

Diplomarbeit

**Transplazentarer Transfer von mütterlichem
Cholesterin in der „ex vivo“ dualen
Plazentaperfusion**

eingereicht von

Magdalena Bicvic

Mat.Nr.: 0534460

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

unter der Anleitung von

Ass.Prof.Dr.rer.nat. Christian Wadsack

Graz, 22.09.2011

Magdalena Bicvic

Eidesstattliche 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 22.09.2011

Magdalena Bievic

Danksagung

Zunächst einmal möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium erst möglich gemacht haben! Vielen herzlichen Dank für Eure Unterstützung, dass Ihr immer hinter mir gestanden seid und stets ein offenes Ohr für jegliche Sorgen und Nöte hattet.

Ebenfalls ein herzliches Dankeschön geht an Ass. Prof. Dr. rer. nat. Christian Wadsack, für seine Beratung und Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit. Ein besonderer Dank geht an Susanne Kopp, die mich während der Laborzeit beim praktischen Teil der Diplomarbeit stets hervorragend und geduldig betreut hat.

Weiterhin danke ich Ivana Sreckovic für die statistische Auswertung der erhobenen Daten.

Last but not least danke ich ganz herzlich meinen Mitbewohnern Lucie Matzkies und Marcel Berthold. Danke Lucie, dass du es immer wieder geschafft hast mich aufzumuntern und zu motivieren, wenn das Ziel vor Augen ein wenig verschwommen ist und danke Marcel fürs Korrekturlesen und die vielen guten Tipps bezüglich der Formulierung.

Zusammenfassung

Die humane Plazenta ist sowohl von der mütterlichen als auch fetalen Zirkulation umgeben. Trophoblasten als auch Syncytiotrophoblasten sind spezifische Plazentazellen, die für die Aufnahme und auch Abgabe von Substanzen in die mütterliche Blutzirkulation verantwortlich sind und damit nur limitierende Regulationsmechanismen für den plazentaren Gefäßtonus besitzen. Die fetoplazentare Zirkulation der Plazenta besitzt ein intaktes Endothel und ist daher für die Regulation des Blutdruckes maßgeblich verantwortlich. Ziel dieser Arbeit ist es, der Hypothese nachzugehen, ob fetales Lipoprotein (LDL) den Gefäßtonus in der Plazenta beeinflussen kann.

Dazu wurden drei Plazenten, nach normal verlaufenen termingerechten Schwangerschaften, in der „ex-vivo“ dualen Plazentaperfusion untersucht. Es wurde jeweils ein geeignetes Gefäßepaar in einem vorzugsweise randständigen Kotyledon ausgewählt, kanüliert und anschließend die Plazenta in eine Perfusionskammer eingespannt. Zunächst wurde in einer einstündigen Konditionierungsphase natives Perfusionsmedium perfundiert, dieses aber anschließend auf ein frisches, mit fluoreszenzmarkiertem LDL versetztes Medium gewechselt, welches weitere fünf Stunden perfundiert wurde (Hauptphase des Experiments). In der Konditionierungsphase wurden alle 15 Minuten arterielle und venöse Proben entnommen, die am Blutgasanalysegerät auf pO_2 , pCO_2 , Laktat und pH-Wert untersucht wurden. Die ersten Proben in der Hauptphase wurden ebenfalls im Abstand von 15 und dann weiteren 30 Minuten entnommen, die folgenden stündlich. Diese Proben wurden in weiterer Folge noch photometrisch auf ihren LDL-Gehalt untersucht. Nach Ablauf der Hauptphase wurde das perfundierte Gewebe mit Hilfe einer Fixierlösung fixiert, um es späteren histologischen Untersuchungen unterziehen zu können.

Aufgrund der Zusammenschau aller vorliegenden Ergebnisse kann man auf einen vasodilatatorischen Effekt des perfundierten LDLs schließen. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht geklärt, denkbar wäre jedoch, ähnlich wie bei HDL, eine Freisetzung von endothelialer Stickstoffmonoxid-Synthase, kurz NO-Synthetase, einem Enzym welches vasodilatatorisch auf den Gefäßtonus wirkt.

Schlüsselwörter: „ex-vivo“ duale Plazentaperfusion, humane Plazenta, Lipoproteine, Gefäßtonus.

Abstract

The human placenta is surrounded by the fetal and likewise the maternal circulation. Trophoblasts and Syncytiotrophoblasts are specific cells in the placenta which are responsible for the uptake and release of substances into the maternal circulation on the other. Trophoblasts and Syncytiotrophoblasts have very limited mechanisms to regulate the vascular tone in the placenta. In turn the placental circulation consists of an endothelium and therefore functions as a regulator of bloodpressure within the organ. The purpose of this thesis is to scrutinize the hypothesis whether fetal lipoproteins (LDL) are able to influence the vascular tone in the human placenta.

Against this background the uptake of LDL was investigated by using the “ex vivo” dual placenta perfusion of three normal placentas at term. Corresponding vessels of preferably peripheral cotyledons were chosen and canulated, and followed by inserting the placenta into a perfusion chamber. Firstly during the conditioning phase of one hour, the placenta was perfused with native perfusion medium. After that the medium was replaced by a medium containing fluorescence labeled LDL. The placenta was perfused for further five hours under the same conditions, representing the main phase of the experiment. During the conditioning phase arterial and venous samples were taken for every 15 minutes, pO_2 , pCO_2 , Lactate and pH were analyzed by a blood gas analyzer. The first two samples were taken after starting with the lipoprotein perfusion after 15 minutes, then another 30 minutes, afterwards sampling took place hourly. For determining the lipoprotein concentration the collected samples were further analyzed fluorimetrically. After the experiment the perfused tissue was fixed with formalin for the localisation of possible morphological tissue changes.

Based on the results a vasodilatory LDL on the feto-placental endothelium of the perfused cotyledon cannot be excluded. The exact mechanism is still under debate and needs further investigations. Similar to HDL, an interaction also of LDL with the endothelial nitric oxide synthase, an enzyme with a vasodilatory effect on the vascular tone, could be conceivable in the human placenta.

Keywords: “ex-vivo” dual placenta perfusion, human placenta, lipoproteins, vascular tone

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	iii
Zusammenfassung.....	iv
Abstract.....	v
Inhaltsverzeichnis	vi
Glossar und Abkürzungen.....	viii
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xii
1 Die Fragestellung.....	1
2 Einleitung	2
2.1 Die menschliche Plazenta – Entwicklung und Aufbau	2
2.1.1 Die reife Plazenta	4
2.1.2 Der fetale Kreislauf	7
2.1.3 Die Blutzirkulation in der Plazenta	8
2.1.4 Die Funktion der Plazenta.....	9
2.1.5 Die Plazenta kurz vor und nach der Geburt	14
2.2 Cholesterinstoffwechsel und Cholesterinbiosynthese.....	15
2.2.1 Cholesterintransport	17
2.2.2 Regulation des Cholesterinstoffwechsels.....	18
2.2.3 Lipoproteinstoffwechsel und Apolipoproteine	18
2.2.4 Lipide in der Schwangerschaft.....	24
3 Material und Methoden	26
3.1 Material	26
3.1.1 Präparation des Kotyledons.....	27
3.2 Versuchsaufbau und Prinzip des Perfusionskreislaufs	29
3.3 Herstellung des Perfusionsmediums	32
3.4 Isolierung von fetalem LDL nach der Dichtegradientenmethode	33
3.5 Fluoreszenzmarkierung des Lipoproteins.....	34
3.5.1 Entsalzung mittels Gelfiltration mit Sephadex PD-10 Säule	34
3.5.2 Fluoreszenzmarkierung	34
3.6 Quantitative photometrische Bestimmung von LDL	36
3.7 Ablauf des Plazentaperfusionsexperiments.....	37
4 Ergebnisse.....	40
4.1 Graphische Darstellung der Ergebnisse	40

4.2	Statistik	74
5	Diskussion	101
6	Literaturverzeichnis	108

Glossar und Abkürzungen

A./ Aa.....	arteria/ arteriae
ACAT.....	Acetyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
A.d.....	Aqua destillata
Acetyl-CoA.....	Acetyl-Coenzym A
Apo.....	Apolipoprotein
ATP.....	Adenosintriphosphat
β-HMG-CoA	beta-Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzym A- Reduktase
CHE.....	Cholesterinesterase
CHO.....	Cholesterinoxidase
CHOD.....	Cholesteroxidase
CO ₂	Kohlendioxid
DHEA/ DHEA-S.....	Dehydroepiandrosteron/ -Sulfat
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
eLPL.....	endotheliale Lipoproteinlipase
h.....	Stunde
H ⁺	Wasserstoffionen, Protonen
H ₂ CO ₃	Kohlensäure
HCG.....	Human chorionic gonadotropin
HDL.....	High Density Lipoprotein
H ₂ O.....	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPL.....	Human placental lactogen
IDL.....	Intermediate Density Lipoprotein
IgG.....	Immunglobulin G
Konz.	Konzentration
LCAT.....	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL.....	Low Density Lipoprotein
LH.....	Luteinisierendes Hormon
M.....	Molar
MHN.....	Morbus haemolyticus neonatorum
N ₂	Stickstoff
NaOH.....	Natriumhydroxid, Natronlauge

NH ₄ ⁺	Ammoniumionen
O ₂	Sauerstoff
PAP	Phenol + Aminophenazon
PBS.....	Phosphate buffered saline
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
pLPL.....	plazentare Lipoproteinlipase
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
POD.....	Peroxidase
SCAP.....	SREBP-cleavage activating protein
SLOS.....	Smith-Lemli-Opitz-Syndrom
SREBP.....	sterol regulatory element-binding protein
Std.	Stunde
TAG.....	Triacylglycerid
V./ Vv.	vena/ venae
VLDL.....	Very Low Density Lipoprotein

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau einer Blastozyste (2).....	2
Abbildung 2: Plazenta um den vierten Schwangerschaftsmonat (6)	3
Abbildung 3: Plazenta, maternale Seite.....	4
Abbildung 4: Plazenta, fetale Seite.....	5
Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Plazenta (7)	5
Abbildung 6: Plazentaschranke im Elektronenmikroskop (9)	6
Abbildung 7: Fetaler Kreislauf (11).....	8
Abbildung 8: Cholesterin Strukturformel ($C_{27}H_{45}OH$) (15).....	15
Abbildung 9: Acetyl-CoA-Strukturformel (17).....	16
Abbildung 10: Cholesterinerster Strukturformel (18).....	17
Abbildung 11: Schematische Darstellung eines Lipoproteins (19)	19
Abbildung 12: Anabole Stoffwechsellaage des mütterlichen Organismus während des	24
Abbildung 13: Katabole Stoffwechsellaage des mütterlichen Organismus während des	25
Abbildung 14: Gefäßverlauf in der Plazenta (21).....	26
Abbildung 15: Ligieren eines fetalen Gefäßes	27
Abbildung 16: Kanülieren eines fetale Gefäßes.....	28
Abbildung 17: Perfusionskammer.....	29
Abbildung 18: Entfernen überschüssigen Plazentagewebes	30
Abbildung 19: Kanüliertes, eingespanntes und fixiertes Kotyledon.....	30
Abbildung 20: Blasenfalle.....	31
Abbildung 21: PD-10 Desalting Columns (23)	34
Abbildung 22: Alexa Fluor 568 Carboxylsäure-Succinimidylester (24).....	35
Abbildung 23: Fetaler Perfusionskreislauf schematisch.....	39
Abbildung 24: Perfusion Nr.1 - 08.02.2011.....	41
Abbildung 25: pO_2 Perfusion Nr.1 - 08.02.2011.....	43
Abbildung 26: pCO_2 Perfusion Nr.1 - 08.02.2011	44
Abbildung 27: Laktat Perfusion Nr.1 - 08.02.2011	45
Abbildung 28: pH Perfusion Nr.1 - 08.02.2011	46
Abbildung 29: Perfusion Nr.1 - Fluoreszenz fetales LDL Alexa 568.....	48
Abbildung 30: Perfusion Nr.2 - 09.02.2011.....	52
Abbildung 31: pO_2 Perfusion Nr.2 – 09.02.2011	54

Abbildung 32: pCO ₂ Perfusion Nr.2 – 09.03.2011	55
Abbildung 33: Laktat Perfusion Nr.2 - 09.02.2011	56
Abbildung 34: pH Perfusion Nr.2 – 09.02.2011	57
Abbildung 35: Perfusion Nr.2 – Fluoreszenz fetales LDL Alexa 568	59
Abbildung 36: Perfusion Nr.3 – 14.03.2011	63
Abbildung 37: pO ₂ Perfusion Nr.3 – 14.03.2011	65
Abbildung 38: pCO ₂ Perfusion Nr.3 – 14.03.2011	66
Abbildung 39: Laktat Perfusion Nr.3 - 14.03.2011	67
Abbildung 40: pH Perfusion Nr.3 – 14.03.2011	68
Abbildung 41: Perfusion Nr.3 – Fluoreszenz fetales und adultes LDL Alexa 568 und 647	71
Abbildung 42: Q-Q-Diagramm und Bockplot pO ₂ arteriell (a), venös (b), pCO ₂ arteriell (c), venös (d), Laktat arteriell (e), venös (f), pH arteriell (g), venös (h), Perfusionsdruck (i)	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die einzelnen Apolipoproteine (14).....	21
Tabelle 2: Übersicht über die Lipoproteine (13).....	23
Tabelle 3: Zusammensetzung Earl's Puffer und Perfusionsmedium.....	32
Tabelle 4: Zusätze zum Perfusionsmedium im Verlauf des Experiments.....	32
Tabelle 5: Metabolische Kriterien für eine duale humane Plazentaperfusion	39
Tabelle 6: Ergebnisse Perfusion Nr.1 - 08.02.2011	42
Tabelle 7: Ergebnisse der Fluoreszenzanalyse Perfusion Nr.1 - fetales LDL Alexa 568-markiert.....	47
Tabelle 8: Ergebnisse Perfusion Nr.2 - 09.02.2011	53
Tabelle 9: Ergebnisse der Fluoreszenzanalyse - fetales LDL Alexa 568-markiert	58
Tabelle 10: Ergebnisse Perfusion Nr.3 - 14.03.2011	64
Tabelle 11: Ergebnisse der Fluoreszenzanalyse - fetales LDL Alexa 568-markiert	69
Tabelle 12: Ergebnisse der Fluoreszenzanalyse – adultes LDL Alexa 647-markiert	70
Tabelle 13: Deskriptive Statistik	78
Tabelle 14: Test auf Normalverteilung.....	78
Tabelle 15: T-Test.....	88
Tabelle 16: Bonferroni-Test.....	90

1 Die Fragestellung

Die Plazenta ist das Organ welches den mütterlichen vom kindlichen Blutkreislauf trennt. Sie stellt auf der einen Seite eine Barriere zwischen den beiden Individuen dar, was bedeutet, dass sie den Transport einiger Substanzen zum Feten ausschließt. Andererseits ist sie das Bindeglied zwischen fetalem und mütterlichem Kreislauf und ermöglicht dadurch selektiv die Diffusion bzw. den Transport von notwendigen Nährstoffen, entstehenden stoffwechselbedingten Schadstoffen und Botenstoffen. Mit der nun etablierten Methode der „ex vivo“ Plazentaperfusion sind direkte Auswirkungen von mütterlichen sowie fetalen Molekülen auf die Plazenta und auf die fetale Zirkulation untersuchbar.

Inwieweit und in welcher Form mütterliches Cholesterin über die Plazentabariere transportiert werden kann, konnte bislang nicht oder nur mit indirekten Methoden *in vitro* mit Zellversuchen an isolierten Zellen nachgewiesen werden. Nachdem der Transport von Lipiden über die Plazenta direkten Einfluss auch auf die fetale Zirkulation hat, sind die funktionellen Auswirkungen auf das fetoplazentare Endothel zu überprüfen.

Ziel dieser Studie ist der Hypothese, ob und wie fetales Lipoprotein (LDL) den Gefäßtonus in der Plazenta beeinflussen kann, nachzugehen. Dazu werden aus mütterlichem und fetalem Plasma Lipoproteine isoliert, Protein- und Lipidanteil mit Farbstoffen markiert um dann in der Plazentaperfusion diese Substanzen zuzusetzen. Der Perfusionsdruck wird über die gesamte Dauer des Experiments aufgezeichnet.

2 Einleitung

2.1 Die menschliche Plazenta – Entwicklung und Aufbau

Die Plazenta (lat. *placenta* „Kuchen“, dt. „Mutterkuchen“) ist ein während der Schwangerschaft in der Gebärmutter gelegenes ca. 15-20 cm großes und 500 g schweres discoidales Organ von etwa 2-4 cm Dicke. Sie besteht gleichermaßen aus fetalem und maternalem Gewebe und ihre Hautaufgabe besteht darin, den Stoffaustausch und somit die Versorgung des Feten während der Schwangerschaft zu gewährleisten (1).

Da sowohl Mutter als auch Ungeborenes über einen eigenen Kreislauf verfügen, bildet die Plazenta das Bindeglied zwischen diesen beiden Systemen, um die Versorgung des Feten zu ermöglichen. Somit besteht über die gesamte Dauer der Schwangerschaft ein Weg, über den der Stoffaustausch (Nährstoffe, Schadstoffe, Botenstoffe) zwischen Mutter und Fetus in beide Richtungen gegeben ist.

Desweiteren stellt die Plazenta aber auch eine Barriere zwischen diesen beiden Systemen dar. Zum einen bleiben dadurch beide Kreisläufe voneinander getrennt und die Blutssysteme kommen nicht direkt miteinander in Berührung und zum anderen ist der Fetus vor schädigenden Substanzen geschützt.

Mit der Implantation der Blastozyste (Abbildung 1, Entwicklungsstadium etwa drei bis vier Tage nach Befruchtung) in die Uteruswand beginnt die eigentliche Entwicklung der Plazenta. Während der Entwicklung zur Blastozyste haben sich die Zellen bereits in einen innen gelegenen Embryoblasten und eine äußere schützende Schicht aus Trophoblasten differenziert. Aus den Trophoblasten entwickeln sich in weiterer Folge Plazenta und Eihäute (3).

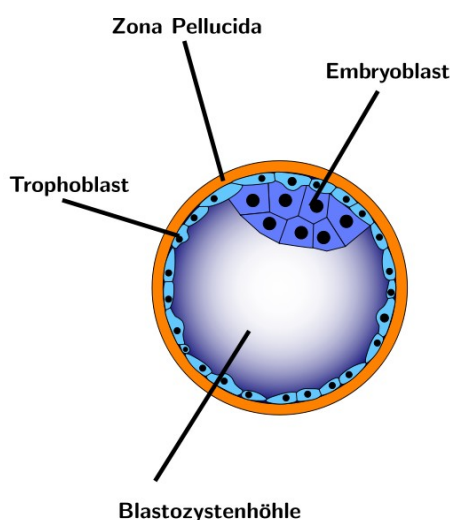


Abbildung 1: Aufbau einer Blastozyste (2)

Die Trophoblasten, die mit der Uteruswand in Kontakt treten differenzieren sich in zwei verschiedene Zellarten, den Synzytiotrophoblasten (außen gelegen) und den Zytotrophoblasten (innen gelegen, trennt Embryoblasten vom Synzytiotrophoblasten). Dieses Stadium der Plazentaentwicklung wird als prälakunäres Stadium bezeichnet.

Ist der Keim vollständig in der Dezidua eingewachsen, bilden sich Lakunen im Synzytiotrophoblasten, die durch Zusammenfließen den intervillösen Raum formen (lakunäres Stadium), der sich durch Arrosion dezidualer Gefäße mit mütterlichem Blut füllt. Die beiden Trophoblastschichten (Synzytio- und Zytotrophoblast) bilden in den folgenden Entwicklungsstadien Zotten (Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten), die schließlich Blutgefäße führen und über einen Haftstiel Anschluss zum fetalen Kreislauf bekommen. Die Zotten entwickeln sich dann weiter zu Mesenchymalzotten, unreifen oder reifen Intermediärzotten, Stammzotten oder Terminalzotten. Sie erfüllen unterschiedlichste Funktionen und bilden den Zottenbaum aus. Von maternaler Seite wachsen Spiralarterien zum intervillösen Raum, die durch extravillöse Trophoblasten zu weiten unelastischen Gefäßen umgebaut werden und so die Blutversorgung des Feten bewerkstelligen. Das Lakunensystem stellt eine riesige Austauschfläche mit intensivem Stoffaustausch zwischen mütterlichem Blut im intervillösen Raum und fetalen Kreislauf über die Zottengefäße dar. Bis zum vierten Schwangerschaftsmonat hat sich die definitive Plazenta ausgebildet, die nun bereits ihr endgültiges Aussehen einnimmt, indem die Dezidua Septen bildet. Die Plazentasepten ziehen zwischen die intervillösen Räume und bilden die Kotyledonen. Die Septen reichen allerdings nicht bis zum Chorion, so dass die einzelnen Kotyledonen miteinander in Kontakt stehen (4, 5).

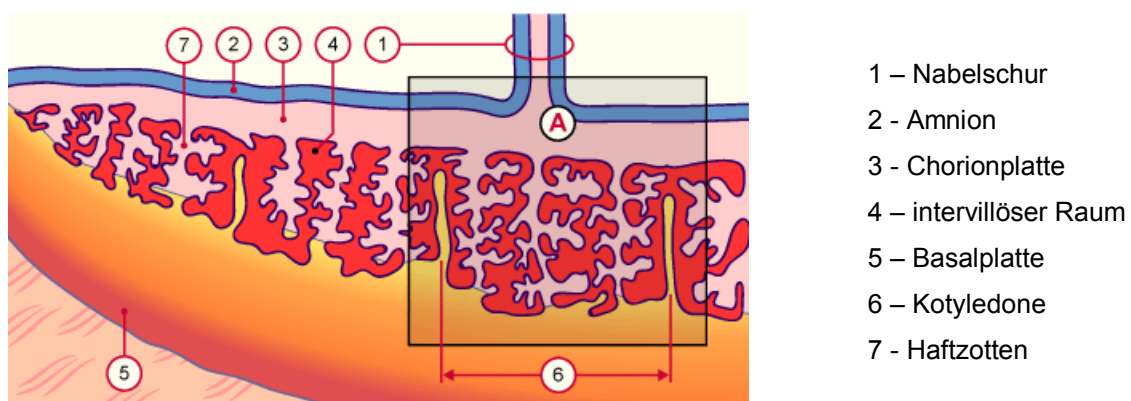


Abbildung 2: Plazenta um den vierten Schwangerschaftsmonat (6)

2.1.1 Die reife Plazenta

Die reife Plazenta zum Ende der Schwangerschaft hat einen Durchmesser von etwa 15 bis 25 cm und ist in blutleerem Zustand etwa 2,5 bis 3 cm dick.

Auf der maternalen Seite (Basalplatte) kann man die einzelnen Kotyledonen gut voneinander abtrennen (Abbildung 3). Die Furchen zwischen den Kotyledonen entstehen durch die Septierung der Dezidua. Die fetale Seite der Plazenta wird von der Chorionplatte gebildet (Abbildung 4). Diese besteht aus dem Amnion (dünne, gefäßlose innerste Eihaut), embryonalem Mesenchym, Zytotrophoblast und Synzytiotrophoblast. Auf fetaler Seite sieht man eine Vielzahl von Gefäßen, Arterien und Venen, die sich in der Nabelschnur, die meist recht zentral in der Chorionplatte inseriert, vereinen. In der Nabelschnur kommen zwei Nabelarterien und die Nabelvene zum liegen, die sich dann in weiterer Folge auf fetaler Seite in die bereits erwähnten Choriongefäße verzweigen. Arterien und Venen können dadurch unterschieden werden, dass Arterien die Venen meist überkreuzen (3).



Abbildung 3: Plazenta, maternale Seite



Abbildung 4: Plazenta, fetale Seite

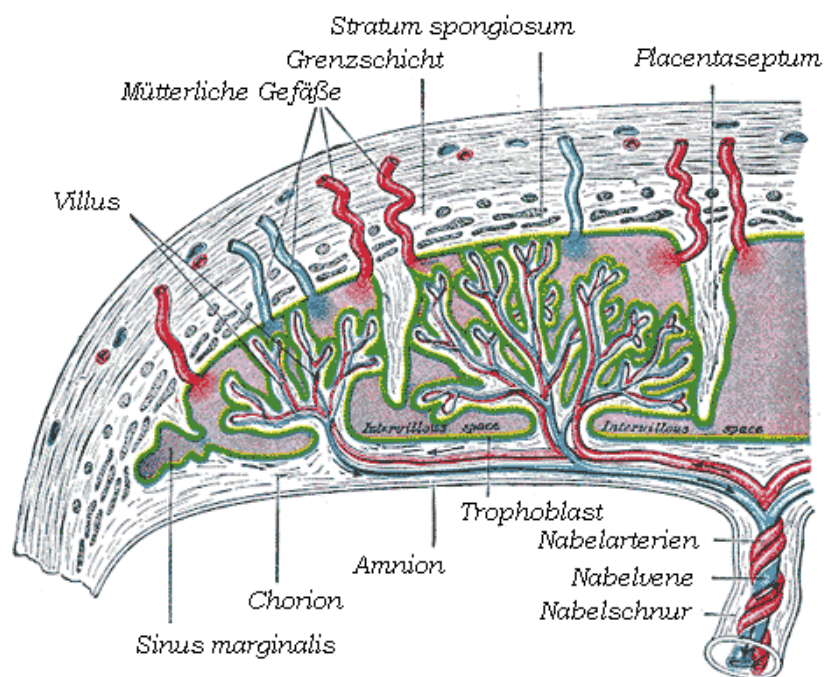


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Plazenta (7)

Die humane Plazenta stellt gleichzeitig auch eine trennende Schicht und somit Barriere zwischen mütterlichem und fetalem Kreislauf dar, die sogenannte Plazentaschranke. Diese besteht aus mehreren fetalen Zellpopulationen, durch die über unterschiedliche Transportmechanismen Stoffe zwischen Mutter und Kind ausgetauscht werden oder der Übertritt jener Stoffe in den kindlichen Kreislauf verhindert wird. Bis etwa zur 20. Schwangerschaftswoche besteht sie insgesamt aus vier Schichten fetalen Gewebes:

1. Synzytiotrophoblast
2. Zytotrophoblast
3. Bindegewebe in den Zotten
4. fetalem Kapillarendothel

Im Laufe der Schwangerschaft finden einige histologische Veränderungen statt, so dass die Plazentaschranke schließlich nur noch aus drei Schichten besteht, Synzytiotrophoblasten, fetalem Bindegewebe und fetalem Kapillarendothel. Dadurch, dass das Chorion (die Synzytiotrophoblastenschicht) in direktem Kontakt mit dem mütterlichen Blut steht, wird die humane Plazenta als hämomonochorial bezeichnet (8).

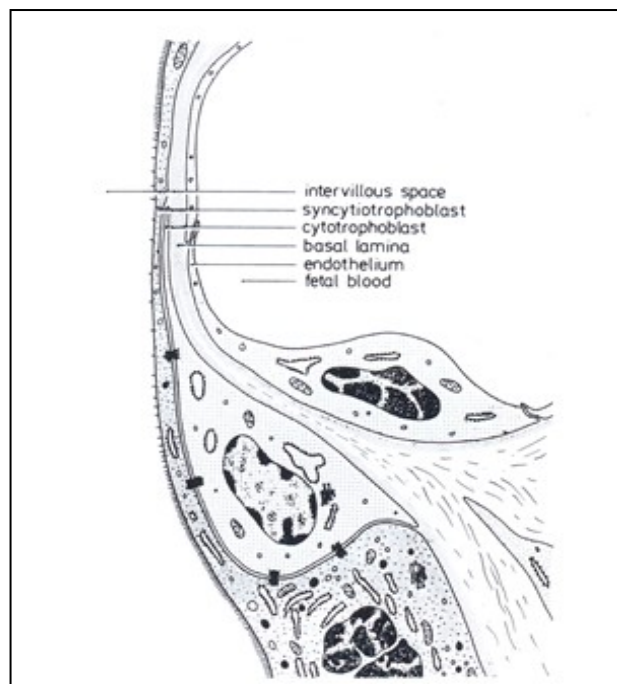


Abbildung 6: Plazentaschranke im Elektronenmikroskop (9)

2.1.2 Der fetale Kreislauf

Der Kreislauf, so wie er im Mutterleib während der Schwangerschaft besteht, unterscheidet sich in großem Maße vom Kreislauf nach der Geburt. Das liegt hauptsächlich daran, dass der Fetus seine Lungen nicht nutzen kann und somit über die Plazenta mit Sauerstoff versorgt werden muss. Nach der Geburt muss sich das Herz-Kreislaufsystem des Neugeborenen umgehend an die geänderten Verhältnisse adaptieren, was mit unmittelbar nach der Geburt stattfindenden Umbauvorgängen an seinen Herz-Kreislauforganen einhergeht. Vor der Geburt wird der Lungenkreislauf ausgespart, weil dort kein Gasaustausch stattfindet, wodurch die Pulmonalgefäße enggestellt sind.

Die Plazenta übernimmt die Funktion des Gasaustauschs. Dadurch gelangt das mit Sauerstoff angereicherte Blut über die V. umbilicalis zum Fetus. Da der Pulmonalkreislauf weitgehend ausgespart werden kann, besitzt der fetale Kreislauf drei Kurzschlussverbindungen (Ductus venosus Arantii, Foramen ovale, Ductus arteriosus Botalli), die das Blut dem Körperkreislauf zuführen. Etwa die Hälfte des sauerstoffreichen Blutes, das aus der V. umbilicalis kommt, wird über den Ductus venosus gleich zum Herzen geleitet. Die andere Hälfte fließt in die Leber und dann weiter über die Vv. hepaticae in die V. cava inferior. Nach kurzer Passage in der V. cava inferior wird das Blut weiter in den rechten Vorhof geleitet. Dort wird wiederum der Großteil durch das Foramen ovale in den linken Vorhof geleitet und umgeht somit den Pulmonalkreislauf. Über den linken Ventrikel nimmt es dann den regelrechten Weg über die Aorta ascendens in den Körperkreislauf. Der geringe Rest gelangt in den Truncus pulmonalis, wovon wiederum nur etwa 10% in die Lunge selbst geleitet werden. Die restliche Menge wird über den Ductus arteriosus direkt in die Aorta descendens geleitet und schützt somit den Lungenkreislauf mit seinem hohen Gefäßwiderstand vor einer Überlastung. Zuletzt gelangt nur ein geringer Teil des Blutes, das aus der Aorta ascendens kommt in die Aorta descendens. Etwa zweidrittel fließen über die Aa. umbilicalis zurück zur Plazenta, wo sie erneut mit Sauerstoff angereichert werden. Das restliche Drittel versorgt die unteren Extremitäten und die Eingeweide (8, 10).

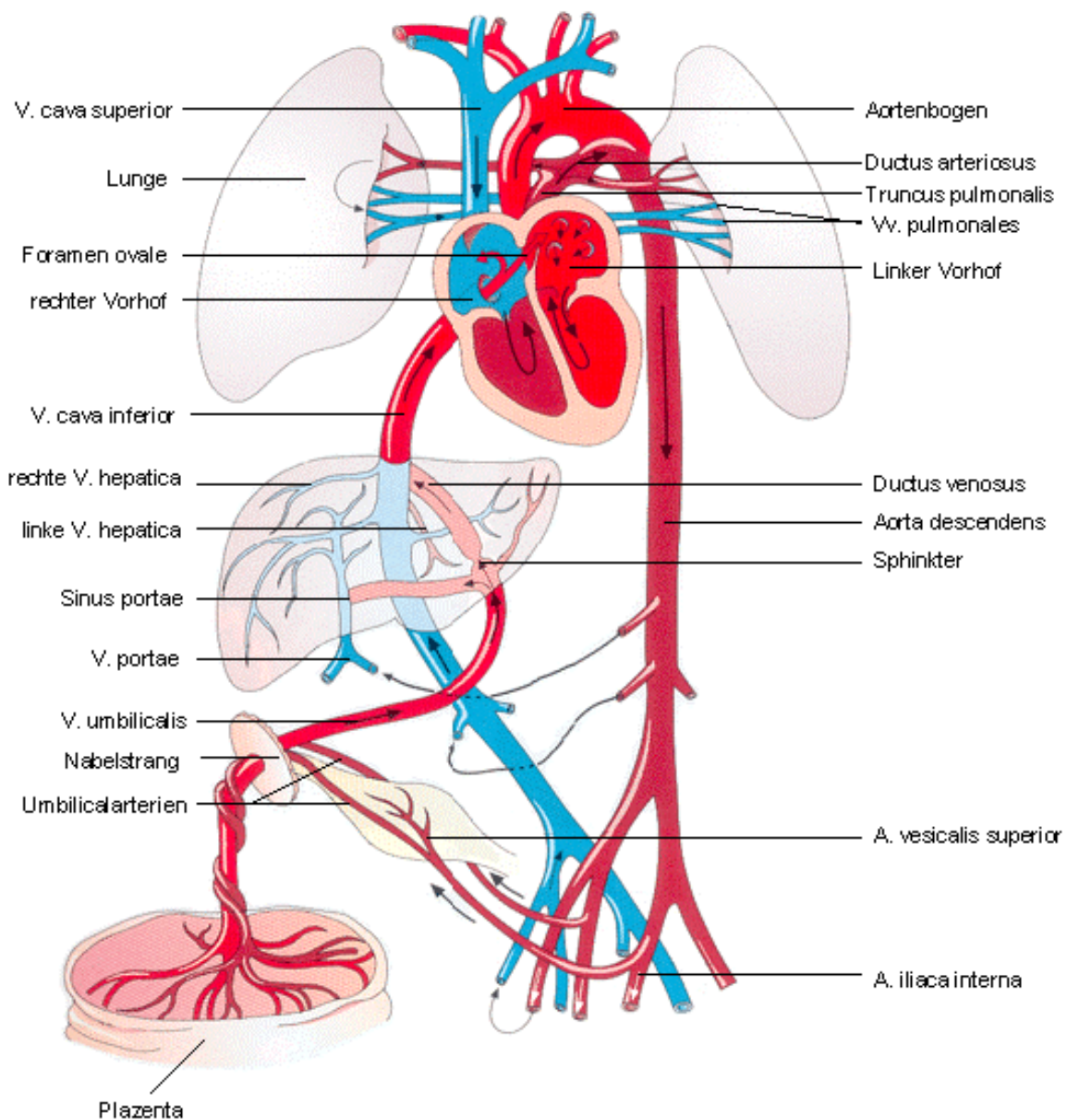


Abbildung 7: Fetaler Kreislauf (11)

2.1.3 Die Blutzirkulation in der Plazenta

Die einzelnen Kötyledonen werden von 80 bis 100 Spiralarterien, die aus dem Endometrium kommen, versorgt. Sie treten in den intervillösen Raum ein und stoßen das mütterliche Blut in diesen hinein, da es bedingt durch den mütterlichen Blutdruck pulsatil dort ankommt. Im intervillösen Raum werden dann die terminalen Chorionzotten von mütterlichem Blut umspült, dabei finden Stoff- und Gasaustausch mit dem fetalen Blut statt. Über endometriale Venen gelangt das Blut schließlich zurück in den mütterlichen Kreislauf.

