. entgiftetem Zustand der Ausscheidung zugeführt werden. Für den Vorgang dieser Biotransformation steht in der Plazenta eine große Auswahl an Enzymen zur Verfügung, beispielsweise CYP450- oder CYP2-Enzyme für Phase I-Reaktionen und Uridin-Diphosphat-Glucuronosyltransferase, Epoxidhydrolase oder Sulfotransferase für Phase-II-Reaktionen (4). Dieser Metabolismus schafft einerseits die Möglichkeit, Fremdstoffe wie etwa Medikamente zu entgiften, andererseits bildet er bisweilen auch Metabolite, die potentiell schädlich für den Fetus sein können. Nikotin beispielsweise wird in der Plazenta zu Cotenin metabolisiert. Dieses Cotenin sammelt sich in der fetalen Zirkulation an und führt dort zu einer Vasokonstriktion der fetalen Gefäße (7).

4) Synthesefunktion

In der Plazenta werden verschiedene Steroid- und Peptidhormone gebildet, z. B. das humane Plazentalaktogen, ein plazentares Wachstumshormon, das humane Choriongonadotropin, Progesteron oder Östrogen, letzteres, sobald die fetale Le-

ber und Nebennieren die notwendige Vorstufe DHEAS dafür bereitstellen. Abgesehen davon spielt die Plazenta eine wichtige Rolle in der Synthese von Botenstoffen wie z. B. Acetylcholin, Tachykinin, den Platelet activating factor (PAF) oder Prostaglandine (7). Die von der Plazenta hergestellten Proteine lassen sich in drei Gruppen einteilen: erstens die ausschließlich vom Trophoblasten produzierten Stoffe, wie z. B. hCG, hPL oder SP₁, zweitens die Proteine, die nicht nur von trophoblastärem Gewebe gebildet werden können, wie etwa PAPP-A, und drittens Proteine, z. B. das α_2 -Pregnancy Associated Glycoprotein, die der mütterliche Körper zwar auch dann produziert, wenn keine Schwangerschaft vorliegt, während einer solchen aber vermehrt exprimiert werden (8).

B) Methoden

Das für eine Diplomarbeit ausgeschriebene Thema in der Themenbörse der Grazer Medizinischen Universität war mit „Plazentaperfusion als *Ex-vivo*-Methode für Transfer von Substanzen“ betitelt. Nach Klärung der wichtigsten Rahmenbedingungen (Anlage als Literatarbeit, Schreibsprache deutsch, Zeitrahmen zur Erstellung ca. ein Jahr), konnte eine erste grobe Gliederung der Arbeitsschritte aufgestellt werden: Diese sah zuerst eine Phase des Einlesens in das Themengebiet, anschließend die Literatursuche zur Beantwortung der zentralen Fragestellungen und danach die Bearbeitung der gefundenen Literatur im Sinne eines Ordners, Gegenüberstellens und Vergleichens, sowie das Schreiben des Textes an sich vor. Weiters war das Konzeptpapier auszufüllen und dem Studienrektor zur Annahme vorzulegen.

Zum Einlesen in das Themengebiet darf auf folgende Referenzen verwiesen werden: (4), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (16), (17).

Der nächste Schritt bestand in der Formulierung von Suchbegriffen für die Recherche in der elektronischen Datenbank PubMed. Artikel, die z. B. Ergebnisse von anderen Untersuchungsmethoden als der dualen Perfusion beschrieben, oder die Tiermodelle zum Gegenstand ihrer Thematik hatten, solche, die sich nur auf das Krankheitsbild der Preeklampsie oder auf Arachidonsäurederivate konzentrierten, Studien zum Transfer einzelner Medikamente sowie andere, nicht der

Beantwortung der zentralen Fragestellungen dienlich erscheinende Artikel, konnten ausgeschieden werden, sodass sich die Gesamtzahl von über 1.000 Treffern am Ende auf genau zwanzig reduzierte. Wenn man den Titel eines Artikels im Web of Science in die Suchmaschine eingibt, dann zeigt das Programm an, in wie vielen weiteren Publikationen dieser Artikel bislang zitiert wurde und es ist möglich, die – soweit verfügbaren – Abstracts dieser Publikationen zu sehen. Aus den Treffern dieser „Zitierlisten“ konnten ebenfalls zwei für die Arbeit interessante Texte gefiltert werden.

Die definierten Schlagwörter und die genauen Zahlen zu den jeweiligen Suchbegriffen sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Punkte in den weißen Zeilen stehen für die Vervollständigung „placenta perfusion“ und den jeweils letzten Teil der Suchbegriffe aus der darüberliegenden Zeile. Ziel dieser Suchstrategie ist es, all diejenigen Studien zu erfassen, die humane Plazenten zum Gegenstand ihrer Untersuchung haben und jene an Tieren auszuschließen.

Schlagwort	Treffer	ausgewählt
Human placenta perfusion lipidS	32	4
Placenta perfusion lipidS NOT human ...	10	0
Human placenta perfusion placenta pathology	120	0
Placenta perfusion placenta pathology NOT human ...	14	0
Human placenta perfusion diabetes	31	2
Placenta perfusion diabetes NOT human ...	7	0
Human placenta perfusion fatty acids	123	8
Placenta perfusion fatty acids NOT human ...	21	0
Human placenta perfusion fetal growth	247	0
Placenta perfusion fetal growth NOT human ...	55	0
Human placenta perfusion lipoprotein enzymes	2	0
Placenta perfusion lipoprotein enzymes NOT human ...	0	0
Human placenta perfusion LDL/low density lipoproteins	1/2	1/0
Placenta perfusion LDL/low density lipoproteins NOT human ...	1/1	0/0
Human placenta perfusion HDL/high density lipoproteins	0/0	0/0
Placenta perfusion HDL/high density lipoproteins NOT human ...	0/0	0/0
Human placenta perfusion VLDL/very low density lipopro-	0/0	0/0

teins		
Placenta perfusion VLDL/very low density lipoproteins NOT human ...	1/1	0/0
Human placenta perfusion lipases	0	0
Placenta perfusion lipases NOT human ...	0	0
Human placenta perfusion pathology endothelium	13	0
Placenta perfusion pathology endothelium NOT human ...	1	0
Human placenta perfusion diabetes antioxidants	3	1
Placenta perfusion diabetes antioxidants NOT human ...	1	0
Human placenta perfusion pathology endothelS	24	1
Placenta perfusion pathology endothelS NOT human ...	2	0
Human placenta perfusion lipid metabolism	26	0
Placenta perfusion lipid metabolism NOT human ...	10	0
Human placenta perfusion lipid transfer	30	1
Placenta perfusion lipid transfer NOT human ...	12	0
Artikel aus Zitierlisten	534	2
Gesamt	1.323	20

Tabelle 1: Ergebnis Literatursuche aus Pubmed und Web of Science

Der Zugang zu den Volltexten der Arbeiten war entweder kostenlos durch die Lizenz als Student der Medizinischen Universität Graz oder kostenpflichtig.

Parallel zur Literatursuche waren der genaue Aufbau und die Gliederung der geplanten Arbeit zu überlegen, die Kapitelüberschriften und der grobe Umfang der einzelnen Abschnitte.

Als nächstes galt es, eine Literaturmappe anzulegen und die zwanzig ausgewählten Artikel tabellarisch zu erfassen. Dazu mussten Rubriken gefunden werden, die die wichtigsten Charakteristika der einzelnen Studien wie z. B. die Perfusionszeit oder die Anzahl der verwendeten Kötyledone beschreiben konnten. In dieser Form fiel es leichter, die Studien einander gegenüber zu stellen und sie zu vergleichen, um die daraus gewonnenen Erkenntnisse abschließend im Teil D, der Diskussion, auszuführen. In der Zwischenzeit konnten anhand der oben genannten Literatur sowie ggf. weiteren Quellen (siehe Referenzen) die Plazenta an sich sowie die Methoden, sie zu studieren, im Besonderen die der dualen Perfusion beschrieben werden.

C) Ergebnisse

I) Mögliche Untersuchungsmethoden der Plazenta

1) Die duale Perfusion der humanen Plazenta

1967 beschrieben Panigel et al. erstmals die Möglichkeit, in der ausgestoßenen Plazenta mit Hilfe eines geeigneten Instrumentariums die Kreislagsituation *in utero* zu simulieren (4). Die Methode wurde fortan weiterentwickelt und verbessert, sodass es heute gelingt, für längere Zeiträume getrennte mütterliche und kindliche Zirkulationen entweder über die gesamte Plazenta oder, wie es meist der Fall ist, in einem einzelnen Kotyledon aufzubauen und anhand dieses Systems besonders Transferprozesse in einer bis dahin nicht möglichen direkten Weise zu untersuchen.

Vor der Auseinandersetzung mit dem genauen Prozedere der dualen Perfusionsmethode sei zum besseren Verständnis die pränatale Kreislagsituation in Erinnerung gerufen:

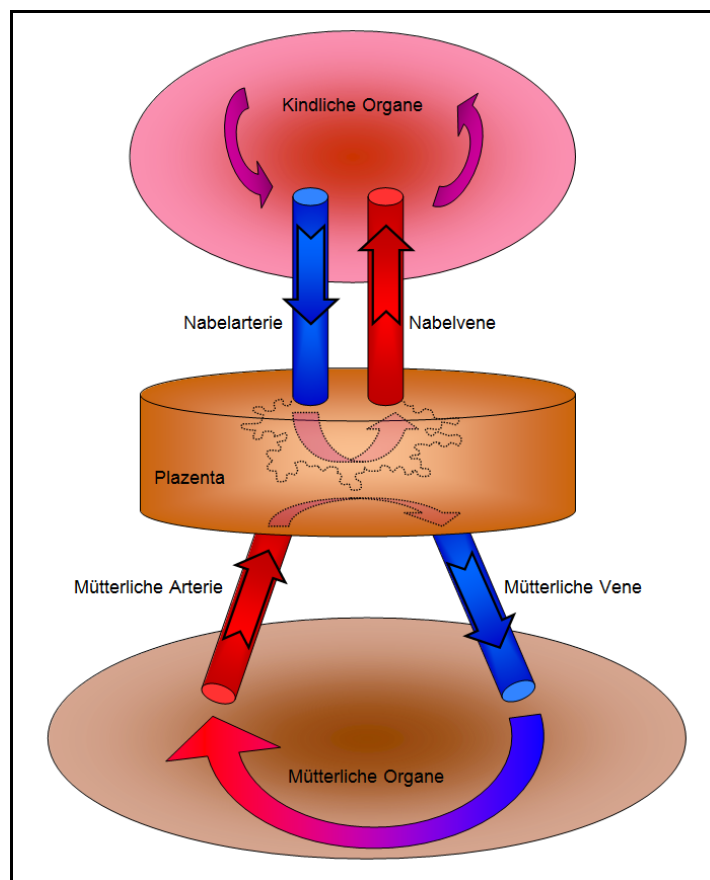


Abbildung 2: Mütterlicher und kindlicher Kreislauf

a) Methode und Instrumentarium

Die an der Grazer Universitätsklinik angewandte und hier beschriebene Methode der dualen Perfusion eines humanen Plazentakotyledons ist stark angelehnt an die Ausführung von H. Schneider und A. Huch.

Die Plazenta wird unmittelbar nach der Vaginal- oder Kaiserschnittgeburt in ein Bad aus physiologischer Kochsalzlösung gelegt, um die Gewebekompression zu verringern, dadurch die spätere Perfusion zu erleichtern und das Gewebe vor Austrocknung und Nekrotisierung zu schützen. Ein meist peripher liegendes (9) Kotyledon, das nach sorgfältiger Inspektion unbeschädigt und für die Perfusion geeignet erscheint, wird ausgewählt und dessen versorgendes fetales Gefäßpaar identifiziert. Am Rand liegende Kotyledone eignen sich aus zwei Gründen besser als zentrale: Einerseits entspricht der kleinere Durchmesser der periphereren Gefäße eher als derjenige der großen nabelschnurnahen Gefäße dem Durchmesser der zu verwendenden Kanülen. Andererseits kann ein peripheres Kotyledon aufgrund seiner exzentrischen Lage leichter mit der angrenzenden Dezidua in die Perfusionskammer eingespannt werden. Mit einer atraumatischen Nadel und chirurgischem Faden umschlingt man nun die Arterie und die Vene je zwei Mal im Abstand von ca. 2 – 4 cm. Die Schlinge, die der Nabelschnur am nächsten liegt, wird sofort zugezogen, um einen Reflux in Richtung Nabelschnur zu verhindern, während die Fäden der inneren Schlinge noch lose liegen. (Abb. 3)

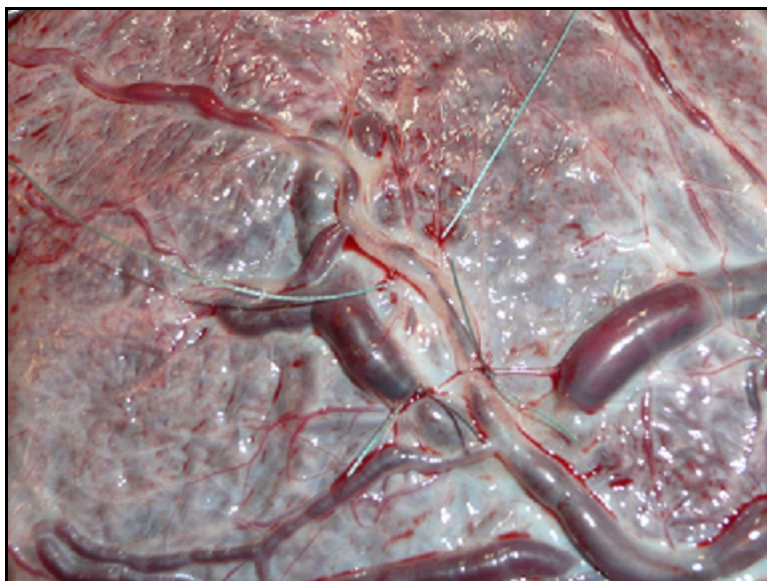


Abbildung 3: Umschlingen des fetalen Gefäßpaares

Zuerst wird die fetale Arterie mit einer kleinen Metallkanüle, die mit einem Silikon-schlauch verbunden ist, katheterisiert. Die an ihrem Ende etwas aufgetriebene Knopfkanüle wird vorsichtig ca. 0,5 cm weit in das Gefäß vorgeschoben und danach durch Zuziehen des zuvor gelegten Fadens hinter dem verdickten Bereich fixiert. Zum einen kann dadurch die Kanüle nicht mehr aus dem Gefäß heraussrutschen und zum anderen wird so der Übergangsbereich fest verschlossen. (Abb. 4)

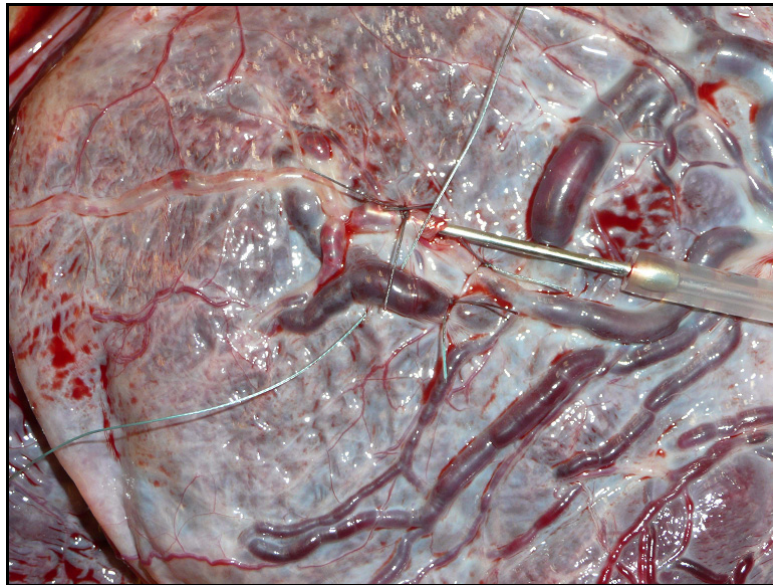


Abbildung 4: Kanülierung eines fetalen Gefäßes

Die Vene wird auf die gleiche Weise kanüliert. Danach können behutsam unter leichtem Druck einige Milliliter heparinhaltiges Perfusionsmedium über die gelegten Kanülen in die fetalen Gefäße injiziert werden. Um möglichst viel Blut aus den Gefäßen zu waschen, lässt man nun eine größere Menge des Perfusats in die Arterie fließen. Der Auffangbehälter für den venösen Abfluss befindet sich ca. 10 – 12 cm höher als die Chorionplatte, damit aufgrund des hydrostatischen Druckes das Lumen der Vene ähnlich stark aufgedehnt bleibt wie unmittelbar nach der Geburt.