Auf fetaler Seite bringen die Umbilicalarterien sauerstoffarmes Blut vom Fetus zur Plazenta. An der Insertionsstelle der Nabelschnur verzweigen sich die Gefäße und

verteilen sich somit über das gesamte Organ. In den Kapillaren der terminalen Chorionzotten entsteht durch ein Diffusionsgefälle der Sauerstoffaustausch zwischen mütterlichem und fetalem Blut, so dass im intervillösen Raum Sauerstoff aufgenommen wird. Außerdem werden gelöste Stoffwechselprodukte aus dem kindlichen Kreislauf abgegeben, um vom maternalen Kreislauf aufgenommen und abtransportiert werden zu können. Das mit Sauerstoff angereicherte Blut fließt nun über die Umbilikalvene zurück zum Fetus.

In der reifen Plazenta sind die intervillösen Räume mit etwa 150ml Blut gefüllt und durch den maternalen Blutdruck wird dieses Volumen etwa drei- bis viermal in der Minute ausgetauscht. Der Stoffaustausch findet jedoch nicht an allen Chorionzotten statt, die zusammen eine Austauschfläche von ca. 12 m² zur Verfügung stellen, sondern nur an jenen, deren Kapillaren in einem engen Kontakt zu der sie umgebenden Synzytiumschicht aufweisen. Ein Bürstensaum mit zusätzlichen Mikrozotten bewirkt eine große Intensivierung des Austauschpotentials an diesen Zotten (3).

Die Blutversorgung des Fetus über die Plazenta ist der wichtigste Faktor bezüglich seiner Entwicklung. Die Gefäße der Plazenta sind nicht zur Autoregulation befähigt, d.h. dass bei jeglichem Blutdruckabfall die Plazentaperfusion sinkt. Ist der uteroplazentare Kreislauf eingeschränkt, resultiert das in fetaler Hypoxie und in weiterer Folge intrauteriner Wachstumsverzögerung (engl. IUGR – intrauterine growth retardation). Dies geschieht z.B. durch Uteruskontraktionen oder mütterliche Hypotonie. Ist die Versorgung gar gänzlich unterbrochen (Kompression der Nabelschnur) kann das zum fetalen Tod führen (8).

2.1.4 Die Funktion der Plazenta

Als Bindeglied zwischen Mutter und Fetus hat die Plazenta vielfältige Funktionen zu erfüllen. Alle diese Funktionen dienen der Erhaltung und Entwicklung des Ungeborenen.

Eine der wichtigsten Funktionen der Plazenta stellt der Stoffaustausch dar, denn über dieses Organ werden, bei vollständiger Trennung beider Kreisläufe, Gase (Sauerstoff und Kohlendioxid) und Nähr- und Abfallstoffe bidirektional ausgetauscht. Für den Transport der unterschiedlichen Substanzen stehen folgende passive und aktive Mechanismen zur Verfügung:

- **Einfache Diffusion:**

Die einfache Diffusion ist ein passiver Vorgang und wird bedingt durch einen Konzentrationsgradienten, findet somit vom Ort höherer zum Ort niedrigerer Konzentration statt. Für die Diffusion spielen neben der Konzentration des ausgetauschten Stoffes, die Größe der Austauschfläche, die Länge des Diffusionsweges und die Dicke der zu passierenden Membran eine Rolle (Fick'sches Gesetz) (10). Somit diffundiert ein bestimmter Stoff umso schneller (V_{diff} =Diffusionsgeschwindigkeit), je größer der Diffusionskoeffizient (D =jede Substanz hat einen bestimmten Diffusionskoeffizienten), je größer die Diffusionsfläche (A), je größer der Konzentrationsunterschied zu beiden Seiten der Membran (Δc) und je geringer ihre Dicke (d) ist. Somit ergibt sich mathematisch:

$$V_{\text{diff}}=(D \times A \times \Delta c)/d$$

Die einfache Diffusion ist der Transportvorgang beim Austausch der Atemgase Sauerstoff (O_2) und Kohlendioxid (CO_2).

- **Erleichterte Diffusion:**

Die erleichterte Diffusion verläuft ähnlich wie die freie Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten, sie ist ebenfalls ein passiver Vorgang. Jedoch werden zusätzlich membranständige Transportproteine (Carrier) benötigt. In der Plazenta stehen für den Transport von Glukose und Laktat solche Carrier zur Verfügung.

- **Aktiver Transport:**

Aktiver Transport findet gegen ein Konzentrations- oder ein elektrisches Potentialgefälle statt und benötigt primär Energie in Form von ATP oder bezieht diese sekundär, indem die potentielle Energie des elektrischen Gefälles zum Transport einer Substanz ausgenutzt wird. In der Plazenta stehen aktive Transporter sowohl auf maternaler als auch auf fetaler Seite zur Verfügung und gewährleisten somit den Transport in beide Richtungen. Diese Form des Transports bewerkstelligt den Austausch von Ionen (Ionenpumpe), Aminosäuren, Glukose und Vitaminen. Allerdings können dadurch auch Medikamente, die in ihrem chemischen Aufbau körpereigenen Substraten ähneln in den kindlichen Kreislauf gelangen.

- **Rezeptorvermittelte Endozytose**

Als Endozytose wird das Einstülpfen der zu passierenden Membran und dadurch das Umhüllen des Stoffes, der transportiert werden soll, bezeichnet. Dieser Transportweg ist hochmolekularen Stoffen, wie z.B. Proteinen, Fetten oder Immunglobulinen, vorbehalten. Ist der Vorgang des Einstülpens beendet, wird die Membran vollständig abgeschnürt und als Vesikel an das Zellinnere abgegeben.

Zwei Formen der Endozytose können unterschieden werden. Zum einen die Phagozytose („Zellfressen“), bei der feste Substanzen in die Zelle aufgenommen werden und zum anderen die Pinozytose („Zelltrinken“), die die Aufnahme gelöster Substanzen erledigt.

- **Diapedese**

Beschreibt den Transportweg, den sowohl Erythrozyten als auch Viren und Bakterien durch die Plazenta nehmen können. Dabei können die genannten Substanzen durch Endothelnischen in den fetalen Kreislauf oder im Falle von Erythrozyten ebenfalls aus diesem heraus in den maternalen Kreislauf gelangen.

(8, 10, 12)

Neben dem Transport verschiedenster Substrate hat die Plazenta noch andere wichtige Funktionen. Vor allem während der frühen Schwangerschaft werden in ihr Glykogen, Cholesterin und Fettsäuren produziert, da das Ungeborene dies noch nicht selbst bewerkstelligen kann. Sie übernimmt also Stoffwechselfunktion, dessen Produkte wiederum auch von der Plazenta, wie bereits erwähnt, ausgetauscht werden.

Ebenso wichtig ist die immunologische Funktion der Plazenta. Das fetale Immunsystem ist derart unreif, dass es selbst nur wenig Antikörper bilden kann. Deswegen erhält der Fetus mütterliche Antikörper (IgG) durch transplazentare Übertragung, die somit über die Dauer der Schwangerschaft und etwa in den ersten sechs Lebensmonaten eine gewisse passive Immunität garantieren.

Allerdings kann der Vorgang der Übertragung von Antikörpern den Fetus auch bedrohen. Im Falle der Rhesusinkompatibilität kommt es durch Sensibilisierung einer Rhesus-negativen Mutter mit Erythrozyten eines Rhesus-positiven Kindes zur Antikörperbildung gegen die Erythrozyten des Kindes. Diese Antikörper können, bei einer weiteren Schwangerschaft mit einem Rhesus-positiven Kind,

aus dem mütterlichen in den fetalen Kreislauf gelangen und bewirken dort einen Zerfall der fetalen Erythrozyten (Hämolyse) und dadurch eine Anämie. Bei der fetalen Erythroblastose oder Morbus haemolyticus neonatorum (MHN), wie dieses Krankheitsbild bezeichnet wird, ist die Hämolyse manchmal derart ausgeprägt, dass der Fetus die Anämie nicht mehr kompensieren kann und es schließlich zum Fruchttod kommt. Über eine Bilirubinbestimmung aus dem Fruchtwasser kann das Ausmaß der Hämolyse abgeschätzt und bei Bedarf rettende Maßnahmen ergriffen werden. Als geeignete Maßnahmen stehen einerseits die intrauterine, intraperitoneale oder intravenöse Transfusion von Erythrozytenkonzentraten zur Verfügung, so dass das Überleben des Feten bis zur Geburt gesichert werden kann. Andererseits gibt es die Möglichkeit, die Schwangerschaft vorzeitig zu beenden.

Durch die Rhesusprophylaxe bei Rhesus-negativen Müttern ist die Erkrankung heute sehr selten geworden (3, 8).

In der Schwangerschaft ergänzt die Plazenta als endokrines Organ die mütterlichen Hormone um so die Schwangerschaft zu erhalten. Sie synthetisiert diese im Synzytiotrophoblasten aus Vorstufen, die entweder vom Fetus oder der Mutter selbst kommen. Es handelt sich um folgende Hormone:

- **Humanes Choriongonadotropin** (engl. *human chorionic gonadotropin*, *HCG*):

Das HCG besteht aus zwei Untereinheiten, der α - und β -Untereinheit. Erstere ist dem luteinisierenden Hormon (LH) sehr ähnlich, wird in der Frühschwangerschaft vom Trophoblasten synthetisiert, erreicht sein Maximum bis zur achten Schwangerschaftswoche und fällt anschließend wieder stetig ab. Es bewirkt die Aufrechterhaltung des Corpus luteum (somit die Produktion von Progesteron und Östrogen) und das Ausbleiben der Menstruationsblutung. Zweitere ist die β -Untereinheit, welche zum Nachweis einer Schwangerschaft verwendet werden kann. Da der Trophoblast nicht über die komplette Enzymausstattung verfügt, ist die Plazenta bei der Hormonsynthese auf die Anlieferung von Synthesevorstufen angewiesen. Für die Östrogene (Östradiol, Östron und Östriol) wird Dehydroepiandrosteron (DHEA-S) zunächst aus der maternalen, später aus der fetalen Nebenniere zur Verfügung gestellt, dessen Synthese durch HCG stimuliert wird.

- **Humanes Plazentalaktogen** (engl. *human placental lactogen*, *HPL*):

Das Hormon ist ab etwa der achten Schwangerschaftswoche nachweisbar und nimmt während der gesamten Schwangerschaftsdauer an Konzentration zu, bis es um die 36. Schwangerschaftswoche ein Plateau erreicht. Es ähnelt in seiner Struktur dem hypophysären Wachstumshormon und wirkt ebenfalls auf Wachstum und Entwicklung. Es hat diabetogenen und lipolytischen Einfluss und bewirkt dadurch einen Anstieg freier Fettsäuren im mütterlichen Blut, die ihr dann als Energielieferanten dienen. Dadurch kann die eingesparte Glukose dem Fetus zukommen.

Außerdem stimuliert HPL das Wachstum der Brüste und bereitet diese zusammen mit den Steroidhormonen auf die Laktation vor.

- **Steroidhormone (Östrogen und Progesteron):**

Um diese zu synthetisieren benötigt die Plazenta deren Vorstufen (DHEA, DHEA-S), da sie selbst nicht über das erforderliche Enzym verfügt (17 α -Hydroxylase) um die Umwandlung von C₂₁-Steroiden zu C₁₉-Steroiden zu vollführen. Diese Vorstufen erhält sie aus dem mütterlichen oder fetalen Kreislauf.

In der Schwangerschaft wird vor allem Östriol synthetisiert. Dazu werden die Vorstufen DHEA und DHEA-S in der Plazenta zu Östron, Östradiol und Östriol umgewandelt. Die Produktion dieser Hormone steigt während der Schwangerschaft stetig an. Östrogen wird benötigt, um den Uterus auf die Geburt vorzubereiten, indem dessen Durchblutung stimuliert und er zum Wachstum angeregt wird. Weiterhin regt auch Östrogen das Wachstum der Brustdrüse und die Progesteronsynthese in der Plazenta an.

Progesteron ist hingegen für die Erhaltung der Schwangerschaft verantwortlich. Fällt das HCG ab etwa der zehnten Schwangerschaftswoche langsam ab, übernimmt das Progesteron dessen Aufgabe („luteoplazentärer Shift“). Hier ist die Mutter allein dafür verantwortlich die Vorstufen zu liefern, denn das Hormon wird ausschließlich aus mütterlichem Cholesterin synthetisiert. Die erhaltende Funktion des Progesterons liegt darin begründet, dass es den Uterustonuss herabsetzt und das Endometrium erhält. Außerdem ist es ebenfalls am Brustdrüsenwachstum und der Vorbereitung auf die Laktation beteiligt. Schließlich bewirkt es kurz vor der Geburt die Bildung von

Oxytozinrezeptoren in der Uterusmuskulatur. Für den Feten liefert das Progesteron die Vorstufe zur Bildung von Gluko- und Mineralkortikoiden.

(8, 12)

2.1.5 Die Plazenta kurz vor und nach der Geburt

Zum Ende der Schwangerschaft hin vollziehen sich einige Veränderungen innerhalb der Plazenta. Da sie nur auf einen begrenzten Zeitraum (die Dauer der Schwangerschaft) ausgelegt ist, nimmt der Stoffaustausch ab, je länger die Schwangerschaft andauert. So kann man eine Zunahme des Bindegewebes innerhalb der Zotten, eine Verstärkung der Basalmembran fetalen Kapillarendothels, den Verschluss kleinerer Zottenkapillaren und die Ablagerung von Fibrinoid auf der Zottenoberfläche beobachten. All diese Veränderungen führen zu vermindertem Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind, da sie die Transportvorgänge behindern, indem die Diffusionsstrecke zunimmt. Außerdem führen die Fibrinoidablagerungen zur teilweisen Infarzierung von Plazentagewebe, da sie den Blutfluss unterbinden (3).

Während der Schwangerschaft ist die maternale Seite der Plazenta fest mit der Uteruswand verankert, unter anderem durch Druck der Amnionflüssigkeit. Dieser Druck geht unmittelbar mit der Geburt des Kindes verloren, außerdem führen die Uteruskontraktionen in der Nachgeburtsphase zu einer Verkleinerung der Adhäsionsfläche. Die Gefäße, die den Halt verlieren führen zur Ausbildung eines retroplazentären Hämatoms, welches wiederum die Haftfläche verkleinert und somit zur weiteren Lösung der Plazenta führt. Nach Ausstoßen der Plazenta wird diese auf beiden Seiten auf Vollständigkeit überprüft. Dadurch, dass die Lösung mit Hilfe von Scherkräften abläuft, ist es möglich, dass Rückstände im Uterus verbleiben, die anschließend manuell ausgeräumt werden müssen (12).

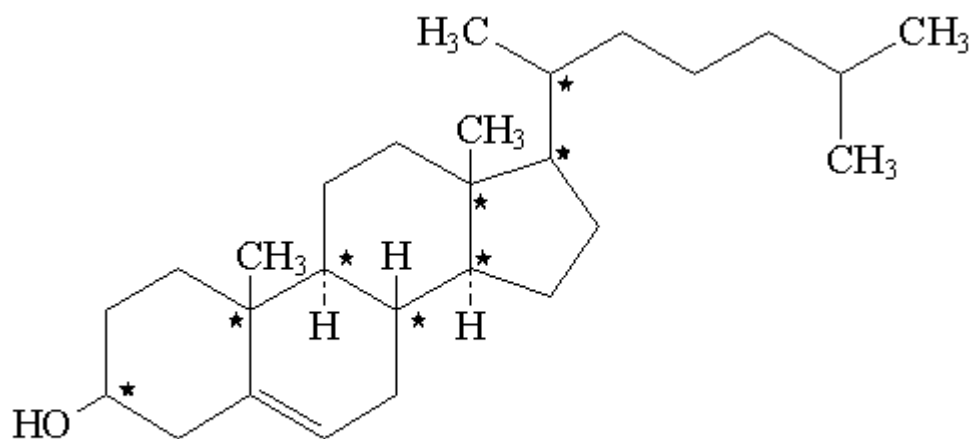
Bei einer spontanen vaginalen Geburt verläuft die Plazentageburt wie bereits beschrieben. Als Geburtshelfer hat man somit keinen Einfluss auf den Zustand des Gewebes nach der Geburt. Erfolgt die Geburt per Kaiserschnitt, liegt die Geburt der Plazenta ebenfalls in der Verantwortung des operierenden Gynäkologen. Dieser kann somit dazu beitragen, das Gewebe möglichst schonend zu entbinden, indem er es so vorsichtig wie möglich manuell zu lösen beginnt. Der Zustand des Plazentagewebes ist ein wichtiges Kriterium für das Gelingen der Perfusionsexperimente, weshalb die Plazenten nach Sectioge-burt bevorzugt für die Experimente herangenommen werden. Diese Plazenten sind

meist auf mütterlicher Seite besser erhalten, weisen weniger Risse im Gewebe auf und sind somit stabiler im Hinblick auf die Dichtigkeit.

2.2 Cholesterinstoffwechsel und Cholesterinbiosynthese

Cholesterin ist für den menschlichen Organismus ein lebenswichtiges Molekül, da es aber nicht in ausreichendem Ausmaß produziert werden kann, ist der Organismus auf eine exogene Zufuhr angewiesen. Der tägliche Bedarf beim Erwachsenen beträgt etwa 1000 mg Cholesterin, wobei die gleiche Menge über Gallensäuren ausgeschieden wird. Der größte Anteil wird dabei endogen über die Cholesterin-Biosynthese synthetisiert, weniger als die Hälfte muss mit der Nahrung zugeführt werden. Da es nicht wasserlöslich ist, befinden sich etwa 95 % innerhalb der Zellen. Der Rest wird an Apolipoproteine gebunden im Blut transportiert (13).

Cholesterin ist ein notwendiger Bestandteil von Plasmamembranen und erhöht deren Stabilität, indem es die Fluidität der Membran herabsetzt. Dies geschieht durch Behinderung der Fettsäureseitenkettenbewegung anderer Membranlipide durch das steife Steroidringsystem (14).



★ Asymmetriezentren

Abbildung 8: Cholesterin Strukturformel (C₂₇H₄₅OH) (15)

Cholesterin dient desweiteren als Vorstufenmolekül bei der Synthese von Steroidhormonen und Gallensäuren. Sein Zwischenprodukt innerhalb der Cholesterin-Biosynthese, das 7-Dehydrocholesterin, ist das Provitamin zur Synthese des Vitamin D, das in der Haut unter Einfluss von UV-Licht gebildet wird. Für die Entwicklung des Ungeborenen spielt Cholesterin ebenfalls eine essentielle Rolle, zum Beispiel durch Aktivierung des sogenannten Hedgehog-Proteins, an der Entwicklung des Vorderhirns beteiligt (16).

Alle Zellen des menschlichen Körpers sind zur Cholesterinbiosynthese befähigt, allerdings nehmen die Leber und der Darm hierbei eine besondere Rolle ein. Sämtliche Kohlenstoffatome des Steroids stammen vom Acetyl-CoA, welches in mehreren aufeinanderfolgenden Reaktionen schließlich zum Cholesterin umgebaut wird.

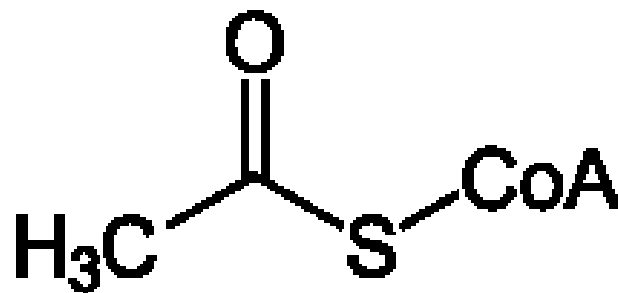


Abbildung 9: Acetyl-CoA-Strukturformel (17)

Grob kann die Cholesterinbiosynthese in vier große Schritte eingeteilt werden:

1. Drei Acetyl-CoA (C₂-Körper) werden zu einem Mevalonat (C₅-Körper) zusammengesetzt. Hierbei handelt es sich um den geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt der Synthese.
2. Mevalonat wird zum aktiven Isopren Isopentenyl-Pyrophosphat (C₅-Körper) umgebaut.
3. Sechs Moleküle des aktiven Isoprens lagern sich zu einem Squalen zusammen (C₃₀-Körper).
4. Abschließend wird das Cholesterin (C₂₇-Körper) gebildet.

Die Biosynthese findet zum einen im Zytosol der Zellen und zum anderen im Endoplasmatischen Retikulum statt (13, 14).

Wie bereits erwähnt, herrscht im erwachsenen Organismus ein Gleichgewicht bezüglich Verbrauch und Neusynthese des Moleküls. Der Fetus kann dieses Gleichgewicht nicht bewerkstelligen, da er aufgrund seines stetigen

Entwicklungsvorgangs auf große Mengen angewiesen ist. Somit ist die Cholesterin-Neusyntheserate im Fetus wesentlich höher als im Erwachsenen.

Welche enorme Rolle das Cholesterin während der Entwicklung spielt, zeigte erstmals die Entdeckung des Smith-Lemli-Opitz-Syndroms (SLOS), bei dem eine bereits reduzierte endogene Cholesterinbiosynthese Auslöser unterschiedlicher kongenitaler Defekte ist (16).

2.2.1 Cholesterintransport

Hat die Zelle mehr Cholesterin produziert als sie benötigt, wird das Cholesterin in seine Speicherform, den Cholesterinester, überführt. Diesen Vorgang übernimmt die ACAT (Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase), indem sie im Endoplasmatischen Retikulum die Fettsäure eines Acyl-CoAs, meist eine Öl- oder Stearinsäure, auf das Cholesterin überträgt. Die Aktivität der ACAT ist abhängig von der Cholesterinkonzentration in der Zelle. Im Blut wird die Veresterung von der LCAT (Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase) übernommen, ein Enzym, das eine Fettsäure von Lecithin überträgt. Dabei entsteht neben dem Cholesterinester ein Lysolecithin.

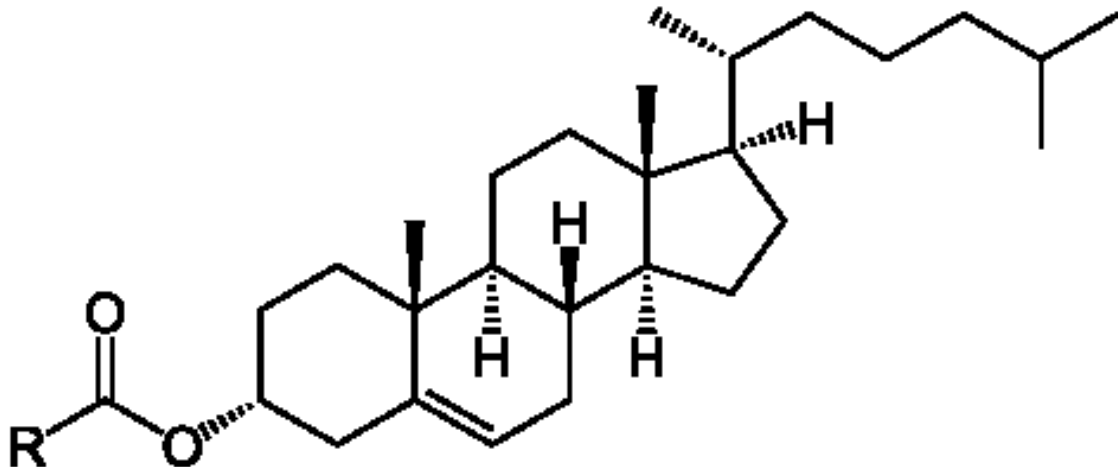


Abbildung 10: Cholesterinester Strukturformel (18)

In dieser Form kann das Cholesterin wie bereits erwähnt gespeichert, aber auch transportiert werden. Der Ester ist ein stark hydrophobes Molekül und kann nur verpackt in Lipoproteine durch den Körper transportiert werden. Sind die Cholesterinester in ihre Zielzellen gelangt, werden sie dort von lysosomalen Lipasen wieder zu freiem Cholesterin hydrolysiert. Dieses wird dann erneut entweder in Zellmembranen eingebaut oder als Cholesterinester im Zytosol gespeichert. Der Transport geschieht ständig von der Leber zu peripheren

Gewebe und wieder zurück. Überschüssiges Cholesterin wird in Form von Gallensäuren ausgeschieden, was sich als einzige Möglichkeit erweist es in signifikanter Menge aus dem Organismus zu entsorgen (13, 14).

2.2.2 Regulation des Cholesterinstoffwechsels

Die Menge an im Organismus vorhandenem, neusynthetisiertem und ausgeschiedenem Cholesterin wird über verschiedene Mechanismen reguliert. Zum einen gibt es die allosterische und zu anderen die hormonelle Regulation. Beide setzen am Schlüsselenzym der Biosynthese, der β -HMG-CoA-Reduktase an.

Das Enzym unterliegt einem negativen Rückkopplungsmechanismus und wird sowohl durch sein direktes Produkt, das Mevalonat, als auch das Endprodukt, das Cholesterin, selbst gehemmt. Zusätzlich sinkt bei hohem Cholesteringehalt die Halbwertszeit des Enzyms, es wird schneller abgebaut und steht dadurch der Biosynthese nicht zur Verfügung. Weiterhin hemmt eine hohe intrazelluläre Cholesterinkonzentration die Bildung von LDL-Rezeptoren auf der Oberfläche von Leberzellen, was in verminderter zellulärer Aufnahme des Moleküls resultiert.

Die hormonelle Regulation läuft über die beiden Gegenspieler Insulin und Glukagon, wobei Insulin die Biosynthese fördert und Glukagon diese hemmt. Diese Effekte kommen durch eine, im Falle von Insulin, Phosphorylierung und somit Aktivierung der β -HMG-CoA-Reduktase und, im Falle von Glukagon, Dephosphorylierung und somit Inaktivierung des Enzyms zustande.

Zuletzt gibt es noch die Möglichkeit der Regulation auf DNA-Ebene. Liegt nicht ausreichend Cholesterin in der Zelle vor, werden über SREBP (engl. *sterol regulatory element-binding protein*) Transkriptionsfaktoren aktiviert, die dafür sorgen, dass zum einen über die vermehrte intrazelluläre Aufnahme und zum anderen über die gesteigerte Neusynthese das Gleichgewicht innerhalb der Zelle wiederhergestellt wird. SREBP liegt gebunden an SCAP (engl. *SREBP cleavage-activating protein*) im Endoplasmatischen Retikulum vor und wird von diesem von dort heraus zum Golgi Apparat transportiert (13, 14).

2.2.3 Lipoproteinstoffwechsel und Apolipoproteine

Lipoproteine werden benötigt um Moleküle, die nicht wasserlöslich sind (Lipide, Phospholipide, Triacylglycerine und Cholesterin), im Blut transportieren zu können. Sie bestehen aus einem hydrophoben unpolaren Kern, der aus

Triacylglycerinen und Cholesterinestern besteht, und einer amphiphilen Hülle aus Proteinen, Phospholipiden und Cholesterin. Außerdem tragen sie auf ihrer Oberfläche verankerte Apolipoproteine, die für die hydrophilen Eigenschaften und die Bindung an Rezeptoren und Enzyme verantwortlich sind.

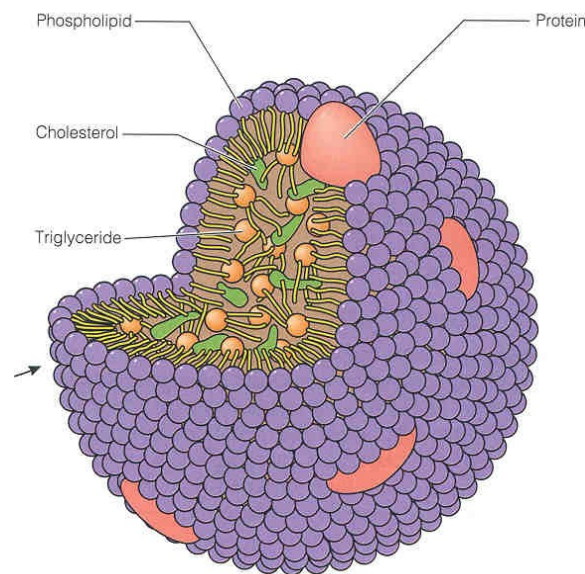


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines Lipoproteins (19)

Aufgrund ihrer Dichte, die durch den unterschiedlich großen Anteil an Proteinen zustande kommt, können Lipoproteine in fünf Klassen unterteilt werden. Je dichter die Lipoproteine werden, umso geringer werden sie in ihrer Größe:

1. Chylomikronen
2. VLDL (engl. *Very low density lipoproteins*)
3. IDL (engl. *intermediate density lipoproteins*)
4. LDL (engl. *low density lipoproteins*)
5. HDL (engl. *high density lipoproteins*)

Diese komplexen Moleküle sind nach wie vor schlecht wasserlöslich und besitzen keinerlei Signalstrukturen, die ihren Stoffwechsel regulieren. Apolipoproteine, der Proteinanteil dieser Moleküle, die fast alle in der Leber gebildet werden, übernehmen diese Funktionen.

Die Apolipoproteine besitzen einen großen Anteil an amphiphilen Helices, die sich zwischen die Phospholipide einlagern und das Molekül dadurch stabilisieren und wasserlöslich machen. Je nach Aufbau sind sie Liganden für Rezeptoren oder Enzymaktivatoren. Bis auf das Apolipoprotein ApoB wechseln sie zwischen den

einzelnen Lipoproteinen hin und her und sind mit fortschreitender Metabolisierung in unterschiedlichen Kombinationen auf den Lipoproteinen zu finden. Im Folgenden werden die einzelnen Apolipoproteine näher betrachtet:

- Apolipoprotein A:
Aktiviert die LCAT, sodass diese freies Cholesterin zum Cholesterinester verestern kann.
- Apolipoprotein B₄₈ und B₁₀₀:
Beide werden vom gleichen Gen kodiert, allerdings werden sie an unterschiedlichen Orten gebildet. ApoB₁₀₀ entsteht in der Leber und dient als Rezeptorligand während ApoA₄₈, das als Trägermolekül dient, in den Mukosazellen des Darms gebildet wrd. Als einzige Apolipoproteine sind diese beiden nicht zwischen den Lipoproteinen austauschbar.
- Apolipoprotein C-II:
Dient der Lipoproteinlipase als Cofaktor und trägt somit zur Spaltung von Triacylglycerinen in Glycerin und freie Fettsäuren bei.
- Apolipoprotein E:
Dieses ist verantwortlich für die Endozytose der Lipoproteine in der Leber, da es die Bindung des Moleküls an den ApoE/ApoB₁₀₀-Rezeptor vermittelt. Der Rezeptor wird in fast allen Körperzellen exprimiert, befindet sich am häufigsten allerdings auf Zellen der Nebennierenrinde und der Gonaden, die das Cholesterin zur Steroidhormonsynthese benötigen. Im Gegensatz zur Leber ist in der Peripherie ApoB₁₀₀ der wichtigere Ligand und wird als LDL-Rezeptor bezeichnet (13).

Apolipo- protein	Molekül- masse (kDa)	Vorkommen	Hauptsyntheseort	Funktion
ApoA-I	29	HDL, Chylomikronen	Leber, Darm	Aktivator der LCAT
ApoA-II	17,4	Chylomikronen, HDL	Darm	Strukturelement, Aktivator der hepatischen Lipase
ApoA-IV	39	Chylomikronen, HDL	Leber	unbekannt
ApoB ₄₈ (nicht austauschbar)	250	Chylomikronen, Remnants	Darm	Chylomikronen(-Remnant)- Struktur
ApoB ₁₀₀ (nicht austauschbar)	550	VLDL, IDL, LDL	Leber	Ligand für die zelluläre Aufnahme (ApoB ₁₀₀ Rezeptor)
ApoC-I	7	HDL, Chylomikronen, VLDL	Leber	Aktivator der LCAT
ApoC-II	9	Chylomikronen, -Remnants, VLDL, HDL	Leber	Aktivator der Lipoproteinlipase
ApoC-III	9	Chylomikronen, -Remnants, VLDL, HDL	Leber	Inhibitor der Lipoproteinlipase
ApoD	7	HDL	Leber	Aktivator der LCAT, Strukturelement
ApoE	35	Chylomikronen, -Remnants, VLDL, IDL, HDL	Leber, Makrophagen	Ligand für die zelluläre Aufnahme

Tabelle 1: Übersicht über die einzelnen Apolipoproteine (14)

Cholesterin, gleichermaßen wie andere Nahrungsfette, muss einen langen Weg zurücklegen, bis es zu seinen Zielzellen gelangt. Auf diesem Weg wird es, aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften von Lipoproteinen transportiert. Deren Apolipoproteine wurden bereits besprochen, nun sollen die einzelnen Lipoproteine erläutert werden.

Zunächst werden die Fette von den Mukosazellen des Dünndarms resorbiert und dort im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi Apparat in Chylomikronen verpackt. Zusammen mit ihrem Apolipoprotein ApoB₄₈ werden sie über die

Lympe ins Blut befördert. Dort werden sie von HDL mit ApoC, zur Aktivierung der Lipoproteinlipase, und ApoE, zur Endozytose in der Leber, beliefert. In weiterer Folge werden die Triacylglycerine durch die Lipoproteinlipase mit ApoC-II als Cofaktor in freie Fettsäuren und Glycerin gespalten. Der Verlust der Triacylglycerine führt dazu, dass die nun kleineren Chylomikronen-Remnants mit Hilfe des ApoE-Rezeptors endozytotisch in der Leber aufgenommen werden. Die Fette, die von der Leber selbst nicht verstoffwechselt werden, werden von ihr in VLDL verpackt und mit ApoB₁₀₀, ApoC-II und ApoE wieder ins Blut abgegeben. ApoB₁₀₀ dient der späteren Bindung der LDL an ihre Rezeptoren auf peripheren Geweben. ApoE sorgt für die Aufnahme aus VLDL entstandener IDL in der Leber. Ein zusätzliches ApoC-I sorgt dafür, dass VLDL nicht zu früh über den ApoE-Rezeptor wieder von der Leber aufgenommen werden, indem es die Rezeptorbindungsstelle blockiert, bis es zur Konformationsänderung des Moleküls nach Triacylglycerinabgabe kommt. Die nun entstandenen IDL können zwei verschiedene Wege einschlagen. Die Triacylglycerin-reicheren Moleküle werden von der Leber aufgenommen, die restlichen werden zu LDL umgebaut, indem, die sich auf der Oberfläche der Hepatozyten befindende, hepatische Lipase weitere Triacylglycerine abspaltet. Durch die geänderte Struktur des Lipoproteins wird der ApoB₁₀₀-Rezeptor frei und das Molekül kann nun über den LDL-Rezeptor im Gewebe aufgenommen werden. Nicht mehr benötigte ApoC und E werden von HDL übernommen. LDL zirkuliert einige Zeit im Blut und stellt für Steroidhormonproduzierendes Gewebe ein schnell verfügbares Cholesterinreservoir. Der LDL-Rezeptor befindet sich auf fast allen Zellen des Körpers und wird nach Aufnahme des LDL, in Vesikel verpackt, zurück zur Zelloberfläche transportiert. Die Aufnahme von LDL in die Zelle erfolgt als rezeptorvermittelte Endozytose. Dabei wird das LDL über seinen Rezeptor an der Zelloberfläche gebunden. Die Rezeptoren sind Transmembranglykoproteine, die spezifisch an ApoB₁₀₀ binden. Sie sitzen in umhüllten Vertiefungen der Zelloberfläche und bilden umhüllte Vesikel, sobald das Substrat bindet. Im Zytosol werden die Vesikel durch Endosomen lysiert, so dass das LDL frei wird. Die jetzt wieder frei gewordenen Rezeptoren werden der Zelloberfläche zugeführt, so dass sie erneut binden können. Innerhalb der Zelle aktiviert das frei werdende Cholesterin eine Aktivierung der ACAT, wodurch es wieder verestert wird und im Zytosol gespeichert werden kann. Außerdem verhindert es die Bindung des

Transkriptionsfaktors SREBP an SCAP, so dass die Transkription der β -HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors reduziert wird.

Bisher wurde nur die Funktion der Versorgung peripheren Gewebes mit Cholesterin beschrieben. Nun soll der Transport überschüssigen Cholesterins und dessen Transport zur Leber erläutert werden. Diese Funktion übernimmt das HDL, indem es das Cholesterin aus der Peripherie aufnimmt und je nach Bedarf verteilt oder gleich zur Leber befördert. Die Verteilung des Cholesterins innerhalb der Lipoproteine und der austauschbaren Apolipoproteine übernimmt ebenfalls das HDL.

Die Leber produziert HDL als scheibchenförmige Vorstufen, sogenannte nascente HDL, zusammen mit ApoA, C und E. Erst im Laufe der Cholesterinaufnahme aus der Peripherie reifen die Vorstufen zu ihrer kugeligen Form heran. Wie bereits erwähnt, werden HDL entweder über ApoE-Rezeptoren in der Leber aufgenommen oder sie geben je nach Bedarf Cholesterin über Scavenger-Rezeptoren ab. Im Gegensatz zum LDL-Rezeptor liegt hier keine negative Rückkopplung vor (13, 14).

	Chylomikronen	VLDL	LDL	HDL
Durchmesser	100-1000 nm	50 nm	20 nm	10 nm
Inhalt	85% TAG	50% TAG 20% Phospholipide 10% Cholesterinester 10% Protein	40% Cholesterinester 20% Protein 20% Phospholipide 10% TAG	50% Protein 25% Phospholipide 15% Cholesterinester
Apoproteine (wichtigste)	B ₄₈ , E, C	C, B ₁₀₀ , E	B ₁₀₀	C, A, E
Bildungsort	Darm	Leber	Leber	Leber
Lebensdauer	10 Minuten	6 Stunden	5 Tage	7 Tage

Tabelle 2: Übersicht über die Lipoproteine (13)

2.2.4 Lipide in der Schwangerschaft

Der Organismus einer Schwangeren passt sich gänzlich an die Bedürfnisse des Ungeborenen an, somit dienen alle Veränderungen im Stoffwechsel dazu, dem Feten die bestmöglichen Entwicklungsbedingungen zu gewährleisten. Zu Beginn der Schwangerschaft befindet sich der mütterliche Organismus in einem anabolen Zustand, d.h. die Fettdepots werden durch Hemmung der Lipolyse und gleichzeitige Hyperphagie der Mutter aufgefüllt. Verantwortlich dafür sind unter anderem die Hormone Östrogen, Progesteron und Insulin. Während der späteren Schwangerschaft kommt es unter Einfluss des HPL zur Lipolyse und Fettdepotmobilisation.

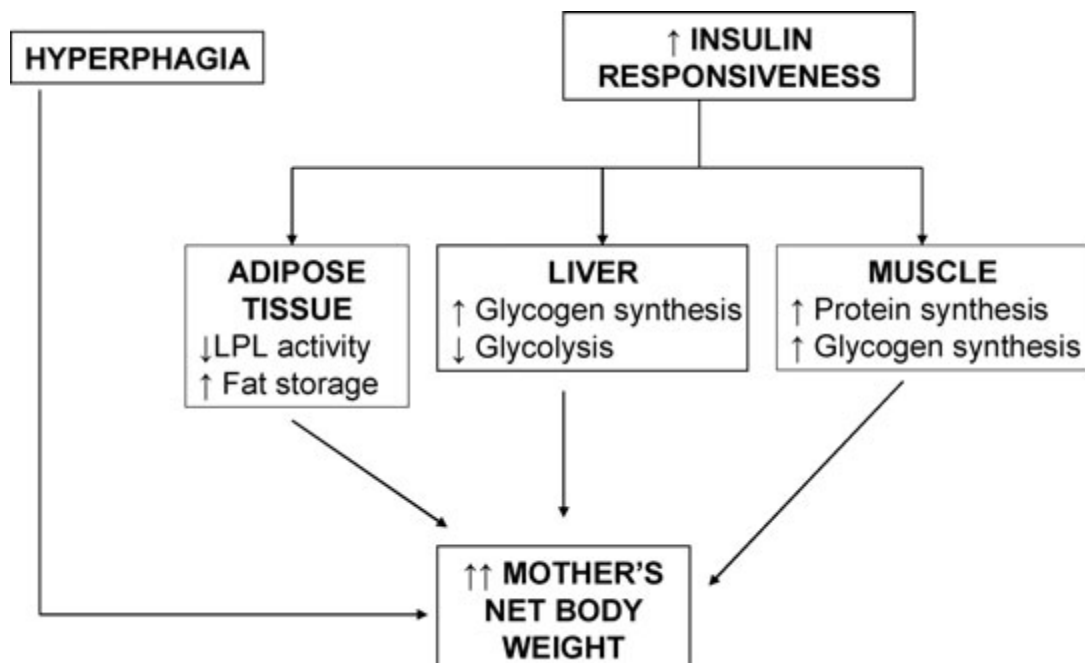


Abbildung 12: Anabole Stoffwechsellage des mütterlichen Organismus während des ersten Trimesters (20)

Von der anabolen wechselt der Organismus in eine katabole Stoffwechsellage, baut die Fettdepots ab und stellt somit große Mengen freier Fettsäuren als Energiequelle zur Verfügung. Der Fetus bezieht seine Energie hauptsächlich aus Glukose und Aminosäuren, da diese besonders wichtig für z.B. die Entwicklung seines Zentralnervensystems sind. Die in großen Mengen freiwerdenden Fettsäuren führen bei der Schwangeren zur physiologischen maternalen Hyperlipidämie.

Neben einer starken Erhöhung der Triacylglycerine findet sich eine weniger starke Erhöhung von Phospholipiden, Cholesterin, Lipoproteinen (VLDL, LDL, HDL) und den Triacylglycerinen innerhalb der Lipoproteine.

Zunächst fallen Total- und LDL-Cholesterin ab, erreichen aber im dritten Trimenon ihr Maximum. Bei den Triacylglycerinen und VLDL spielt sich diese Veränderung innerhalb der ersten acht Wochen ab. Die VLDL steigen aufgrund der verminderten Aktivität der Lipoproteinlipase und der Östrogen-bedingten VLDL-Synthese. Ab etwa der 12. Schwangerschaftswoche fällt der HDL-Spiegel, bleibt aber bis zum Ende höher als sein Ausgangswert (20).

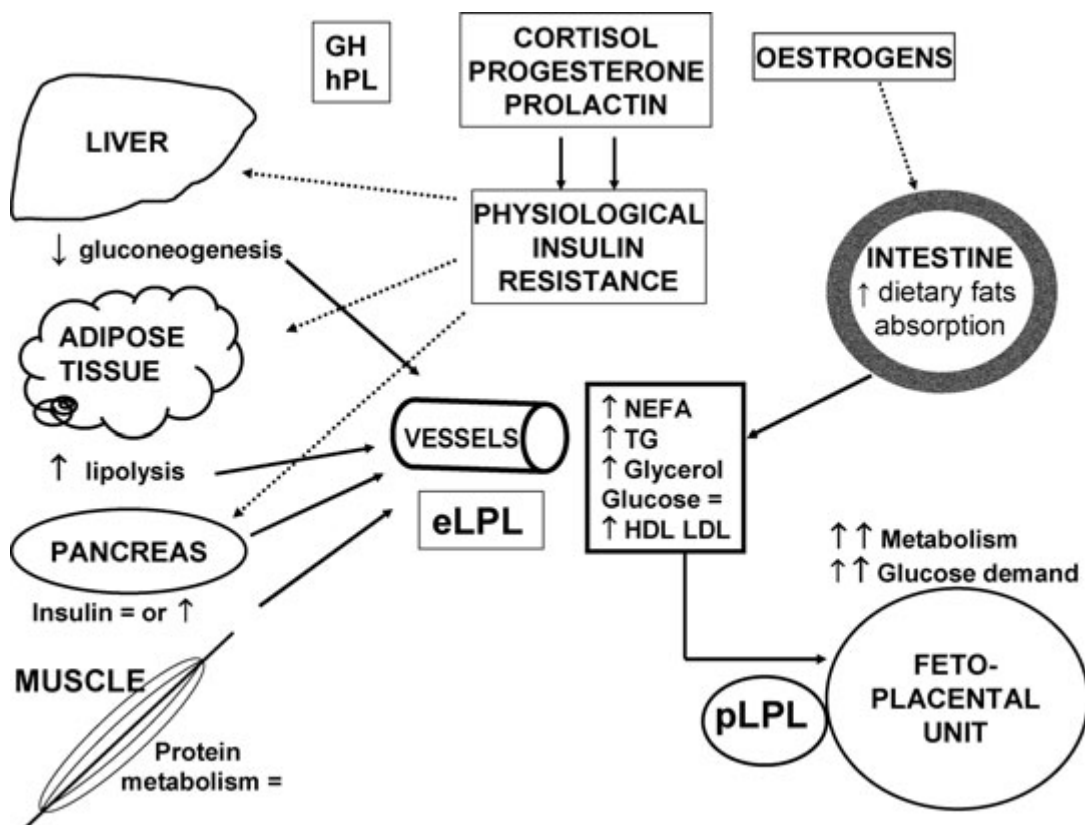


Abbildung 13: Katabole Stoffwechsellage des mütterlichen Organismus während des dritten Trimesters (20)

3 Material und Methoden

3.1 Material

Für die Versuche werden Plazenten aus termingerechten unkomplizierten Schwangerschaften benutzt, die entweder vaginal entbunden oder per Kaiserschnitt entnommen wurden. Aus der Versuchsreihe ausgeschlossen sind Plazenten von Frühgeburten, Mehrlingsschwangerschaften und von Müttern mit Erkrankungen während der Schwangerschaft, wie Diabetes mellitus oder EPH-Gestosen (Präeklampsie, Eklampsie oder HELLP-Syndrom).

Für den Versuchsaufbau ist es sehr wichtig, dass die Nabelschnur unmittelbar nach Geburt der Plazenta abgeklemmt wird, damit die fetalen Gefäße in weiterer Folge nicht kollabieren.

Ein weiteres Problem stellt die Zeit zwischen Plazentageburt und eigentlichem Start des Versuchs dar. Die Ischämieperiode soll 20 bis maximal 30 Minuten betragen.

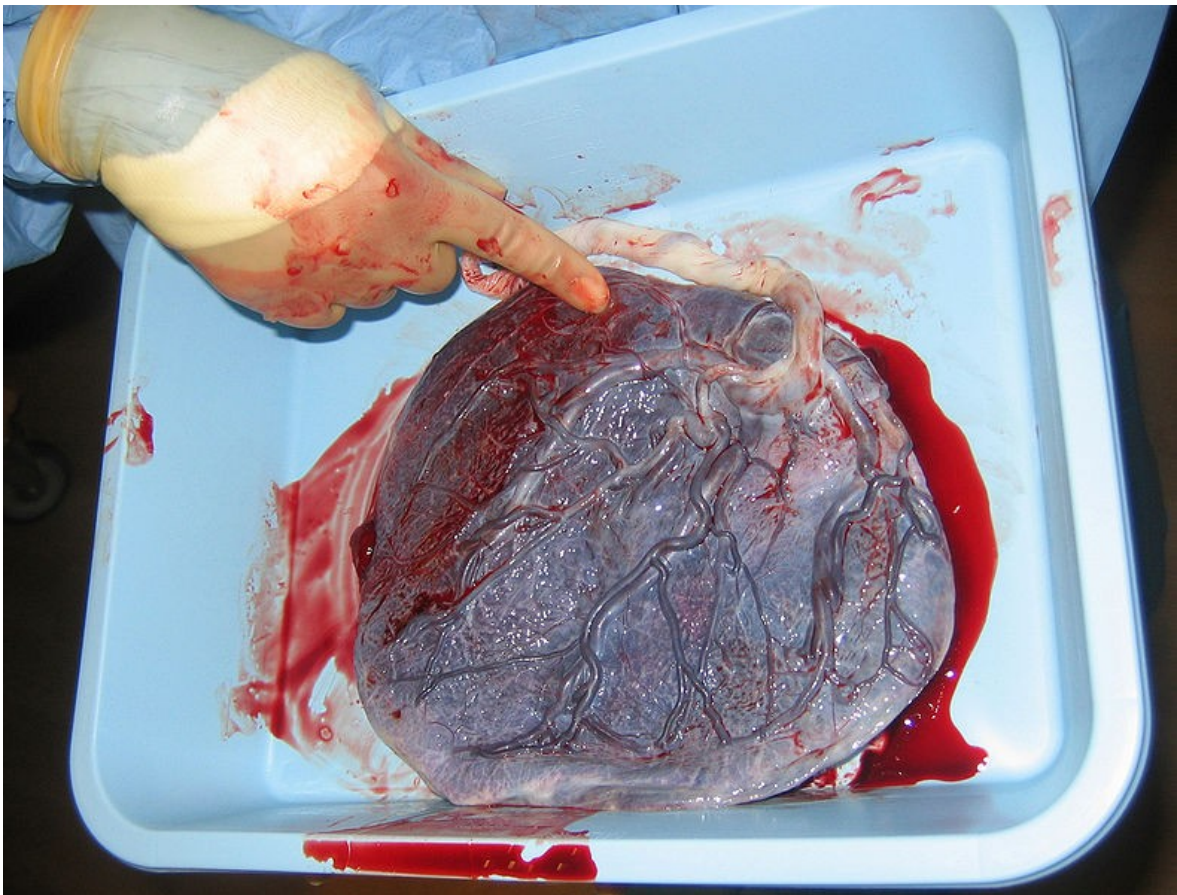


Abbildung 14: Gefäßverlauf in der Plazenta (21)

3.1.1 Präparation des Kotyledons

Die Plazenta wird unmittelbar nach der Geburt in einem Plastikbehälter in das Versuchslabor transportiert. Dabei ist darauf zu achten, dass sie nicht gekühlt wird, da sonst das Blut, welches sich noch immer in den Gefäßen und im Gewebe befindet, gerinnt und die Plazenta dadurch für den Versuch unbrauchbar wird. Im Labor angekommen wird sofort mit der Präparation des Kotyledons und des Versuchsaufbaus begonnen. Dazu werden mütterliche und fetale Seite zunächst vorsichtig inspiziert. Ein geeignetes Kotyledon wird ausgewählt. Dieses hat optimalerweise eine einzelne Arterie und Vene auf fetaler Seite, die keine anastomotischen Verbindungen mit benachbarten Kotyledonen aufweisen, und eine unbeschädigte mütterliche Seite.

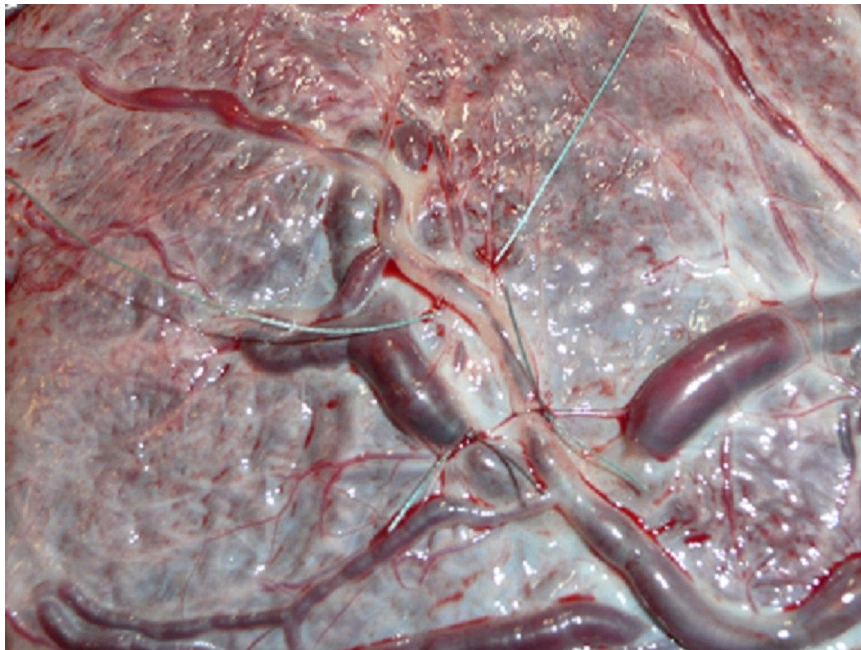


Abbildung 15: Ligieren eines fetalen Gefäßes

Für den Versuchsaufbau ist es vorteilhaft, wenn ein solches Kotyledon in der Peripherie der Plazenta gefunden wird. Einerseits haben die dort gelegenen Gefäße eher die Durchmesser, die den Durchmessern der Kanülen entsprechen und andererseits ist ein peripheres Kotyledon leichter in die Perfusionskammer einzuspannen, da man die angrenzende Dezidua zur Hilfe nehmen kann. Hat man korrespondierende Arterie und Vene aufgesucht, wird zunächst die Vene vorsichtig, ohne diese zu beschädigen, mit 3x0 Vinyl Nahtmaterial (Ethicon) angeschlungen und per Ligatur verschlossen. Eine weitere Umschlingung wird etwa 2 cm distaler der ersten gesetzt und zunächst offen gelassen. Anschließend

wird die Vene mit Hilfe einer Gefäßschere eröffnet und mit einer bulbösen Metallkanüle, die mit einem Teflonschlauch verbunden ist, kanüliert.

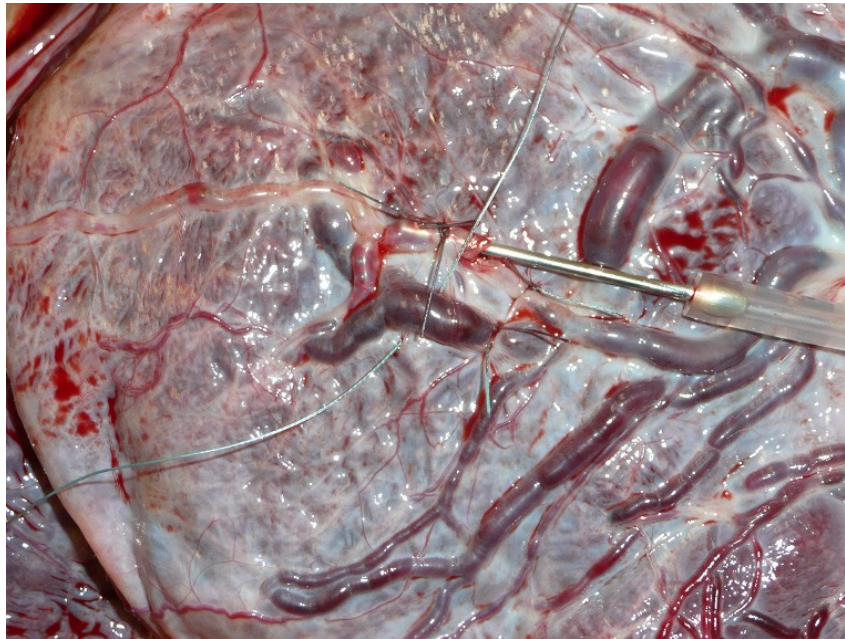


Abbildung 16: Kanülieren eines fetale Gefäßes

Um den richtigen Sitz der Kanüle zu überprüfen, wird unter vorsichtigem Druck an einer Spritze, die mit dem Teflonschlauch verbunden ist und Perfusionslösung enthält, ein wenig Perfusionslösung in die Vene eingebracht. Liegt die Kanüle richtig im Gefäß, so weitet sich dieses sobald die Lösung hineinfließt. Nun wird auch die zweite Ligatur verschlossen und die Metallkanüle dadurch sicher im Gefäß befestigt. Auf die gleiche Art und Weise wird nun mit der Arterie verfahren. Ist auch diese sicher mit der eingebrachten Kanüle verbunden, wird das korrespondierende System mit ca. 15 ml Perfusionslösung gespült, um das noch vorhandene Blut weitestgehend heraus zu spülen. Dazu wird die Lösung auf arterieller Seite unter vorsichtigem Druck mit einer 20 ml Spritze in das Gefäß gebracht und auf venöser Seite tröpfchenweise in einem Behälter aufgefangen. Mit dieser Methode überprüft man gleichzeitig, ob die ausgewählten und kanülierten Gefäße auch wirklich korrespondieren. Nun ist das Kotyledon bereit in die Perfusionskammer eingespannt zu werden.



Abbildung 17: Perfusionskammer

3.2 Versuchsaufbau und Prinzip des Perfusionskreislaufs

Der für unsere Experimente gewählte Versuchsaufbau orientiert sich an dem von H. Schneider und A. Huch (1985) entwickelten Verfahren der ex-vivo Perfusion einer humanen Plazenta.

Das ausgewählte Kotyledon mit dem kanülierten Gefäßpaar wird nun in die aus Plexiglas bestehende Perfusionskammer eingespannt. Das Gewebe, welches das Kotyledon umgibt, wird zunächst, mit der fetalen Seite nach oben, auf sechs Metallstifte aufgespießt und dadurch aufgespannt. Dies geschieht äußerst vorsichtig, um das zu perfundierende Kotyledon nicht zu beschädigen. Überschüssiges Plazentagewebe wird an den Rändern mit einer Schere entfernt. Anschließend werden das Kotyledon und die aus ihm herausragenden Schläuche mit einer schützenden Folie abgedeckt, um den Versuchsaufbau noch besser zu fixieren.

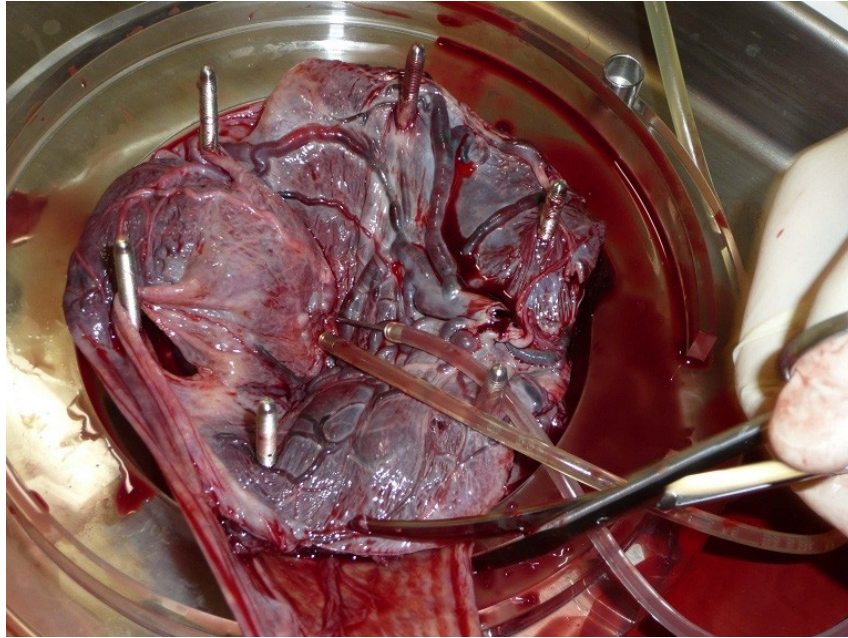


Abbildung 18: Entfernen überschüssigen Plazentagewebes

Es wird ein passendes ringförmiges Verschlusssteil aus Plexiglas aufgesetzt und mit Schraubenmuttern vorsichtig fixiert, wobei die Perfusionsschläuche durch einen seitlichen Auslass und ein Distanzstück vor Kompression geschützt sind. Schließlich wird das Kotyledon in der Perfusionskammer eingespannt, wobei die mütterliche Seite der Plazenta nach oben zum Liegen kommt, da sie nach der Befestigung zum Einspannen gedreht wird. Dadurch ist letztlich die fetale Seite nach unten positioniert und die mütterliche nach oben, wodurch man im Laufe des Experiments das Aufhellen des perfundierten Kotyledons beobachten kann. Zuletzt werden noch die Schläuche mit dem Kreislauf verbunden und das Experiment kann gestartet werden.

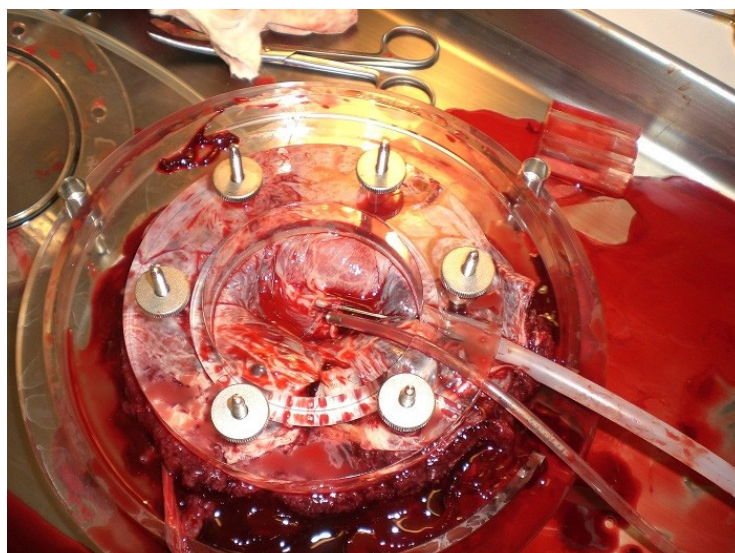


Abbildung 19: Kanüliertes, eingespanntes und fixiertes Kotyledon

Der gesamte Aufbau der Perfusionskammer ist doppelwandig und umschließt einen Hohlraum, der während des Experiments von 37°C warmem Wasser durchspült wird, um die Temperatur des Kotyledons möglichst physiologisch zu halten.

Eine Rollpumpe lässt die Perfusionslösung, deren Flussrate in der fetalen Zirkulation 6ml/min beträgt, im Kreislauf zirkulieren. Ein Messzylinder dient der rezirkulierenden Perfusionslösung als Reservoir und wird während des Experiments mit Hilfe eines Wasserbades durch einen elektrischen Erhitzer auf einer Temperatur von 37 °C gehalten. Da der Messzylinder skaliert ist, kann man etwaige Volumensverluste an Perfusat sofort ablesen. Kurz bevor die Perfusionslösung das Kotyledon erreicht, wird sie durch eine sogenannte Blasenfalle geleitet, welche die entstandenen Luftbläschen entfernen soll und dadurch die Kapillaren der Plazenta vor Luftembolien schützt.

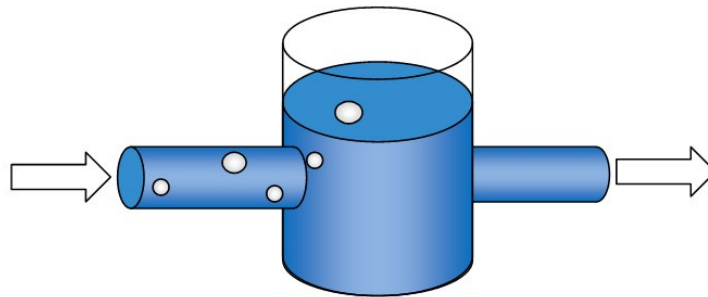


Abbildung 20: Blasenfalle

Die Rollpumpe ist über einen Transducer mit einem Computerprogramm verbunden, so dass aufgenommene Daten, wie z.B. der Perfusionsdruck sofort an das Programm geschickt und dort als Kurvendiagramm aufgezeichnet werden. Der gemessene und aufgezeichnete Druck lag im Bereich zwischen 0-60 mmHg. Stieg der Druck dauerhaft darüber hinaus, wurde das Experiment abgebrochen, da man annehmen muss, dass bei solch hohen Drücken die Membranen zwischen maternalem und fetalem Kompartiment zerstört werden und es zum „leak“, also Verlust von Perfusionslösung, kommt. Zuletzt wurde die Perfusionslösung, bevor sie die Plazenta erreicht, mit 93 % Stickstoff (N₂) und 5 % Kohlendioxid (CO₂) begast. Dies erfolgt, um die Sauerstoffsättigung, die in utero herrscht, in etwa nachzustellen.

3.3 Herstellung des Perfusionsmediums

Das Perfusionsmedium ist jene Flüssigkeit, die während der kompletten Experimentdauer im Kreislauf zirkuliert. Sie wird während der unterschiedlichen Phasen insgesamt dreimal gewechselt und enthält bis auf die Vorphase noch Zusätze.