Nachdem die kindliche Zirkulation etabliert worden ist, kann das restliche Plazentagewebe mit einer Schere entfernt werden, wobei ein großzügiger Rand um das ausgewählte Kotyledon herum erhalten bleiben muss. Das Präparat wird sodann in einer hohlzylinderförmigen Perfusionskammer aus Plexiglas (Abb. 5) aufgespannt, indem man durch den breiten verbliebenen Gewebssaum um das perfun-

dierte Kotyledon herum zugespitzte Metallstäbe treibt, die senkrecht aus einem in seinem Durchmesser variablen Halterungsring aus der Kammer ragen. (Abb. 6)



Abbildung 5: Perfusionskammer

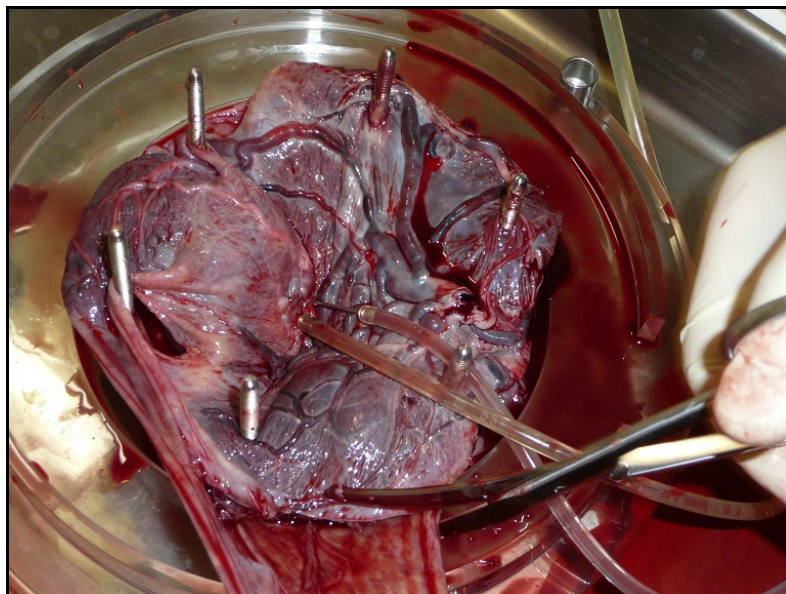


Abbildung 6: Einspannen des Präparats in die Perfusionskammer

Ein passender ringförmiger Verschluss aus Plexiglas, Klemmen und Schraubenmuttern fixieren das Gewebe. (Abb. 7)

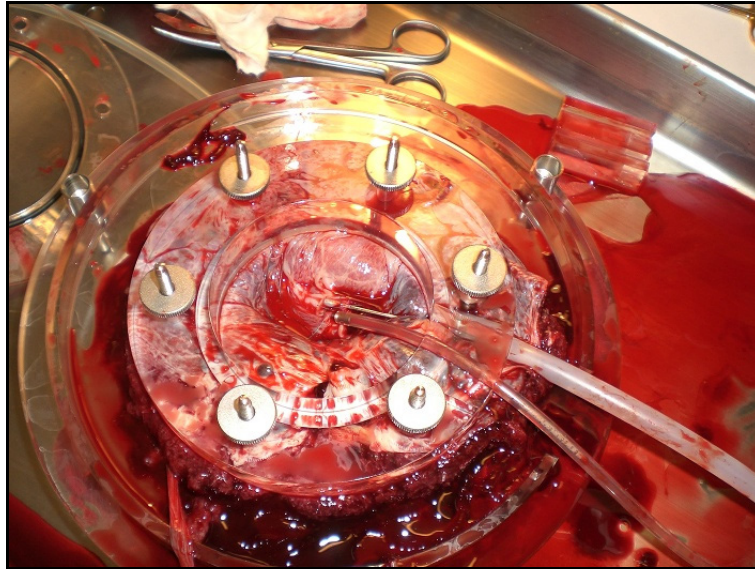


Abbildung 7: Präparat in der Perfusionskammer fixiert

Das Kotyledon wird zuerst mit der mütterlichen Seite nach unten eingespannt und nach der Befestigung gewendet: Somit schaut endgültig die fetale Seite nach unten und die maternale nach oben. Eine umgekehrte „australische“ Anordnung ist jedoch ebenfalls möglich. Der Boden und die untere sowie die obere Hälfte der Perfusionskammer sind doppelwandig. Den Hohlraum durchspült 37°C-warmes Wasser, um die Temperatur im Kotyledon physiologisch hoch zu halten.

Während die fetale Zirkulation mit einem Flow von 8 – 10 ml/min und einem Druck von 35 – 50 mmHg zu laufen beginnt, kann nun an die Versorgung der maternalen Seite gedacht werden: Durch die zentrale Öffnung der Perfusionskammer wird von oben ein Oktopus aus 2 – 4 Knopfkanülen und entsprechenden Silikonschläuchen in den inneren Hohlraum der zylinderförmigen Kammer eingeführt. Deren metallene Enden sind, wie die der Kanülen für die kindlichen Gefäße, aufgetrieben. Bevor sie vorsichtig durch die Basalplatte durchgestoßen und in den intervillösen Raum eingeführt werden, soll man darauf achten, dass die Verteilung der Schläuche über das Perfusionsgebiet gleichmäßig erfolgt, da eine regelmäßige Flussverteilung für eine wirkungsvolle Perfusion unerlässlich ist. Nachdem der Oktopus an den mütterlichen Kreislauf angeschlossen worden ist, kann auch auf dieser Seite eine erste Perfusion mit 12 ml/min erfolgen, wobei das Perfusat durch die Silikonschläuche in den intervillösen Raum einströmt, danach durch mehrere venöse Öffnungen abfließt und aufgrund des aus dem Höhenunterschied zwischen intervillösem Raum und mütterlichem Vorratsgefäß entstandenen hydrostatischen

Drucks wieder in das mütterliche Reservoir rezirkulieren kann (10). Nach dem Geburtstrauma und der Hypoxie braucht das Plazentagewebe etwa eine Stunde Erholungszeit, bevor mit den Untersuchungen begonnen werden kann (9). Dank eines speziellen Gewebemetabolismus und des besseren Erhalts der ATP-Speicher erscheinen das fetale und das plazentare Gewebe jedoch resistenter gegenüber Ischämien zu sein als erwachsene Zellen (11).

Die beiden getrennten Perfusionskreisläufe werden durch zwei Pumpen betrieben; für jeden Kreislauf gibt es einen Oxygenator, einen Flow-, einen Druck- und einen pH-Messer, einen Wärmeaustauscher, ein Thermometer und einen Filter (7). Um zu verhindern, dass sich im Perfusat Luftblasen halten, werden zwischen den längeren Schlauchstücken im mütterlichen und kindlichen Kreislauf Blasenfallen eingebaut (siehe Abb. 8).

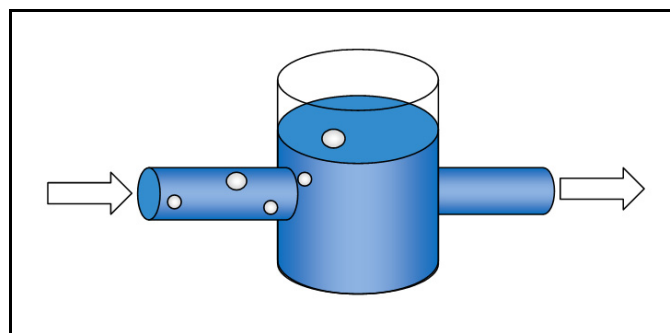


Abbildung 8: "Blasenfalle"

b) Einsatzgebiete

Die Technik der *in vitro* perfundierten humanen Plazenta eignet sich besonders für folgende Fragestellungen:

- Transferprozesse können im Gesamten (z. B. direkter materno-fetaler Transfer) oder in ihre Teilschritte aufgegliedert (z. B. Aufnahme aus dem maternalen Perfusat im Gegensatz zur Abgabe in das fetale bei der Frage nach der Rolle der Plazenta als „Puffer“ für potenziell schädliche Stoffe) untersucht werden. Die Ergebnisse erlauben Rückschlüsse auf die Natur des Transfers (aktiv oder passiv). In Kombination mit anderen Untersuchungstechniken können ergänzend zu den Perfusionsdaten weitere Informationen gewonnen werden, beispielsweise über die mögliche Anreicherung eines zugegebenen Stoffes im Plazentagewebe oder über die Fragestellung, ob in den Empfängerkreislauf die

unverändert gebliebene Substanz übertritt oder ob es sich nur um Bestandteile davon handelt, etwa eingebaut in neue Verbindungen.

- Die Auswirkungen von endogenen (z. B. biogene Amine, vergl. II, 3, f) und exogenen (z. B. Ethanol, Medikamente) Stoffen auf den fetalen Perfusionsdruck und somit auf den Transfer können beobachtet werden.
- Von der Plazenta freigesetzte Substanzen wie Hormone [z. B. Leptin: (39^S), (40^S)], Mikropartikel und Zytokine (38^S), Arachidonsäurederivate u.v.a.m. können im Perfusat detektiert und gemessen werden (7).
- Messungen des Glucoseverbrauchs, der Laktat- und der Hormonproduktion lassen Rückschlüsse auf den Plazentametabolismus zu. Da die Perfusionsmethode es erlaubt, auch pathologische Zustände wie beispielweise Hypoxie zu simulieren, kann man deren Auswirkungen auf den placentaren Stoffwechsel einerseits sowie auf den Transfer andererseits untersuchen.
- Durch die Verwendung von krankhaft veränderten Plazenten (z. B. bei mütterlichem Diabetes mellitus oder bei Eklampsie) können Erkenntnisse in Hinblick auf die tatsächlich vorliegenden funktionellen Veränderungen bei den entsprechenden Pathologien gewonnen werden.
- Langzeitperfusionsen werden hauptsächlich dafür eingesetzt, die Auswirkungen von Xenobiotika auf die Funktionen der Plazenta zu studieren (9).

c) Evaluationskriterien

Um einerseits bereits zu Beginn einschätzen zu können, ob das etablierte System korrekt funktioniert, und andererseits während des Untersuchungsverlaufes die Integrität der Plazenta und ihrer Zirkulationen zu kontrollieren, ist es hilfreich, Basis- und Vergleichswerte, also Evaluationskriterien, zur Hand zu haben.

Der materno-fetale Netto-Sauerstofftransfer kann schon am Anfang dazu verwendet werden, die Unversehrtheit und die Funktion des perfundierten Präparats und besonders die Deckungsgleichheit der beiden Perfusionsgebiete abzuschätzen.

Kriterien für die Gesamtfunktion der Plazenta lassen sich unter drei Aspekten subsumieren:

1. Morphologie. Die mikroskopische Analyse des Plazentagewebes kann nur nach Beendigung der Perfusionsstudie erfolgen, da eine kontinuierliche Probenentnahme zu gravierenden Beeinträchtigungen der Plazentafunktion führen würde. Die

histologische Untersuchung liefert Aussagen über das Ausmaß der Schädigung der Gewebsstruktur.

2. Metabolismus. Auf den Stoffwechsel kann anhand mehrerer Parameter rückgeschlossen werden: Referenzwerte für *Glucoseverbrauch* und *Laktatproduktion* (wobei Laktat hauptsächlich in den mütterlichen Kreislauf freigesetzt wird) unterliegen starken Schwankungen je nach Forschungslabor und Studienanordnung (bei geschlossener Zirkulation sind die Werte geringer als bei offener). Der *Sauerstoffverbrauch* ist u. a. direkt abhängig von der den beiden Kreisläufen angebotenen Menge an Sauerstoff. Neben der *Bildung und Freisetzung plazentarer Peptidhormone* wie z. B. hCG und hPL kann auch die *Verstoffwechselung eines bestimmten Substrates* nach der Formel $\frac{V-A \cdot Q}{W}$ berechnet werden (V-A= venös-

arterielle Konzentrationsdifferenz, Q=Flow rate, W=Nassgewicht). Schließlich lässt sich auch der Energiehaushalt über eine kontinuierliche MR-spektroskopische Bestimmung von β -ATP, *anorganischem Phosphor* und dem *Gewebs-pH-Wert* abschätzen.

3. Hämodynamik/Permeabilität. Für die Beurteilung der Permeabilität hat es sich aufgrund starker interexperimenteller Unterschiede als hilfreich erwiesen, einen Referenzstoff, z. B. das rasch diffundierende Antipyrin, einzuführen (12). Konzentrationsveränderung im Perfusat, Flow rates und Transport fractions (vergl. II, 2, a) Clearance (Cl) (vergl. II, 2, b) und Clearance Index $Cl_i = \frac{Cl \text{ der Testsubstanz}}{Cl \text{ des Referenzstoffes}}$)

erlauben Aussagen über die Effizienz der placentaren Transportfunktion.

Neben diesen generellen Plazentafunktionskriterien gibt es auch solche, die die Unversehrtheit der fetalen Gefäße definieren, nämlich den fetalen Perfusionsdruck und das Aufrechterhalten des fetalen Perfusionsvolumens.

Für die Entscheidung, ob eine Perfusion weiter betrieben werden kann oder abgebrochen werden muss, sind der fetale venöse Druck, der fetale Netto-O₂-Transfer, der fetale Perfusionsdruck und der fetale Volumsverlust ausschlaggebend.

Ein Teil all der genannten Werte kann bereits während der Perfusion erhoben werden. Dazu zählen Perfusionsdruck, Flow rate, Volumsverlust, pH-Wert, maternales und fetales pCO₂ und pO₂, O₂-Verbrauch, β -ATP, Laktatproduktion und anorganischer Phosphor. Glucoseverbrauch, Protein- und Hormonsynthese sowie

deren Freisetzung, Enzyme und der histologische Zustand können erst nach Beendigung der Perfusion untersucht werden (9, 13).a

d) Grenzen und Limitationen

Trotz aller Bemühungen sind der Aussagekraft der dualen Plazentaperfusion doch Grenzen gesetzt:

Erstens können die mit der Perfusion generierten Daten nur den Zustand am Ende der Schwangerschaft widerspiegeln. Die Plazenta unterliegt in den neun Monaten ihrer Existenz aber starken Veränderungen, beginnend bei der Plazentaschranke, die in der ersten Schwangerschaftshälfte aus sechs, danach nur noch aus drei Schichten besteht, also stark ausdünnt, über die gewaltige Zunahme der Austauschfläche des Syncytiotrophoblasten (14) bis hin zur Flussrate im intervillösen Raum, die sich von ca. 50 ml/min um die 10. Woche auf ca. 600 ml/min um den Geburtstermin steigert. Es ist auch anzunehmen, dass sich Transportmechanismen und der Plazentametabolismus den Bedürfnissen des wachsenden Fetus anpassen und sich im Laufe der Entwicklung verändern. Die fetal-plazentarmaternale Zirkulation etabliert sich erst am Ende der 10. Schwangerschaftswoche, bis dahin erfolgt der Stoffaustausch zum Fetus nur über Diffusion (4). Auch die Konzentrationen von Albumin und nicht veresterten freien Fettsäuren im mütterlichen und kindlichen Plasma ändern sich im Laufe der Schwangerschaft, was sich auf den Transfer auswirkt (14). Aufgrund dieser eklatanten Unterschiede lassen sich Erkenntnisse aus der Perfusionsmethode leider nicht vorbehaltlos auf frühere Schwangerschaftsstadien bzw. auf Frühgeburten übertragen. Dazu kommt, dass sich die Möglichkeit, eine duale Perfusion durchzuführen, grundsätzlich auf das dritte Trimester beschränkt, da zu früheren Zeitpunkten die Schädigung der Zotten durch den Geburtsprozess zu groß ist (9).

Zweitens stellt die Versuchsanordnung ein metabolisch statisches System dar im Gegensatz zu dem dynamischen der schwangeren Frau. Einflüsse von Hormonproduktionsstätten außerhalb der Plazenta, die z. B. für Leptin [(39^s), (40^s)] eine bedeutende Rolle spielen, müssen beispielsweise vernachlässigt werden. Der Metabolismus in den mütterlichen und kindlichen Organen findet keine Berücksichtigung, ebensowenig wie Vorstufen plazentarer Hormone und anderer Metabolite, die der mütterliche und der kindliche Körper zur Verfügung stellen würden.

Drittens ist es möglich, dass aufgrund einer limitierten Zugabemöglichkeit von Proteinen zum Perfusat ein künstlicher, gegenüber den physiologischen Verhältnissen veränderter Proteinstatus die Untersuchungsergebnisse verfälscht, da die Proteinbindung einen Einflussfaktor für den Transfer darstellt.

Viertens kann eine gewisse traumatische Schädigung des Plazentagewebes durch den Geburtsvorgang und die anschließende Ischämie bzw. Hypoxie bis zur Einrichtung der künstlichen Kreisläufe nicht verhindert werden (7).

2) Weitere In-vitro-Methoden

Zu den In-vitro-Gewebsmethoden zählen histologische Schnitte der Plazenta, Villus-Explantate und mikrovillöse Membranvesikel. Abseits davon gibt es die Möglichkeit einer Zellkultur für Syncytiotrophoblasten, trophoblastäre Zelllinien und subzelluläre Strukturen wie z. B. Mikrosomen und isolierte Transporter und Rezeptoren. Diese Anordnungen eignen sich im Allgemeinen gut für Untersuchungen von Transportsystemen sowie von plazentaren Enzymen (4).

Anhand von Gewebeschnitten können z. B. Aufnahme- und Transportprozesse von Aminosäuren analysiert werden. An Syncytiotrophoblastengewebe lassen sich u. a. die Aufnahme von Nährstoffen und Medikamenten, die Freisetzung von Hormonen, Peptiden und biogenen Aminen und die Auswirkung von Chemikalien auf diese Vorgänge studieren (7). Neben spontan aus Zytotrophoblastenkulturen entstandenen Zelllinien und solchen, die durch virale Vektoren genmanipuliert und unsterblich gemacht wurden, sind hauptsächlich Zellkulturen aus humanen Chorionkarzinomzellen für Studien zum transplazentaren Transport und Metabolismus in Verwendung. Letztere ähneln in ihren biochemischen und morphologischen Eigenschaften den invasiven Trophoblastenzellen, doch es muss der Tatsache Rechnung getragen werden, dass es sich hierbei eben um Karzinomzellen handelt, die entsprechend andere, karzinom-spezifische Eigenschaften als die physiologischen invasiven Trophoblastenzellen besitzen und folglich nicht vorbehaltlos als Modell für die Zweitgenannten dienen können. Besondere Verwendung finden Chorionkarzinomzellen für Studien an der Plazentabarriere in der Toxikologieforschung. An Membranvesikeln lassen sich Transportvorgänge aus dem maternalen und fetalen Plasma getrennt untersuchen, plazentare Mikrosomen hingegen stel-

len ein gutes Modell zur Analyse von Enzymaktivitäten und Stoffwechselvorgängen in der Plazenta dar (6).

Je kleiner das untersuchte Element ist und je stärker seiner natürlichen Umgebung entrissen, desto mehr stellt das im Fokus Befindliche nur einen Puzzleteil, einen begrenzten Aspekt des komplexen Ganzen dar.

3) *In-vivo-Methoden*

In-vivo-Untersuchungen am Menschen und am Tier sind, wie bereits ausgeführt, aufgrund von ethischen Überlegungen und anatomischen Unterschiedlichkeiten enge Grenzen gesetzt. Am ehesten lassen sich noch Erkenntnisse aus Forschungen an Rhesusaffen und Pavianen auf den Menschen übertragen (4), doch sollte *Ex-vivo*- und *In-vitro*-Methoden gegenüber Tierversuchen der Vorzug gegeben werden.

Ein einfaches und ethisch weitgehend unbedenkliches *In-vivo*-Verfahren ist die simultane Entnahme von mütterlichem peripherem sowie kindlichem Nabelschnurblut nach Ausstoßen der Plazenta. Aus dem Verhältnis der fetalen zur maternalen Konzentration (F/M-Ratio) eines zu untersuchenden Stoffes kann auf den plazentaren Transfer desselben rückgeschlossen werden. Zusätzliche Messungen der Konzentration im Plazentagewebe lassen darüber hinaus Aussagen über die Speicherfähigkeit bzw. die Fähigkeit zur Retention des Stoffes in der Plazenta zu. Vergleiche der Konzentrationen in der Nabelschnurarterie und -vene geben Aufschluss über eine mögliche Metabolisierung in den kindlichen Organen. Wichtig sind Hintergrundinformationen wie z. B. die der Mutter verabreichte Dosis der Substanz und der Umstand, ob es sich um eine einmalige Gabe oder um eine kontinuierliche Infusion, also einen konstanten Wirkstoffspiegel, handelte (7).