Das Medium enthält Earl's Puffer (Substanzen von J.T. Baker Analytik) und 9,2 g/l Zellzuchtmedium NCT-135 im Verhältnis 1:2 (Bio Whittacer Europe, Camprex Company), 40 g/l Bovinalbumin Fraktion V (Boehringer Mannheimer GmbH), 1,33 g/l D-Glukose (Merck Darmstadt), 250 mg/l Amoxicillin (Sigma Aldrich Chemie GmbH), 500 µg/l Heparin (Liquemin® N25000 5ml, Roche) und 10 g/l Dextran FP 40 (Serva, Elektrophoresis GmbH Heidelberg). Sind alle Substanzen gut vermischt, wird die Perfusionslösung mit 1 molarer NaOH auf pH 7,4 eingestellt, indem man diese tröpfchenweise hinzupipettiert. Anschließend kann sie einige Tage im Kühlschrank gelagert werden.

1 l Earl's Puffer enthält:

1,5 l Perfusionsmedium enthalten:

NaCl	6,8 g	NCT-135 (9,2 g/l)	1l
KCl	0,4 g	Earl's Puffer	0,5 l
NaH ₂ PO ₄	0,14 g	Albumin	60 g
MgSO ₄	0,2 g	D-Glukose	2 g
CaCl ₂	0,2 g	Amoxicillin	375 mg
NaHCO ₃	1,8 g	Heparin	750 µg
		Dextran	15 g

Tabelle 3: Zusammensetzung Earl's Puffer und Perfusionsmedium

Im Verlauf des Experiments werden nach einer Vorlaufphase, die dem Spülen des Kreislaufs und der Konditionierung des Gewebes an die Versuchsbedingungen dient, in der Hauptphase des Experiments floreszenzmarkiertes fetales LDL und im Anschluss an den Versuch eine Fixierlösung zum Perfusionsmedium hinzugegeben.

Konditionierungsphase 60 min	Native Perfusionslösung	Ca. 60 ml
Hauptphase 5 h	Perfusionsmedium Fluoreszenzmarkiertes fetales LDL (25 µg/ml)	48,75 ml 1,25 ml
Spülung 5 min	NaCl	50 ml
Fixierung 20 min	Formaldehyd	50 ml

Tabelle 4: Zusätze zum Perfusionsmedium im Verlauf des Experiments

3.4 Isolierung von fetalem LDL nach der Dichtegradientenmethode

Fetales LDL wird aus Nabelschnurblut isoliert, das nach der Geburt der Plazenta aus den Gefäßen der Nabelschnur entnommen wird. Alles in allem stellt das Isolieren des Lipoproteins ein zeitintensives Verfahren dar, welches aus mehreren Einzelschritten besteht.

Zunächst wird aus dem Nabelschnurblut Plasma isoliert. Dies geschieht durch langsames Zentrifugieren bei 2500 Umdrehungen für eine Dauer von 10 min. Durch Zugabe von Kaliumbromid wird eine Dichte von mindestens 1,24 g/ml (ca. 0,2 g KBr/ml Plasma) eingestellt. Beim Mischen muss darauf geachtet werden, dass kein Schaum entsteht.

Als nächstes werden eine Kaliumbromidlösung mit einer Dichte von 1,006 g/ml und DII-Lipidfarbstoff gerichtet. Dazu wird der Stock des Farbstoffs mit einer Konzentration von 25 mg/ml auf 2,5 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO) verdünnt (Verdünnung 1:10). Für den nächsten Schritt werden insgesamt acht Behälter für die Ultrazentrifuge benötigt. Diese werden jeweils mit 1,7 ml Plasma gefüllt und das restliche Volumen mit Kaliumbromidlösung ganz langsam, luftblasenfrei überschichtet. Sieben der acht Behälter werden mit einem Stöpsel dicht verschlossen. Im achten wird dem Plasma zuvor noch der DII-Lipidfarbstoff (3 µl pro 1,7 ml Plasma) zugegeben. Dadurch werden innerhalb des Behälters die Regionen sichtbar in denen sich die Lipoproteine LDL und HDL befinden sichtbar. Dies ist insofern wichtig, als dass man nach der Zentrifugation nur eine der beiden Fraktionen, in diesem Fall das LDL benötigt.

Der Rotor der Ultrazentrifuge wird mit den Behältern bestückt und diese bei 15 °C und 100.000 rpm für zweieinhalb Stunden laufen gelassen.

Nach Ablauf dieser Zeit wird in dem mit DII-Lipidfarbstoff markierten Behälter überprüft, ob die Lipoproteinfraktionen sich bereits getrennt haben. Der obere schwach rosafarbige Bereich stellt die LDL-Bande dar, der untere rosafarbige Bereich markiert das HDL. Der farblich markierte Behälter dient als Vorlage für die restlichen, so dass mit dessen Hilfe auf den übrigen Behältern die Banden mit einem Stift markiert werden können.

Mit einer Nadel und Spritze kann nun die LDL-Fraktion entnommen werden und in einem weiteren Behälter gepoolt werden.

3.5 Fluoreszenzmarkierung des Lipoproteins

Bevor das gewonnene Lipoprotein fluoreszenzmarkiert werden kann, muss es zunächst noch entsalzt und dadurch auf eine physiologische Salzkonzentration gebracht werden.

3.5.1 Entsalzung mittels Gelfiltration mit Sephadex PD-10 Säule

Das Entsalzen des gewonnenen Lipoproteins geschieht mit Hilfe der PD-10 Desalting Columns (GE Healthcare Europe GmbH). Das zu reinigende Material, in diesem Fall das gesammelte Lipoprotein, wird in die Säulen gefüllt. Diese enthalten Sephadex G-25 Medium, welches eine schnelle Trennung hochmolekularer Substanzen von Substanzen niedrigerer Molekülgröße ermöglicht, da es den Effekt eines Molekularsiebes ausnutzt. Größere Moleküle, wie das Lipoprotein, eluieren im Ausschlussvolumen des Materials, während kleinere Moleküle, wie Salze, in den Poren des Gelfiltrationsmaterials zurückgehalten werden, wodurch sie erst später eluieren (22).



Abbildung 21: PD-10 Desalting Columns (23)

3.5.2 Fluoreszenzmarkierung

Für die Fluoreszenzmarkierung wird das Alexa Fluor® 568 Labeling Kit (Invitrogen – Life Technologies GmbH) verwendet. Die gefärbten Lipoproteine haben ein Absorptionsmaximum bei etwa 577 nm und 603 nm. Das benutzte Kit enthält alle

Materialien, die sowohl zum Färben als auch zum Reinigen der Substanzen benötigt werden.

Der Farbstoff enthält einen Succinimidylester, der mit primären Aminen von Proteinen reagiert und somit sehr stabile Konjugate bildet.

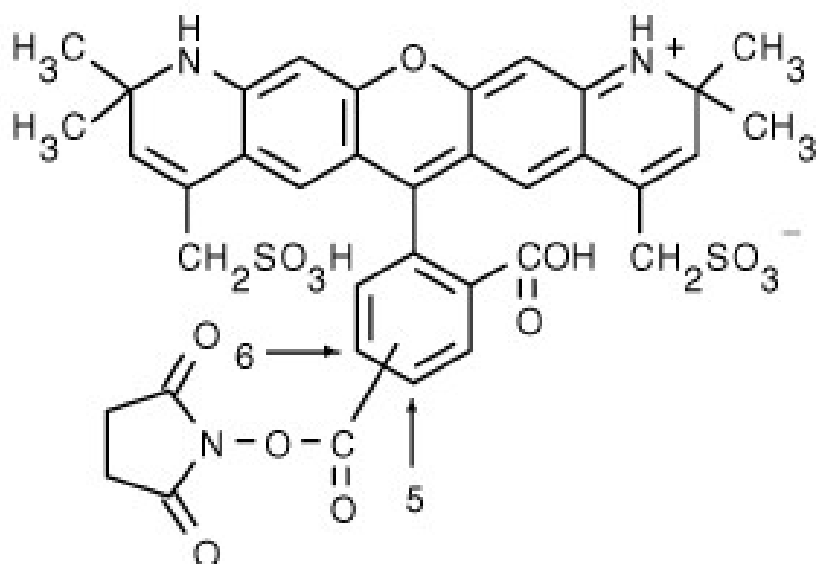


Abbildung 22: Alexa Fluor 568 Carboxylsäure-Succinimidylester (24)

Um eine optimale Färbung zu erreichen, muss das Protein gereinigt sein und in einem Puffer frei von Ammoniumionen (NH_4^+) und primären Aminen vorliegen. Zunächst wird eine 1 M Natriumbicarbonat-Lösung hergestellt. Dazu wird die im Labeling Kit enthaltene Menge an Natriumbicarbonat in 1 ml Aqua destillata (A.d.) gelöst.

Als nächstes wird das Protein auf eine Konzentration von 2 mg/ml in PBS oder 0,1 M Natriumbicarbonat eingestellt. 0,5 ml der Proteinlösung werden zur pH-Wert-Erhöhung mit 50 μl 1M Natriumbicarbonat-Lösung gemischt.

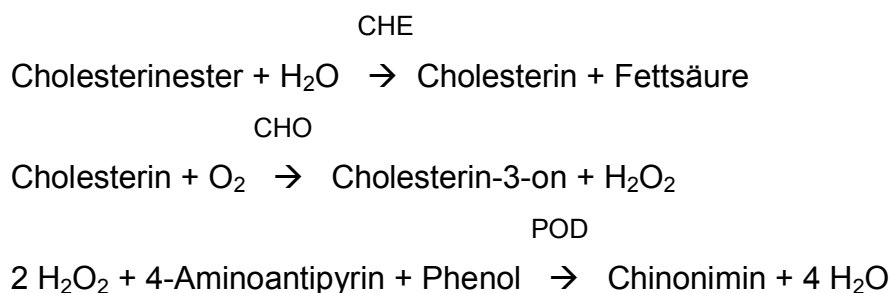
Der Farbstoff wird auf Raumtemperatur erwärmt und die Protein-Natriumbicarbonat-Lösung zu diesem hinzupipettiert und einige Male geschwenkt. In Alufolie gewickelt wird die Mischung nun eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Roller inkubiert.

In der Zwischenzeit wird eine Säule, ähnlich der die zum Entsalzen des Proteins verwendet wurde, gerichtet. Dazu wird sie senkrecht in einem Stativ befestigt, so dass die Lösung gleichmäßig hineinpipettiert werden kann. Der Vorgang dient der Entfernung überschüssigen Farbstoffs und ist somit ein erneuter Reinigungsvorgang des nun fluoreszenzmarkierten Lipoproteins. Die

Auswaschlösung (10X Elutionbuffer) wird auf Raumtemperatur erwärmt und 1:10 in A.d. verdünnt. Die Reinigungssäule wird nun mittels einer Pasteurpipette mit Reinigungsgel befüllt, welches langsam blasenfrei in die Säule hineinpipettiert wird bis es etwa 3 cm vom Beginn der Säule entfernt ist. Anschließend wird die Mischung, die das fluoreszenzmarkierte Lipoprotein enthält, hinzupipettiert. Als letztes wird langsam die Elutionslösung auf die Säule pipettiert bis das markierte Protein eluiert ist. Der Vorgang dauert etwa 30 Minuten. Zwei farbige Banden werden sichtbar, die eine enthält das markierte Protein, die andere überschüssigen Farbstoff. Die schneller wandernde Bande enthält das Protein und wird unterhalb der Säule in einem Behälter aufgefangen und gesammelt. Das gesammelte Material ist lichtempfindlich und muss, damit es die Fluoreszenz nicht verliert, lichtgeschützt aufbewahrt werden (25).

3.6 Quantitative photometrische Bestimmung von LDL

Bei der Bestimmung handelt es sich um einen enzymatisch photometrischen Test nach der „CHOD-PAP-Methode“ (CHOD = cholesterol oxidase; PAP = phenol + aminophenazone). Als erstes wird das Cholesterin hydrolysiert und oxidiert, das dabei entstehende Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reagiert unter katalytischer Wirkung von Peroxidase mit 4-Aminoantipyrin und Phenol zu rotem Chinonimin.



Bei 500 nm und einer Schichtdicke von 1 cm wird bei 20 – 25 °C innerhalb von 60 Minuten nach Färbung gegen einen Reagenzienleewert gemessen.

Berechnet wird anhand eines Standards:

$$\text{Cholesterin [mg/l]} = \Delta E_{\text{Probe}} / \Delta E_{\text{Std}} \times \text{Konz. Std. [mg/dl]}$$

Umrechnungsfaktor

Cholesterin [mg/dl] x 0,02586 = Cholesterin [mmol/l]

3.7 Ablauf des Plazentaperfusionsexperiments

Das Perfusionsexperiment teilt sich in drei Phasen, Konditionierungs-, Haupt- und Schlussphase, die insgesamt sieben Stunden Zeit in Anspruch nehmen. Zu Beginn, nachdem der geschlossene Perfusionskreislauf hergestellt wurde, startet die Konditionierungsphase. Diese dauert eine Stunde und dient der Anpassung des Gewebes an die Versuchssituation. Nach der Ischämieperiode, die sich zunächst an die Plazentageburt anschließt, muss das Gewebe wieder die Stoffwechselvorgänge aufnehmen. In dieser Zeit werden viertelstündlich Proben, jeweils ca. 1 ml aus dem venösen und 1 ml aus dem arteriellen Schenkel des Kreislaufs, entnommen und mit Hilfe eines Blutgasanalysegerätes (ABL800 BASIC - Radiometer) die Werte für pCO₂, pO₂, Laktat und pH-Wert überprüft, welche neben anderen Parametern, Kriterien für ein intaktes Gewebe während der Perfusion darstellen (Tabelle 5). Desweiteren wird darauf geachtet, dass der Perfusionsdruck stabil bleibt, anhand dessen der Gefäßtonus innerhalb der Plazenta überprüft und eine Aussage über dessen Verfassung gemacht werden kann. Steigen die Drücke zu stark an, ist das Gewebe gefährdet Schaden zu erleiden, was dazu führen würde, dass es undicht wird und das Experiment abgebrochen werden müsste. Die Konditionierungsphase wird ausschließlich mit reinem Perfusionsmedium lediglich mit Zusatz von Heparin durchgeführt.

Im Anschluss folgt die Hauptphase, die insgesamt fünf Stunden dauert. Das Perfusionsmedium wird gewechselt und frisches, mit fluoreszenzmarkiertem Lipoprotein in einer Konzentration von 25 µg/ml versetztes Medium, wird luftblasenfrei an die Pumpe angeschlossen. Der Messzylinder wird in Alufolie eingewickelt in das Wasserbad gestellt, um die Flüssigkeit vor Lichteinstrahlung zu schützen. Nach 15 Minuten werden zwei Proben, je 1 ml aus dem venösen und 1 ml aus dem arteriellen Schenkel entnommen und mit dem Blutgasanalysegerät ausgewertet. Nach weiteren 30 Minuten werden erneut zwei Proben genommen, mit denen ebenso verfahren wird. Das Blutgasanalysegerät benötigt für die Auswertung ein Mindestvolumen von ca. 35 µl, die verwendeten Kapillaren wurden mit ca. 100 µl gefüllt. Der Rest der Proben wird lichtgeschützt für die spätere Messung der Lipoproteine mittels photometrischer Bestimmung aufbewahrt. Nun

werden die Proben nur mehr einmal stündlich entnommen, ausgewertet und aufbewahrt. Anhand der Skala des Messzylinders wird die Menge des Perfusionsmediums überprüft und etwaiger Flüssigkeitsverlust gleich vermerkt. Ein Verlust von mehr als 4 ml/h bedeutet, dass das System undicht ist und der Versuch somit abgebrochen werden muss, da die Kriterien für eine erfolgreiche Perfusion nach internationalen Standards nicht gegeben sind (26).

Ist die Hauptphase des Versuchs abgeschlossen, folgt die Schlussphase in der das Gewebe zunächst gespült und vom Perfusionsmedium befreit wird. Dieser Vorgang dient der Vorbereitung für die Konservierung des Plazentagewebes.

Gespült wird der Kreislauf mit einer physiologischen Kochsalzlösung, die wiederum luftblasenfrei im Austausch gegen die Perfusionslösung der Hauptphase ausgetauscht wird. Nach Ablauf von fünf Minuten wird schließlich das Plazentakotyledon konserviert, indem das Medium erneut ausgetauscht wird. Um das Gewebe zu fixieren wird eine Formaldehydlösung verwendet, die zuletzt für etwa 20 Minuten durch den Kreislauf zirkuliert. Nach Ablauf dieser 20 Minuten wird die Pumpe gestoppt, das perfundierte Kotyledon aus der Perfusionskammer entnommen und Gewebeprobe(n) aus dem perfundierten Bereich entnommen. Insgesamt werden zwölf Gewebeprobe(n) entnommen. Die kanülierten fetalen Gefäße werden in jeweils vier Proben aufgeteilt, indem sie mit einem Skalpell in kleine Stückchen geschnitten, in Probenbehälter verpackt und zur weiteren Fixierung wiederum in Formaldehyd eingelegt werden. Außerdem werden noch vier Proben aus umliegendem perfundiertem Plazentagewebe entnommen. Dieses erkennt man daran, dass es sich im Gegensatz zum nichtperfundierten Gewebe im Verlauf des Versuchs stark aufgehellt hat, da das Perfusionsmedium das Blut aus dem Gewebe ausgewaschen hat.

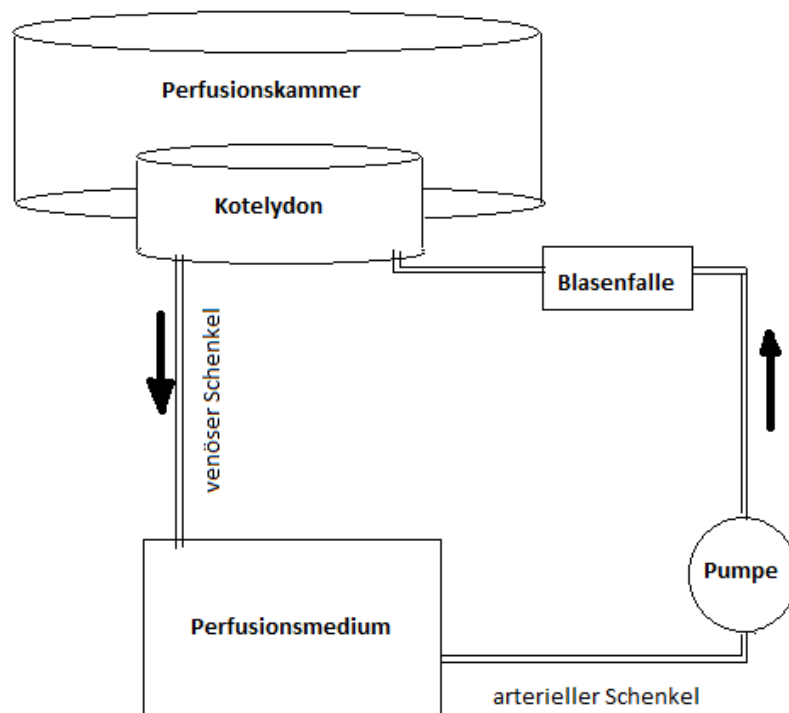


Abbildung 23: Fetal Perfuionskreislauf schematisch

Metabolische Kriterien für eine duale humane Plazentaperfusion	
Während der Perfusion	Perfusionsdruck
	Flussrate
	Volumenverlust (<4 ml/h)
	Sauerstoffverbrauch
	Nettotransfer von O ₂
Nach der Perfusion	Laktatproduktion
	Gewebeintegrität
	Morphologie des Kotyledons

Tabelle 5: Metabolische Kriterien für eine duale humane Plazentaperfusion

4 Ergebnisse

Das Perfusionsexperiment ist von Seiten seiner Umsetzung und Auswertung anspruchsvoll. Der Grund hierfür ist die hohe Störanfälligkeit der Versuche, die nur unter optimalen Voraussetzungen zum Erfolg führen. Als optimale Bedingungen gelten die Unversehrtheit des Gewebes der mütterlichen Seite der Plazenta, das Vorhandensein eines geeigneten Gefäßpaares in der Peripherie auf fetaler Seite der Plazenta aber auch die Fertigkeiten der Person, die den Versuchsaufbau präpariert. Vor den eigentlichen Versuchen mit Zusatz von LDL lag eine dreimonatige Trainingsphase, während derer einerseits das Präparieren der Plazenta trainiert wurde und andererseits die Versuche wegen eben jener genannten Schwierigkeiten abgebrochen werden mussten.

Es wurden drei vollständige Versuche durchgeführt, dessen Ergebnisse in weiterer Folge zunächst graphisch dargestellt werden und anschließend kurz beschrieben werden sollen. Der genaue Versuchsaufbau wurde bereits im Kapitel 3.7 erläutert. Wichtig zu erwähnen ist, dass bei unserem Versuchsaufbau die Begasung des Perfusionsmediums aus technischen Gründen nicht erfolgte. Die Literatur hingegen empfiehlt die Begasung des fetalen Kreislaufs mit N_2 , um den pO_2 auch während der Perfusion im physiologischen Bereich des Feten zu halten (27).

Zunächst wurde der Druck mit Hilfe eines Druckabnehmers sekundlich während des Experiments innerhalb der Plazenta gemessen und über einen Transducer an die PC-Software gesendet. Die Druckwerte wurden in mbar in eine Excel-Datei übertragen und gespeichert, woraufhin sie in einem Liniendiagramm gegen die Zeit aufgetragen werden konnten, um den Druckverlauf graphisch darzustellen. Als nächstes wurden die Ergebnisse, die während jedes Versuchs genommenen Proben, mittels Blutgasanalysegerät analysiert und ausgewertet. Hauptaugenmerk wurde auf pO_2 , pCO_2 , Laktat und pH-Wert, jeweils arteriell und venös, über die gesamte Versuchsdauer gelegt. Schließlich wurden die gewonnenen Daten einer statistischen Auswertung unterzogen.

4.1 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Um die einzelnen Versuche vergleichen zu können, wurden für jeden einzelnen Versuch Liniendiagramme erstellt. Anschließend werden die ausgewerteten Fluoreszenzdaten in einem Diagramm graphisch dargestellt. Außerdem sind die Ergebnisse jeder Perfusion in einer Tabelle zusammengefasst.

Perfusionsdruck Perfusion Nr.1

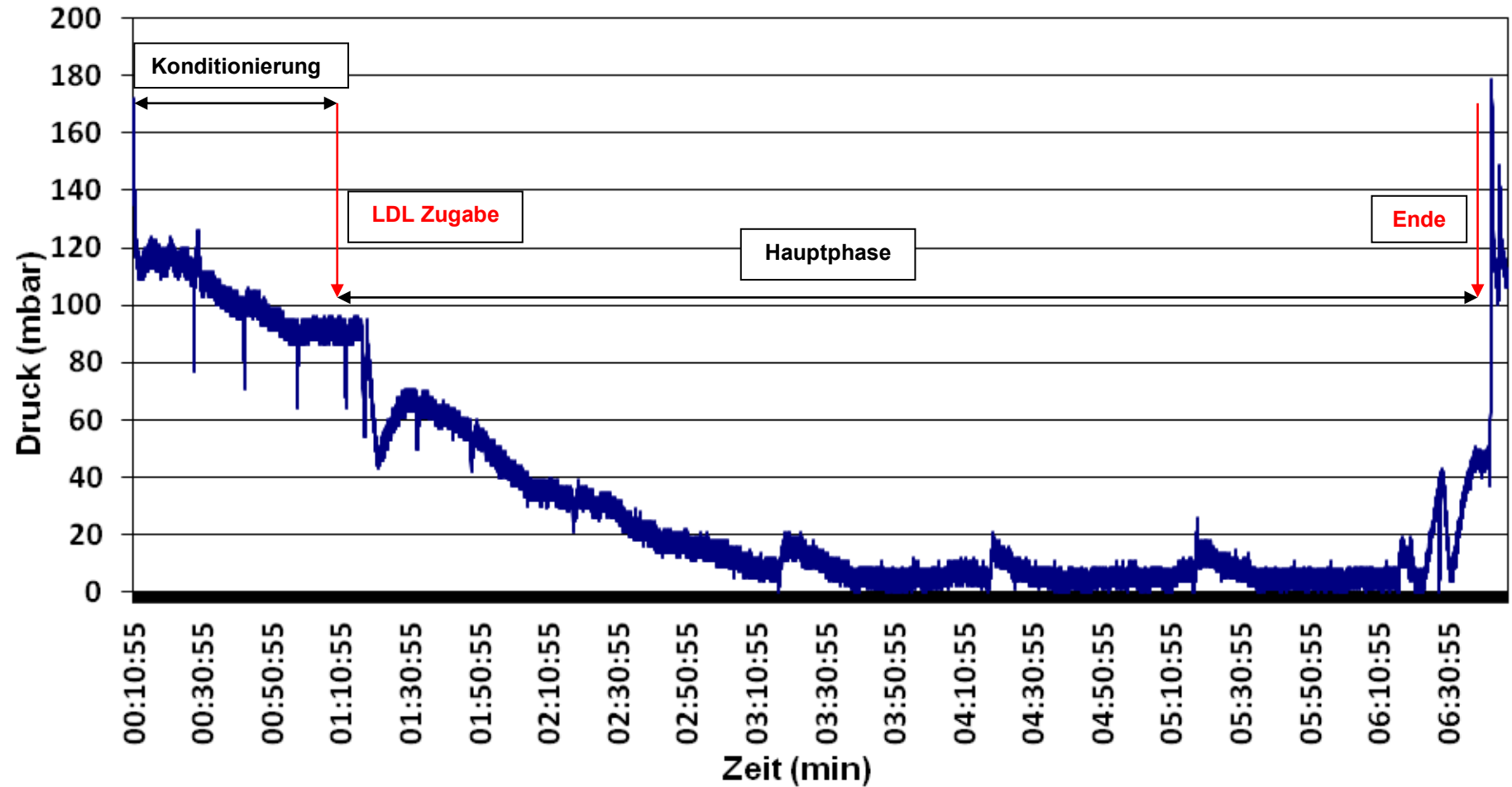


Abbildung 24: Perfusion Nr.1 - 08.02.2011

Perfusion Nr.1 08.02.2011									
	a>	v	a<	v	a<	v	a>	v	
Zeit	pO₂	pO₂	pCO₂	pCO₂	cLac	cLac	pH	pH	Perfusionsdruck
(min)	arteriell)	venös	arteriell	venös	arteriell	venös	arteriell	venös	(mbar)
Konditionierung									
0	177,00	44,30	25,00	72,60	0,10	6,20	7,45	7,01	133,00
15	66,90	83,30	25,00	33,10	2,10	3,30	7,44	7,30	117,00
30	89,80	116,00	22,70	28,10	2,90	3,60	7,47	7,34	116,00
45	81,90	72,90	22,70	29,90	3,70	4,50	7,45	7,32	100,00
60	84,20	69,90	22,40	28,20	4,30	5,10	7,45	7,33	91,00
MW	99,96±43,90	77,28±26,00	23,56±1,32	38,38±19,24	2,62±1,63	4,54±1,17	7,45±0,01	7,26±0,14	111,40±16,32
LDL-Perfusion 65									
80	114,00	90,10	19,90	27,40	2,80	3,90	7,52	7,35	72,00
95	110,00	81,60	18,80	27,60	4,10	5,10	7,51	7,32	64,00
125	94,00	77,50	19,40	27,40	6,10	7,20	7,45	7,29	39,00
185	87,90	104,00	18,90	23,00	10,30	11,00	7,35	7,24	12,00
245	75,30	62,20	18,20	23,50	14,20	15,00	7,25	7,12	5,00
305	74,30	70,80	15,40	20,30	18,00	18,00	7,16	7,03	4,00
365	72,50	62,90	14,10	18,60	21,00	21,00	6,99	6,89	4,00
MW	86,75±17,20	77,96±15,10	20,21±2,19	29,98±3,66	7,47±7,05	8,66±6,61	7,37±0,20	7,21±0,17	63,08±29,69