II) Die duale Perfusion eines humanen Plazentakotyledons zur Untersuchung von (Lipid-) Austauschvorgängen

1) Biochemische und physikalische Eigenschaften der Moleküle, die Einfluss auf deren Durchgängigkeit durch die Plazenta haben

Die Barriere, die Moleküle beim Durchtritt durch die Plazenta zu überwinden haben, entspricht in ihrem Aufbau der Lipiddoppelschicht biologischer Membranen. Hierbei handelt es sich um Aggregate amphiphiler Moleküle, bei denen sich die hydrophilen Kopfgruppen der Lipidverbindungen an der Oberfläche in Richtung umgebendes Wasser und die lipophilen Kohlenwasserstoffketten im Inneren zueinander hin orientieren.

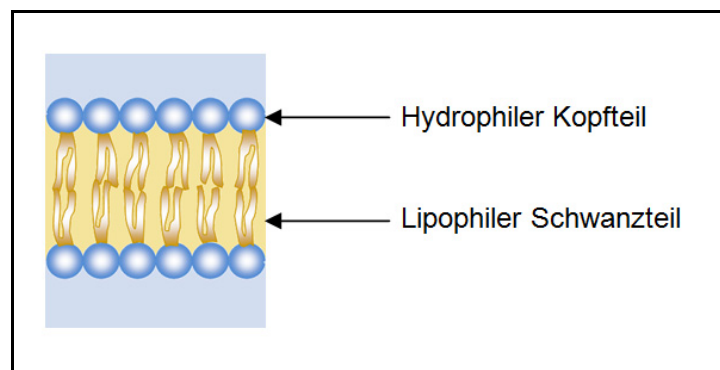


Abbildung 9: Lipiddoppelschicht

Die Bereitschaft von einzelnen Substanzen, durch eine solche Membran frei zu diffundieren, hängt von folgenden biochemischen und physikalischen Gegebenheiten ab:

- Für hydrophile Stoffe ist der Durchtritt durch eine Biomembran mit einem sehr großen Bedarf an Aktivierungsenergie verbunden, da vor dem Eintritt in die Lipiddoppelschicht die Hydrathülle erst abgelegt werden muss, damit die Substanz fettlöslich wird. Deshalb ist bei biologischen Membranen in ihrem natürlichen Umfeld nur die einfache Diffusion lipophiler Stoffe zu beobachten (15). Hydrophile Substanzen passieren die Plazentabarriere vor allem durch wassergefüllte Kanäle, die zwischen den Zellen, also extrazellulär, liegen (12). Dieser Membran-limitierte Transfer für größere, ionisierte, hydrophile Verbindungen nimmt mehr Zeit in Anspruch und hängt von den weiteren Bestandteilen der Membran ab (6).

- Ab einem Molekulargewicht von 500 Da zeigt sich der Transfer verringert, ab 1.000 Da ist er kaum noch zu verzeichnen. Je niedermolekularer also eine Substanz ist, desto besser diffundiert sie durch die Plazentamembran.
- Wirft man einen genaueren Blick auf den Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und Diffusionsbereitschaft eines Moleküls, so zeigt eine Studie von Schneider et al. (12) noch einen interessanten Aspekt auf: Diffusionskoeffizient D und Molekulargewicht M_r verhalten sich indirekt, Permeabilität P und D direkt proportional zueinander. Mit größer werdendem M_r sinken folglich D und P , jedoch ist bei steigendem M_r ein leichter Rückgang des Verhältnisses $P:D$ zu vermerken, was darauf hinweist, dass es hier noch andere Faktoren gibt, die bei größeren Molekülen die Diffusion erschweren.
- Stoffe in ihrer ionisierten Form können die Lipiddoppelschicht gewöhnlich nicht passieren.
- Der pH-Wert beeinflusst die Diffusion insofern, als sich bei einem starken Abfall des fetalen pH-Werts (z. B. im Rahmen einer intrauterinen Asphyxie) der Transfer vom Kind zur Mutter verringert. Dadurch entsteht die Gefahr, dass sich Medikamente wie beispielsweise Lidocain, das die Mutter im Rahmen des Geburtsvorganges verabreicht bekommt, im kindlichen Kreislauf ansammeln.
- Durch die Bindung eines Stoffes an Plasmaproteine entsteht ein Komplex, der zu groß ist, um die Plazenta ungehindert passieren zu können. Fettsäure oder manche Medikamente beispielsweise binden über Liganden an Albumin und stehen in gebundener Form dem Transfer nicht zur Verfügung. Unterschiedliche Konzentrationen an Plasmaproteinen von Mutter und Kind beziehungsweise Veränderungen der Konzentrationen während der Schwangerschaft (aufgrund des größeren Blutvolumens sinkt die Albuminkonzentration der Mutter) sollten in diesem Zusammenhang beachtet werden.
- Bei In-vitro-Studien wurde beobachtet, dass einige Substanzen zwar aus dem mütterlichen Kreislauf aufgenommen, aber verstärkt im Plazentagewebe gebunden werden, sodass sich der Transfer in die fetale Zirkulation verzögert beziehungsweise verringert. In wie weit dieses „Depot-Phänomen“ in vivo eine Rolle spielt, ist in vielen Fällen noch unklar. Zu den bislang vorliegenden Forschungsergebnissen gehören beispielsweise jene

für das lipophile Buprenorphin, das in der Plazenta stark gespeichert wird und sich nur zu einem geringen Prozentsatz im fetalen Kreislauf nachweisen lässt. Auf jeden Fall verdeutlicht dieses Depot-Phänomen den zweistufigen Prozess des Plazentatransfers: erstens die Aufnahme aus dem mütterlichen Kreislauf in den Syncytiotrophoblasten und zweitens die Abgabe aus demselben in den kindlichen Kreislauf (4).

Der passive Transfer stellt also den idealen Transportmechanismus für niedermolekulare, stark fettlösliche, ungebundene und nicht-ionisierte Moleküle dar.

Für andere Transportmechanismen als die passive Diffusion, für Carrier-vermittelte Transferformen zum Beispiel, sind hingegen sind andere Eigenschaften für die Durchtrittsbereitschaft eines Stoffes ausschlaggebend: Je ähnlicher ein Fremdstoff einer körpereigenen Verbindung ist, für die es einen spezifischen Transporter gibt, desto leichter kann dieses Xenobiotikum statt des natürlichen Substrates die Plazenta durchqueren (4).

2) Mögliche Einflussgrößen auf den Transfer

a) Flussrate

Der geschwindigkeitsbestimmende Faktor der passiven Diffusion lipophiler Stoffe ist der Flow, der Blutfluss. Unter physiologischen Bedingungen steigt der Flow im intervillösen Raum von ca. 50 ml/min in der 10. Schwangerschaftswoche auf ca. 600 ml/min zum Zeitpunkt der Geburt. Bei sinkender Flussgeschwindigkeit im nicht Steady-state kann *in vivo* ein verzögerter Transfer von Substanzen in beide Richtungen beobachtet werden (4). Schneider et al. (16) setzten die maternalen und fetalen Flow rates (Q_M , Q_F) zueinander in Beziehung (Flow ratio $R = \frac{Q_F}{Q_M}$) und er-

kannten, dass eine Veränderung dieses Verhältnisses in beide Richtungen ausgehend von $R \approx 1$ bei annähernd gleichen Flussgeschwindigkeiten auf der maternalen und fetalen Seite eine Verringerung der Clearance von Antipyrin zur Folge hat. Bezogen auf den maternalen Flow sinkt die Clearance (Clearance in % von Q_M) bei kleiner werdendem R und steigt bei ansteigendem R .

Bei einer konstanten Flow ratio von 1 und beschleunigten Flow rates sinken die Transport fractions, wie Schröder et al. (17) veranschaulichen, indem sie in 27 Perfusionsanordnungen die Transport fractions von Antipyrin bei veränderten Flussgeschwindigkeiten ermittelten. Transport fractions sind normierte Werte, die Konzentrationsveränderung im maternalen oder fetalen Kreislauf in Bezug auf die maternale arterielle Konzentration beschreiben.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass unterschiedliche Autoren verschiedene Formeln und zum Teil auch verschiedene Bezeichnungen verwenden.

Schneider et al. (16) beschreiben $T_M = \frac{C_{Ma} - C_{Mv}}{C_{Ma} - C_{Fa}}$ und $T_F = \frac{C_{Fv} - C_{Fa}}{C_{Ma} - C_{Fa}}$. Challier (13)

unterscheidet zwischen der Placenta transport fraction T: $T = \frac{C_{Fv} - C_{Fa}}{C_{Ma} - C_{Fa}}$ und der

Extraction fraction E: $E = \frac{C_{Ma} - C_{Mv}}{C_{Ma} - C_{Fa}}$. Schröder et al. definieren die Transport fracti-

ons folgendermaßen:

$$T_M = \frac{C_{Ma} - C_{Mv}}{C_{Ma}} \quad T_F = \frac{C_{Fv}}{C_{Ma}}$$

(T_F/T_M = fetale/maternale Transport fraction; C_{Fv} , C_{Ma} , C_{Mv} =Konzentrationen in der fetalen/maternalen arteriellen/venösen Zirkulation)

Ausgehend von der Annahme, dass C_{Ma} konstant ist, ergibt sich dementsprechend Folgendes: Eine Steigerung von Q_M und Q_F in gleichem Maße, sodass die Flow ratio von 1 erhalten bleibt, bedeutet, dass weniger Antipyrin in die fetale Zirkulation übertritt ($T_F \downarrow \rightarrow C_{Fv} \downarrow$) und gleichzeitig weniger aus der maternalen Zirkulation aufgenommen wird ($T_M \downarrow \rightarrow C_{Mv} \uparrow$).

Schröder et al. erhöhten weiters die Flow ratio ($R = \frac{Q_F}{Q_M}$) von 0,125 auf 8, was eine

Beschleunigung von Q_F und eine Verlangsamung von Q_M bedeutet, und beobachteten eine Senkung von T_F und eine Steigerung von T_M . Aufgrund der höheren Flussgeschwindigkeit in der fetalen Zirkulation wird bei gleichbleibender Menge an übergetretenem Antipyrin weniger Konzentration pro Zeiteinheit gemessen ($T_F \downarrow \rightarrow C_{Fv} \downarrow$), während mehr Antipyrin aus der maternalen Zirkulation aufgenommen wird ($T_M \uparrow \rightarrow C_{Mv} \downarrow$).

b) Zirkulationssystem (offen/geschlossen)

Die Wahl des Zirkulationssystems hängt von der Fragestellung ab: Für Studien zum transplazentaren Transfer, zur Bildung von Stoffen in der Plazenta, für die Bestimmung von Volumsveränderungen im fetalen Kompartiment oder für Perfusionen über einen Zeitraum von mehr als zwei Stunden (9) eignen sich Modelle mit geschlossenen Kreisläufen. Für Clearance-Untersuchungen ist ein offenes System zu bevorzugen, da sich hier ein Steady-state-Gleichgewicht einstellen kann, aus dem die Clearance einfach zu berechnen ist (4) [Clearance = Transport fraction x Flow rate (13)].

c) Shunts und unphysiologische Durchströmungsmuster

Von einem Shunt spricht man, wenn Perfusat zwischen dem Ein- und dem Ausstrom „kurz geschlossen“ wird, also nicht in Bereiche vordringt, in denen ein Stoffaustausch stattfinden kann. Neben anatomischen Shunts, bei denen beispielsweise mütterliches Blut noch vor Eintritt in den intervillösen Raum venös abfließt, treten bei künstlichen Perfusionen vergleichbare artifizielle Shunts auf, wenn sich die Perfusionsgebiete der beiden Kreisläufe nicht kongruent überlappen. Abgesehen davon ist anzunehmen, dass die *In-vitro*-Perfusionsmuster von den physiologischen abweichen. Shuntflüsse und unregelmäßige Durchströmungsverteilungen schlagen sich in reduzierten Transfer fractions nieder (17).

d) Perfusionsdruck

Der Perfusionsdruck verhält sich direkt proportional zur Flow rate (16). Man nimmt an, dass der fetale Perfusionsdruck *in vivo* bei 30 mmHg und der Druck im intervillösen Raum bei 10 mmHg liegt (7).

e) Perfusionsmedium

Bei Verwendung von verdünntem Blut als Perfusionsmedium im Vergleich zu Earle's gepufferter Salzlösung, mit einem Gewebeskulturnährmedium vermischt, bemerkten Schneider et al. (11) einen signifikant gesteigerten Glucoseverbrauch und eine – allerdings statistisch nicht signifikant – verringerte Laktatproduktion. Möglicherweise lässt dies auf einen gesteigerten Plazentametabolismus bei Verwendung von Blut in den Zirkulationen schließen. In Bezug auf den Sauerstoffverbrauch konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Perfusionsmedien festgestellt werden. Contractor et al. (44) stellten zwei verschiedene Perfusi-

onsanordnungen gegenüber: Eine Gruppe von Kotyledonen wurde in offenem Kreislauf mit Earle's gepufferter Salzlösung unter Zugabe von Dextran perfundiert und beide Perfusate wurden mit 95% O₂ und 5% CO₂ equilibriert. Eine zweite Gruppe wurde mit einem geschlossen rezirkulierenden Perfusat bestehend aus frischem autologem Nabelschnurblut und Earle's Salzlösung in beiden Zirkulationen versorgt und nur die mütterliche Seite wurde oxygeniert. Die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Plazentagewebes zeigten eklatante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen: Bei den Earle's-Perfusat-Plazenten konnten schon nach 30 Minuten leichte morphologische Veränderungen beobachtet werden. Nach einer Stunde zeigten sich schwere Gewebsschäden, ödematöse Schwellungen aller Zellen und deren Organellen und im Besonderen gravierende Schäden an über 60% der Mitochondrien. Die Morphologie der Nabelschnurblut-Plazenten hingegen blieb bis zu einer Perfusionszeit von zwei Stunden beinahe unverändert und zeigt erst nach drei Stunden leichte ödematöse Veränderungen und Schäden an den Mikrovilli, während rund 80% der Mitochondrien intakt blieben.

f) Substanzen

Der Transfer durch die Plazenta verläuft, wie bereits angesprochen, in zwei Schritten, wobei besonders der Übertritt aus dem Syncytiotrophoblasten in den fetalen Kreislauf vom placentaren Blutfluss abhängig ist. Dieser kann durch Substanzen beeinflusst werden, die über ihre Wirkung als Vasokonstriktoren oder –dilatoren den Perfusionsdruck heben oder senken und somit den Blutfluss abschwächen oder verstärken. Als Vasokonstriktoren wurden beispielsweise Norepinephrin, Histamin, Serotonin oder Prostaglandin E₂ identifiziert. Bei Acetylcholin, Epinephrin oder Adenosin wurde neben der konstriktorischen auch eine dilatorische Wirkung beobachtet. Medikamente und andere chemische Substanzen wie z. B. Nicotin, Morphin oder Alkohol können den placentaren Blutfluss direkt oder indirekt über die Freisetzung dieser biogenen Amine beeinflussen (7).

g) Sauerstoffkonzentration

Der physiologischen Sauerstoffspannung in den fetalen Gefäßen kommt man am nächsten, wenn das mütterliche Perfusat mit 95% O₂ und 5% CO₂ und das kindliche mit 95% N₂ und 5% CO₂ versorgt werden (9).

Im Vergleich von Plazenten, deren beide Perfusate mit 95% Sauerstoff und 5% CO₂ equilibriert wurden, mit solchen, bei denen man 95% Stickstoff und 5% CO₂ verwendete, verzeichnen Schneider et al. (11) nahezu eine Verdoppelung des Glucoseverbrauchs und einen leichten Anstieg der Laktatproduktion bei der Stickstoff-Gruppe. Die Membranpermeabilität für Antipyrin, einen Marker der freien Diffusion, und Kreatinin zeigte sich in dieser Studie von dem unterschiedlichen Sauerstoffangebot nur gering verändert. Sich zwar in den absoluten Werten von Schneider et al. unterscheidend, tendenziell aber gut dazu passend, beschreiben Bachmaier et al. (18) unter hypoxischen Bedingungen (95% N₂ und 5% CO₂ für beide Perfusate) einen Anstieg des Glucoseverbrauchs und der Laktatproduktion, die allerdings keine statistische Signifikanz erreichen. Die Diffusion und Clearance von Antipyrin nehmen in dieser Untersuchungsreihe bei Hypoxie im Gegensatz zu normoxischen Bedingungen (fetales Perfusat mit 95% N₂ und 5% CO₂ angereichert, für maternales Perfusat atmosphärische Gaszusammensetzung) als Zeichen einer gestörten Barrierefunktion signifikant ab. Histologische Schnittbilder zeigen nach sechsstündiger hypoxischer Perfusion deutliche degenerative Veränderungen der Morphologie des Plazentagewebes (ödematöses villöses Stroma, angeschwollene oder zerstörte Mitochondrien, Veränderungen in den fetalen Endothelzellen usw.), was die beeinträchtigte Membranfunktion erklärt. Im Gegensatz dazu zeigt sich die Integrität des Plazentagewebes nach gleich langer normoxischer Perfusion nur gering verletzt. Der nicht signifikante Anstieg des Perfusionsdrucks unter Sauerstoffmangel lässt sich am ehesten durch die veränderte fetale Gefäßmorphologie erklären.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien könnten möglicherweise mit den verwendeten Gaskonzentrationen bei der sauerstoffreichen Perfusion zusammenhängen: Während Schneider et al. beide Kreisläufe mit 95% O₂ und 5% CO₂ versorgten, equilibrierten Bachmaier et al. das fetale Perfusat mit 95% N₂ und 5% CO₂ und das maternale mit einer atmosphärischen Gaszusammensetzung. Hohe Sauerstoffspannungen im fetalen Kreislauf verändern aber bekanntlich die Plazentamorphologie innerhalb von zwei Stunden (9). Außerdem konnten Schneider et al. aufgrund einer gewissen Sauerstoffdurchlässigkeit des Schlauchsystems keine vollständige Anoxie schaffen. Eine dramatische Veränderung der Membranpermeabilität verzeichnet diese Forschungsgruppe erst bei induzierter Suppression der Glycolyse.

In diesem Kontext sei nochmals darauf verwiesen, dass das Ausmaß des Sauerstoffverbrauchs in direktem Zusammenhang mit jener Menge an Sauerstoff steht, mit der die Perfusate equilibriert werden (13).

h) Perfusionsdauer

Nach Myren et al. (6) ist die maximale Untersuchungsdauer eines humanen dual perfundierten Plazentakotyledons auf 48 Stunden beschränkt, doch die meisten Studien werden gar nicht erst auf einen dieses Limit ausschöpfenden Zeitrahmen hin angelegt. Anhand von verschiedenen Evaluierungskriterien (vergl. C, I, 1, c) kann auf den generellen Funktionszustand der Plazenta und die Integrität der kindlichen Gefäße rückgeschlossen werden. Je länger eine Perfusion andauert, desto stärker sind die morphologischen Veränderungen des Gewebes, die in der Folge zu einem veränderten Transferverhalten führen können. Im Rahmen einer Perfusionsdauer von bis zu sechs Stunden unter normoxischen Bedingungen sind diese histologischen Veränderungen allerdings nur sehr gering ausgeprägt (18). Miller et al. (9) sprechen sogar nach einer Perfusionsdauer von 12-18 Stunden noch von einem guten Erhaltungszustand der histologischen Plazentastrukturen.

i) Veränderungen der Plazentamorphologie

Im Rahmen verschiedener Erkrankungen oder Schadstoffexpositionen, z. B. bei Raucherinnen oder bei Müttern, die starker Luftverschmutzung oder vermehrten Giftstoffen in der Nahrung ausgesetzt sind (4), treten pathologische Veränderungen der Plazentamorphologie auf, die sich auf die Plazentafunktionen auswirken können. Im Speziellen sei hier auf die strukturellen Veränderungen von Plazenten diabetischer Mütter hingewiesen: Typischerweise zeigen sich eine Mikroangiopathie oder eine vermehrte Gefäßentwicklung, eine Verdickung der Basalmembran, gesteigerte Fibrosierung und eine Proliferation der glatten Muskelzellen. Ein erweitertes raues endoplasmatisches Retikulum und ein vermehrtes Auftreten zytoplasmatischer Vesikel lassen eine gesteigerte Synthese- und Transferaktivität des Plazentagewebes vermuten (19). Darüber hinaus sticht bei Plazenten diabetischer Mütter ein veränderter plazentarer Rezeptorstatus, eine vermehrte Expression von hCG und VEGF (vascular endothelial growth factor) und eine gesteigerte Aktivität der Lipoproteinlipase ins Auge, einem Enzym, das für die Aufnahme von Fettsäuren aus dem mütterlichen Blut in die Plazenta verantwortlich ist. Gleichzeitig sind die Plasmaspiegel von Arachidon- und Decosahexaensäure

von diabetischen Schwangeren höher als bei gesunden Müttern, was den Schluss erlaubt, dass unter diabetischer Stoffwechsellage zwar die Aufnahme von langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren vermehrt, der Transfer derselben zum Kind allerdings verringert ist. Mit dieser Vermutung in Einklang steht die Beobachtung, dass die Menge dieser Fettsäuren bei Auftreten von Gestationsdiabetes in den mütterlichen Erythrozyten und Plasmaphospholipiden im Normbereich liegt, die Neugeborenen aber geringere Spiegel an langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren aufweisen als Kinder gesunder Mütter (20).

j) Vaginalgeburt oder Sectio caesarea

Schneider et al. (11) verglichen in einer Studie über den Energiestoffwechsel dual perfundierter Kotyledonen die Gewebekonzentrationen von ATP und Laktat in Plazenten nach vaginalen Geburten mit solchen nach Schnittentbindungen. Die signifikant höheren Laktat- und ebenfalls signifikant niedrigeren ATP-Werte in der Sectio-Gruppe sind sehr klar darauf zurückzuführen, dass die Zeitspanne zwischen dem Abklemmen der Nabelschnur und dem Einfrieren des Plazentagewebes für die colorimetrische Analyse nach einem Kaiserschnitt etwa doppelt so lange dauerte wie nach einer Spontangeburt, und nicht etwa auf andere durch die unterschiedlichen Geburtsmethoden bedingte Faktoren. Diese Interpretation steht im Einklang mit zahlreichen anderen Untersuchungen von Plazenten nach vaginalen und chirurgischen Entbindungen, bei denen vergleichbare Werte zu beobachten waren (18,10).

k) Metabolisierung einer Substanz in der Plazenta

Während ihres Passierens der Plazenta können Substanzen oder Bestandteile davon Gegenstand der Biotransformation werden. Metaboliten der Phase-I-Reaktionen können die Plazenta leichter durchqueren als deren Ausgangsstoffe und naturgemäß auch leichter als die durch Konjugation wasserlöslich gemachten Endprodukte der Phase II (7).

So kann beispielsweise eine Verbindung von der Plazenta aufgenommen, im Gewebe enzymatisch in ihre Bestandteile zerlegt und in dieser Form entweder gespeichert oder der Synthese von beispielsweise Plazentahormonen beziehungsweise direkt dem Transfer in die andere Zirkulation zur Verfügung gestellt werden. Der Metabolismus im Plazentagewebe erklärt auch das oft unterschiedliche Verhalten bei Stoffaufnahme und -abgabe (z. B. andere Geschwindigkeiten).

3) Lipidtransfer – Tabelle

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
21^s Zit. 43	n=4 ¹⁾	120 min, einige allerdings frühzeitig abgebrochen	Krebs-Ringer-Bicarbonat Pufferlösung mit 2,5 g/100 ml Cohn Fraction V bovinem Albumin , 50 mg/100ml Glucose und abgelaufenem humanen Zitratblut von der Blutbank im Ausmaß von einem Drittel des Volumens. pO ₂ im fet. Perfusat > 30 mmHg pH=7,4	Geschlossene Zirkulation (1300 ml Rezirkulationsreservoir.) Flow rate: 550-650 ml/min Perfusionsdruck: 80-100 mmHg	Geschlossene Zirkulation (650 ml Rezirkulationsreservoir.) Flow rate: 100 ml/min Perfusionsdruck: 80/60-160/140 mmHg	100 mg/1000 ml BSP zugegeben jeweils in denselben Krl. wie Palmitat	[C ¹⁴], Glucose, freie FS und BSP als Indikator für Undichtigkeiten einer Zirkulation	-) Die Plazenta transportiert Palmitinsäure großteils unverändert von der mütterlichen in die fetale Zirkulation. Nur ein geringer Teil der in die Plazenta aufgenommenen FS (weniger als 20%) wird in andere Substanzen umgewandelt und findet sich in TG, Cholesterinestern, Cholesterin und Phospholipiden wieder. -) Der Transport scheint aktiver Natur zu sein, da er auch gegen einen leichten Konzentrationsgradienten erfolgen kann (800 µEq im mat. Perfusat und 900 µEq im fet.). Er verläuft grundsätzlich von der mütterlichen zur kindlichen Seite, kann aber, bei entsprechend hohem Konzentrationsunterschied (fetal >>> maternal) auch umgekehrt werden. -) Aus beiden Kompartimenten verschwinden 30-50% der initial vorhandenen Glucose.	1) n=4 für feto-maternalen Transfer 2) n=3 für materno-fetalen Transfer Die aus dem Jahre 1969 stammende Arbeit liefert entgegen der bis dahin vorherrschenden Meinung, die vom Fetus benötigten FS würde dieser ausschließlich selber produzieren, erste Beweise dafür, dass FS durch die Plazenta hindurch mit Hilfe eines vermutlich aktiven Mechanismus zum Kind transportiert werden können, und zwar in quantitativ bedeutsamen Mengen. In den Messungen wurden nur die markierten zugegebenen FS betrachtet; diejenigen FS, die im Cohn Fraction V bovinem Albumin enthalten sind, flossen nicht in die Ergebnisse ein. In dieser Studie wurden <i>ganze</i> Plazenten perfundiert, nicht bloß einzelne Kotyledonen.
	n=3 ²⁾			900 µEq/L Palmitinsäure-2-3-H³	900 µEq/L Palmitinsäure-16-[C¹⁴]				
	n=1			800 µEq/L Palmitinsäure-2-3-H³	900 µEq/L Palmitinsäure-16-[C¹⁴]				
	k.A.			Keine genauen Angaben für die übrigen Versuchsanordnungen: Palmitinsäure-16-[C ¹⁴] für eindirektional, Palmitinsäure-2-3-H ³ und Palmitinsäure-16-[C ¹⁴] für bidirektional gerichtete Untersuchungen					

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
22 ^s Zit. 78	n=2	k.A.	Humanes Serum aus abgelaufenem Plasma mit Zitronensäure-Dextrose, teilweise verdünnt mit Earle's gepufferter Salzlösung im Verhältnis 1:1 oder 1:2. Zugabe von 0,04 g/100 ml CaCl ₂ sowie je 5000 Units/ml Penicillin und Streptomycin. pH=7,4 durch Zugabe von 6 N HCl. 95% O ₂ , 5% CO ₂	Offene Zirkulation	Offene Zirkulation	<u>0,05 mCi/1,3 mg Palmitinsäure-1-[C¹⁴]</u> , <u>5,0 mCi/5,6 mg Palmitinsäure (N)-9, 10-³H, 0,05 mCi/0,25 mg Linolsäure-1-¹⁴C, 0,25 mCi/0,25 mg L-Leucin-4,5-³H(N), 0,25 mCi/3 mg Antipyrin-N-methyl-³H</u> , zu gegeben in den mat. oder fet. Krl. In manchen Studien <u>FS-freies bovines Albumin</u> zu <u>1%</u>	Transferraten der zugegebenen Substanzen für <i>materno-fetalen</i> Transfer	-) Die Transferraten von Linol- und Palmitinsäure unterscheiden sich nur gering (Verhältnis der Transferraten Palmitin- zu Linolsäure in drei Versuchen: 1,11; 1,14; 1,08 → Palmitinsäure wird etwas mehr transferiert) -) Im Vergleich zu Leucin wird die Palmitinsäure eher langsam transportiert. -) Zwei Experimente wurden mit Albumin im Perfusat durchgeführt (unklar, ob im mat., fet. oder beiden); <u>Palmitinsäure</u> zu zwei verschiedenen Konz. (<u>0,03 mg/100 ml bzw. 1 mg/100 ml</u>) wurde in die mütterliche Zirkulation zugegeben. Die Transferraten stiegen unter Albumin von 2 bzw. 1,6% auf 6,5 bzw. 5% bezogen auf Antipyrin an, wobei der letzte Wert jeweils den Net Transfer beschreibt. Die Anwesenheit von Albumin beschleunigt also den Transfer von Palmitinsäure.	Das humane Serum (Perfusionsmedium) beinhaltet auch die natürlich im Blut vorkommenden FS. Somit können bei der Studie durch die Bestimmung der Verteilung der markierten FS eigentlich nur Austauschraten und kein Net Transfer ermittelt werden. Die beiden Maße sind aber vergleichbar, wie in der Studie dargelegt wird. Die Analyse der Radioaktivität in den histologischen Gewebsschnitten spricht für einen starken Metabolismus der Palmitinsäure in der Plazenta. In den letzten SS-Monaten benötigt der Fetus eine drastisch gesteigerte Menge an FS. Schätzungen zufolge schwankt der Anteil des Bedarfs, der über den plazentaren Transfer gedeckt werden kann, zwischen 20% und 80%; der Rest verlangt eine <i>De novo</i> -Synthese im Fetus selber.
	n=2			Flow rate: k.A. Perfusionsdruck: k.A.	Flow rate: k.A. Perfusionsdruck: k.A.		Transferraten der zugegebenen Substanzen für <i>feto-maternalen</i> Transfer		

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
23^S Zit. 31	n=13	Beobachtungszeit-räume von 30-45 min	Earle's gepuf-ferte Salzlö-sung mit <u>1 g/100 ml FS-freiem huma-nem oder bo-vinem Serum-albumin.</u> 95% O₂, 5% CO₂.	Offene Zirkulation Flow rate: k.A. Perfusionsdruck: k.A. Radioaktiv markierte <u>FS in einer Ge-samtkon-zentration</u> von <u>40 µM: 3,8 mg/50 µCi Natrium-(1-¹⁴C)-He-xanoat, 10 mCi/mmol (1-¹⁴C)-De-cansäure, 230 mCi/mmol (9,10-³H)-Palmitinsäu-re, 170 mCi/mmol Antipyrin-N-(³H)methyl, 10 µCi/ml ¹²⁵I-labeled hu-manes Se-rumalbumin.</u>	Offene Zirkulation Flow rate: k.A. Perfusionsdruck: k.A.	---	Menge der in den mat. Krl. zugegebenen Substanzen im fet. Perfusat	Die Clearance der freien FS (in Bezug auf die Clearance von Antipyrin) steigt logarithmisch mit absteigender Kettenlänge der freien FS. Im Allgemeinen treten Substanzen umso leichter durch Membranen, je lipophiler sie sind. In diesem Fall lässt sich jedoch das Gegenteil beobachten, nämlich dass der Transfer der lipophilsten, also der längsten FS, am langsamsten abläuft. Hier müssen also andere Faktoren bestimmend für den Transfer sein. Einen Erklärungsansatz könnte die unterschiedliche Proteinbindung der einzelnen Stoffe liefern. Außerdem diffundieren lipophile Stoffe frei umso leichter, je kleiner sie sind.	In 7 Experimenten wurde die Clearance von Albumin gemessen; der Wert ist beachtlich höher als jener, den man aus bisherigen <i>In vivo</i>-Untersuchungen ableiten kann. Die Ursache dafür liegt vermutlich im Überdruck und somit sind diese Werte als Artefakt der Untersuchungsmethode zu betrachten. Der Einfluss dieses Fehlers auf die Ergebnisse für den Transfer von Palmitinsäure sind beachtlich, sodass in dieser Studie eine Korrektur vorgenommen wurde. Somit ergeben sich Transferraten für Palmitinsäure von 4% bezogen auf Antipyrin, etwa die Hälfte des Werts, der in (24^S) beschrieben wurde. Somit wird die Bedeutung der <i>De novo</i>-Synthese von FS durch den Fetus noch mehr betont.

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
24^s Zit. 44	n=4	30-45 min insges., 15- 20 min pro Experiment	Gepufferte Salzlösung mit 95% O ₂ und 5% CO ₂	Offene Zirkulation	Offene Zirkulation	1 bzw. 2 g / 100 ml BSA in den <u>mat.</u> Krl.	Menge der in das fet. Perfusat übergetretenen FS	Transfer der FS sinkt bei Zugabe von BSA ins <u>mat.</u> Kompartiment (für Decansäure stärker als für Hexansäure).	Es lässt sich eine logarithmische Zunahme des Transfers mit kürzer werdender C-Kette von C16 zu C8 beobachten. Der Transfer kann also nicht allein von der Lipidlöslichkeit abhängen, da die FS umso fettlöslicher sind, je länger sie werden. Es müssen also noch andere Faktoren einen Einfluss auf den Transfer haben, wie z.B. die Proteinbindung, die umso stärker wird, je länger die C-Kette ist, oder die Molekülgröße. Ab C4 nimmt der Transfer wieder ab, was sich wahrscheinlich auf veränderte Wasserlöslichkeit und Proteinbindung zurückführen lässt.
	n=4			Flow rate: k.A.	Flow rate: k.A.	0,05 bzw. 1 g / 100 ml BSA in den <u>fet.</u> Krl.		Transfer der FS steigt bei Zugabe von BSA ins <u>fet.</u> Kompartiment (für Decansäure stärker als für Hexansäure). Je mehr BSA zugegeben, desto stärker der Effekt.	
	n=5			Perfusionsdruck: k.A.	Perfusionsdruck: k.A.	1 g / 100 ml BSA in <u>mat.</u> und <u>fet.</u> Krl.		Transfer für Hexansäure bleibt unverändert, Transfer für Decansäure sinkt bei Zugabe von BSA in <u>beide</u> Kompartimente. Zugabe von Albumin in das fet. Perfusat kann also den verlangsamenden Effekt von derselben Menge Albumin im mat. Perfusat nicht kompensieren.	

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
25^s Zit. k.A.	k.A.	2 h	Earle's balancierte Salzlösung mit 30 g/L Dextran (T 70) und 1 g/L Glucose. 5% O ₂ , 5% CO ₂ , 90% N ₂	Offene Zirkulation Flow rate: k.A. Perfusionsdruck: 0-20	Offene Zirkulation Flow rate: k.A. Perfusionsdruck: 40-60	---	Markierte FS im venösen mat. und fet. Perfusat und im placentaren Gewebe	-) LA und αLN finden sich im fet. Kompartiment v.a. als freie FS wieder. -) Hingegen ist die übergetretene AA hauptsächlich in Phosphoglyceriden eingebaut zu finden. -) Die Plazenta nimmt aktiv	

				mmHg	mmHg			FS auf und bevorzugt dabei langkettige, mehrfach ungesättigte FS für den Transport zum Fetus. -) AA wird im Vergleich zu den anderen FS am meisten aufgenommen. -) Im Plazentagewebe liegen die FS v.a. als TG vor.	
				Zugabe von radioaktiv markierten FS in den art. Schenkel: LA, αLN und AA					

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
26^s Zit. 58	n=9	90 min nach 60 min Auswasch- und Kontrollzeit	Modifizierte Krebs-Ringer-Lösung, 95% O ₂ und 5% CO ₂ . FS-freies <u>Hu-manalbumin: 0,5% w/v</u> im mat. und fet. Perfusat	Offene Zirkulation. Flow rate: 20 ml/min Perfusionsdruck: k.A. ² H ₂ O [¹⁴ C]-markierte und nicht markierte FS in einer den in TG veresterten FS entsprechenden Konz. ¹ <u>Molares Verhältnis Albumin: freie FS = 0,78</u>	Offene Zirkulation. Flow rate: 7 ml/min Perfusionsdruck: < 80 mmHg	---	Konzentration der FS und des ² H ₂ O im art. und ven. fet. und mat. Perfusat, daraus die Clearance von FS und ² H ₂ O berechnet. FS im Plazentagewebe. [³ H]Ölsäure ist jeweils die Referenz-FS.	Die einzelnen FS werden in unterschiedlichem Ausmaß transferiert (unterschiedliche Selektivität für den Transfer). Für die untersuchten FS ergab sich die Reihenfolge: DHA> αLN>LA>OA>AA	Bedeutung dieser FS für den Fetus: -) Entwicklung von Retina und Gehirn -) Aufrechterhalten der Funktionalität von Zellmembranen -) Vorläufer von Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen Nicht nur die Konzentration der einzelnen FS bestimmt die Selektivität der Aufnahme sondern auch die Anzahl der Doppelbindungen.