Tabelle 6: Ergebnisse Perfusion Nr.1 - 08.02.2011

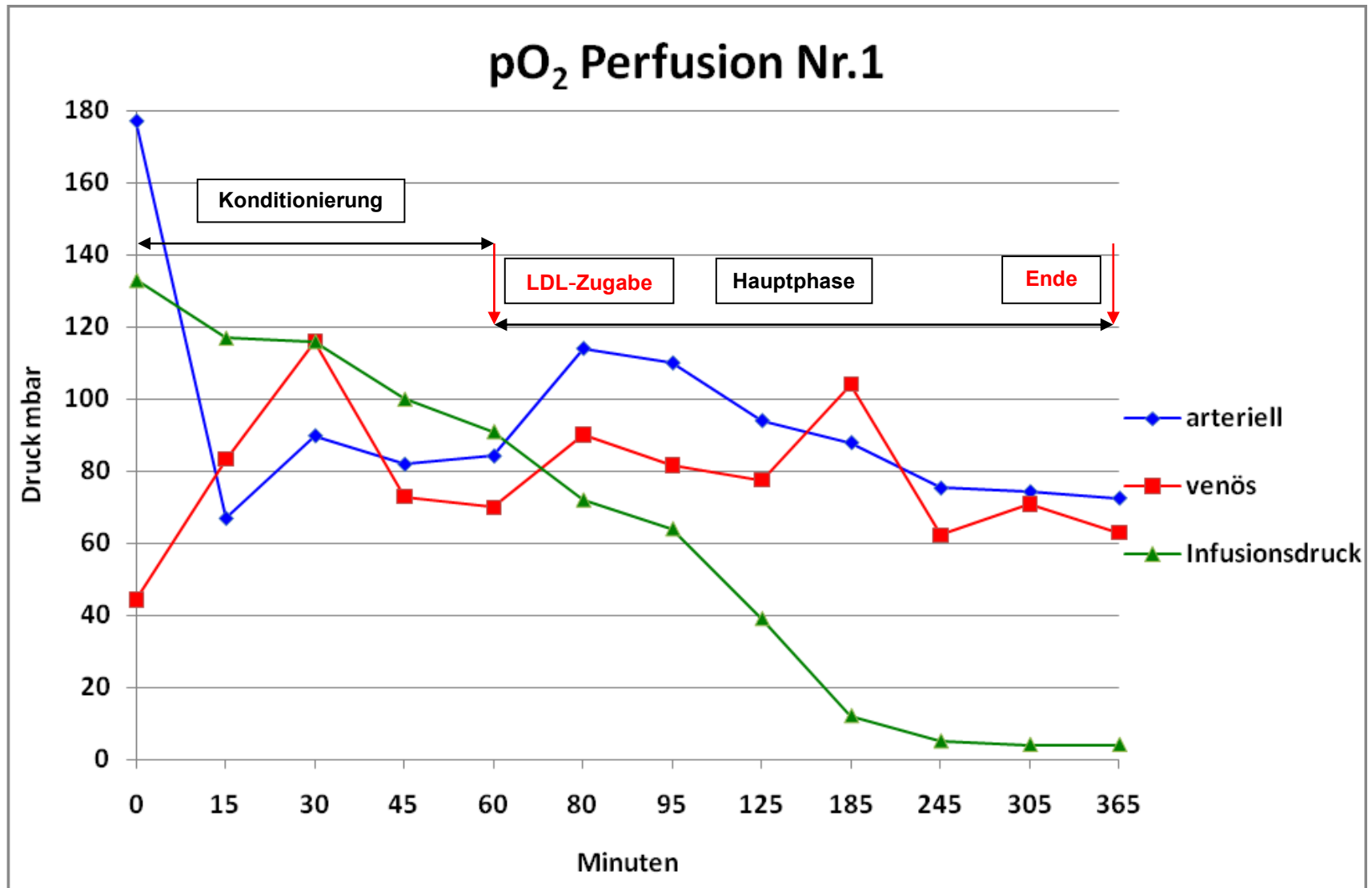


Abbildung 25: pO₂ Perfusion Nr.1 - 08.02.2011

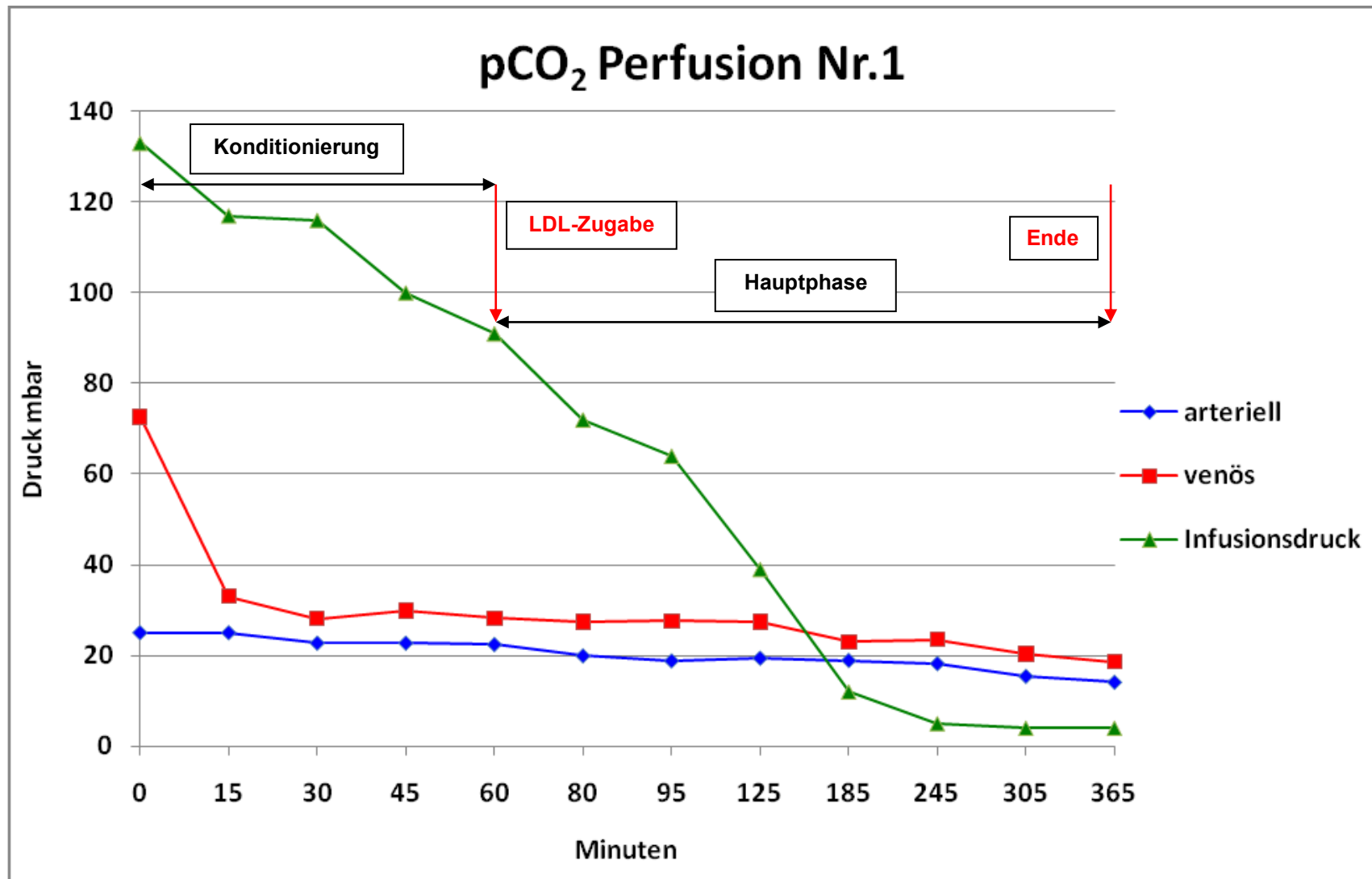


Abbildung 26: pCO₂ Perfusion Nr.1 - 08.02.2011

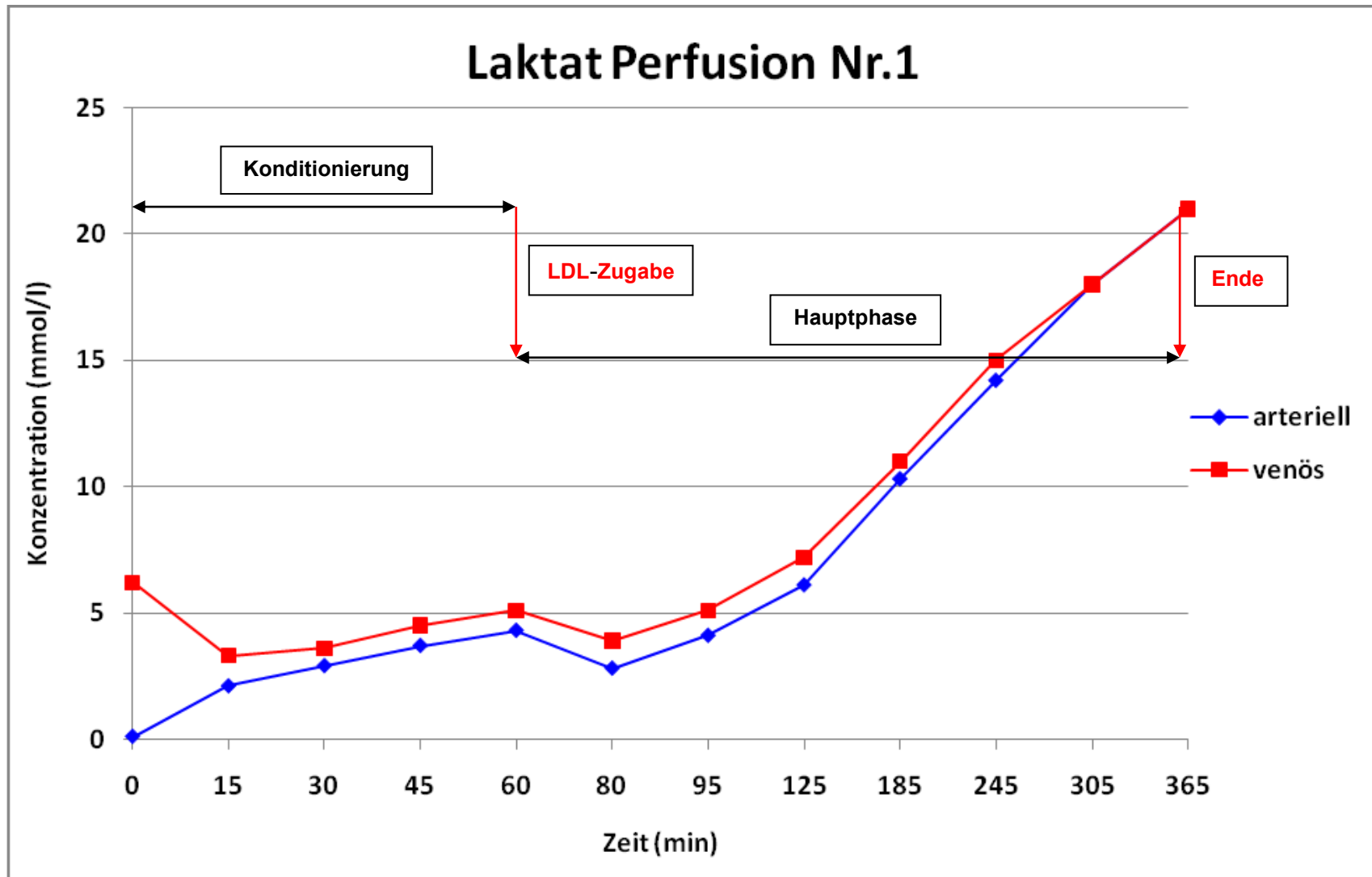


Abbildung 27: Laktat Perfusion Nr.1 - 08.02.2011

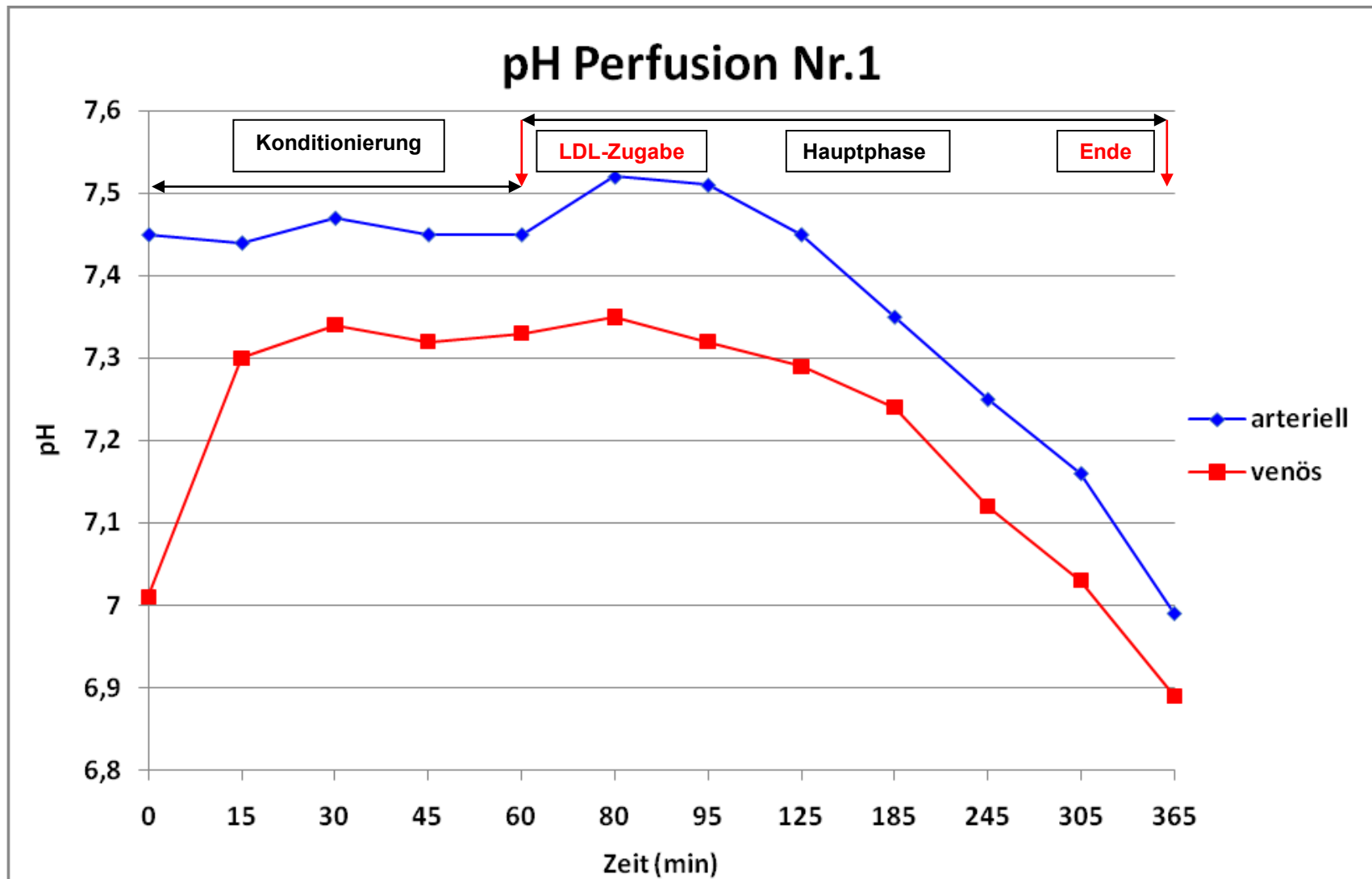


Abbildung 28: pH Perfusion Nr.1 - 08.02.2011

Fluoreszenz		
fetales LDL Alexa 568		
Zeit (min)	arteriell MW	venös MW
15	90928,52	97120,56
30	97120,56	99649,59
60	87722,39	96103,3
120	81812,47	95946,29
180	94601,07	82047,68
240	119708,16	113294,05
300	120058,84	126768,28
MW	98850,29	101561,39

Tabelle 7: Ergebnisse der Fluoreszenzanalyse Perfusion Nr.1 - fetales LDL Alexa 568-markiert

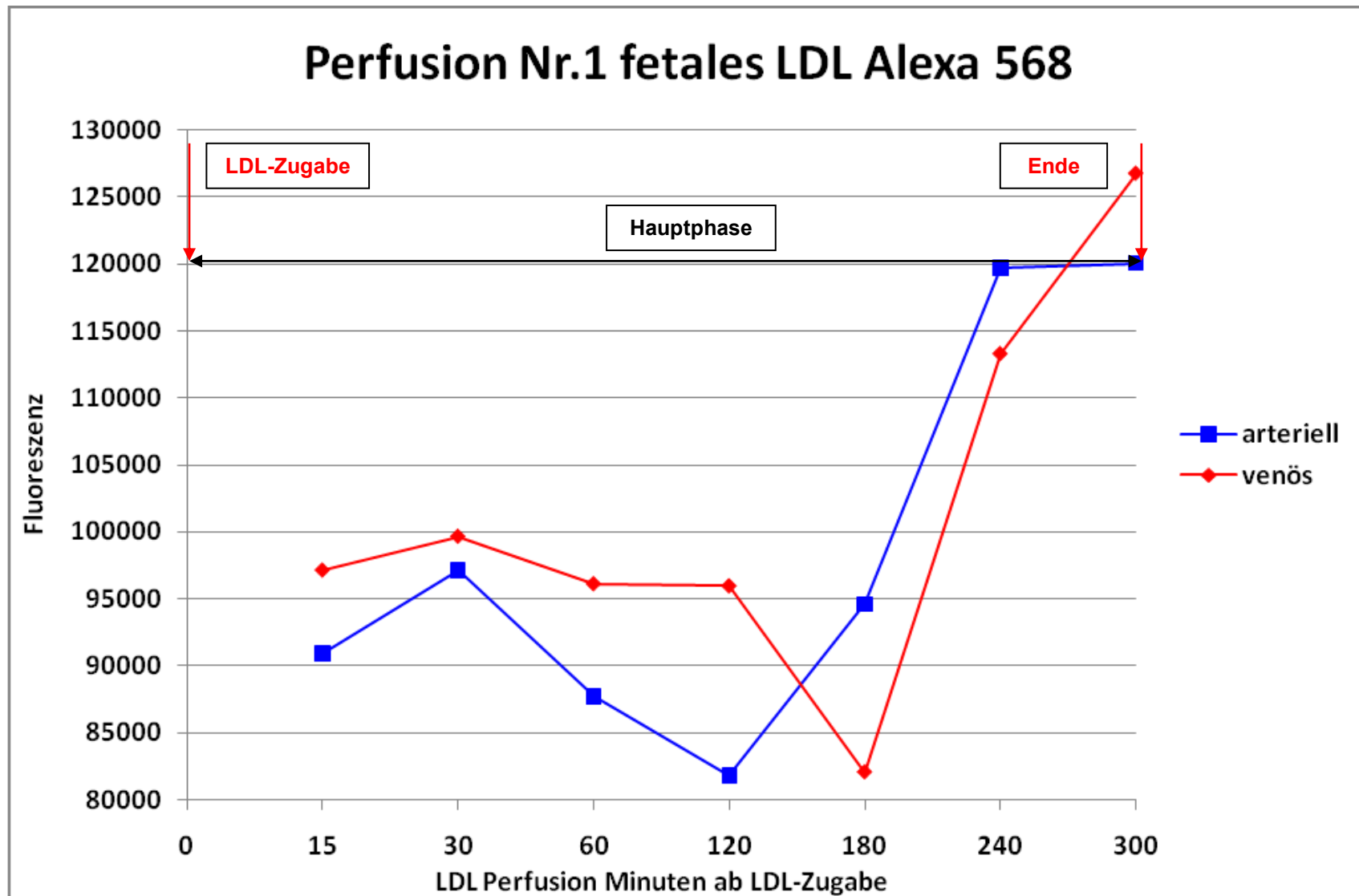


Abbildung 29: Perfusion Nr.1 - Fluoreszenz fetales LDL Alexa 568

Ergebnisse der Perfusion Nr.1 vom 08.02.2011:

Perfusionsdruck: Der Wert des Ausgangsdruckes liegt bei diesem Versuch bei 133 mbar und sinkt gleichförmig bis zur 80. Minute um fast 50% auf 72 mbar (Abbildung 24). Auffällig ist, dass der Druck anschließend ab dem Beginn der Versuchshauptphase und innerhalb deren ersten 100 Minuten rapide bis auf 12 mbar sinkt und sich schließlich ab der 245. Minute auf etwa 4 mbar einstellt. Jeweils zu den Zeitpunkten der arteriellen Probenentnahme steigt der Druck kurzzeitig stark an, um dann recht schnell wieder das vorherige Niveau zu erreichen. Der venöse Schenkel reagiert nicht mit einem Druckanstieg bei Probenentnahme.

pO₂: Die Werte müssen für arteriellen und venösen Schenkel getrennt analysiert werden. Zu Beginn des Experiments ist der pO₂ im arteriellen Schenkel sehr hoch, er liegt bei 177 mbar (Abbildung 25). Nach 15 Minuten Perfusion sinkt dieser Wert drastisch bis auf 67 mbar, um sich in weiterer Folge während der Konditionierungsphase um einen Wert von etwa 85 mbar einzustellen. Der Beginn der Hauptphase, d.h. Zugabe des Lipoproteins, ist mit einem Wechsel des Perfusionsmediums verbunden und zu Beginn dieser Phase ist innerhalb der ersten 20 Minuten ein erneuter kurzzeitiger Anstieg des arteriellen pO₂ auf 114 mbar zu beobachten. Ab der 80. Minute sinkt der pO₂ aber kontinuierlich bis er sich ab der 245. Minute auf etwa 72 mbar reguliert. Der durchschnittliche arterielle pO₂ während der Konditionierungsphase beträgt $99,96 \pm 43,90$ mbar, in der Hauptphase liegt der Durchschnittswert bei $86,75 \pm 17,20$ mbar.

Der venöse pO₂ zeigt zu Beginn des Experiments den linear entgegengesetzten Verlauf im Vergleich zum arteriellen pO₂. Das heißt zum einen ist der Ausgangswert mit 44 mbar der niedrigste während der ganzen Versuchszeit und zum anderen steigt der Wert besonders in den ersten 30 Minuten stetig und signifikant bis auf 116 mbar an, um sich dann aber bis Minute 60 auf etwa 70 mbar zu stabilisieren. Das Wechseln des Perfusionsmediums nach der ersten Stunde des Experiments bewirkt auch beim venösen pO₂ zunächst ein kurzzeitiges Ansteigen. Der Wert fällt dann aber auch in weiterer Folge recht konstant und erreicht zum Ende des Versuchs etwa 62 mbar. Der durchschnittliche venöse pO₂ während der Konditionierungsphase beträgt $77,28 \pm 26$ mbar, in der Hauptphase liegt der Durchschnittswert bei $77,96 \pm 15,10$ mbar.

Nach der ersten Stunde des Versuchs, die die Konditionierungsphase darstellt, hält sich der venöse pO_2 konstant unterhalb des arteriellen Wertes.

pCO_2 : Ebenso wie pO_2 sind arterieller und venöser Schenkel getrennt zu analysieren (Abbildung 26). Auffällig ist, dass sich die arteriellen pCO_2 -Werte über die gesamte Experimentdauer kaum ändern. Der Ausgangswert liegt bei 25 mbar und sinkt langsam aber stetig über die gesamten 365 Minuten um fast 50 % auf 14 mbar. Der durchschnittliche arterielle pCO_2 während der Konditionierungsphase beträgt $23,56 \pm 1,32$ mbar, in der Hauptphase liegt der Durchschnittswert bei $20,21 \pm 2,19$ mbar. Auf der venösen Seite ist zu erkennen, dass der Wert zu Versuchsbeginn bei ca. 73 mbar liegt und zunächst innerhalb der ersten 15 Minuten auf 33 mbar sinkt, sich dann aber im weitere Verlauf auch stetig Richtung 18 mbar, die den Enddruckwert darstellen, bewegt. Der durchschnittliche venöse pCO_2 während der Konditionierungsphase beträgt $38,38 \pm 19,24$ mbar, in der Hauptphase liegt der Durchschnittswert bei $29,98 \pm 3,66$ mbar. Es gibt innerhalb der pCO_2 Kurven keinerlei Ausreißerwerte nach oben oder unten und der venöse pCO_2 bleibt stetig etwa 30 % höher als der arterielle.

Laktat: Die Ausgangslaktatkonzentrationen liegen arteriell und venös relativ weit auseinander. Arteriell ist mit einer Konzentration von 0,1 mmol/l die Laktatkonzentration nahezu vernachlässigbar, venös hingegen liegt die Konzentration bei 6,2 mmol/l (Abbildung 27). Innerhalb der ersten Viertelstunde nähern sich die Werte deutlich an, so dass bei Minute 15 arteriell eine Konzentration von 2,1 mmol/l und venös 3,3 mmol/l gemessen wird. Bis zur 60. Minute steigen die Werte sowohl arteriell als auch venös gleichmäßig an und liegen schließlich arteriell bei 4,3 mmol/l und venös 5,1 mmol/l. Nach erfolgtem Wechsel des Perfusionsmediums sinken die Werte beider Schenkel wieder gleichförmig ab, um ab der 80. Minute erneut gleichförmig und konstant anzusteigen. Mit Abschluss des Experiments in der 365. Minute liegen die Konzentrationen sowohl arteriell als auch venös bei 21 mmol/l.

pH-Wert: Die Entwicklung des pH-Werts über die Zeit des Experiments ist gleichförmig, die Ausgangswerte unterscheiden sich dahingehend, dass der arterielle bei 7,45 und der venöse bei 7,01 liegt (Abbildung 28). In den ersten 15 Minuten nähern sich die Werte einander an, so dass nach dieser Zeit der venöse auf 7,30 gestiegen ist und der arterielle mit 7,44 annähernd gleich geblieben ist. Innerhalb der nächsten 45 Minuten ändern die Werte sich nur unwesentlich. Ab

der 60. Minute, und dem zu diesem Zeitpunkt erfolgten Wechsel des Perfusionsmediums, gibt es allerdings sowohl arteriell als auch venös einen Anstieg des pH-Werts, wobei der arterielle stärker steigt und in der 80. Minute seinen höchsten Wert mit 7,52 erreicht. Ab diesem Zeitpunkt sinken die Werte arteriell und venös langsam aber stetig und erreiche mit Ende des Experiments ihre tiefsten Werte. Arteriell liegt der pH-Wert zum Versuchsende bei 6,99, venös bei 6,89.

Fluoreszenz: Die LDL-Zugabe erfolgt im Versuch bei Minute 60 und stellt den Wechsel von der Konditionierungsphase auf die Hauptphase dar (Abbildung 29). Der Nullpunkt in der Graphik entspricht der LDL-Zugabe und somit der 60. Minute. Die Proben wurden ohne EDTA-Zugabe und ohne Zentrifugation analysiert. Nach 15 Minuten LDL-Perfusion wurden arteriell und venös die ersten Proben entnommen, die Fluoreszenz beträgt zu diesem Zeitpunkt arteriell 90.928,5 und venös 97.120,5. In den folgenden 15 Minuten steigen beide Werte zunächst an, um dann in weiterer Folge stark abzufallen. In der 120. Minute erreicht der arterielle Wert mit 81.812,5 und in der 180. Minute der venöse mit 82.047,7 seinen niedrigsten Punkt. Innerhalb der nächsten 120 Minuten steigen die Werte arteriell und venös wieder stark an. Arteriell pendelt sich der Wert bei 120.000 ein, venös erreicht er bei 300 Minuten seinen höchsten Punkt mit 126.768,3. Auffällig ist, dass sich die Fluoreszenz beider Schenkel gleichförmig bewegt.

Perfusionsdruck Perfusion Nr.2

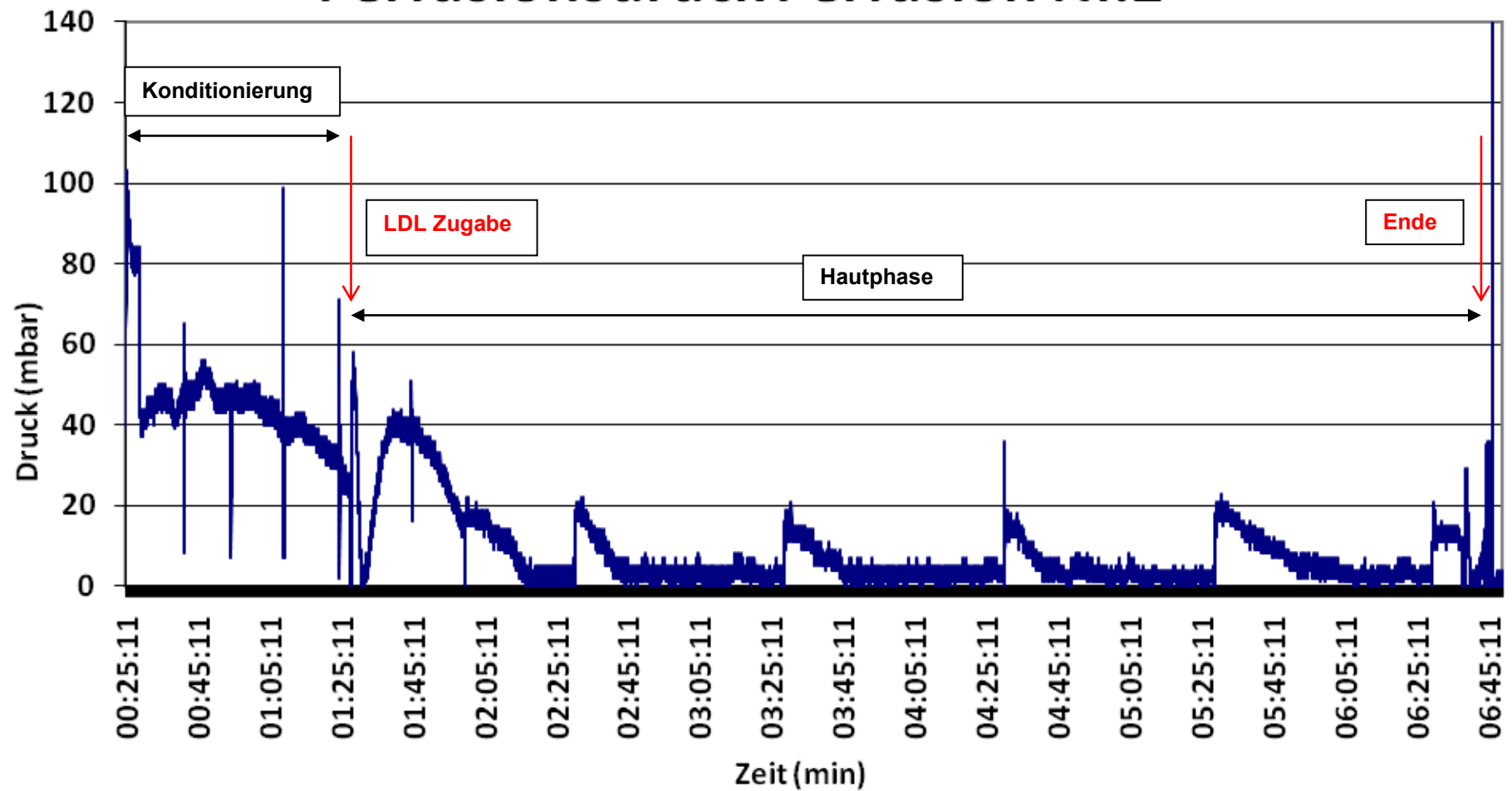


Abbildung 30: Perfusion Nr.2 - 09.02.2011

Perfusion Nr.2 09.02.2011									
	a>	v	a<	v	a<	v	a>	v	
Zeit	pO₂	pO₂	pCO₂	pCO₂	cLac	cLac	pH	pH	Perfusionsdruck
(min)	arteriell	venös	arteriell	venös	arteriell	venös	arteriell	venös	(mbar)
(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmol/l)	(mmol/l)			
Konditionierung									
0	171,00	29,20	20,90	90,70	0,10	6,90	7,53	6,85	80,00
15	115,00	59,60	31,20	42,70	3,90	5,10	7,30	7,15	98,00
30	75,10	36,90	40,30	50,50	5,30	6,30	7,17	7,067	42,00
45	65,30	36,10	38,60	46,00	6,20	6,80	7,13	7,06	44,00
60	100,00	39,10	34,90	44,30	7,40	7,70	7,15	7,05	47,00
MW	105,28±41,70	40,18±11,50	33,18±7,71	54,84±20,26	4,58±2,81	6,56±0,96	7,25±0,16	7,04±0,11	62,2±25,34
LDL-Perfusion 65									
80	126,00	100,00	39,60	45,00	3,10	3,60	7,24	7,21	36,00
95	108,00	61,90	41,80	51,20	3,60	4,20	7,23	7,16	21,00
125	88,50	63,20	45,20	50,30	4,70	4,80	7,19	7,15	16,00
185	109,00	52,90	39,50	46,10	6,10	6,50	7,22	7,15	4,00
245	92,60	52,40	42,20	48,30	7,30	7,50	7,16	7,11	4,00
305	92,70	57,90	44,20	51,10	8,60	8,60	7,13	7,07	4,00
365	96,00	71,20	45,40	50,30	9,80	10,00	7,08	7,04	2,00
MW	103,27±13,25	55,03±16,48	38,65±2,47	51,38±2,50	5,50±2,50	6,50±2,39	7,21±0,06	7,09±0,06	33,17±12,67