1

	Palmitinsäure	Ölsäure	LA	αLN	DyLN	AA	EPA	DHA
Konz. der FS entsprechend den FS in TG	37,20 μM	40,52 μM	16,79 μM	0,98 μM	0,88 μM	0,78 μM	0,20 μM	0,29 μM

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
27^s Zit. 26	n=5	30 min Krebs-Ringer, 30 min Ringer mit FS-freiem Humanalbumin, Ende der Perfusion nach weiteren 60 min.	Modifizierte Krebs-Ringer-Lösung, 95% O ₂ und 5% CO ₂ . FS-freies Hu-manalbumin: 0,5% w/v im maternalen und fetalen Perfusat	Offene Zirkulation Flow rate: 20 ml/min Perfusionsdruck: k.A. ² H ₂ O (ein flow-limitierter Marker). [¹⁴ C]-markierte und nicht markierte FS in einer den freien FS im mütterlichen Blut entsprechenden Konz. ² <u>Gesamtkonz. der FS: 87 µM</u>	Offene Zirkulation Flow rate: 7 ml/min Perfusionsdruck: < 80 mmHg	---	Konzentration der FS und des ² H ₂ O im fet. und mat. Perfusat, daraus die Clearance von FS und ² H ₂ O berechnet. Für Angaben über die Selektivität für die einzelnen FS werden die Ergebnisse jeweils auf die Werte von LA bezogen.	Selektivität: Bei Triglycerid-FS-Zusammensetzung ergibt sich für die Selektivität des Transfers: <u>DHA>αLN>LA>AA.</u> Bei FS-Zusammensetzung entsprechend der freien FS ändert sich diese auf: <u>DHA>AA> αLN>LA.</u> -) Sig. Steigerung des Transfers von AA und DHA. -) Kein Unterschied in der Transfer-Selektivität für αLN. Die Selektivität für die „Accumulation“ der FS in der Plazenta (d.h. der steady-state-Konzentration der FS in einem sich ständig austauschenden FS-Reservoir in der Plazenta) bleibt unverändert.	Die Selektivität der Plazenta für αLN und DHA scheint von der FS-Zusammensetzung im mütterlichen Blut eher unabhängig zu sein; die Selektivität für AA hingegen steigt mit steigender mütterlicher AA-Konzentration. Die starke Auswirkung auf AA hängt damit zusammen, dass die Plazenta eine wichtige Produktionsstätte für Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene ist. Man beachte, dass bei TG-Zusammensetzung die Selektivität für die <i>Aufnahme</i> von AA höher, für den <i>Transport</i> hingegen niedriger als für alle anderen FS ist: Die Plazenta benötigt ein gewisses Mindestmaß an AA und falls sie diese Menge nicht von der mütterlichen

² Diese Mischung aus FS entspricht jeder der freien, nicht veresterten FS im mütterlichen Blut. In anderen Studien (26^s) wird dieselbe totale Konzentration an FS verwendet (87µM), die Zusammensetzung aber entspricht derjenigen der in Triglyceriden veresterten FS. Die beschriebene Studie vergleicht ihre Ergebnisse mit den bereits bekannten Resultaten aus Studien, deren FS-Mischung nach der FS-Verteilung in Triglyceriden erstellt wurde. Es kann angenommen werden, dass die TG-Zusammensetzung dem physiologischen Zustand untertags, die Zusammensetzung wie bei freien FS jenem während der Nacht entspricht.

	Palmitinsäure	Ölsäure	LA	αLN	DyLN	AA	EPA	DHA
TG-Zusammensetzung	38,1 mol%	41,5 mol%	17,2 mol%	1,0 mol%	0,9 mol%	0,8 mol%	0,2 mol%	0,3 mol%
Zusammensetzung wie bei freien FS	59,9 mol%	23,5 mol%	6,9 mol%	1,3 mol%	1,0 mol%	1,9 mol%	3,1 mol%	2,3 mol%

								Absoluter Transfer: Signifikanter Unterschied beim absoluten Transfer aller vier FS zu beobachten: -) Für α LN, AA und DHA ist der absolute Transfer bei FS-Zusammensetzung entsprechend der freien FS größer als bei Triglycerid-Zusammensetzung, -) für LA ist der absolute Transfer geringer	Seite her bekommen kann, greift sie auf AA aus dem fet. Krl. zurück. Die Ernährung der Mutter und folglich die Menge der einzelnen FS im mütterlichen Blut sind der einflussreichste Faktor für den individuellen Transfer dieser mehrfach ungesättigten FS von der Mutter zum Fetus.
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
28^s Zit. 9	n=10 ¹⁾	k.A.	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung	Geschlossene Zirkulation (2 L Rezirkulationsreservoir) Flow rate: 600 ml/min Perfusionsdruck: k.A. Glucose kontinuierlich zugegeben mit 600 mg/h	Geschlossene Zirkulation (k.A zum Rezirkulationsreservoir) Flow rate: 30 ml/min Perfusionsdruck: k.A.	6,3 g Ethanol in das mat. Reservoir	Glucose, Ethanol, Laktat, Triglyceride, Phospholipide, an Phosphor geknüpfte Lipide (lipid phosphorus) und freie FS in Proben aus dem mat. und fet. Reservoir.	Generell steigen die Produktionsraten unter dem Einfluss von Ethanol an; ein signifikanter Anstieg wird nur bei der Produktion von Phospholipiden und freien Fettsäuren beobachtet.	¹⁾ Ethanolgruppe ²⁾ Kontrollgruppe Der Ethanolmetabolismus der Plazenta scheint qualitativ ähnlich dem der Leber. Die außerdem untersuchte histologische Struktur verändert sich unter dem Einfluss von Ethanol nicht; Ursache dafür ist vermutl. die geringe Konzentration an Ethanol.
	n=8 ²⁾					---			

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
29^S Zit. 6	n = 5 ¹⁾	90 min	Modifizierte Krebs-Ringer-Lösung, 5% CO ₂ , 95% O ₂ .	Offene Zirkulation	Offene Zirkulation	---	FS- und H ₂ ¹⁸ O-Konzentrationen im mat. und fet. Perfusat. Die absoluten Transferraten der FS wurden bezogen auf die H ₂ ¹⁸ O-Clearance ausgedrückt.	Kein Unterschied zwischen Plazenten von Raucherinnen und Nichtraucherinnen festzustellen, was den Transfer der FS betrifft. FS werden in folgender Reihenfolge selektiv transportiert: DHA>AA>αLN>LA. (Entsprechend den Doppelbindungen: 6>4>3>2)	¹⁾ Nichtraucher ²⁾ Raucher (>10 Zigaretten/d) Bekanntlich wird durch das Rauchen die Morphologie der Plazenta verändert; die Funktion des FS-Transports scheint davon aber unbeeinflusst zu bleiben. Allerdings ist es durchaus möglich, dass <i>in vivo</i> Auswirkungen durch z.B. veränderten Blutfluss (Metabolit von Nikotin führt zur Vasokonstriktion) bestehen.
	n = 5 ²⁾		5 g/L Humanalbumin H ₂ ¹⁸ O	Flow rate: 20 ml/min Perfusionsdruck: k.A.	Flow rate: 7 ml/min Perfusionsdruck: k.A.				
	n = 4 ³⁾		Physiologische Mischung aus FS in g/100g: Palmitinsäure 59,9, Ölsäure 23,5, LA 6,9, αLN 1,3, Dihomo-γ-Linolensäure 1,0, AA 1,9, EPA 3,1, DHA 2,3 und physiologisches Verhältnis Albumin:FS (0,78 aus 5 g/L Albumin und 87 μM FS).	Radioaktiv markierte FS in kBQ/μmol: [C¹⁴]Linolensäure 28, [C¹⁴]α-Linolensäure 162, [C¹⁴]Arachidonsäure 8 und [C¹⁴]Decosahexaensäure 26		2 mg/ml Ethanol in den mat. Kreislauf		-) Signifikante Reduktion des Transfers von α-LN und DHA und nicht-signifikante Steigerung von AA und LA beobachtet → veränderte Selektivität für den Transfer der einzelnen FS: AA>αLN>LA>DHA -) Signifikante Reduktion der Clearance von H ₂ ¹⁸ O.	³⁾ Alkoholgruppe Die Reduktion der H ₂ ¹⁸ O-Clearance kann als verringerte Austauschfläche der Plazenta interpretiert werden; dieses Ergebnis passt zu früheren Untersuchungen, die unter dem Einfluss von Ethanol eine verringerte Plazentadurchblutung feststellten (Vasokonstriktion durch vermehrte Produktion von Prostaglandinen). Die Gegenwart von Ethanol reduziert die Verfügbarkeit von mehrfach ungesättigten FS für den Fetus, der jedoch für seine Entwicklung auf eine kontinuierliche Versorgung mit FS angewiesen ist.

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
30^s Zit. 11	n = 4	10 min Auswaschperiode, 1 h Kontrollzeit, 4 h Perfusion, 1 h Kontrollzeit	Antipyrin (mat. 1mM), Kulturmedium M199 (10,9 g/L), Dextran (mat. 7,5 g/L, fet. 30,0 g/L), Glucose (mat. 2,77 mM), Heparin (2000 units/L), Kanamycin (100 mg/L), Natrium-bicarbonat (mat. 30 mM, fet. 25 mM für pH mat. 7,4 und pH fet. 7,35).	Geschlossene Zirkulation (250 ml Rezirkulationsreservoir) Flow rate: 15 ml/min. Perfusionsdruck: k.A. Mischung aus vier FS-Ethylestern: Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäureethylester zu 5 µM (n=2) und 20 µM (n=2)	Geschlossene Zirkulation (150 ml Rezirkulationsreservoir) Flow rate: 3 ml/min. Perfusionsdruck (in mmHg): vorher: 38,9; während des Experiments: 39,5; nachher: 43,1.	Ohne Albumin	FS-Ethylester im fetalen und maternalen Perfusat und im Plazentagewebe.	-) FS-Ethylester verschwinden kontinuierlich aus dem maternalen Perfusat, gelangen aber nicht ins fetale Perfusat, weder bei Perfusion mit niedriger noch mit hoher FS-Ethylester-Konzentration. -) Bei hoher FS-Ethylesterkonzentration im mat. Perfusat verläuft die Elimination aus dem Perfusat langsamer als bei niedriger Konzentration -) Albumin hat keinen Einfluss auf den Transfer der FS-Ethylester	FS-Ethylester, die im mütterlichen Körper aus der Veresterung von Ethanol mit FS entstehen, gelangen nicht zum Kind, sondern werden von der Plazenta aufgenommen und in Mitochondrien enzymatisch abgebaut (vergleiche Subzellularstudien derselben Forschungsgruppe). Dieser Metabolismus kann durch entsprechend hohe Konzentrationen an Substrat gesättigt werden (deshalb verringert sich die Eliminationsgeschwindigkeit bei steigender Konzentration von FS-Ethylestern im mat. Perfusat).
	n = 6	10 min Auswaschperiode, 1 h Kontrollzeit (30 min ohne, 30 min mit Albumin), 3 h Perfusion, 1 h Kontrollzeit	mat.: 95% O ₂ und 5% CO ₂ ; fet.: 95% N ₂ und 5% CO ₂ .	Selbe Anordnung. Mischung aus vier FS-Ethylestern: Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolsäureethylester zu 2 µM (n=3) und 20 µM (n=3)	Selbe Anordnung. Perfusionsdruck (in mmHg): vorher: 46,2 ohne und 49,3 mit Albumin; während des Experiments: 54,7; nachher: 56,2.	Mit bovinem Albumin zu 0,5% (w/v) in den mat. und fet. Kreislauf		-) Die einzelnen FS-Ethylester werden unterschiedlich schnell aufgenommen und auch verschieden lange in der Plazenta behalten (Stearinsäure am langsamsten eliminiert und am längsten in der Plazenta verblieben, Linolsäure am schnellsten und kürzesten).	Diejenigen FS-Ethylester, die im Mekonium eines Neugeborenen gefunden werden, stammen also nicht direkt von der Mutter, sondern entstehen aus dem Ethanol, das durch die Plazenta von der Mutter zum Kind gelangt, und das im Kind metabolisiert wird. Somit können FS-Ethylester im Mekonium als direkter Biomarker für die Exposition des Feten im Mutterleib gegenüber Ethanol dienen.

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
31^s Zit. 2	n=5 ¹⁾	120 min	<u>Mat. Perfusat:</u> Autologes mat. Blut, verdünnt mit Tc-199-Medium (Hkt. ca. 6); 95 % O ₂ , 5% CO ₂ .	Geschlossene Zirkulation (150-160 ml Rezirkulationsreservoir) Flow rate: 24-30 ml/min Perfusionsdruck: 15-18 mmHg	Geschlossene Zirkulation (110-120 ml Rezirkulationsreservoir) Flow rate: 6-9 ml/min	---	Konzentrationen von CFI, Phospholipiden und Cholesterin als Bestandteile der Liposomen, sowie Kreatinin aus dem fet. und mat. Perfusat. Daraus Transfer und Aufnahme des Plazentagewebes berechnet.	Je kleiner die Liposomen, desto größer sind die Aufnahme in die Plazenta und der Transfer von CFI in das fetale Kompartiment. Große und multilamelläre Liposomen werden viel weniger in die Plazenta aufgenommen und folglich kommt auch weniger CFI ins fetale Perfusat. Freies CFI wird zwar in größerem Ausmaß als CFI in kleinen Liposomen aus der mat. Zirk. aufgenommen, doch der Übertritt in die fet. Zirk. von CFI in kleinen Liposomen ist größer als der des freien Stoffes. ([CFI] _{fet.} = 1,9% bei freiem, [CFI] _{fet.} = 3,7% bei CFI in kleinen Liposomen).	¹⁾ n=5 mit freiem CFI, kleinen und großen Liposomen ²⁾ n=6 mit freiem CFI, kleinen und großen Liposomen Freies CFI ist sehr polar und lipophil. Im fet. Perfusat können keine Liposomen mehr nachgewiesen werden; daraus lässt sich schließen, dass Liposomen nach ihrer Aufnahme in die Plazenta abgebaut werden. Die zelluläre Aufnahme von Liposomen geschieht entweder über Endozytose oder über Fusion.
	n=6 ²⁾		<u>Fet. Perfusat:</u> Verdünntes autologes Nabelschnurblut (Hkt. ca. 14)	Perfusionsdruck: 15-18 mmHg <u>Creatinin:</u> <u>30 mg</u> <u>5 nM freies CFI</u> Liposomen in drei verschiedenen Größen (aus Lecithin und Cholesterin) mit CFI ³	Perfusionsdruck: 40-50 mmHg				

3

	Kleine Liposomen (n=10)	Große Liposomen (n=10)	Multilamelläre Liposomen (n=11)
Größe (nm)	74 +/- 0,9	147,0 +/- 1,4	296 +/- 1,7
Anfängliche Konzentration an CFI (mM)	250	250	250
Anfängliche Konzentration an Phosphatidylcholin (µM)	66	66	66
Endkonzentration an Phosphatidylcholin (µM)	58 +/- 1,4	58 +/- 1,0	55 +/- 1,2
Anfänglichen Konzentration an Cholesterin (µM)	66	66	66
Endkonzentration an Cholesterin (µM)	57 +/- 1,2	60 +/- 0,7	56 +/- 0,7
Prozentsatz an Verkapselung	1,5 +/- 0,2	24,4 +/- 3,5 S	2,1 +/- 0,1
Latenzzeit von CFI	98,0 +/- 0,3	98,6 +/- 0,2	98,0 +/- 0,3

Angaben als Mittelwert +/- Standardabweichung. S P < 0,01 verglichen mit den Ergebnissen von den kleinen und multilamellären Liposomen.

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
32^s Zit. 6	n=4	2 h	k.A.	Geschlossene Zirkulation (k.A. zum Rezirkulationsreservoir.)	Geschlossene Zirkulation (k.A. zum Rezirkulationsreservoir.)	$[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha_2\text{M}$	Radioaktivität im mat. und fet. Krl. sowie im Plazentagewebe.	Bei Zugabe von $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha_2\text{M}$ treten nur 0,07% in den fet. Krl. über. Auch im Plazentagewebe ist die Substanz nur sehr gering nachzuweisen.	In dieser Studie wurden Ergebnisse von der dualen Perfusionsmethode, von Untersuchungen an inkubierten Trophoblastenzellen sowie Subzellularstudien an microvillösen Membranen zusammengefasst. Es lässt sich ein direkter Nachweis für eine Rezeptor-vermittelte Endozytose von $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha_2\text{M-T}$ in der Plazenta erbringen. Nach der Aufnahme des Komplexes in das Plazentagewebe wird derselbe abgebaut, bevor Bestandteile zum Fetus weiter transportiert werden. 30% des Zinks im Plasma werden von $\alpha_2\text{M}$ transportiert; möglicherweise dienen die Rezeptor-vermittelte Endocytose und der folgende Abbau dieses Zink-haltigen Komplexes physiologischer Weise dazu, das Decken des Zinkbedarfs der Plazenta und des Fetus zu unterstützen.
	n=5			Flow rate: k.A. Perfusionsdruck: k.A. <u>0,5 mg $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha_2\text{M}$ oder $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha_2\text{M-T}$ je nach Experiment.</u> <u>10 mM Chloroquin</u> bei den entsprechenden Untersuchungen. <u>30 mg Creatinin in 1 ml</u>	Flow rate: k.A. Perfusionsdruck: k.A.	$[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha_2\text{M-T}$		Die Radioaktivität steigt nach einer Verzögerungszeit von etwa 30 min im fet. Krl. rasch auf etwa 0,94% der Ausgangsdosis im mat. Krl. an. Im Plazentagewebe ist gleichfalls eine vermehrte Aufnahme zu beobachten. Allerdings kann $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha_2\text{M-T}$ als intaktes Protein in der fet. Zirkulation nicht nachgewiesen werden.	
	n=k.A.					$[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha_2\text{M-T}$ und Chloroquin		Chloroquin verhindert vollständig die Abnahme der Radioaktivität im mat. Zirkulation und somit den Transfer zum fet. Kompartiment.	

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
33^s Zit. 25	n=7 ¹⁾	50-60 min, Probenentnahme in 10-min-Intervallen	Perfusionsmedium 199 mit 2,2 g/L NaHCO ₃ , 100 mg/L L-Glutamin, 3 g/L Fraktion V humanes Serumalbumin, 27 g/L Dextran (av M _r 79.000)	Offene Zirkulation	Offene Zirkulation	---	Radioaktivität im mat. und fet. Effluent, daraus die Aufnahme, die Clearance und den Clearance Index (das Verhältnis der AA-Clearance zur Clearance von Antipyrin) für AA berechnet	-) Sign. Steigerung der Aufnahme und des Transfers von AA in diabetischen Plazenten.	¹⁾ n=7 Plazenten von diabetischen Müttern (IDDM) ²⁾ n=7 Kontrollplazenten Plazenten diabetischer Mütter weisen strukturelle Veränderungen auf wie z.B. Mikroangiopathie, Verdickung der Basalmembran, vermehrte Fibrose und Proliferation glatter Muskelzellen. Ein vergrößertes raues ER und mehr cytoplasmatische Vesikel lassen eine gesteigerte Synthese- und Transferaktivität des Plazentagewebes vermuten. Diese Veränderungen könnten einen Kompensationsmechanismus darstellen, um die Nährstoffversorgung für den Fetus zu gewährleisten. Der gesteigerte AA-Transfer, der nicht einfach durch ein vermehrtes AA-Angebot im mütterlichen Blut erklärbar ist, könnte somit die aus anderen Studien bekannte verminderte AA-Produktion diabetischer Plazenten ausgleichen. Tiermodelle können weiters vermuten lassen, dass AA dazu beiträgt, durch IDDM bedingte fetale Anomalien zu verhindern.
	n=7 ²⁾			Flow rate: k.A. Perfusionsdruck: k.A. <u>³H-markierte AA (50 µCi)</u> sowie <u>nicht markierte AA (2,6 mg/L)</u> , vorbereitet mit 30 mg/ml FS-freiem Humanalbumin 30 min vor jedem Experiment <u>30 mg/ml Antipyrin</u> je 30 min vor jedem Experiment	Flow rate: k.A. Perfusionsdruck: k.A. <u>2,8 mg/L nicht markierte AA</u>		Antipyrin im fet. Effluent	-) Sign. verringerte Clearance, aber sig. gesteigerter Clearance Index von Antipyrin in diabetischen Plazenten. -) Sign. vermehrte Einlagerung der AA in TG im mat. und fet. Perfusat bei diabetischen Plazenten, umgekehrt weniger nicht veresterte AA im Plazentagewebe und fet. Effluent bei IDDM-Plazenten. -) Sign. vermehrte Einlagerung von AA in Phospholipide im fet. Effluent bei IDDM-Plazenten. -) Signifikant verringertes Vorkommen von AA in Phosphoglyceriden und als unveresterte FS im Plazentagewebe diabetischer Mütter, sign. vermehrtes Vorkommen in TG.	