Tabelle 8: Ergebnisse Perfusion Nr.2 - 09.02.2011

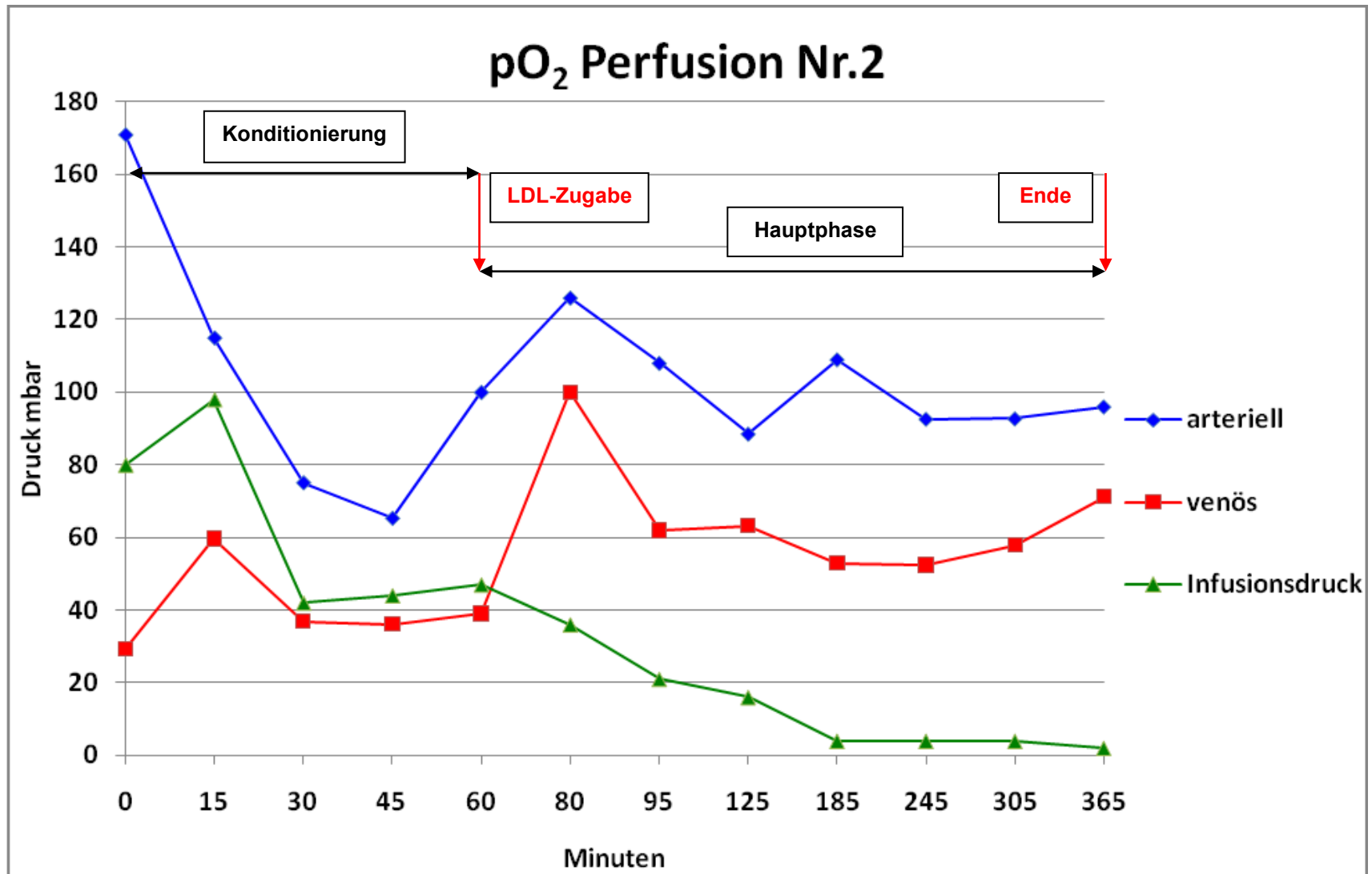


Abbildung 31: pO₂ Perfusion Nr.2 – 09.02.2011

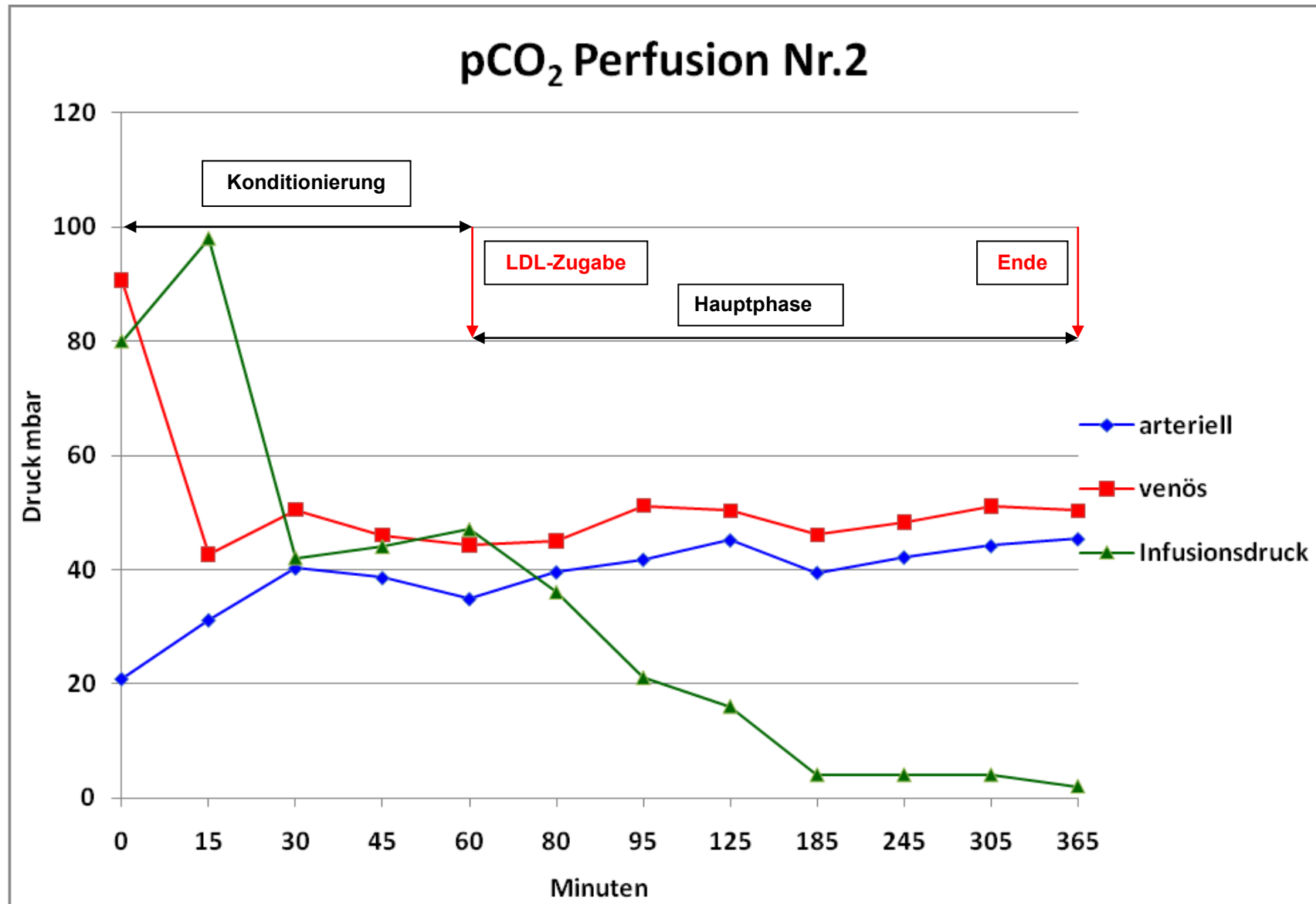


Abbildung 32: pCO₂ Perfusion Nr.2 – 09.03.2011

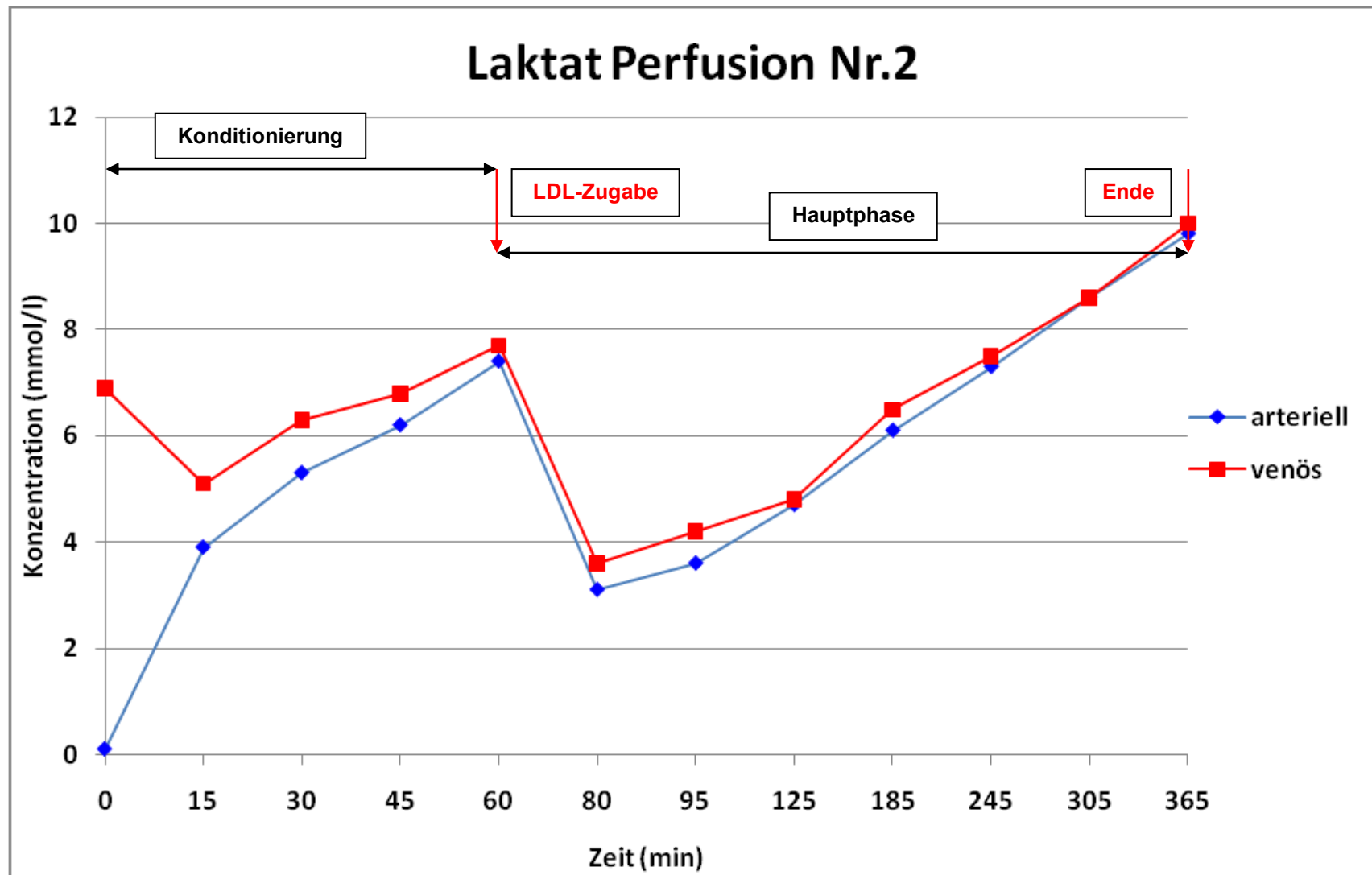


Abbildung 33: Laktat Perfusion Nr.2 - 09.02.2011

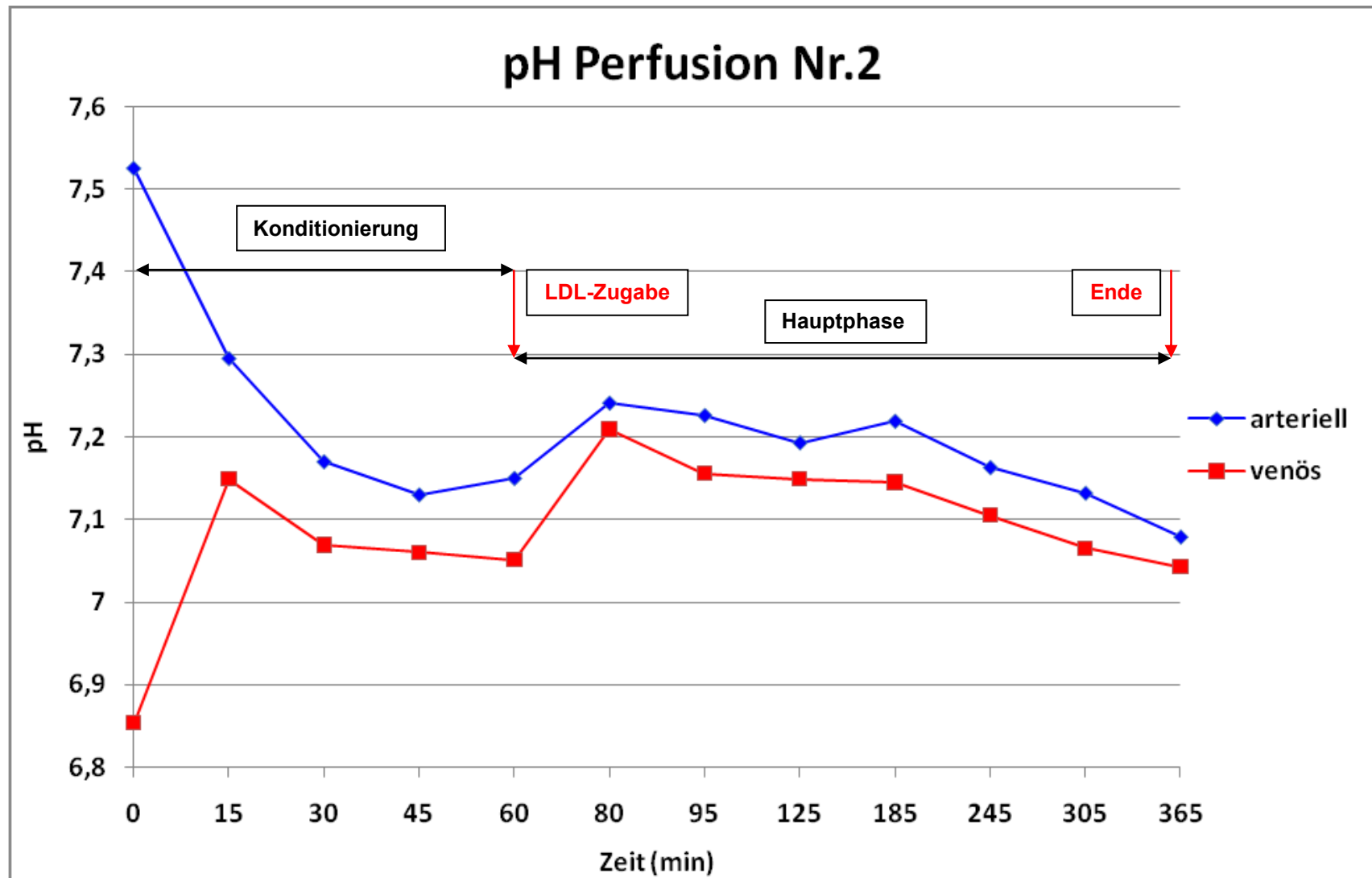


Abbildung 34: pH Perfusion Nr.2 – 09.02.2011

Fluoreszenz		
fetales LDL Alexa 568		
Zeit (min)	arteriell MW	venös MW
15	165024,24	160692,49
30	159912,56	158652,36
60	160804,95	154593,38
120	230049,57	179047,72
180	156701,73	285503
240	271087,88	166658,03
300	284993,13	227556,34
MW	204082,01	190386,19

Tabelle 9: Ergebnisse der Fluoreszenzanalyse - fetales LDL Alexa 568-markiert

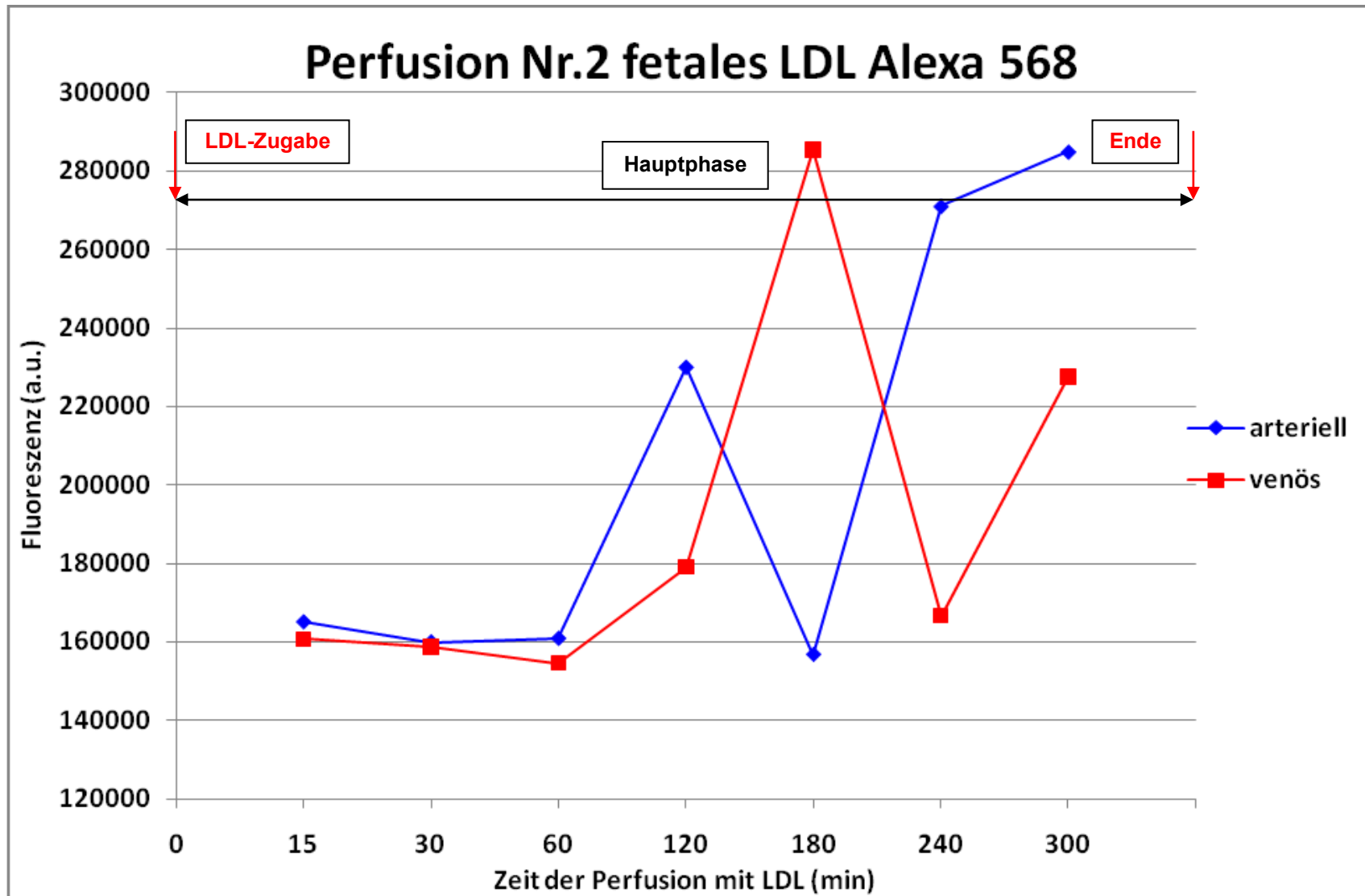


Abbildung 35: Perfusion Nr.2 – Fluoreszenz fetales LDL Alexa 568

Ergebnisse der Perfusion Nr.2 vom 09.02.2011:

Perfusionsdruck: Der Perfusionsdruck zeigt einen ähnlichen Verlauf wie im ersten Versuch (Abbildungen 24 und 30). Der Wert des Ausgangsdruckes ist etwas geringer und liegt bei 80 mbar. Zunächst steigt er zu Beginn der Konditionierungsphase auf 98 mbar, um dann bis zur 80. Minute um mehr als 50% auf 36 mbar zu sinken. Auch im zweiten Versuch sinkt der Druck in der Hauptphase, die mit dem Wechsel des Perfusionsmediums in der 60. Minute beginnt, kontinuierlich auf 4 mbar. Kurzzeitige Druckschwankungen zeigen sich erneut bei der arteriellen Probenentnahme. Die Probenentnahme aus dem venösen Schenkel hat keinen Effekt auf den Druck.

pO₂: Die pO₂ Kurven, sowohl arteriell als auch venös, zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die entsprechenden Kurven aus dem Versuch Nr.1 (Abbildungen 25 und 31). Arteriell liegt zunächst ein sehr hoher Ausgangswert von 171 mbar vor und sinkt innerhalb der ersten Stunde auf 65,3 mbar. Nach Mediumwechsel in der 60. Minute steigt der Wert bis auf 126 mbar an, um dann schließlich konstant abzufallen (Abbildung 32). Zum Ende des Versuchs beträgt der pO₂ arteriell 96 mbar. Venös liegt der Ausgangswert wesentlich tiefer bei 29,2 mbar. Innerhalb der ersten 15 Minuten erfolgt ein kurzzeitiger Anstieg, der Wert fällt bald aber wieder von zunächst 60 mbar auf etwa 37 mbar ab und stellt sich um diesen Wert herum ein. Nach der 60. Minute, und zu diesem Zeitpunkt erfolgtem Perfusionsmediumwechsel, kommt es zu einem erneuten signifikanten Anstieg bis der Sauerstoffpartialdruck bei 80 Minuten 100 mbar erreicht (Abbildung 31). Innerhalb der folgenden Viertelstunde sinkt der Wert erneut auf etwa 60 mbar um etwa dieses Niveau bis zum Versuchsende beizubehalten. Bei sehr weit auseinanderliegenden Ausgangswerten und zunächst entgegengesetzter Bewegung der Kurven, entwickeln sich die arterielle und die venöse Kurve jedoch ähnlich, wobei die venösen pO₂-Werte stets unterhalb der arteriellen bleiben.

pCO₂: Auch die Entwicklung der pCO₂-Werte, sowohl arteriell als auch venös, sind mit dem ersten Versuch vergleichbar. Sie zeigen einen gegenläufigen Verlauf zur pO₂-Kurve. Die Ausgangswerte liegen arteriell bei 21 mbar und venös bei 90 mbar. Sie nähern sich innerhalb der ersten 15 Minuten einander schnell an und pendeln sich arteriell bei einem Wert um 40 mbar und venös bei 50 mbar ein. Sie bewegen sich in etwa gleichförmig über die Versuchsdauer, wobei der venöse stets über dem arteriellen liegt (Abbildung 33).

Laktat: Der arterielle Ausgangswert ist auch im zweiten Versuch mit 0,1 mmol/l vernachlässigbar gering. Er steigt innerhalb der ersten 15 Minuten auf 3,9 mmol/l an und in den weiteren 45 Minuten auf 7,6 mmol/l. In der 60. Minute, verbunden mit dem Beginn der Hauptphase des Experiments, macht die Kurve einen rapiden Knick nach unten und der Wert sinkt bis zur 80. Minute erneut auf 3,1 mmol/l. Anschließend steigt die Kurve fast linear an, um zu Versuchsende bei 9,8 mmol/l zu liegen (Abbildung 34). Der venöse Ausgangswert liegt bei 6,9 mmol/l und sinkt erst einmal innerhalb der ersten 15 Minuten auf 5,1 mmol/l ab. Anschließend steigt auch der venöse Wert bis Minute 60 bis auf 7,7 mmol/l, um dann ebenso wie der arterielle Wert rapide bis auf 3,6 mmol/l zu sinken. Die weitere Entwicklung ist analog zum arteriellen Wert eine steigende fast lineare Kurve, die zu Versuchsende 10 mmol/l erreicht.

pH-Wert: Der arterielle pH-Wert zu Beginn des Experiments liegt bei 7,52, venös bei 6,85. Arteriell sinkt die Kurve innerhalb der ersten Stunde stetig bis auf 7,15 anschließend steigt der pH-Wert aufgrund des Wechsels des Perfusionsmediums bis Minute 80 ein wenig an, bis auf 7,24 um dann langsam aber stetig abzufallen. Der Wert zum Ende der Versuchsdauer liegt bei 7,08. Die venöse pH-Kurve verhält sich zunächst entgegengesetzt. Sie steigt innerhalb der ersten 15 Minuten rasch an auf 7,15, fällt jedoch in den folgenden 45 Minuten wieder auf 7,05 ab. Nach kurzem Anstieg bis zur 80. Minute auf 7,21, der erneut auf dem Wechsel des Perfusionsmediums beruht, fällt auch die venöse Kurve langsam ab, um zum Schluss bei 7,04 zu landen (Abbildung 35).

Fluoreszenz: Die aus dem Perfusionsmedium entnommenen Proben für die Fluoreszenzanalyse wurden bei diesem Versuch zentrifugiert und haben einen Zusatz von EDTA erhalten. Die erste Probenentnahme nach 15 Minuten Perfusion mit markiertem LDL ergibt arteriell einen Wert von 165.024,24 a.u. und venös von 160.692,49 a.u. Der arterielle Wert bleibt bis Minute 60 in etwa konstant, steigt aber innerhalb der folgenden Stunde rapide bis auf 230.049,57 a.u., sinkt dann in der folgenden Stunde ebenso rapide wieder auf etwa den vorherigen Wert um schließlich in der nächsten Stunde wieder stark anzusteigen bis auf 271.087,81 a.u. Der letzte gemessene Wert liegt zu Versuchsende bei 284.993,12 a.u. Der venöse Wert sinkt innerhalb 45 Minuten nach der ersten Probenentnahme leicht ab. In den folgenden zwei Stunden steigt er hingegen sehr stark bis auf 285.502,99 a.u. an, um dann ebenso stark wieder abzusinken. In der 240. Minute

liegt er bereits wieder bei 166.658,3 a.u. In der letzten Stunde des Versuchs steigt er noch einmal und erreicht bei 227.556,34 a.u. seinen Endwert (Abbildung 36).

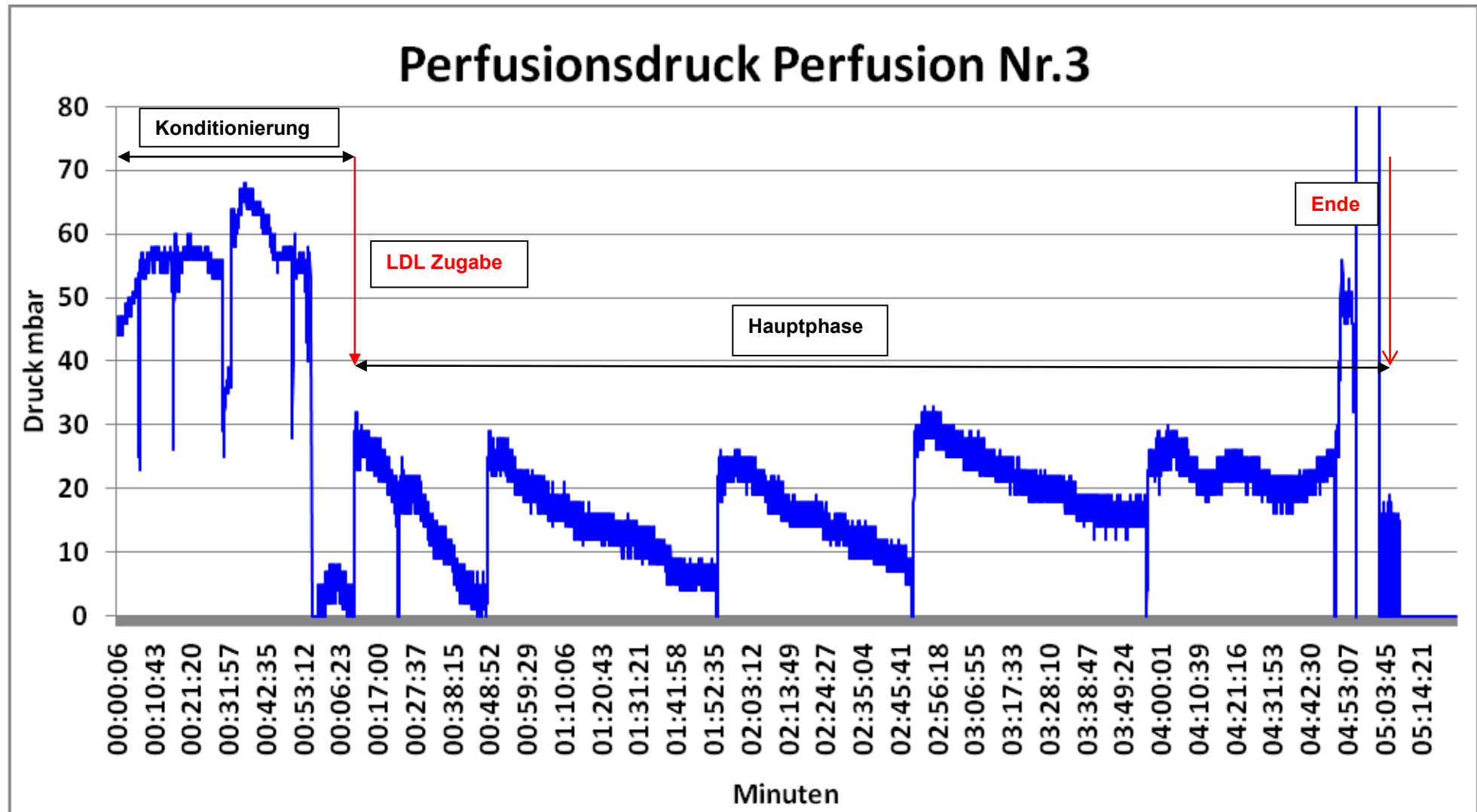


Abbildung 36: Perfusion Nr.3 – 14.03.2011

Perfusion Nr.3 14.03.2011									
	a>	v	a<	v	a<	v	a≈	v	
Zeit	pO₂	pO₂	pCO₂	pCO₂	cLac	cLac	pH	pH	Perfusionsdruck
(min)	arteriell	venös	arteriell	venös	arteriell	venös	arteriell	venös	mbar
(mmHg)	mmHg	mmHg	mmHg	mmHg	mmol/l	mmol/l			
Start Konditionierung									
0	173,00	124,00	62,80	51,60	0,60	2,40	7,22	7,27	44,00
15	119,00	75,20	53,20	63,70	2,90	3,20	7,25	7,17	56,00
30	114,00	81,10	52,70	50,50	3,70	3,70	7,24	7,17	56,00
45	105,00	63,80	55,20	66,70	4,60	5,20	7,20	7,10	56,00
60	197,00	147,00	47,10	48,60	0,60	2,60	7,31	7,28	47,00
MW	141,60±40,83	98,22±35,54	54,20±5,67	56,22±8,34	2,48±1,82	3,42±1,12	7,24±0,04	7,20±0,08	51,80±5,85
LDL-Perfusion 65									
80	109,00	89,20	50,30	56,50	4,40	4,10	7,24	7,19	36,00
95	88,60	74,60	56,70	60,30	5,70	5,10	7,12	7,15	21,00
125	89,10	59,30	64,30	61,70	8,50	7,50	7,02	7,07	16,00
185	103,00	66,20	68,20	68,40	9,60	8,70	6,95	6,99	4,00
245	87,30	62,40	69,90	71,40	10,40	10,20	6,89	6,91	4,00
305	76,10	63,30	70,60	73,80	10,20	10,40	6,87	6,86	4,00
MW	114,65±11,87	82,37±11,11	59,18±8,18	61,20±6,85	5,56±2,51	5,74±2,62	7,12±0,14	7,12±0,13	31,27±12,94