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
34^s Zit. 16	n=7 ¹⁾	Je 30 min pro Konzentrationsveränderung der Glucose in der mat. Zirkulation, 4,5 h insgesamt.	Krebs-Lösung (in mmol/l): NaCl 97,0; NaHCO ₃ 24,4; KCl 3,0; KH ₂ PO ₄ 1,2; CaCl ₂ ·2H ₂ O 1,89; MgSO ₄ ·7H ₂ O 1,0; Glucose 3,0; pH 7,4. 95% O ₂ und 5% CO ₂	Zirkulation: k.A. Flow rate: 10 ml/min	Zirkulation: k.A. Flow rate: 5 ml/min	---	D-Glucose und Laktat im mat. und fet. Perfusat und Effluent, daraus Aufnahme von Glucose aus dem mat. Krl., Transfer in den fet. Krl., Verbrauch durch die Plazenta sowie Freisetzung von Laktat in mat. und fet. Krl. berechnet; L-Glucose im mat. und fet. Perfusat, daraus Diffusionsrate berechnet.	-) Aufnahme und materno-fetaler Transfer von D-Glucose sind direkt proportional der mat. Glucosekonzentration, bei Plazenten diabetischer Mütter jeweils geringer als in der Kontrollgruppe. -) Der Glucoseverbrauch der Plazenta steigt ebenfalls mit steigender mat. Glucosekonzentration, bei Plazenten diabetischer Mütter wiederum geringer. -) Auch die Freisetzung von Laktat in die fet. und mat. Zirkulation ist bei DM-Plazenten reduziert. -) Der materno-fetale Transfer von L-Glucose ist ebenfalls in diabetischen Plazenten geringer als in der Kontrollgruppe.	¹⁾ DM ohne Insulin (nur Diät) ²⁾ Kontrollgruppe Materno-fetaler D-Glucose-transport erfolgt hauptsächlich über Insulin-unabhängige GLUT1-Carrier-vermittelte erleichterte Diffusion; für L-Glucose hingegen gibt es keinen Transporter, es diffundiert einfach nach dem Fick'schen Gesetz. Eigentlich führt ein erhöhter Glucosespiegel zu einer vermehrten Expression von GLUT1. Bei DM ist der Transport von Glucose allerdings verringert, was dahingehend gedeutet werden könnte, dass die Plazenta eine Schutzfunktion für den Fetus vor Hyperglycämie einnimmt. Ein diabetisches Milieu könnte also ein vermindertes Vorkommen von GLUT1 bedeuten, wobei diesbezüglich widersprüchliche Forschungsergebnisse vorliegen.
	n=9 ²⁾			Perfusionsdruck (k.A., ob fet. oder mat.): 1. Perfusion: 38,1 mmHg bei DM-Gruppe, 38 mmHg bei Kontrollgruppe 4. Perfusion: 38,9 mmHg bei DM-Gruppe, 39,3 mmHg bei Kontrollgruppe <u>Glucose zu 4, 8, 16 und 24 mmol/L</u>	 <u>Glucose konstant 3 mmol/L</u>				

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
35^s Zit. 8	n=9 ¹⁾	Je 30 min pro Konzentrationsveränderung der Glucose in der mat. Zirkulation, 4,5 h insgesamt	Krebs-Lösung (in mmol/l): NaCl 97,0; NaHCO ₃ 24,4; KCl 3,0; KH ₂ PO ₄ 1,2; CaCl ₂ ·2H ₂ O 1,89; MgSO ₄ ·7H ₂ O 1,0; Glucose 3,0; pH 7,4. 95% O ₂ und 5% CO ₂	Zirkulation: k.A. Flow rate: 10 ml/min Perfusionsdruck: k.A.	Zirkulation: k.A. Flow rate: 5 ml/min Perfusionsdruck: k.A.	---	D-Glucose und Laktat im mat. und fet. Perfusat und Effluent, daraus Aufnahme von Glucose aus dem mat. Krl., Transfer in den fet. Krl., Verbrauch durch die Plazenta sowie Freisetzung von Laktat in mat. und fet. Krl. berechnet	-) Aufnahme von Glucose aus dem mat. Perfusat und materno-fetaler Glucosetransfer steigen in allen drei Gruppen, je höher die Glucosekonzentration im mat. Perfusat ist. -) Glucoseaufnahme aus dem maternalen Perfusat und Glucosetransfer sind bei DM-mit-Insulin-Plazenten und Kontrollplazenten <i>größer</i> als bei DM-ohne-Insulin-Plazenten. -) Beide DM-Gruppen-Plazenten haben einen niedrigeren Glucoseverbrauch als die der gesunden Kontrollgruppe und nur in der Kontrollgruppe steigt der plazentare Glucoseverbrauch mit steigender mat. Glucosekonzentration -) Die Diffusion von ³ H-L-Glucose ist bei diabetischen Plazenten verringert. -) Die Freisetzung von Laktat zeigt sich von der Glucosekonzentration unabhängig.	¹⁾ DM mit Insulin ²⁾ DM ohne Insulin (nur Diät) ³⁾ Kontrollgruppe Zusammenfassung: Der transplazentare Glucosetransport ist in Plazenten von diabetischen Müttern, die Insulin verabreicht bekamen, größer als in Plazenten diabetischer Mütter, die nur mit Diät allein behandelt wurden. Die Insulintherapie kann also den bei diabetischen Müttern verringerten Glucosetransfer normalisieren. Allerdings ist es fraglich, ob das für das Kind einen Vorteil bedeutet.
	n=10 ²⁾								
	n=9 ³⁾								

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
36^s Zit. 5	n=7 ¹⁾	k.A.	Krebs-Henseleit-Pufferlösung: NaCl 121 mM, KCl 4 mM, KH ₂ PO ₄ 0,95 mM, MgSO ₄ ·7H ₂ O 1,2 mM, NaHCO ₃ 22 mM, Glucose-H ₂ O 11,1 mM, CaCl ₂ 2 mM. Heparin 2500 IE/L. pH=7,4; 95% O ₂ , 5% CO ₂ .	Geschlossene Zirkulation (150 ml Rezirkulationsreservoir) Flow rate: 12 ml/min Perfusionsdruck: k.A.	Geschlossene Zirkulation (150 ml Rezirkulationsreservoir) Flow rate: 6 ml/min Perfusionsdruck: 15-40 mmHg	In die fet. Zirkulation: Zugabe von <u>150 mE/ml Insulin</u> zu n=12 der Kontrollplazenten 15 min. vor Zugabe von <u>L-NAME in steigenden Konzentrationen</u>	Fetaler arterieller Druck als Maß für den fetalen Gefäßwiderstand.	-) Der Ausgangswert des fetalen arteriellen Drucks ist bei DM I-Plazenten höher als in der Kontrollgruppe. -) Die Nettozunahme des fetalen art. Drucks bei Zugabe von L-NAME ist ebenfalls bei DM I-Plazenten größer als bei gesunden Plazenten. -) Insulin hat keinen Einfluss auf diese Zunahme.	1) DM Typ I 2) Kontrollplazenten Diabetes ist vermutlich assoziiert mit einem erhöhten Ruhetonus der fetalen Plazentengefäße. Dieser kann nicht durch verminderte NO-Wirkung erklärt werden, im Gegenteil: Der NO-Signalweg scheint bei diabetischen Plazenten sogar verstärkt zu sein, da die Zugabe von einem NO-Synthasehemmer (L-NAME) bei DM-Plazenten eine größere Auswirkung zeigt als in der Kontrollgruppe.
	n=24 ²⁾								

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
37^s Zit. 76	n=7	20 min-Intervalle, abwechselnd mit und ohne t-BHP	Krebs-Ringer-Bicarbonat Pufferlösung, 95% O ₂ , 5% CO ₂	Zirkulation: k.A. Flow rate: 8-10 ml/min Perfusionsdruck: k.A. <u>t-Butyl-Hydroperoxid</u> zu <u>10, 25, 50 und 100 µmol/L</u>	Zirkulation: k.A. Flow rate: 2-4 ml/min Perfusionsdruck: ca. 30 mmHg	---	Lipid-Peroxide im mütterlichen und fetalen Effluent, daraus die Sekretionsrate der Plazenta für Lipid-Peroxide berechnet.	-) Die Sekretion von Lipid-Peroxide durch die Plazenta wird durch Zugabe von t-BHP dosisabhängig gesteigert. -) Die plazentare Sekretion von Lipid-Peroxiden ist auf die maternale Seite hin größer als auf die fetale.	Lipid-Peroxide sind reaktive und schädigende Verbindungen, die durch Interaktion zwischen einem Lipid und einem Radikal entstehen. In der Plazenta haben sie eine vasokonstriktorische Wirkung, indem sie die Thromboxanproduktion fördern und die Prostacyclinproduktion hemmen.

	n=6	Nacheinander 20 min-Intervalle für je: Krebs-Ringer, t-BHP, Krebs-Ringer, Aspirin, Aspirin plus t-BHP, t-BHP	Krebs-Ringer-Bicarbonat Pufferlösung, 95% O ₂ , 5% CO ₂	Zirkulation: k.A. Flow rate: 8-10 ml/min Perfusionsdruck: k.A. t-Butyl-Hydroperoxid zu 100 µmol/L und/oder niedrig dosiertes Aspirin zu 5 x 10⁻⁵ mol/L	Zirkulation: k.A. Flow rate: 2-4 ml/min Perfusionsdruck: 30 mm Hg	---		-) Die Zugabe von Aspirin allein zeigt keine Auswirkungen. -) Aspirin kann aber den Effekt von zugegebenen Peroxiden, nämlich Lipid-Peroxide zu erzeugen, hemmen. Diese Hemmung ist dauerhaft, da Aspirin die COX irreversibel inaktiviert.	In der Schwangerschaft sind die mütterlichen Blutspiegel an Lipid-Peroxiden erhöht – besonders bei Frauen mit Präeklampsie – und fallen nach der Geburt rasch wieder ab. Daraus und aus den Ergebnissen dieser Studie lässt sich schließen, dass die Plazenta Lipid-Peroxide produziert, die in der mütterlichen Zirkulation messbar sind.
--	-----	--	---	---	---	-----	--	--	--

Art.	Az.	Zeit	Perfusionsmedium	Mat. Zirkulation	Fet. Zirkulation	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
38^s Zit. 3	n=5 ¹⁾ n=4 ²⁾	7 h	GewebekulturmEDIUM NCTC-135 verdünnt mit Earle-Pufferlösung 1:1 / 1:3 mit 1,33 / 2 g/L Glucose (widersprüchliche Angaben), 10 g/L Dextran 40, 4% bovinen Serumalbumin, 2500 IU/L Heparin und 250 mg/L Clamoxyl. <u>Fet.:</u> 95% N ₂	Geschlossene Zirkulation (150 ml Rezirkulationsreservoir) Flow rate: 12 ml/min Perfusionsdruck: k.A.	Geschlossene Zirkulation (150 ml Rezirkulationsreservoir) Flow rate: 6 ml/min Perfusionsdruck: k.A.	---	Verschiedene Zytokine und Enzyme (TNF-α, IL-1ss, IL-6, IL-8 und IL-10; 8-iso-PGF2α, p22phox) sowie Mikropartikel im mat. und fet. Kompartiment	-) Im Laufe der Zeit steigen die Spiegel aller Zytokine -) 90% aller Zytokine werden in das mat. Kompartiment freigesetzt, außer -) 8-iso-PGF2α, hier sind 90% im fetalen Kompartiment zu finden und die Zugabe von X und XO führt zu einer sign. verstärkten Freisetzung. -) Unter Zusatz von X und XO vermehrte Freisetzung von p22phox. -) MPs waren zu 90% im mat. Kreislauf (MP _{mat.} : trophoblastäres Material; MP _{fet.} : v.a. endothelialer Herkunft)	¹⁾ Kontrollplazenten ²⁾ Plazenten unter Zugabe von X und XO <u>Interpretation der Ergebnisse:</u> Die in-vitro-Perfusion an sich verursacht Gewebeschäden an der Plazenta und setzt die Plazenta somit unter oxidativen Stress, der aber – selbst unter Zugabe der ROS-bildenden Substanzen X und XO – nicht sehr stark ist. Die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen kann als Indikator der Unversehrtheit der Plazenta und des Er-

			und 5% CO ₂ <u>Mat.:</u> atmos- phärische Gasmischung mit 5% CO ₂					-) Nur tendenziell mehr antioxidative Enzyme bei Perfusion mit X+XO. -) In Hinblick auf Glucose- und Sauerstoffverbrauch kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen.	halts ihrer antioxidativen Kapazität gedeutet werden.
--	--	--	---	--	--	--	--	--	--

Art.	Az.	Zeit	Perfusions- medium	Mat. Zirkula- tion	Fet. Zirkula- tion	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
39^s Zit. 64	n= 10	270-870 min	Gewebekultur- medium NCTC-135 verdünnt mit Earle-Lösung 2:1 mit <u>2 g/L</u> <u>Glucose, 10</u> <u>g/L Dextran</u> <u>40, 2500 IU/L</u> <u>Heparin, 250</u> <u>mg/L Clamo-</u> <u>xy!</u> <u>Fet.:</u> 95% N ₂ und 5% CO ₂ <u>Mat.:</u> atmos- phärische Gasmischung mit 5% CO ₂	Geschlos- sene Zirkula- tion (150 ml Rezirku- lationsre- servoir.) Flow rate: 12 ml/min Perfusions- druck: k.A.	Geschlossene Zirkulation (150 ml Rezir- kulationsreser- voir.) Flow rate: 4-6 ml/min Perfusions- druck: k.A.	---	Konzentratio- nen an Leptin, hCG und hPL im maternalen und fetalen Perfusat vor und nach der Perfusion	-) 98,4% der Leptinproduk- tion gehen ins maternale Kompartiment. -) 99,95% des hPL- und hCG gehen ebenfalls in die mütterliche Zirkulation. -) Die Leptinfreisetzung in das fetale Kompartiment korreliert positiv mit derje- nigen in das maternale. -) Die Leptinfreisetzung ins fetale Kompartiment kor- reliert positiv mit der Frei- setzung von hCG ins fetale Kompartiment.	Die genaue Rolle des Lep- tins in der Schwangerschaft bleibt weiterhin unklar. Es scheint für die Thermoge- nese, die Mobilisierung von Energiespeichern und als Wachstumshormon für die Angiogenese von Bedeu- tung zu sein und darüber hinaus auch eine an- tiinflammatorische Wirkung zu haben.

Art.	Az.	Zeit	Perfusions- medium	Mat. Zirkula- tion	Fet. Zirkula- tion	Zusatz	gemessen	Ergebnis	Bemerkung
40^s Zit. 23	n=27	k.A.	Krebs-Ringer-Lösung. 95% O ₂ , 5% CO ₂ .	Offene Zirkulation. Flow rate: 20 ml/min Perfusionsdruck: k.A. Nach 30 Min. Zugabe von 0,5% w/v FS-freies Humanalbumin und eine FS-Mischung entsprechend der nicht veresterten FS im mat. Blut im 3. SS-Trimester. [¹⁴ C]-L-Glucose	Offene Zirkulation. Flow rate: 7 ml/min Perfusionsdruck: k.A. Nach 30 Min. Zugabe von 0,5% w/v FS-freiem Humanalbumin	---	Leptin im mat. und fet. Effluent	-) Von der Plazenta produziertes Leptin wird in beiden Zirkulationen gefunden, allerdings auf der mat. signifikant mehr als auf der fet. Seite. -) Es besteht kein sign. Zusammenhang zwischen der Leptinproduktion und mat. BMI, Geburtsgewicht und –percentile, Gestationsalter oder den Nabelschnurblutgaswerten. -) Die mat. (nicht fet.!) Leptinproduktion nimmt jedoch signifikant mit steigendem Verhältnis fetales:plazentares Gewicht zu.	Gegen Ende der SS steigt der mütterliche Leptinspiegel, wobei keine Korrelation mit dem mat. BMI festgestellt werden kann (bei nicht schwangeren Erwachsenen hängen BMI und Leptinspiegel zusammen). Vermutlich ist die Plazenta mit ihrer Leptinproduktion an dieser Steigerung mit beteiligt. Leptin spielt nicht nur in der Regulation der Energiebalance des ges. Körpers eine Rolle, sondern auch für Insulinsekretion, Glucoseverbrauch, FS-Metabolismus und vermutlich auch in der fetalen Entwicklung. [¹⁴ C]-L-Glucose ist ein Diffusionsmarker.

D) Diskussion

Fettsäuren sind in der Entwicklung des menschlichen Fetus in vielerlei Hinsicht von elementarer Bedeutung: Sie sind u. a. für die Bildung und den Erhalt der Funktionsfähigkeit von Membranen verantwortlich, stellen einen Großteil der Energievorräte des Ungeborenen, dienen als Ausgangssubstanzen wichtiger Botenstoffe wie z. B. Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene und sind für die Entwicklung von Augen und Gehirn unerlässlich. Für Decosahexaensäure (DHA) wurde ein direkter Zusammenhang zwischen mütterlichem Konsum an Fisch und Meeresfrüchten, Hauptquellen von DHA, und der Entwicklung der Sehfähigkeit, der Intelligenz und der Feinmotorik des Kindes festgestellt. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA, polyunsaturated fatty acids) sind auch an der Entzündungs- und Immunantwort beteiligt (z. B. an der Steuerung der Lymphozytenproliferation oder an der Aktivierung von natürlichen Killerzellen). Über Interaktion mit dem TLR-4 können langkettige PUFA auch auf die Pathogenese der Arteriosklerose Einfluss nehmen (20).

Während Szabo et al. (21^s) 1969 die Meinung vertraten, der transplazentare Transport von Fettsäuren sei quantitativ vernachlässigbar und der überwiegende Teil der vom Fetus benötigten Fettsäuren würde von diesem selber synthetisiert werden, verweist Haggarty (14) 2002 auf multiple Forschungsergebnisse, die einen beachtlichen Fettsäuretransfer von der mütterlichen zur kindlichen Zirkulation nahe legen. Besonders bei denjenigen Fettsäuren, die der menschliche Körper nicht selber produzieren kann und die deshalb mit der Nahrung zugeführt werden müssen, ist der Fetus von der mütterlichen Versorgung und folglich vom transplazentaren Transfer abhängig. Diese sogenannten *essenziellen* Fettsäuren, Linolsäure (18:2, *n*-6) und α -Linolensäure (18:3, *n*-3), die biochemisch dadurch gekennzeichnet sind, dass ihre Doppelbindungen in *n*-3- bzw. *n*-6-Position liegen, sowie deren langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäure-Derivate, Dihomo- γ -Linolensäure (18:3, *n*-6), Arachidonsäure (20:4, *n*-6), Eicosapentaensäure (20:5, *n*-3) und Decosahexaensäure (22:6, *n*-3), sind aufgrund ihrer großen Bedeutung für den Fetus Gegenstand vieler Perfusionsstudien. Die Plazenta selber besitzt keine Enzyme, die essentielle Fettsäuren in LC-PUFA umwandeln können (Δ 5- und Δ 6-Desaturase) und die fetale Desaturase-Enzymaktivität ist noch so gering,

dass das Kind auch bei diesen Derivaten von der Versorgung durch die Mutter abhängt (20).

Untersuchungen an Frühgeborenen, denen Öl von Meerestieren zur Nahrung dazugegeben wurde, zeigen, dass nicht allein die absolute Menge der zum Fetus gelangenden Fettsäuren dessen Wachstum beeinflussen kann (z. B. eine Minderversorgung), sondern auch das Mischverhältnis dieser Fettsäuren. Eine Erklärung dafür können diese Studien allerdings noch nicht bieten. Es zeigt sich jedoch auch in anderen Untersuchungen (z. B. durch Analyse der Blutfette) immer wieder, dass die Zusammensetzung der Fettsäuren im mütterlichen Blut, also die Ernährung der Mutter, am stärksten Einfluss auf die Mischung der zum Fetus transportierten Fettsäuren nimmt (14).

Die gesamte intrinsische Transportkapazität der Plazenta wurde von Haggarty et al. (41) anhand von dreißig Plazenten gesunder Schwangerschaften untersucht, die eine große Bandbreite an Geburts- und Plazentagewichten abdeckten (von der 8. bis zur 99. kindlichen Gewichtsperzentile). Die Ergebnisse zeigten, dass die Kapazität aller Plazenten in Hinblick auf den Transfer von Glucose, Fett- und Aminosäuren annähernd gleich war, weshalb die Annahme, die Plazenta könnte durch eine geringe Nährstofftransportleistung das fetale Wachstum beeinträchtigen, unwahrscheinlich wird. Im Gegenteil, die Transportleistung der Plazenta bei Kindern mit geringem Gewicht übertrifft sogar die Anforderungen. Es wäre denkbar, dass es *in vivo* physiologische Kontrollsysteme gibt, die den Fettsäuretransport limitieren und an die Bedürfnisse anpassen, oder aber, dass der Transport sehr wohl in seinem gesamten Ausmaß stattfindet, allerdings zeitgleich in beide Richtungen, materno-fetal und feto-maternal (adaptives Transportsystem).

Fettsäuren liegen im mütterlichen Blut in verschiedenen Transportformen vor, z. B. als freie, nicht veresterte Fettsäuren, als Bestandteil von Triglyceriden und Phospholipiden oder als hydrophile Teile in Lipoproteinen. Grundsätzlich besitzt der Trophoblast nur die Möglichkeit, nicht veresterte Fettsäuren, NEFA (non esterified fatty acids), aufzunehmen, doch durch die Lipoproteinlipase, die eine Triglycerid-spaltende Aktivität aufweist, ist auch die Aufnahme von Fettsäuren aus Triglyceriden möglich. Darüber hinaus konnten in der Zwischenzeit spezifische Bindungsstellen für Lipoproteine (LDL, VLDL, HDL), die veresterte Fettsäuren

transportieren, identifiziert werden, die damit eine weitere Fettsäure-Molekülgruppe darstellen. Im Laufe der Schwangerschaft steigt die Triglycerid-Konzentration der Mutter verhältnismäßig stärker an als diejenigen anderer Lipide. Zieht man alle diese Gegebenheiten in Betracht, so ist anzunehmen, dass die in die Plazenta gelangten freien Fettsäuren zu bislang unbekannten Anteilen einerseits direkt aus den NEFA und andererseits aus den Triglyceriden im mütterlichen Blut stammen (14).

Fettsäuren können auf zwei verschiedenen Wegen die Plazentabarriere überwinden: Einerseits diffundieren sie als lipophile Verbindungen durch verschiedene Zellsysteme der Plazentaschranke, andererseits gibt es für einzelne Fettsäuren spezielle Bindungsproteine, FABPs (fatty acid binding proteins), die den spezifischen Transport der jeweiligen Fettsäure unterstützen (41) und in ihrer Aktivität gesättigt werden können (20). Wie groß der Beitrag jeder dieser beiden Wege zum Gesamttransport ist, bleibt noch unklar. FABPs findet man auf beiden Seiten der Syncytiotrophoblastenmembran, weshalb der durch die Bindungsproteine erleichterte Transport bidirektional ablaufen kann. Die placentare Lipase – wobei hier zu hinterfragen ist, ob diese Lipase-Aktivität tatsächlich noch von der Sekretion des Proteins aus dem Trophoblasten kommt oder ob sie nicht eher von mütterlichen Lipasen stammt – spaltet im mütterlichen Blut Triglyceride zu NEFA. Diese NEFA werden mit Hilfe von FABPs durch die mikrovillöse Membran transportiert, wobei der genaue Mechanismus der Transportunterstützung noch unbekannt ist. Im Zytoplasma angelangt, können die Fettsäuren entweder gespeichert, oxidiert, zu Eicosanoiden verändert, verestert oder direkt weitertransportiert werden. Veresterte Fettsäuren werden als Phospholipide, Cholesterinester oder Triglyceride in die fetale Zirkulation exportiert; der direkte Weitertransport der freien Fettsäuren durch die basale Membran in das fetale Blut erfolgt wieder mithilfe von Transport- und Bindungsproteinen.

Die einzelnen langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren, LCPUFA (long-chain polyunsaturated fatty acids), werden von der Plazenta in unterschiedlichem Ausmaß transportiert. Für die Selektivität ihres Transports sind verschiedene Faktoren verantwortlich, z. B. die Menge an vorhandener Lipase, die Aufnahme über die mikrovillöse Membran mithilfe der bereits genannten FABPs, der Metabolis-

mus innerhalb der Plazenta und nicht zuletzt auch die Form, in der die Fettsäuren in den kindlichen Kreislauf exportiert werden.

Aufgrund der unterschiedlichen Selektivität des Fettsäuretransfers lässt sich ein Phänomen, „Biomagnifikation“ genannt, beobachten, das darin besteht, dass die Konzentrationen gewisser LCPUFA, beispielsweise der Arachidonsäure oder der Decosahexaensäure, im fetalen Kreislauf größer sein können als im maternalen. Unterschiedliche Bindungsaffinitäten der FABPs beispielsweise tragen dazu bei, dass die Spiegel von Arachidon- und Decosahexaensäure im intervillösen Raum drei- bis vierfach höher sind als im mütterlichen Blut außerhalb der Plazenta.

Um die Selektivität des Transfers der einzelnen Fettsäuren anschaulich auszudrücken, kann beispielsweise das Verhältnis der Konzentrationen der in die fetale Zirkulation übergetretenen Fettsäuren zur Konzentration der Fettsäuren im maternalen Blut angegeben werden (14).

In einer Studie von 1997 untersuchten Haggarty et al. (26^s) die Selektivität des Transfers der Fettsäuren LA, OA, α LN, AA und DHA. Die genannten Fettsäuren sowie PA, D γ LN und EPA wurden dem maternalen Kompartiment in einer Konzentration zugegeben, die derjenigen der in Triglyceriden veresterten Fettsäuren im mütterlichen Blut entspricht. Für die Selektivität des Transfers ergab sich folgende Reihenfolge: DHA> α LN>LA>OA>AA.

1999 untersuchten Haggarty et al. (27^s) dieselben Fettsäuren erneut, gaben sie diesmal aber (bei gleicher Gesamtmenge wie in der erstgenannten Studie) in einer Zusammensetzung zu, die derjenigen der freien mütterlichen Fettsäuren entspricht. Eine signifikante Steigerung des Transfers von AA und DHA bei unveränderter Selektivität für α LN führte nun zu folgender Reihenfolge: DHA>AA> α LN>LA.

Es besteht also je nach Zusammensetzung der Fettsäuren im maternalen Perfusat ein Unterschied in der Selektivität des Transfers und darüberhinaus konnte auch im absoluten Transfer eine signifikante Veränderung beobachtet werden, nämlich eine Steigerung des Transfers von α LN, AA und DHA und eine Verminderung von LA bei einer Zusammensetzung entsprechend den freien Fettsäuren.

Betrachtet man diese Reihenfolgen in Bezug auf die Kettenlänge der Fettsäuren, so findet man $C_{22}>C_{18}>C_{20}$ bzw. $C_{22}>C_{20}>C_{18}$ (je nach Zusammensetzung der Fettsäuren im Perfusat). In zwei Studien von Dancis et al. (23^s, 24^s) wurde der

Transfer von gesättigten Fettsäuren untersucht, mit dem Ergebnis, dass der Transfer abhängig von der Länge der Kohlenstoffkette umso schneller abläuft, je kürzer dieselbe ist ($C_6 > C_{10} > C_{18}$). Dies scheint nun in mehrfacher Hinsicht widersprüchlich, erstens im Vergleich zu den Aussagen von Haggarty et al. und zweitens angesichts dessen, dass im Allgemeinen Substanzen umso leichter durch Membranen treten, je lipophiler, was bei Fettsäuren bedeutet, je länger sie sind. Es müssen hier also noch weitere Faktoren außer der Lipophilität eine Rolle für die Selektivität des Transfers spielen, beispielsweise unterschiedliche Proteinbindungen, Transportproteine oder andere chemische Eigenschaften der einzelnen Fettsäuren: Zieht man die Anzahl der Doppelbindungen mit in Betracht, so zeigt sich in den Studien von Haggarty et al. die Reihenfolge $22:6 > 18:3 > 18:2 > 18:1 > 20:4$ bei Triglycerid-Zusammensetzung bzw. $22:6 > 20:4 > 18:3 > 18:2$ bei Zusammensetzung wie bei den freien Fettsäuren. Die Selektivität scheint also auch von der Anzahl der Doppelbindungen abhängig zu sein.

Diese Aussagen sind konkordant zu den Ergebnissen einer weiteren Studie von Haggarty et al. (29^s), in der die Auswirkung von Rauchen und Alkohol auf den Fettsäuretransfer untersucht wurden. Bei einer Fettsäuremischung vermutlich entsprechend der Zusammensetzung der freien Fettsäuren im maternalen Kompartiment fand sich bei Raucherinnen sowie bei Nichtraucherinnen die aus der vorangegangenen Studie (27^s) bekannte Reihenfolge $DHA > AA > \alpha LN > LA$. Unter Zugabe von Ethanol in den maternalen Kreislauf verringerte sich jedoch der Transfer von αLN und DHA signifikant, sodass sich $AA > \alpha LN > LA > DHA$ ergab. Diese Veränderung kann, anders als die ebenfalls verringerte Clearance von Diffusionsmarkern, nicht auf die kleinere Austauschfläche bei Plazenten alkoholtrinkender Mütter zurückgeführt werden, sondern beruht augenscheinlich auf einem unmittelbaren Effekt von Ethanol auf den Fettsäuretransfer. Anders verhalten sich die plazentaren Produktionsraten von freien Fettsäuren, diese steigen unter Zugabe von Ethanol signifikant an (28^s).

Auch Diabetes verändert die Selektivität des Fettsäuretransfers: Kuhn et al. (33^s) zeigten eine signifikante Steigerung der Aufnahme und des Transfers von Arachidonsäure, eine ebenfalls signifikant vermehrte Einlagerung der Arachidonsäure in Triglyceride und Phospholipide und folglich ein vermindertes Vorkommen freier Arachidonsäure im Plazentagewebe und in beiden Perfusaten bei Plazenten diabetischer Mütter. Der hier gezeigte gesteigerte Arachidonsäuretransfer könnte ein

Kompensationsmechanismus für die aus anderen Studien bekannte verringerte Arachidonsäureproduktion diabetischer Plazenten sein. Arachidonsäure hat eine Sonderstellung unter den Fettsäuren, da die Plazenta als wichtige Produktionsstätte von Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen einen Mindestbedarf an deren Ausgangssubstanz, der Arachidonsäure, hat. Wenn dieser Bedarf aus dem mütterlichen Blut nicht gedeckt werden kann, greift die Plazenta auf Arachidonsäure aus dem kindlichen Kreislauf zurück und umgekehrt transferiert sie erst nachdem ihr Grundbedarf gedeckt ist diese Fettsäure weiter in die fetale Zirkulation (27^s).

Während der Schwangerschaft ist der Fettstoffwechsel der Mutter beschleunigt: NEFA werden aus dem mütterlichen Fettgewebe mobilisiert und zirkulieren als in Triglyceriden veresterte Fettsäuren im Blut. Es drängt sich nun die Frage auf, welcher Mechanismus für diese erhöhten Triglycerid-Spiegel der Mutter verantwortlich sein könnte. Eine mögliche Antwort liefern die Plazenta selber und das von ihr gebildete Peptidhormon Leptin. Leptin stimuliert die Lipolyse, kann also Fette aus den Energiespeichern der Mutter freisetzen. Es wird vor allem in Adipozyten, doch in geringerem Ausmaß auch in anderen Organen wie beispielsweise dem Magen und der Plazenta gebildet, wobei bei Letzterer die Sekretion beinahe zur Gänze in die mütterliche Zirkulation erfolgt. Über dieses selber produzierte Leptin ist der Plazenta somit die Möglichkeit gegeben, die Freisetzung von NEFA aus dem mütterlichen Fettgewebe und somit die Deckung ihres eigenen Bedarfs an Fettsäuren zu steuern. Dieser Mechanismus erlaubt also eine Anpassung des Angebots an Fettsäuren auf der mütterlichen Seite der Plazenta als Antwort an die kindliche Nachfrage (14).

Hoggard et al. (40^s) fanden keine Zusammenhänge zwischen der plazentaren Leptinsekretion und den Parametern mütterlicher BMI, Geburtsgewicht, Geburtsperzentile und Nabelschnurblutgaswerte. Hingegen nimmt die maternale (nicht die fetale!) Leptinproduktion mit steigendem Verhältnis fetales:plazentares Gewicht signifikant zu. Haggarty (14) vermutet deshalb einen Zusammenhang zwischen plazentarem Leptin und dem Ausmaß an fetalem Wachstum bezogen auf die Versorgung der Plazenta mit Nährstoffen, was die bereits erwähnte Anpassung des Angebots an die fetale Nachfrage ermöglichen würde.

Der NEFA-Konzentrationsgradient zwischen mütterlichem und kindlichem Plasma steigt während der SS kontinuierlich an, bis die Konzentration der NEFA im maternalen Blut diejenige im fetalen am Geburtstermin um etwa das Dreifache übertrifft. Dieser Konzentrationsgradient treibt den materno-fetalen Fettsäuretransfer (20). Albumin, das Hauptträgerprotein der Fettsäuren, ist im Gegensatz dazu auf der kindlichen Seite in höherer Konzentration zu finden, weshalb hier auch deutlich weniger ungebundene freie Fettsäuren vorkommen.

Der Einfluss von Albumin auf den Transfer der Fettsäuren wird in verschiedenen Studien untersucht. Dancis et al. (24^s) beschreiben eine Steigerung des Fettsäuretransfers bei Zugabe von Albumin in die fetale und eine Verringerung bei Zugabe in die maternale Zirkulation. Dies lässt schließen, dass die physiologischen Gegebenheiten, nämlich die Steigerung der fetalen Albuminkonzentration im Laufe der Schwangerschaft, den maternofetalen Transfer der Fettsäuren fördern. Eine Studie von Dancis et al. (22^s) aus dem Jahr 1973 zeigt eine Zunahme des Transfers von Palmitinsäure unter Zugabe von Albumin, wobei allerdings aus der Methodenbeschreibung nicht klar hervorgeht, zu welchem Kompartiment Albumin zugegeben wurde. Von den Ergebnissen der erstgenannten Studie (24^s) ausgehend müsste die Zugabe in die fetale Zirkulation erfolgt sein.

Chan et al. (30^s) konnten für die Aufnahme von Fettsäure-Ethylestern aus dem maternalen Kompartiment bei Zugabe von Albumin zu beiden Kreisläufen keine statistisch signifikanten Unterschiede beschreiben, die Eliminierungsraten für die Ethylester aus dem maternalen Perfusat veränderten sich nur leicht von LA>PA>OA>SA (18:2>18:0>18:1>18:0) zu LA>OA>PA>SA (18:2>18:1>18:0>18:0).

Fettsäuren spielen auch noch in einem anderen Zusammenhang eine bedeutende Rolle: Eingebaut in Phospholipide sind sie ein wichtiger Bestandteil von Lipoproteinen. Diejenigen Eiweißverbindungen, die an der Oberfläche der Lipoproteinaggregate sitzen, werden Apolipoproteine genannt und fungieren u. a. als Liganden an Apolipoproteinrezeptoren, die die Aufnahme der Lipoproteine in verschiedene Körperzellen ermöglichen (15).

Die humane Plazenta ist in ihrem Bedarf an Cholesterin, auf welches in vielerlei Hinsicht, beispielsweise bei der Bildung von Progesteron, nicht verzichtet werden kann, auf die Versorgung aus dem mütterlichen Blut angewiesen, da die eigene

Syntheseleistung der Plazenta für diese Steroidhormonvorstufe den Bedarf nicht abzudecken vermag. Cholesterin wird in allen Lipoproteinen transportiert, am meisten allerdings in LDL. Rezeptoren für LDL an der Trophoblastenoberfläche erkennen ApoB-100. Doch auch ApoE ist ein Ligand des LDL-Rezeptors am Trophoblasten und da ApoE nicht nur mit LDL sondern auch mit VLDL Komplexe bilden kann, ermöglicht es somit die Aufnahme dieses Lipoproteins über den LDL-Rezeptor, wobei die Bindungsaffinität an den LDL-Rezeptor für ApoE sogar noch stärker zu sein scheint als für ApoB-100.