Tabelle 10: Ergebnisse Perfusion Nr.3 - 14.03.2011

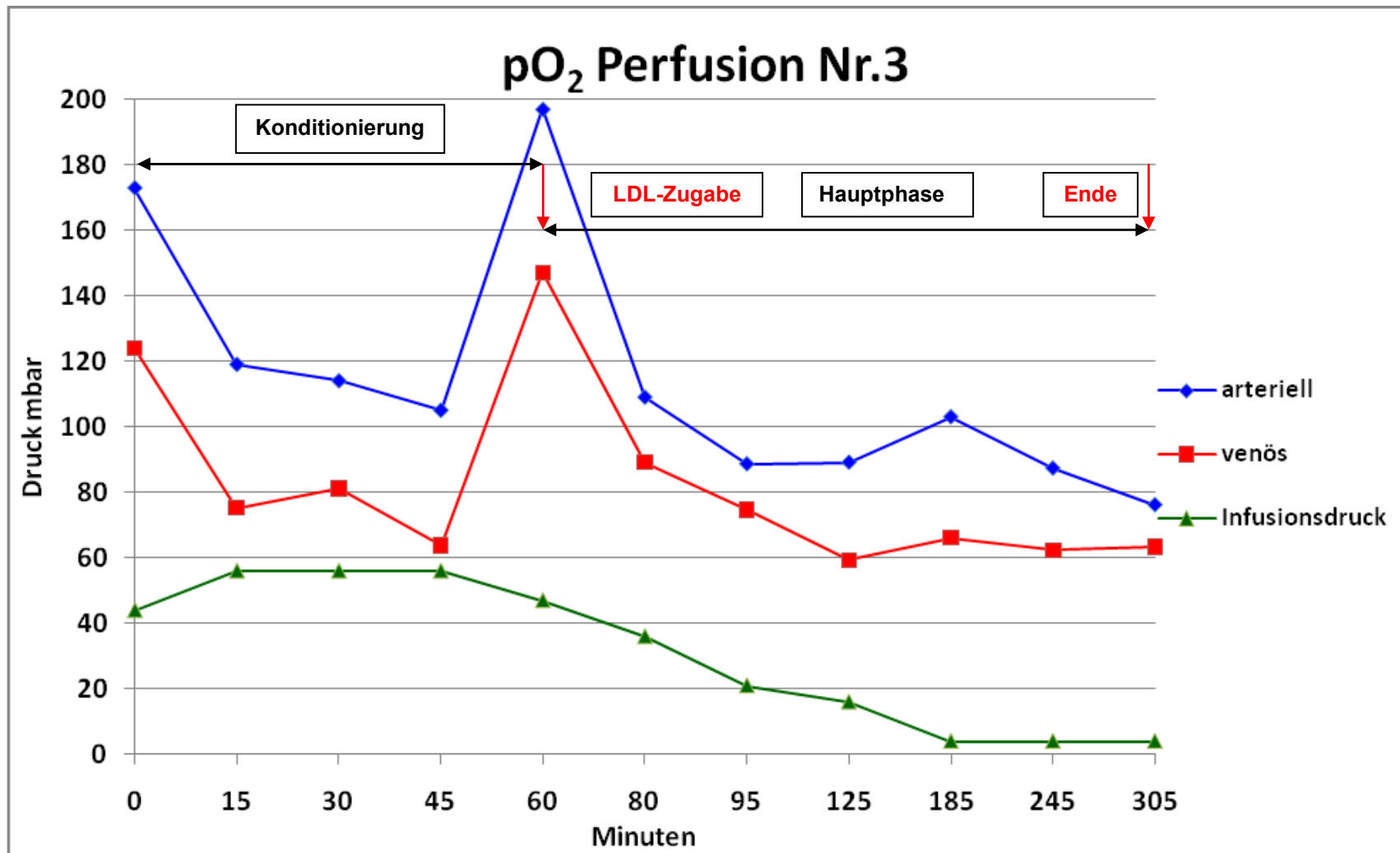


Abbildung 37: pO₂ Perfusion Nr.3 – 14.03.2011

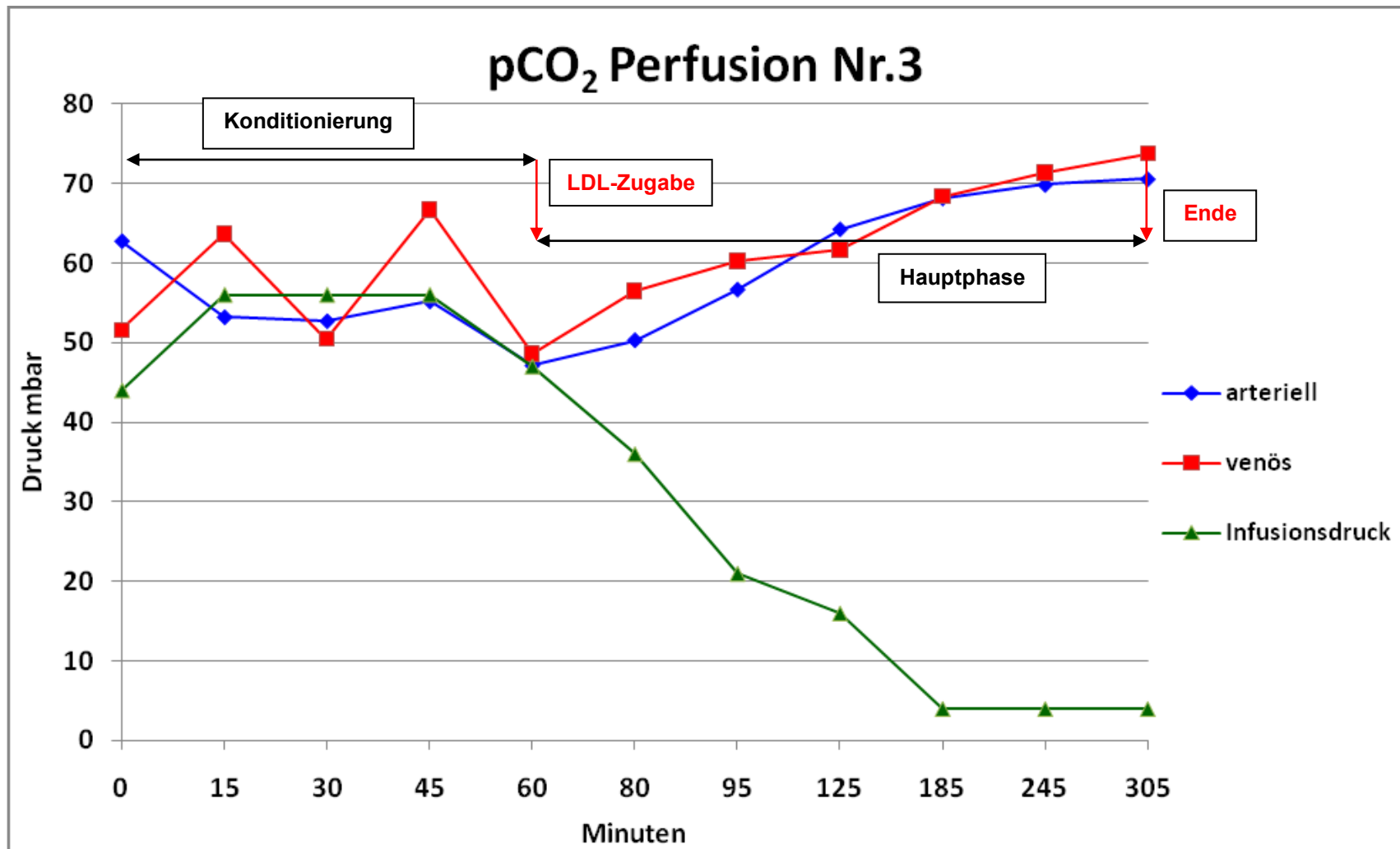


Abbildung 38: pCO₂ Perfusion Nr.3 – 14.03.2011

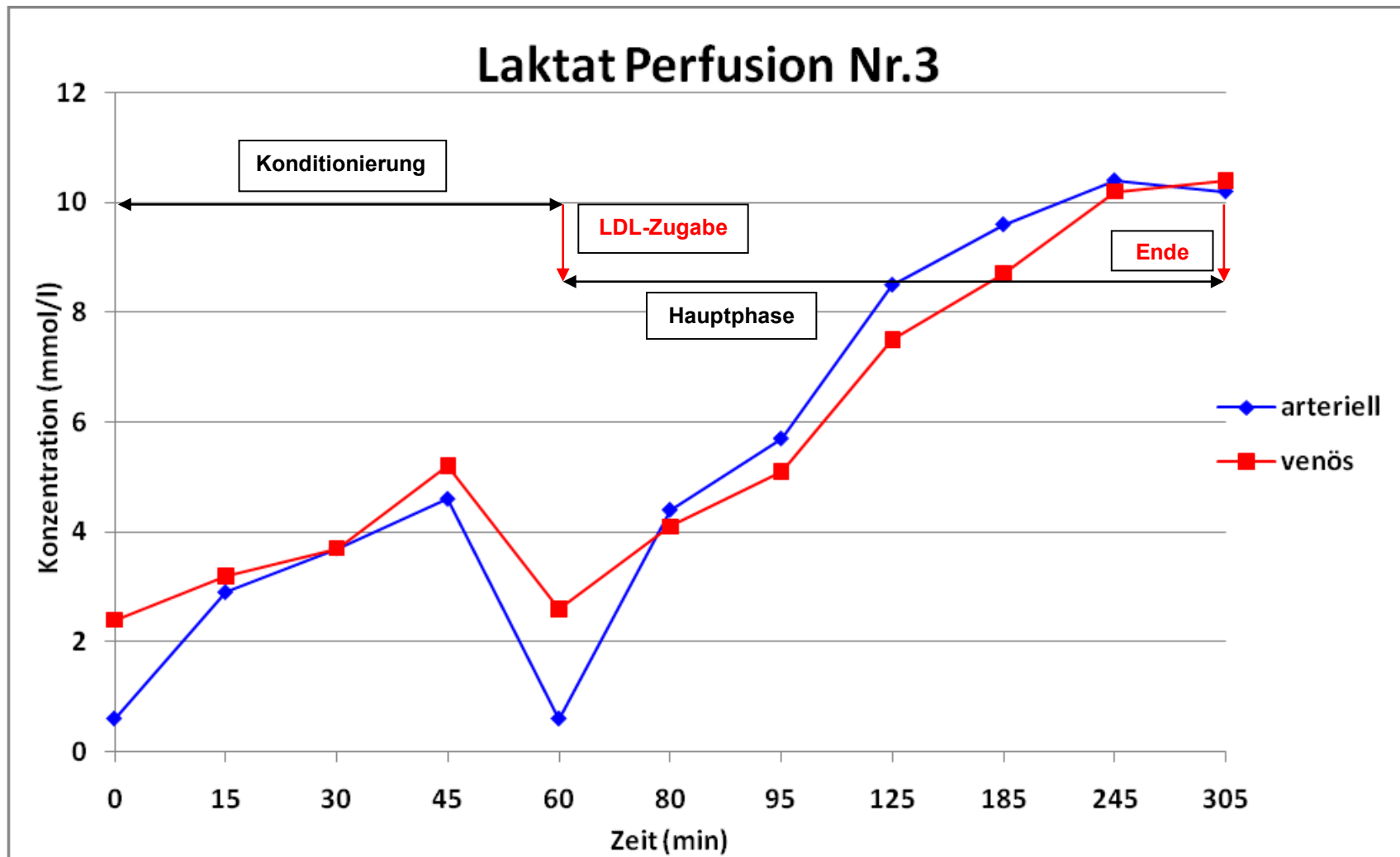


Abbildung 39: Laktat Perfusion Nr.3 - 14.03.2011

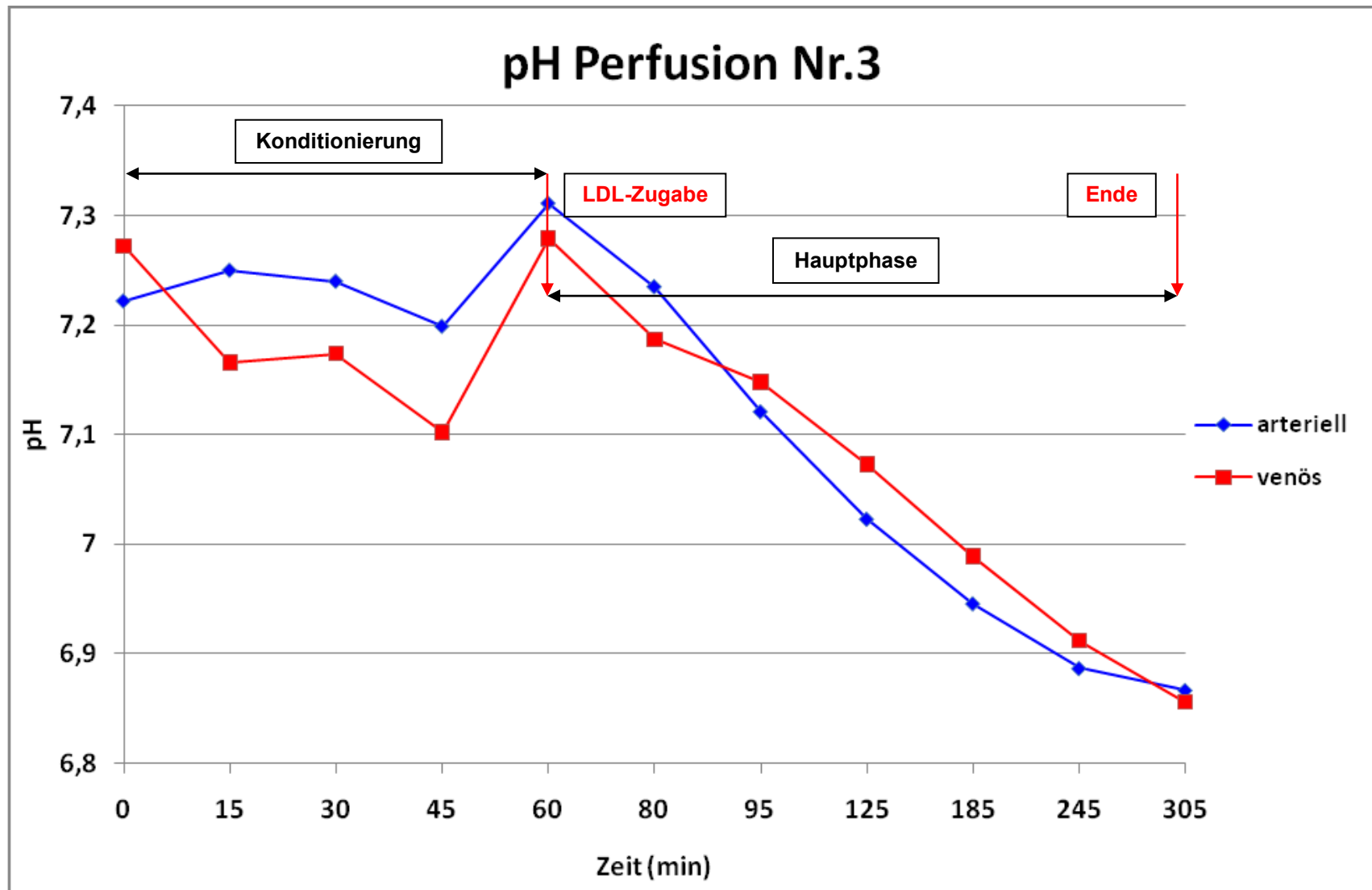


Abbildung 40: pH Perfusion Nr.3 – 14.03.2011

Fluoreszenz		
fetales LDL Alexa 568		
Zeit (min)	arteriell MW	venös MW
15	88289,77	91584,91
30	89454,16	91393,3
60	61751,93	86422,13
120	85729,22	88588,67
180	88832,33	87507,06
240	95689,55	86707,99
300	85811,69	79371,39
MW	85079,81	87367,92

Tabelle 11: Ergebnisse der Fluoreszenzanalyse - fetales LDL Alexa 568-markiert

Fluoreszenz		
adultes LDL		
Alexa 647		
Zeit (min)	arteriell	venös
	MW	MW
15	37975,89	39489,58
30	38545,27	39260,13
60	280534,25	35551,25
120	58341,85	36546,64
180	36221,93	36045,12
240	38202,32	34328,9
300	34546,23	45944,48
MW	74909,68	38166,59

Tabelle 12: Ergebnisse der Fluoreszenzanalyse – adultes LDL Alexa 647-markiert

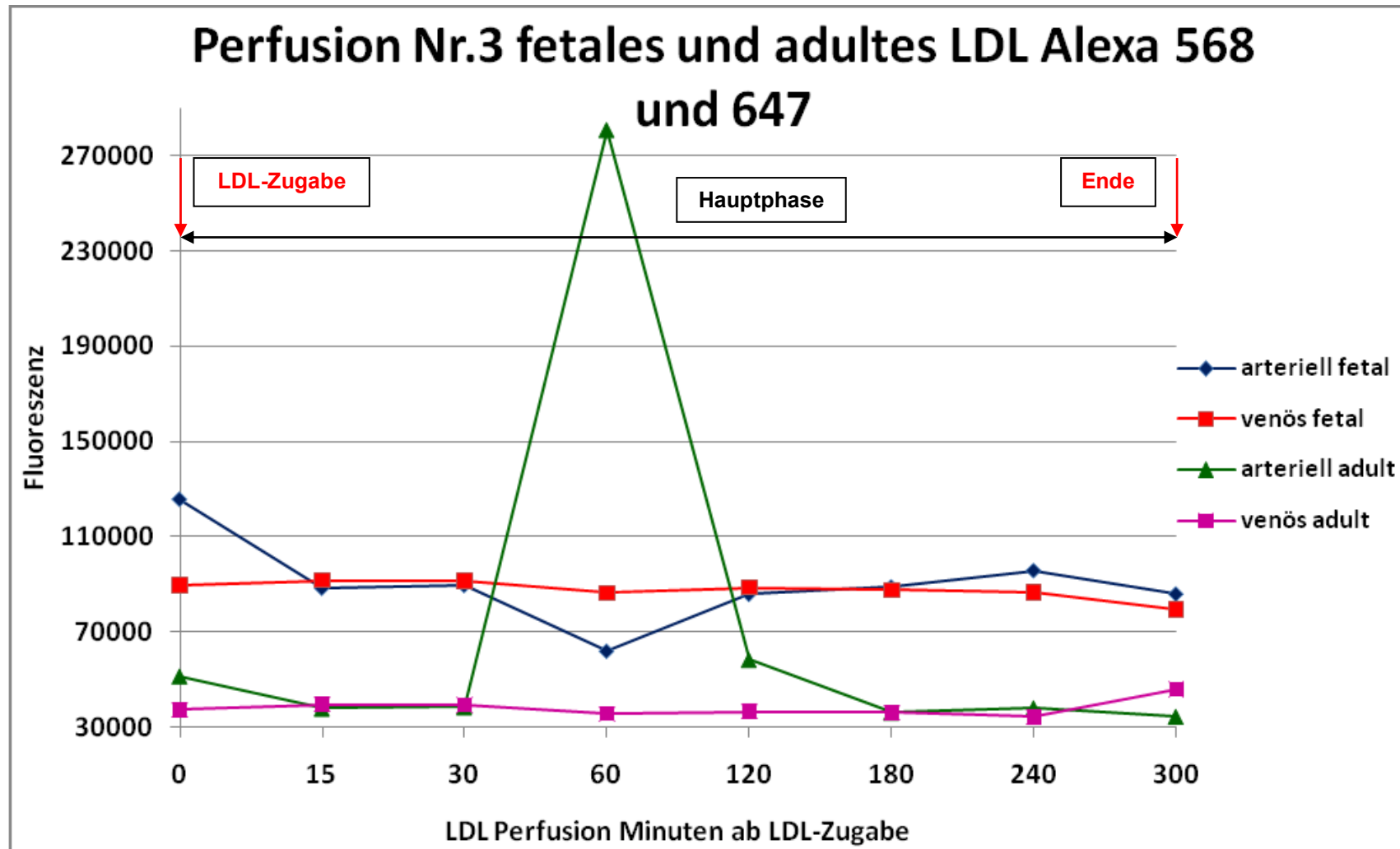


Abbildung 41: Perfusion Nr.3 – Fluoreszenz fetales und adultes LDL Alexa 568 und 647

Ergebnisse der Perfusion Nr.3 vom 14.03.2011:

Zunächst einmal ist zu erwähnen, dass das Setting des dritten Experiments ein anderes ist, als in den zwei vorhergehenden Versuchen. In den ersten beiden Experimenten wurde nach der Konditionierungsphase das Perfusionsmedium auf eines fluoreszenzmarkiertes fetales LDL enthaltendes Medium gewechselt. Im dritten Versuch enthält das Medium nach der Konditionierungsphase sowohl fetales als auch adultes fluoreszenzmarkiertes LDL.

Perfusionsdruck: Wie bereits in den vorhergehenden zwei Versuchen ist der Perfusionsdruck zu Beginn des Experiments mit 44 mbar niedrig (Abbildung 36). Nach Zugabe der Lipoproteine fällt der Perfusionsdruck unter den Durchschnittswert der Konditionierungsphase (Tabelle 10). Innerhalb von 185 Minuten sinkt er stark ab und beträgt nur noch 4 mbar. Der Druck bleibt bis zum Ende des Experiments konstant auf diesem Niveau. Die regelmäßigen Peaks stellen erneut die arterielle Probenentnahme dar, die mit einer kurzzeitigen Druckerhöhung einhergeht.

pO₂: Die pO₂-Kurven, arteriell und venös, verlaufen in etwa parallel (Abbildung 37). Der arterielle Wert zu Beginn des Versuchs liegt bei 173 mbar und sinkt zunächst innerhalb der ersten 45 Minuten auf 105 mbar. Anschließend ist ein Anstieg auf 193 mbar zu beobachten, wobei der Wert im Verlauf des Experiments wieder konstant, aber langsam sinkt. Zu Versuchsende liegt er bei 76 mbar. Die venöse pO₂-Kurve entwickelt sich genauso. Zunächst liegt ein hoher Ausgangswert von 124 mbar vor, dieser sinkt in 45 Minuten auf 63,8 mbar, steigt innerhalb der folgenden Viertelstunde auf 147 mbar um zuletzt konstant zu sinken. Der letzte gemessene Wert zu Versuchsende liegt bei 63,3 mbar.

pCO₂: Innerhalb der pCO₂-Kurven sind einige Schwankungen zu beobachten, der Trend ist allerdings innerhalb der arteriellen und venösen Kurve ähnlich. Arteriell liegt der Ausgangswert bei 62,8 mbar und sinkt in der ersten Stunde bis auf 47 mbar ab (Abbildung 38). Ab diesem Zeitpunkt steigt er langsam aber stetig an, um schließlich zu Versuchsende bei 70,6 mbar zu liegen. Der venöse Wert zu Beginn beträgt 51,6 mbar und schwankt in der ersten Stunde, bei den viertelstündlich entnommenen Proben, um ab der 60. Minute ebenso wie der arterielle Wert langsam konstant anzusteigen. Zu Versuchsende liegt er bei 73,8 mbar.

Laktat: Die Laktatkurven entwickeln sich wie bereits aus den vorherigen Versuchen bekannt. Der arterielle Ausgangswert liegt bei 0,6 mmol/l (Abbildung

39). Innerhalb der ersten 45 Minuten steigt er stetig bis auf 4,6 mmol/l. In den folgenden 15 Minuten sinkt er wieder auf 0,6 mmol/l ab, um schließlich über den Versuchsverlauf stetig zu steigen. Der letzte gemessene Wert beträgt in der 305. Minute 10,2 mmol/l. Venös liegt der erste gemessene Wert zu Beginn des Experiments bei 2,4 mmol/l. Die Kurve steigt in den ersten 45 Minuten ebenfalls an, so dass der Wert in der 45. Minute bei 5,2 mmol/l liegt. Nach einem kurzen Abfall in der folgenden Viertelstunde bis auf 2,6 mmol/l, steigt auch die venöse Laktatkonzentration stetig an. Mit Ende des Experiments beträgt die venöse Konzentration 10,4 mmol/l.

pH-Wert: Der arterielle pH-Wert zu Beginn der Perfusion liegt bei 7,22, nach kurzzeitigem leichten Anstieg sinkt er bis zur 45. Minute und liegt dann bei 7,19 (Abbildung 40). In den folgenden 15 Minuten steigt er rasch auf 7,3 um dann fast linear abzufallen. Der gemessene pH-Wert bei Perfusionsende liegt bei 6,86. Die venöse pH-Kurve sieht ähnlich aus, der Ausgangswert beträgt 7,27 und fällt bis zur 45. Minute auf 7,1 ab. In den nächsten 15 Minuten steigt der Wert auf 7,28, um dann, ebenso wie der arterielle Wert, fast linear abzusinken. Der letzte gemessene Wert bei Perfusionsende beträgt 6,86.

Fluoreszenz: Im dritten Versuch wurde sowohl mit fetalem als auch adultem LDL perfundiert. Das markierte LDL wird erst nach der Konditionierungsphase, die die erste Stunde des Experiments in Anspruch nimmt, perfundiert. Fetales LDL wurde, wie in den vorhergehenden Versuchen, mit Alexa Farbstoff 568 markiert, das adulte LDL mit Alexa Farbstoff 647. Die entnommenen Proben wurden vor der Analyse zentrifugiert und mit EDTA versetzt.

Das fetale LDL im arteriellen Schenkel verhält sich im vorliegenden Versuch sehr konstant. Der Ausgangswert liegt bei 125.679,72, sinkt in den ersten 15 Minuten leicht ab auf 91.584,91, bleibt in den folgenden 15 Minuten auf diesem Niveau und sinkt dann bis zur 45. Minute bis auf 61.751,93 ab. Innerhalb der nächsten Stunde steigt der Wert wieder auf sein vorheriges Niveau und hält sich dort bis zum Ende des Experiments. Der letzte gemessene Wert beträgt 86.707,9. Der venöse Ausgangswert des fetalen LDLs liegt bei 89.514,71 und bleibt über die gesamten 300 Minuten der LDL-Perfusion konstant. Der letzte gemessene Wert liegt in der 300. Minute bei 79.371,39.

Das adulte LDL verhält sich ähnlich, wobei die Werte niedriger sind als die fetalen. Der arterielle Wert zu Beginn der LDL-Perfusion beträgt 51.432,97, sinkt bis zur

30. Minute leicht ab und liegt dann bei 38.545,27. Innerhalb der folgenden halben Stunde steigt der Wert rapide bis auf 280.534,25 an, fällt dann aber gleich wieder in der nächsten halben Stunde auf das vorherige Niveau ab. Der letzte gemessene Wert bei Minute 300 beträgt 34.546,23. Der venöse Wert hält sich ziemlich konstant auf einem Wert. Der Ausgangswert liegt bei 37.230,47 der letzte Wert beträgt 45.944,47.

4.2 Statistik

Um zu prüfen, ob die erhobenen Daten signifikante Ergebnisse erbracht haben, wurden schließlich noch verschiedene statistische Test durchgeführt, zu denen die Daten aus allen drei Perfusionen als Datensatz verwendet wurden.

Zunächst wurde ein T-Test durchgeführt, genauer ein T-Test bei gepaarten Stichproben. Dieser untersucht zwei Mittelwerte, die nicht als vollkommen unabhängig voneinander angesehen werden können. Neben den Angaben über die Mittelwerte und das Konfidenzintervall wird zusätzlich ein Korrelationskoeffizient samt seines Signifikanzniveaus angegeben. Der Korrelationskoeffizient ist ein Maß für die Stärke des linearen Zusammenhangs zwischen den beiden Variablen. Je größer der Betrag des Korrelationskoeffizienten, desto stärker ist der lineare Zusammenhang zwischen den beiden Stichproben (28).

Als nächstes wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Varianzanalysen dienen dem univariaten (eine abhängige Variable, ANOVA) oder multivariaten (mehrere abhängige Variablen, MANOVA) Vergleich von mehr als zwei Mittelwerten. Im vorliegenden Fall handelt es sich um den Vergleich der Werte zu einem konstanten Zeitpunkt, deren Veränderung über den Zeitverlauf analysiert wird (29).

Schließlich wurde noch der Bonferroni-Test berechnet der ein Beispiel für eine Post Hoc Analyse darstellt. Post Hoc Analysen stellen multiple Mittelwertvergleiche dar und zeigen signifikante Mittelwertunterschiede nach Homogenitätskriterien (30).

Ergänzend zu den Tests steht zu Beginn die deskriptive Statistik der ausgewerteten Daten mitsamt Q-Q-Diagrammen und Boxplots, um die Zusammenhänge besser verständlich zu machen.

Deskriptive Statistik

			Statistik	Standardfehler
				r
pO ₂ (mmHg)arteriell	Mittelwert		103,66	5,369
	95% Konfidenzintervall	Untergrenze	92,75	
	des Mittelwerts	Obergrenze	114,57	
	5% getrimmtes Mittel		101,04	
	Median		94,00	
	Varianz		1008,852	
	Standardabweichung		31,762	
	Minimum		65	
	Maximum		197	
	Spannweite		132	
	Interquartilbereich		30	
	Schiefe		1,552	,398
	Kurtosis		2,135	,778
pO ₂ (mmHg)venös	Mittelwert		71,486	4,2145
	95% Konfidenzintervall	Untergrenze	62,921	
	des Mittelwerts	Obergrenze	80,051	
	5% getrimmtes Mittel		70,023	
	Median		66,200	
	Varianz		621,665	
	Standardabweichung		24,9332	
	Minimum		29,2	
	Maximum		147,0	
	Spannweite		117,8	
	Interquartilbereich		22,3	
	Schiefe		1,001	,398
	Kurtosis		1,647	,778
pCO ₂ (mmHg)arteriell	Mittelwert		38,78	2,909
	95% Konfidenzintervall	Untergrenze	32,87	
	des Mittelwerts	Obergrenze	44,69	
	5% getrimmtes Mittel		38,37	
	Median		39,60	
	Varianz		296,206	
	Standardabweichung		17,211	

	Minimum		14	
	Maximum		71	
	Spannweite		56	
	Interquartilbereich		30	
	Schiefe		,285	,398
	Kurtosis		-1,056	,778
pCO2(mmHg)venös	Mittelwert		47,126	2,9863
	95% Konfidenzintervall	Untergrenze	41,057	
	des Mittelwerts	Obergrenze	53,195	
	5% getrimmtes Mittel		46,652	
	Median		48,600	
	Varianz		312,137	
	Standardabweichung		17,6674	
	Minimum		18,6	
	Maximum		90,7	
	Spannweite		72,1	
	Interquartilbereich		32,1	
	Schiefe		,264	,398
	Kurtosis		-,382	,778
cLac(mmol/l)arteriell	Mittelwert		6,197	,7936
	95% Konfidenzintervall	Untergrenze	4,584	
	des Mittelwerts	Obergrenze	7,810	
	5% getrimmtes Mittel		5,785	
	Median		4,700	
	Varianz		22,046	
	Standardabweichung		4,6953	
	Minimum		,1	
	Maximum		21,0	
	Spannweite		20,9	
	Interquartilbereich		5,5	
	Schiefe		1,392	,398
	Kurtosis		2,378	,778
cLac(mmol/l)venös	Mittelwert		7,000	,7059
	95% Konfidenzintervall	Untergrenze	5,565	
	des Mittelwerts	Obergrenze	8,435	
	5% getrimmtes Mittel		6,544	
	Median		6,200	
	Varianz		17,441	
	Standardabweichung		4,1763	
	Minimum		2,4	
	Maximum		21,0	

	Spannweite		18,6	
	Interquartilbereich		4,5	
	Schiefe		1,807	,398
	Kurtosis		3,603	,778
pHarteriell	Mittelwert		7,2375	,03007
	95% Konfidenzintervall	Untergrenze	7,1764	
	des Mittelwerts	Obergrenze	7,2986	
	5% getrimmtes Mittel		7,2418	
	Median		7,2260	
	Varianz		,032	
	Standardabweichung		,17788	
	Minimum		6,87	
	Maximum		7,53	
	Spannweite		,66	
	Interquartilbereich		,31	
	Schiefe		-,144	,398
	Kurtosis		-,482	,778
pHvenös	Mittelwert		7,1358	,02354
	95% Konfidenzintervall	Untergrenze	7,0880	
	des Mittelwerts	Obergrenze	7,1836	
	5% getrimmtes Mittel		7,1397	
	Median		7,1480	
	Varianz		,019	
	Standardabweichung		,13924	
	Minimum		6,85	
	Maximum		7,35	
	Spannweite		,50	
	Interquartilbereich		,22	
	Schiefe		-,301	,398
	Kurtosis		-,536	,778
Perfusionsdruck(mbar)	Mittelwert		42,83	6,448
	95% Konfidenzintervall	Untergrenze	29,73	
	des Mittelwerts	Obergrenze	55,93	
	5% getrimmtes Mittel		40,42	
	Median		39,00	
	Varianz		1454,970	
	Standardabweichung		38,144	
	Minimum		2	
	Maximum		133	
	Spannweite		131	
	Interquartilbereich		60	

Schiefe	,794	,398
Kurtosis	-,322	,778

Tabelle 13: Deskriptive Statistik

Tests auf Normalverteilung

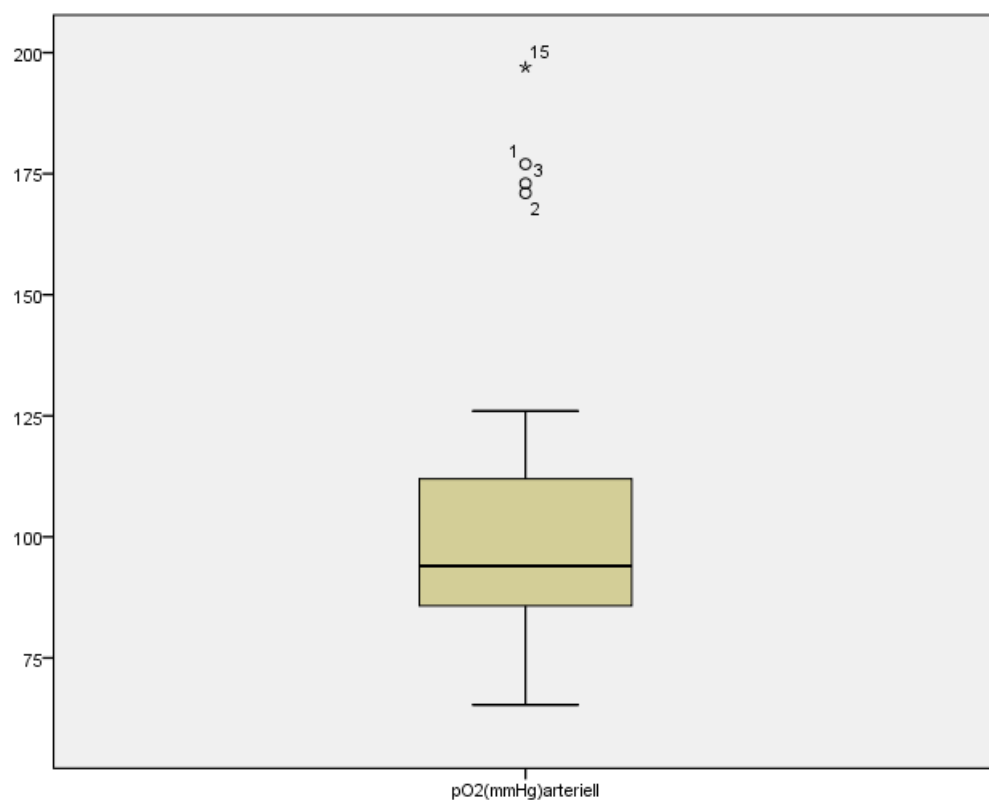
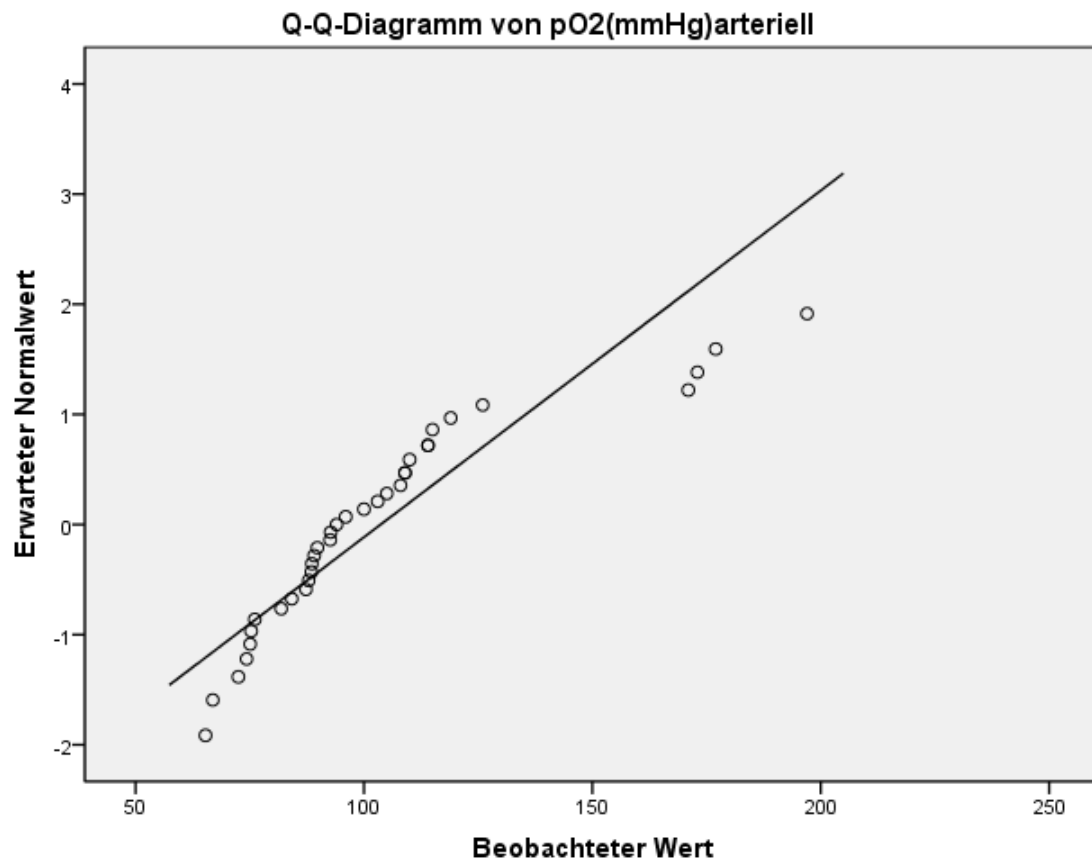
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
pO2(mmHg)arteriell	,189	35	,003	,831	35	,000
pO2(mmHg)venös	,127	35	,171	,934	35	,036
pCO2(mmHg)arteriell	,160	35	,024	,934	35	,036
pCO2(mmHg)venös	,121	35	,200 [*]	,957	35	,190
cLac(mmol/l)arteriell	,157	35	,029	,887	35	,002
cLac(mmol/l)venös	,176	35	,007	,823	35	,000
pHarteriell	,130	35	,146	,954	35	,155
pHvenös	,093	35	,200 [*]	,957	35	,185
Perfusionsdruck(mbar)	,145	35	,060	,889	35	,002