Organe, die Steroidhormone synthetisieren und folglich große Mengen an Cholesterin benötigen, wie beispielsweise die Nebenniere, die Ovarien oder die Hoden, bedienen sich des folgenden Mechanismus: Die Zellen der Organe sezernieren LDL-Rezeptoren und ApoE und steigern somit ihre Aufnahmefähigkeit von Cholesterin aus Lipoproteinen (42). Rindler et al. (42) untersuchten Chorionkarzinomzelllinien, Gewebsteile der Plazenta und ein perfundiertes Kötyledon und kamen bei allen drei Methoden übereinstimmend zur Erkenntnis, dass ApoE von der Plazenta, wahrscheinlich von dem Trophoblasten exprimiert und sodann zu 88 Prozent in die mütterliche Zirkulation freigesetzt wird, was die Aufnahme von mütterlichem VLDL in die Plazenta erleichtert: Die Zugabe von ApoE zu VLDL führt zu einem verstärkten Abbau von VLDL und VLDL bindet stärker an die Plazentamembran als LDL oder HDL. Für diese Effekte wird ApoE verantwortlich gemacht, wobei der genaue Mechanismus bislang nicht erklärt werden kann.

In der humanen Plazenta werden neben LDL-Rezeptoren, die wie beschrieben ApoB-100 und ApoE erkennen, VLDL/ApoE-Rezeptoren, α_2 MR/LRP (α_2 -Makroglobulin/LDL-receptor related protein) und LRP gebildet (20). Liganden an LRP sind ApoE und α_2 -Makroglobulin (43). An α_2 MR/LRP binden u. a. RAP (receptor related protein), α_2 -Makroglobulin, ApoE und die Lipoproteinlipase.

α_2 -Makroglobulin bindet also an dieselben Rezeptoren (α_2 MR/LRP, LRP) wie ApoE und ist in der Lage, durch seine Rezeptorbindung mit α_2 MR/LRP die Bindung von Apo E schwach zu hemmen. Außerdem ist RAP ein gemeinsamer Ligand an α_2 MR/LRP und anderen Lipoproteinrezeptoren (LDL-, VLDL-Rezeptoren) und kann durch seine Interaktion mit α_2 MR/LRP die Bindung aller anderen Liganden vollständig inhibieren (45).

Eaton et al. (32^s) fassten Ergebnisse von der dualen Perfusionsmethode sowie von Zellkulturen und Subzellularstudien zusammen und konnten keine Aufnahme

von nativem, ^{125}I -markiertem $\alpha 2$ -Makroglobulin aus dem maternalen Perfusat nachweisen. Zu einem Komplex mit Trypsin verbunden hingegen verschwindet das markierte $\alpha 2$ -Makroglobulin-Trypsin kontinuierlich aus dem maternalen Kreislauf, wird in der Plazenta abgebaut und in seine Bestandteile zerlegt zum Fetus weitertransportiert.

Technischer Vergleich der zwanzig ausgewählten Studien:

Für die meisten Studien wurden verschiedene Pufferlösungen (z. B. Earle's gepufferte Salzlösung oder Krebs-Ringer-Lösung), fallweise mit humanem Serum angereichert, verwendet. Bei zwei Studien (21^s, 31^s) kam Blut im Perfusat zur Anwendung, wobei sich die Studie von Szabo et al. (21^s) aus dem Jahre 1969 in mehrfacher Hinsicht vom Großteil der anderen Studien abhebt: Es wurde die ganze Plazenta, nicht bloß ein einzelnes Kotyledon, perfundiert. Folglich ist bei der verwendeten geschlossenen Zirkulation das Rezirkulationsreservoir entsprechend größer (1300 ml maternal und 650 ml fetal gegenüber dem Durchschnitt der übrigen Studien von 150-250 ml maternal und 110-150 ml fetal). Die Flow rate in der maternalen Zirkulation übersteigt mit 550-650 $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$ den übrigen Durchschnitt von 8-30 $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$ um das 18- bis 81-fache und der Perfusionsdruck liegt mit 80-100 mmHg maternal und 80/60-160/140 mmHg fetal ebenfalls weit über dem sonstigen Durchschnitt von 0-20 mmHg maternal und 15-60 mmHg fetal. Auch in Hinblick auf die Flow ratio fällt die Studie von Szabo et al. aus dem Rahmen, sie beträgt 0,15-0,18 gegenüber 0,2-0,5 im restlichen Durchschnitt. Abweichend vom Großteil der Studien ist hier auch diejenige von Rice et al. (28^s) mit einer Flow ratio von 0,05 bei einer maternalen Flow rate von 600 $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$. Vermutlich perfundierten Rice et al. auch ganze Plazenten, da ein maternales Rezirkulationsreservoir von 2000 ml angegeben wird. Grundsätzlich ist die Flow ratio (Flow ratio = $\frac{Q_F}{Q_M}$) bei allen Studien kleiner als 1 und die fetale Flow rate immer kleiner als die maternale (bei der Studie von Szabo et al. beträgt die Differenz 100 $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$, bei derjenigen von Rice et al. 30 $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$, ansonsten 2-9 $\frac{\text{ml}}{\text{min}}$.)

Das Spektrum der Perfusionszeiten reicht von $\frac{1}{2}$ h bis zu $14\frac{1}{2}$ h, wobei der Anteil an Studien, deren Perfusionen zwischen 50 und 100 min dauerten, am größten war. Interessant ist der Zusammenhang zwischen Perfusionszeit und Oxygenierung: In der Mehrzahl der Studien wurden das fetale und das maternale Perfusat mit 95% O₂ und 5% CO₂ equilibriert. In den Studien von Di Santo et al. (38^s) und Linnemann et al. (39^s) verwendete man eine atmosphärische Gaszusammensetzung für das maternale Perfusat und 95% N₂ und 5% CO₂ für das fetale. Bei beiden Studien sind die Perfusionszeiten relativ lange, nämlich 7 h bzw. 4,5-14,5 h. Hohe Sauerstoffspiegel führen schon in kurzer Zeit, nach ca. 2 Stunden, zu Schäden in der Plazentamorphologie und es ist anzunehmen, dass man versuchte, solche Schäden durch niedrige Sauerstoffwerte, die auch eher den physiologischen Gegebenheiten entsprechen, zu vermeiden. Darüberhinaus können hohe Sauerstoffwerte das Ausmaß der Hormonproduktion der Plazenta verändern, was für Linnemann et al., die die placentare Leptinproduktion untersuchten, ungünstig gewesen wäre. Hoggard et al. (40^s) befassten sich ebenfalls mit der Leptinsekretion der Plazenta, equilibrierten aber beide Perfusate mit 95% O₂ und 5% CO₂, da bei niedrigeren Sauerstoffwerten Schwierigkeiten bei der Oxygenierung der Pufferlösung auftraten. Inwieweit der hohe Sauerstoffanteil die Ergebnisse beeinflusste, kann aus den Daten nicht abgeschätzt werden: Sie stimmen in ihrer Aussage mit anderen Studienergebnissen überein. Kuhn et al. (25^s) untersuchten den Transfer der Fettsäuren LA, αLN und AA und equilibrierten als einzige der zwanzig ausgewählten Studien beide Perfusionsmedien mit 90% N₂, 5% CO₂ und 5% O₂. Chan et al. (30^s) verwendeten als einzige 95% O₂ und 5% CO₂ für das maternale und 95% N₂ und 5% CO₂ für das fetale Perfusat bei ihrer Studie zu Fettsäureethylestern. Grundsätzlich gibt es sehr wenige Daten zum Transfer von Lipiden und Lipoproteinen. Die in den Studien am häufigsten verwendeten Fettsäuren sind Palmitin- und Linolsäure, gefolgt von α-Linolensäure, Arachidonsäure und Ölsäure. Am öftesten wurde bislang der Transfer von Linolsäure untersucht, gefolgt von α-Linolensäure und Arachidonsäure. Hexan-, Decan-, Dihomo-γ-Linolen-, Eicosa-pentaen-, Decosahexaen- und Stearinsäure waren nur selten Gegenstand der Transferuntersuchung bzw. wurden nur zugegeben, ohne dass ihr Transfer gemessen worden war. Meist erfolgte die Zugabe der Fettsäuren in den maternalen Kreislauf, seltener zu beiden Perfusaten und nie in den fetalen Kreislauf alleine.

E) Referenzen

Die mit ^s (S für Studie) markierten Referenzen sind diejenigen der zwanzig Artikel aus der „Lipidtransfer-Tabelle“.

-
- (1) Paraschkewow B. Wörter und Namen gleicher Herkunft und Struktur: Lexikon etymologischer Dubletten im Deutschen. Berlin-New York: Walter de Gruyter; 2004.
 - (2) Fanghänel J, Pera F, Anderhuber F, Nitsch R. Waldeyer Anatomie des Menschen. Berlin: Walter de Gruyter GmbH&Co.Kg; 2003. p.158-164.
 - (3) Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN. Pathology of the human placenta. New York: Springer; 2006.
 - (4) Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. Drug Transfer and Metabolism by the Human Placenta. Clin. Pharmacokinet. 2004; 43 (8): 487-514.
 - (5) Klinker R, Silbernagel S, editors. Lehrbuch der Physiologie. Stuttgart: Thieme; 2003. p.503-507.
 - (6) Myren M, Mose T, Mathiesen L, Knudsen LE. The human placenta - An alternative for studying foetal exposure. Toxicol In Vitro. 2007 Oct; 21(7):1332-40. Epub 2007 Jun 7. Review.
 - (7) Sastry BVR. Techniques to study human placental transport. Advanced Drug Reviews. 1999; 38: 17-39.
 - (8) Bersinger N, Malek A, Schneider H. De novo synthesis of pregnancy-specific and pregnancy-associated proteins by the *in vitro* perfused human placenta. In: Genbačev O, Klopper A, Beaconsfield R, editors. Placenta as a Model and a Source. New York: Plenum Press; 1989. p.51-61.
 - (9) Miller RK, Wier PJ, Shah Y, di Sant' Agnese PA, D'Gregorio RP. Criteria for *in vivo* dual perfusions in the human placental lobule: Perfusions in excess of 12 hours. In: Genbačev O, Klopper A, Beaconsfield R, editors. Placenta as a Model and a Source. New York: Plenum Press; 1989. p. 27-38.
 - (10) Schneider H, Huch A. Dual *in vitro* Perfusion of an Isolated Lobe of Human Placenta: Method and Instrumentation. In: Schneider H, Dancis J, editors. In vitro Perfusion of Human Placental Tissue. Basel: Karger; 1985; Contributions to Gynecology and Obstetrics, editor Keller PJ. 13: p 40-47.
 - (11) Schneider H, Malek A, Duft R, Bersinger N. Evaluation of an *in vitro* dual perfusion system for the study of placental proteins: energy metabolism. In: Genbačev O, Klopper A, Beaconsfield R, editors. Placenta as a Model and a Source. New York: Plenum Press; 1989. p. 39-50.
 - (12) Schneider H, Sodha RJ, Prögler M, Young MPA. Permeability of the Human Placenta for Hydrophilic Substances Studied in the Isolated Dually *in vitro* Perfused Lobe. In: Schneider H, Dancis J, editors. In vitro Perfusion of Human Placental Tissue. Basel: Karger; 1985; Contributions to Gynecology and Obstetrics, editor Keller PJ. 13: p. 98-103.
 - (13) Challier JC. Criteria for Evaluating Perfusion Experiments and Presentation of Results. In: Schneider H, Dancis J, editors. In vitro Perfusion of Human Placental Tissue. Basel: Karger; 1985; Contributions to Gynecology and Obstetrics, editor Keller PJ. 13: p.32-39.
 - (14) Haggarty P. Placental Regulation of Fatty Acid Delivery and its Effect on Fetal Growth – A Review. Placenta. 2002; 16 Trophoblast Research: S 28-38.

-
- (15) Nelson D, Cox M. Lehninger Biochemie. Berlin Heidelberg: Springer; 2009. p.493-498.
- (16) Schneider H, Prögler M, Sodha RJ. Effect of Flow Rate on the Diffusion of Antipyrine and $^3\text{H}_2\text{O}$ in the Isolated Dually in vitro Perfused Lobe of the Human Placenta. In: Schneider H, Dancis J, editors. In vitro Perfusion of Human Placental Tissue. Basel: Karger; 1985; Contributions to Gynecology and Obstetrics, editor Keller PJ. 13: p.114-123.
- (17) Schröder H, Leichtweiss HP, Rachor D. Passive Exchange and the Distribution of Flows in the Isolated Human Placenta. In: Schneider H, Dancis J, editors. In vitro Perfusion of Human Placental Tissue. Basel: Karger; 1985; Contributions to Gynecology and Obstetrics, editor Keller PJ. 13: p. 106-113.
- (18) Bachmaier N, Linnemann K, May K, Warzok R, Kuno S, Niemeyer M et al. Ultrastructure of Human Placental Tissue After 6 h of Normoxic and Hypoxic Dual In Vitro Placental Perfusion. Placenta. 2007; 28: 861-867.
- (19) Kuhn DC, Crawford MA, Stuart MJ, Botti JJ, Demers LM. Alterations in transfer and lipid distribution of arachidonic acid in placentas of diabetic pregnancies. Diabetes. 1990 Aug;39(8):914-8.
- (20) Hanebutt FL, Demmelmaier H, Schiessl B, Larqué E, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acid transfer across the placenta. Clinical nutrition. 2008 Oct; 27(5): 685-693.
- (21)^S Szabo AJ, Grimaldi RD, Jung WF. Palmitate transport across perfused human placenta. Metabolism. 1969 May;18(5):406-15.
- (22)^S Dancis J, Jansen V, Kayden HJ, Schneider H, Levitz M. Transfer across perfused human placenta. II. Free fatty acids. Pediatr Res. 1973 Apr;7(4):192-7.
- (23)^S Dancis J, Jansen V, Kayden HJ, Bjornson L, Levitz M. Transfer across perfused human placenta. 3. Effect of chain length on transfer of free fatty acids. Pediatr Res. 1974 Sep;8(9):796-9.
- (24)^S Dancis J, Jansen V, Levitz M. Transfer across perfused human placenta. IV. Effect of protein binding on free fatty acids. Pediatr Res. 1976 Jan;10(1):5-10.
- (25)^S Kuhn DC, Crawford MA, Stevens P. Transport and metabolism of essential fatty acids by the human placenta. Contrib Gynecol Obstet. 1985;13:139-40.
- (26)^S Haggarty P, Page K, Abramovich DR, Ashton J, Brown D. Long-chain polyunsaturated fatty acid transport across the perfused human placenta. Placenta. 1997 Nov;18(8):635-42.
- (27)^S Haggarty P, Ashton J, Joynson M, Abramovich DR, Page K. Effect of maternal polyunsaturated fatty acid concentration on transport by the human placenta. Biol Neonate. 1999;75(6):350-9.
- (28)^S Rice PA, Nesbitt RE Jr, Cuenca VG, Zhang W, Gordon GB, Kim TJ. The effect of ethanol on the production of lactate, triglycerides, phospholipids, and free fatty acids in the perfused human placenta. Am J Obstet Gynecol. 1986 Jul;155(1):207-11.
- (29)^S Haggarty P, Abramovich DR, Page K. The effect of maternal smoking and ethanol on fatty acid transport by the human placenta. Br J Nutr. 2002 Mar;87(3):247-52.
- (30)^S Chan D, Knie B, Boskovic R, Koren G. Placental handling of fatty acid ethyl esters: perfusion and subcellular studies. J Pharmacol Exp Ther. 2004 Jul;310(1):75-82. Epub 2004 Mar 5.
- (31)^S Bajoria R, Contractor SF. Effect of the size of liposomes on the transfer and uptake of carboxyfluorescein by the perfused human term placenta. J Pharm Pharmacol. 1997 Jul;49(7):675-81.

-
- (32)^S Eaton BM, Oakey MP, Sooranna SR, Contractor SF. Uptake of alpha 2-macroglobulin-trypsin complex by human placenta is mediated by a microvillous membrane receptor. *Cell Biochem Funct.* 1989 Jan;7(1):57-64.
- (33)^S Kuhn DC, Crawford MA, Stuart MJ, Botti JJ, Demers LM. Alterations in transfer and lipid distribution of arachidonic acid in placentas of diabetic pregnancies. *Diabetes.* 1990 Aug;39(8):914-8.
- (34)^S Osmond DT, Nolan CJ, King RG, Brennecke SP, Gude NM. Effects of gestational diabetes on human placental glucose uptake, transfer, and utilisation. *Diabetologia.* 2000 May;43(5):576-82. Erratum in: *Diabetologia* 2000 Nov;43(11):1451. *Diabetologia* 2001 Jul;44(7):927.
- (35)^S Osmond DT, King RG, Brennecke SP, Gude NM. Placental glucose transport and utilisation is altered at term in insulin-treated, gestational-diabetic patients. *Diabetologia.* 2001 Sep;44(9):1133-9.
- (36)^S Bisseling TM, Wouterse AC, Steegers EA, Elving L, Russel FG, Smits P. Nitric oxide-mediated vascular tone in the fetal placental circulation of patients with type 1 diabetes mellitus. *Placenta.* 2003 Nov;24(10):974-8.
- (37)^S Walsh SW, Wang Y. Secretion of lipid peroxides by the human placenta. *Am J Obstet Gynecol.* 1993 Dec;169(6):1462-6.
- (38)^S Di Santo S, Sager R, Andres AC, Guller S, Schneider H. Dual in vitro perfusion of an isolated cotyledon as a model to study the implication of changes in the third trimester placenta on preeclampsia. *Placenta.* 2007 Apr;28 Suppl A:S23-32. Epub 2007 Mar 2.
- (39)^S Linnemann K, Malek A, Sager R, Blum WF, Schneider H, Fusch C. Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Nov;85(11):4298-301.
- (40)^S Hoggard N, Crabtree J, Allstaff S, Abramovich DR, Haggarty P. Leptin secretion to both the maternal and fetal circulation in the ex vivo perfused human term placenta. *Placenta.* 2001 Apr;22(4):347-52.
- (41) Haggarty P, Allstaff S, Hoad G, Ashton J, Abramovich DR. Placental Nutrient Transfer Capacity and Fetal Growth. *Placenta* 2002; 23: 86-92.
- (42) Rindler MJ, Traber MG, Esterman AL, Bersinger NA, Dancis J. Synthesis and secretion of apolipoprotein E by human placenta and choriocarcinoma cell lines. *Placenta.* 1991 Nov-Dec;12(6):615-24
- (43) Wolf BB, Lopes MB, VandenBerg SR, Gonias SL. Characterization and immunohistochemical localization of alpha 2-macroglobulin receptor (low-density lipoprotein receptor-related protein) in human brain. *Am J Pathol.* 1992 Jul;141(1):37-42.
- (44) Contractor SF, Eaton BM, Firth JA, Bauman KF. A comparison of the effects of different perfusion regimes on the structure of the isolated human placental lobule. *Cell Tissue Res.* 1984;237(3):609-17.
- (45) Nielsen MS, Nykjaer A, Warshawsky I, Schwartz AL, Gliemann J. Analysis of ligand binding to the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Evidence that lipoprotein lipase and the carboxyl-terminal domain of the receptor-associated protein bind to the same site. *J Biol Chem.* 1995 Oct 6;270(40):23713-9.