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

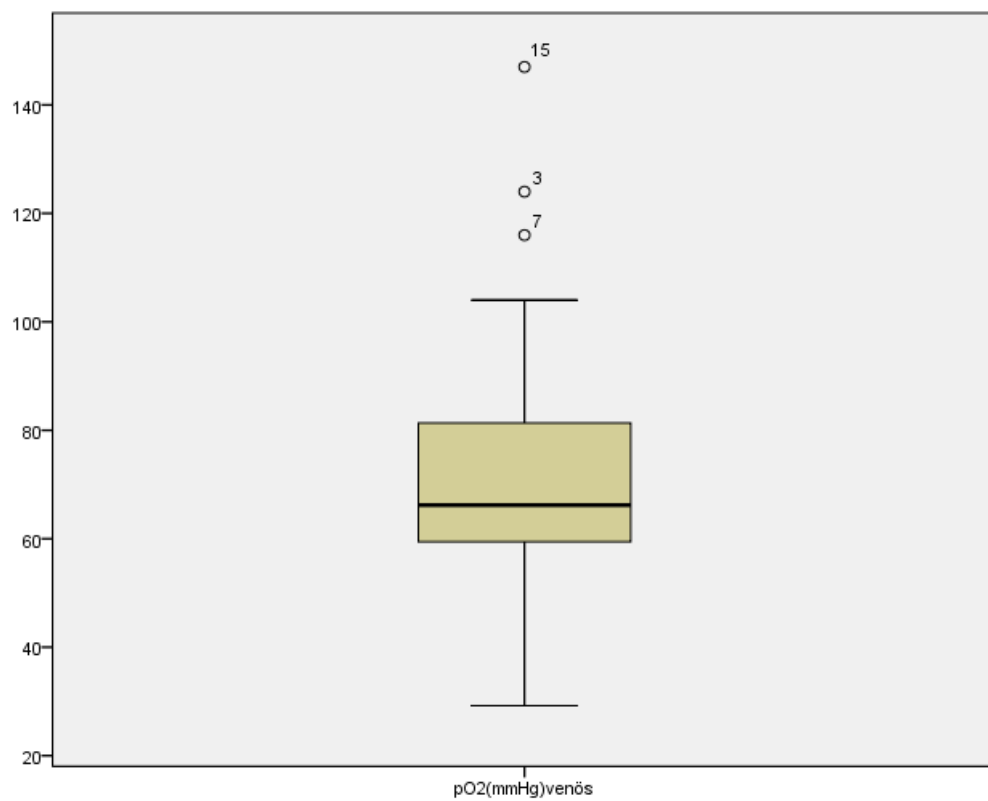
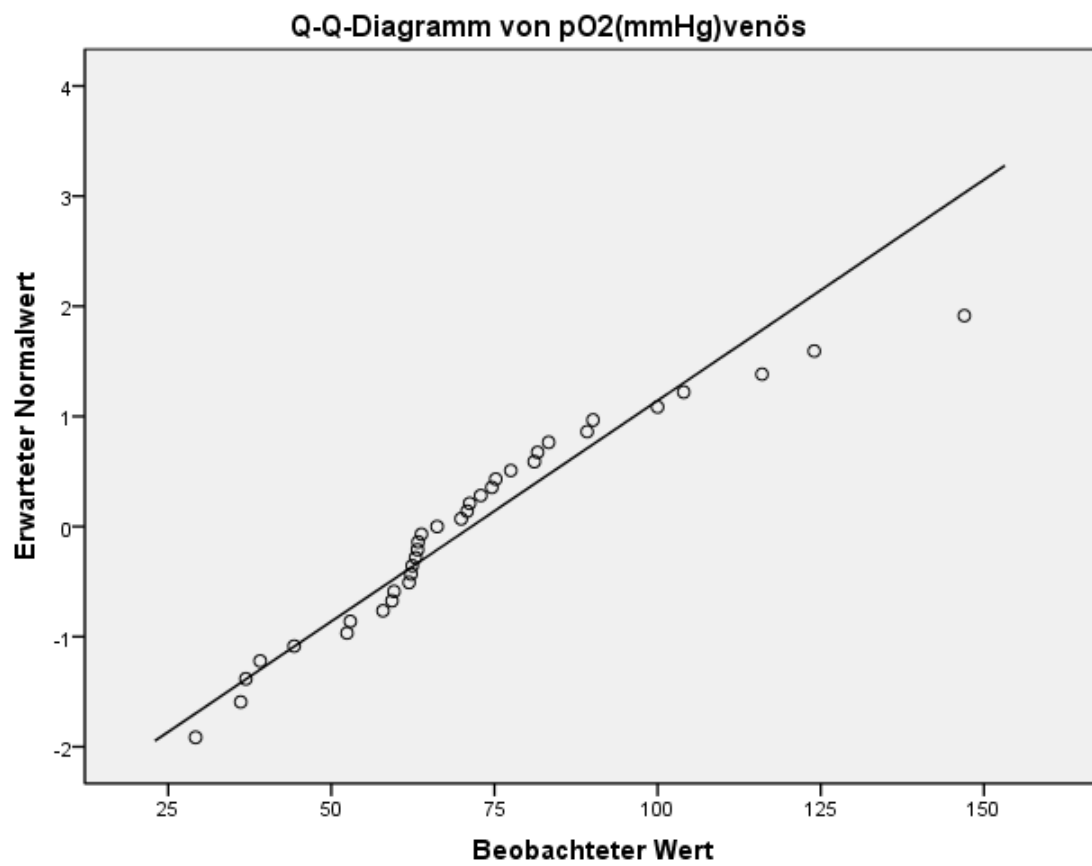
*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

Tabelle 14: Test auf Normalverteilung

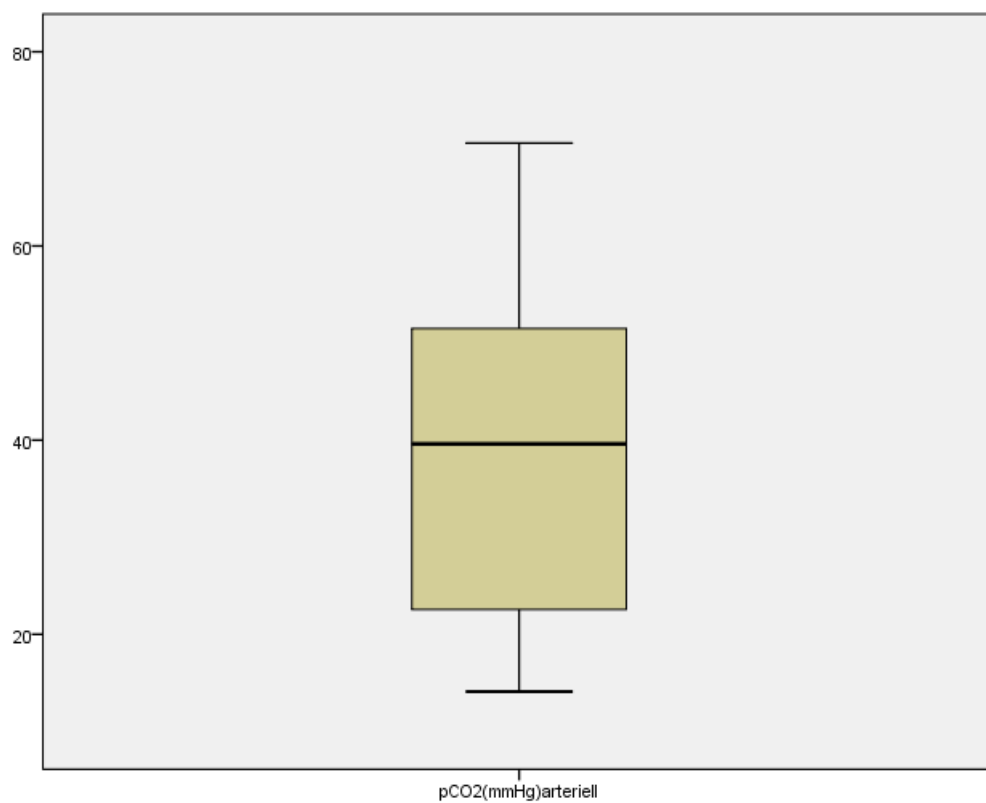
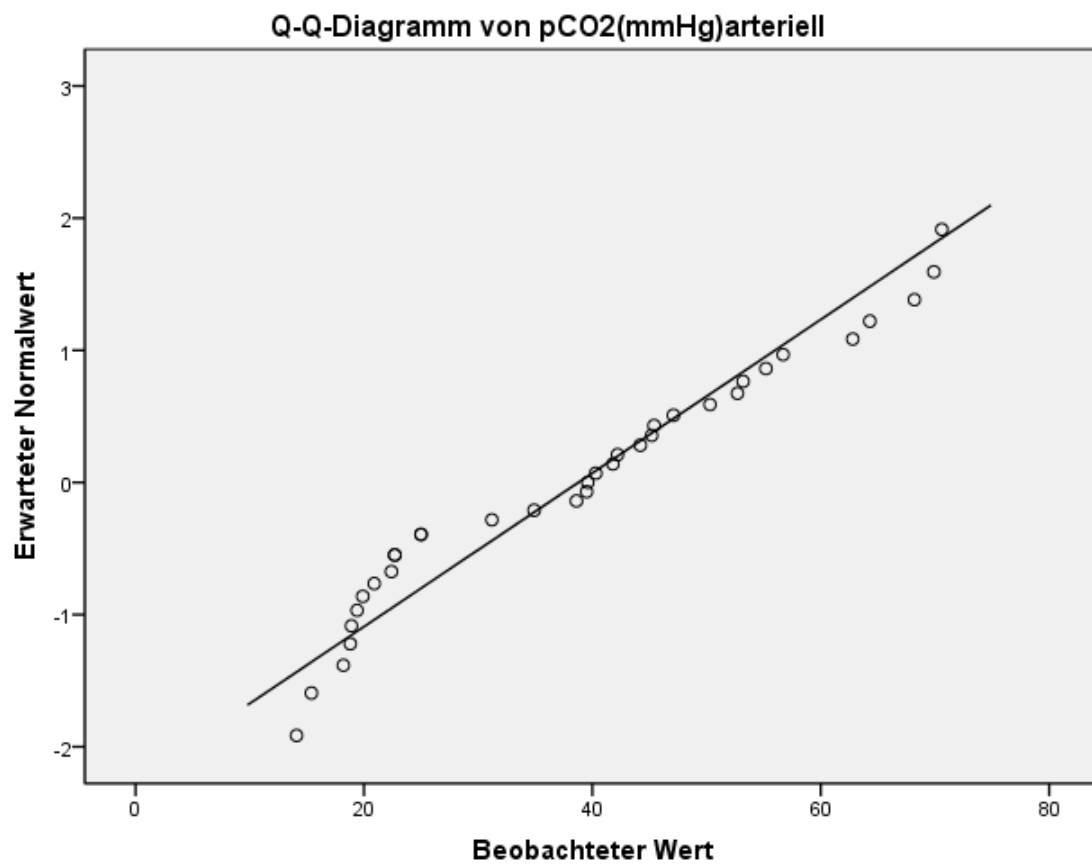
Abbildung 42: Q-Q-Diagramm und Bockplot pO₂ arteriell (a), venös (b), pCO₂ arteriell (c), venös (d), Laktat arteriell (e), venös (f), pH arteriell (g), venös (h), Perfusionsdruck (i)
a)



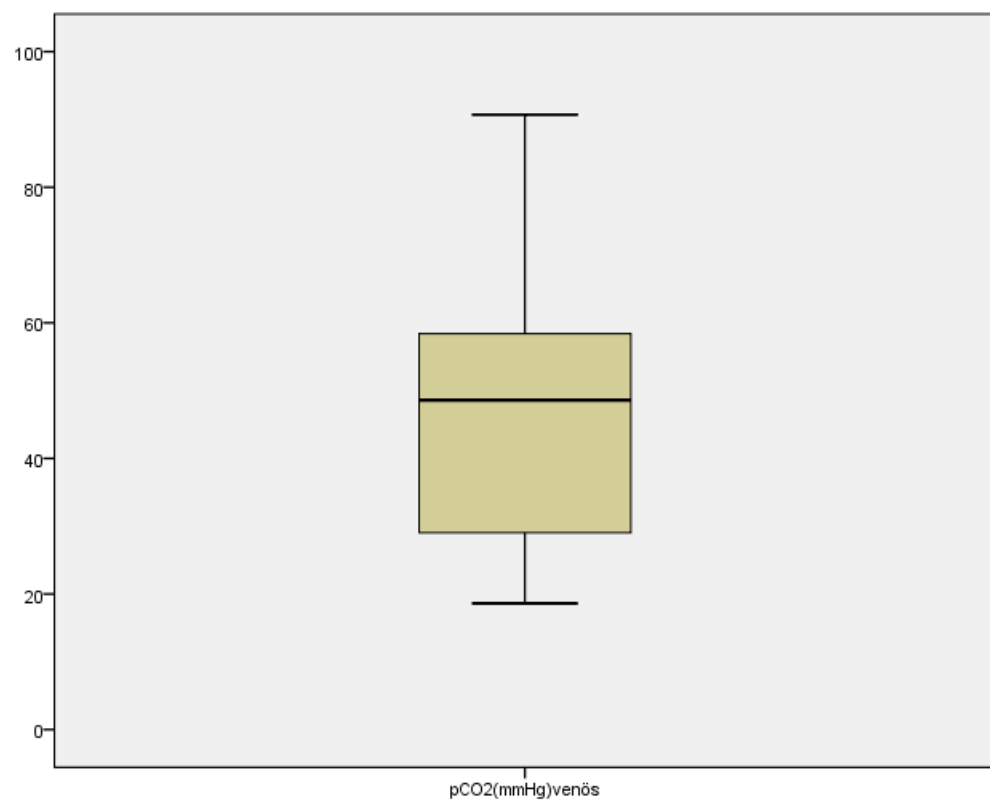
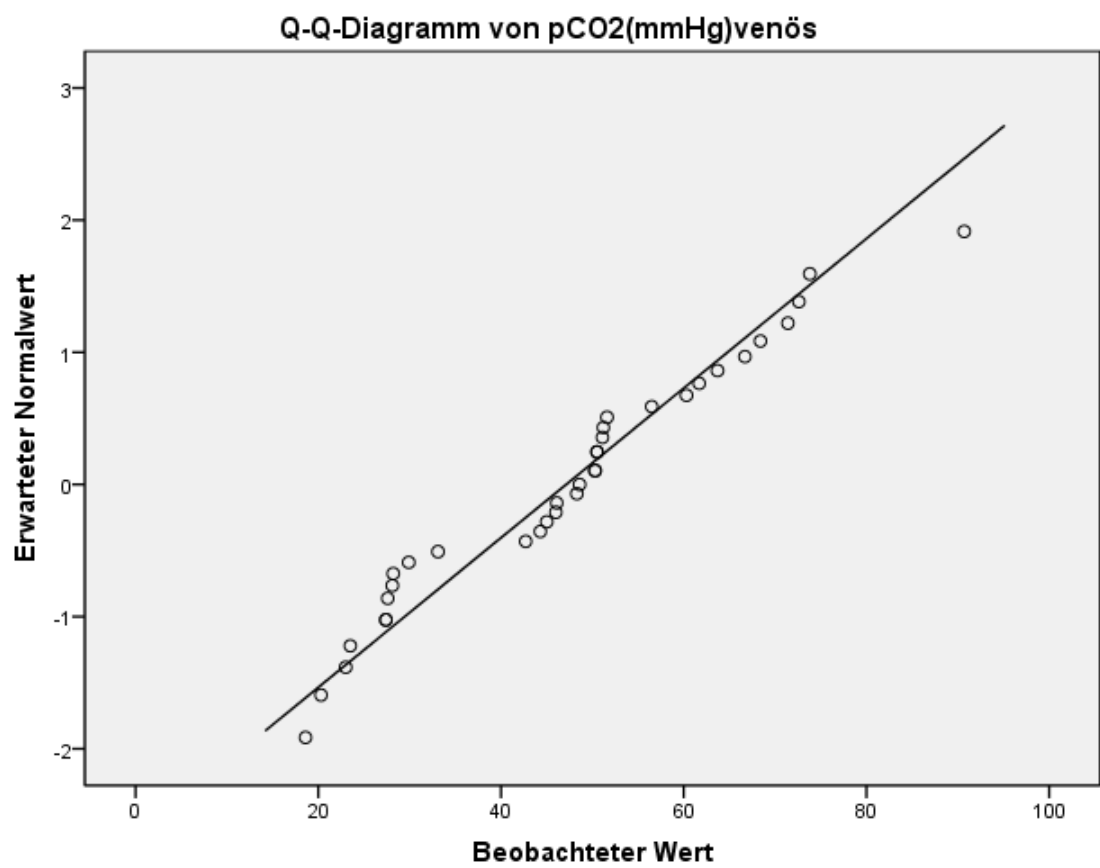
b)



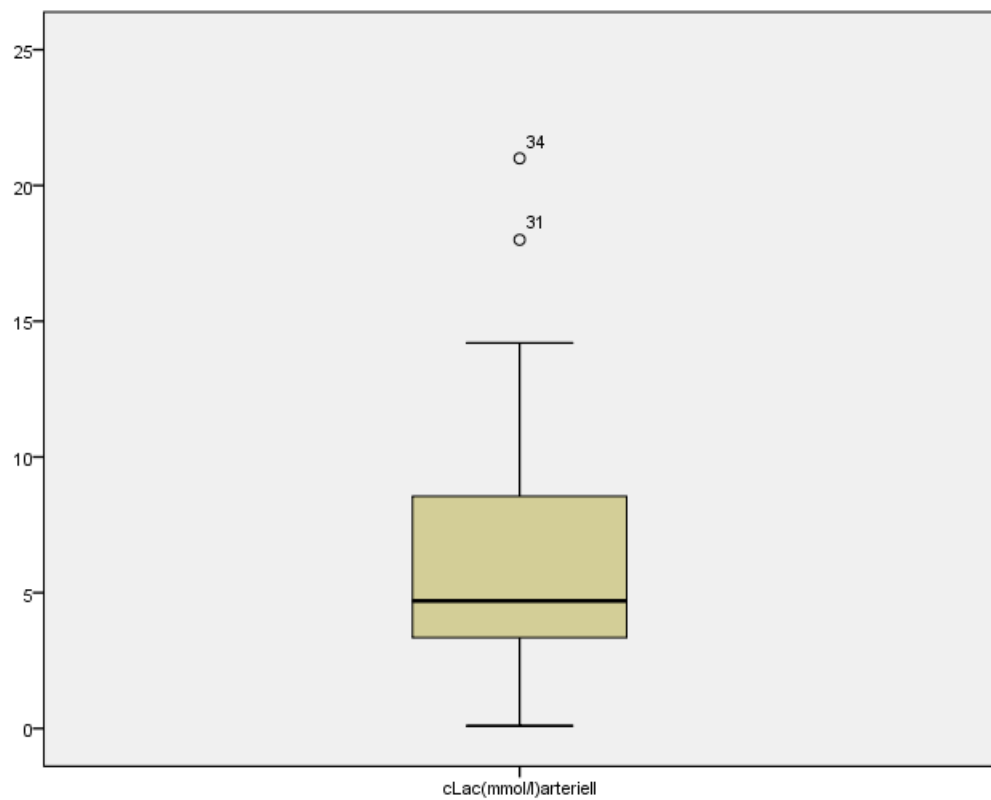
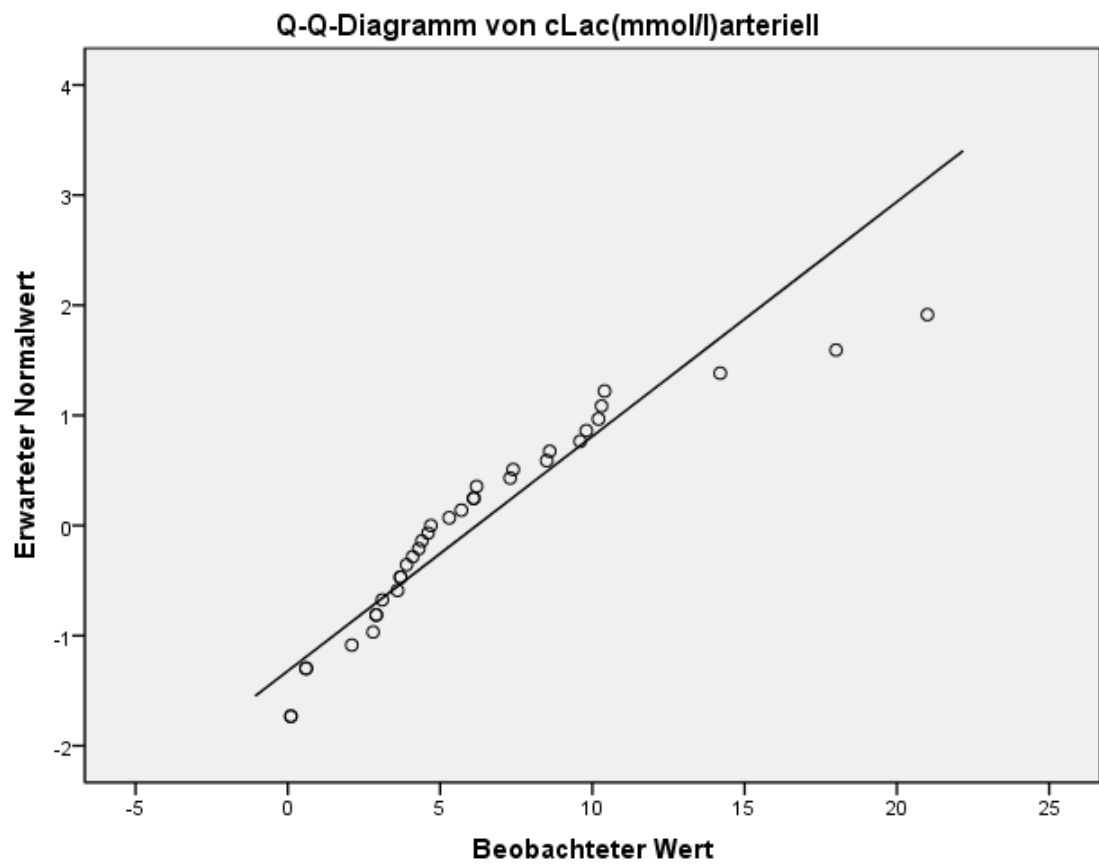
c)



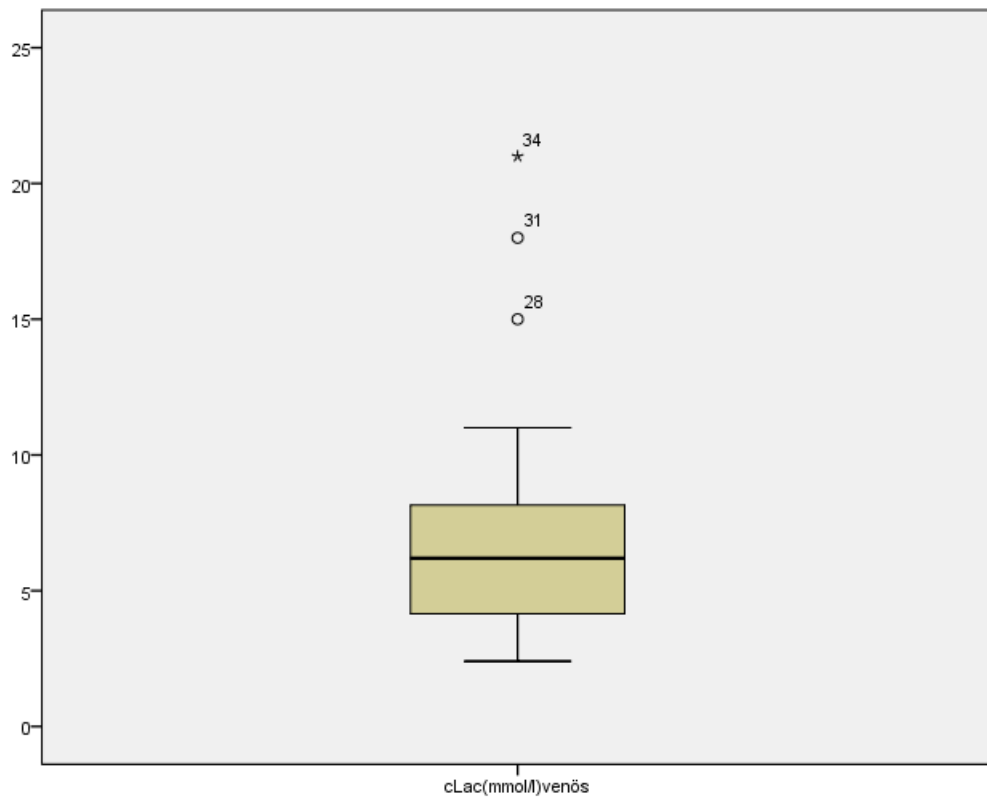
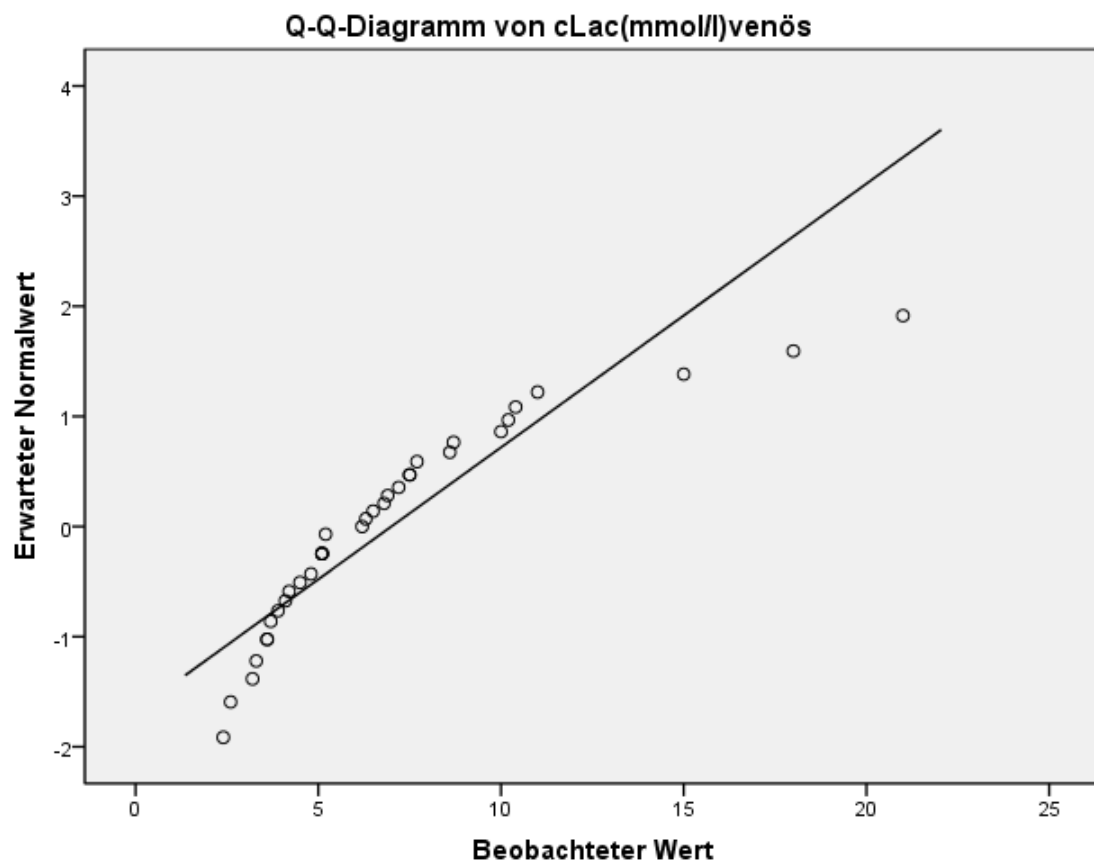
d)



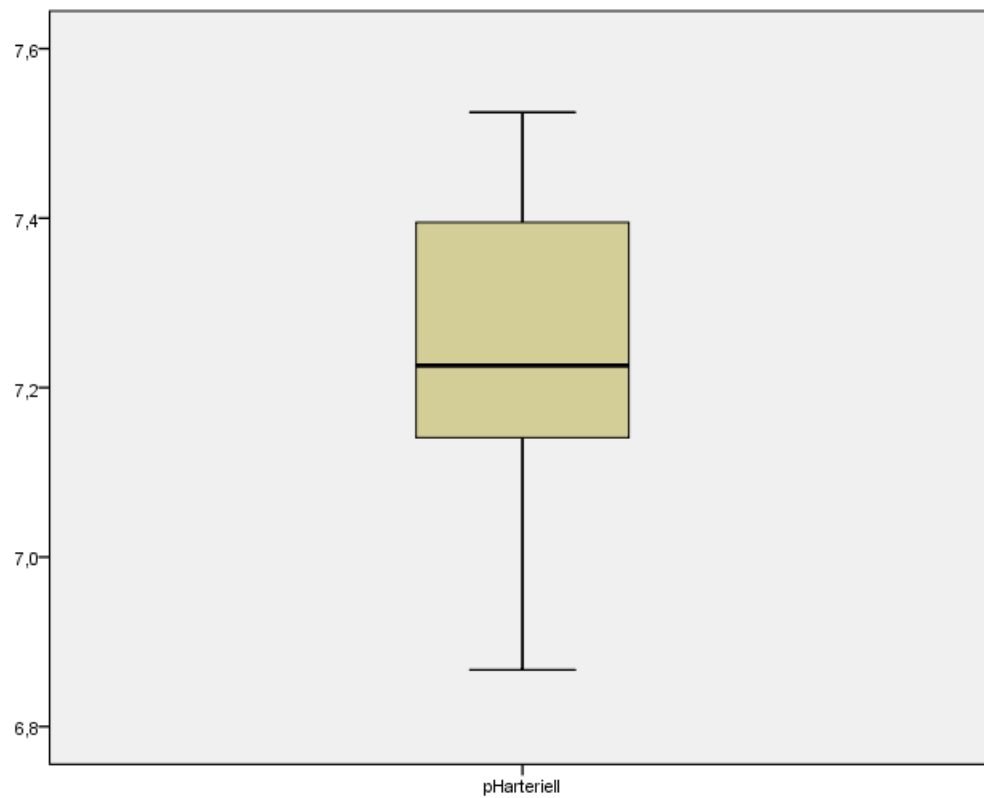
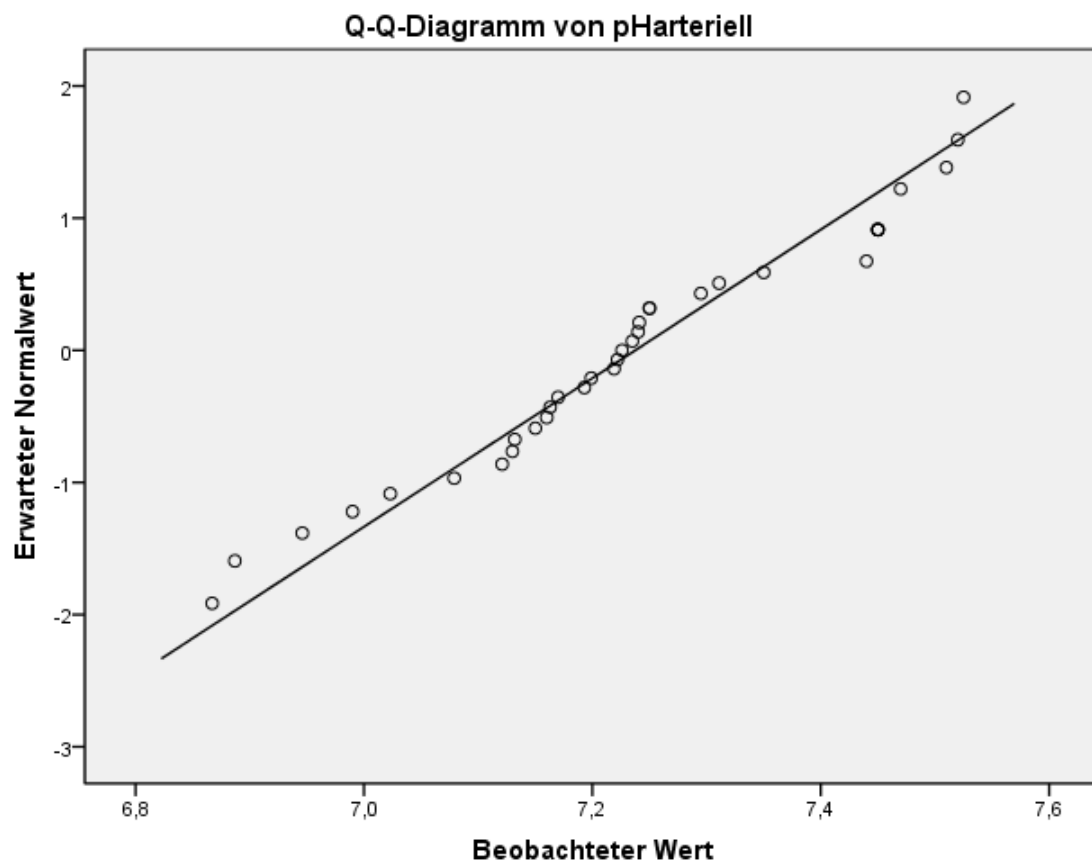
e)



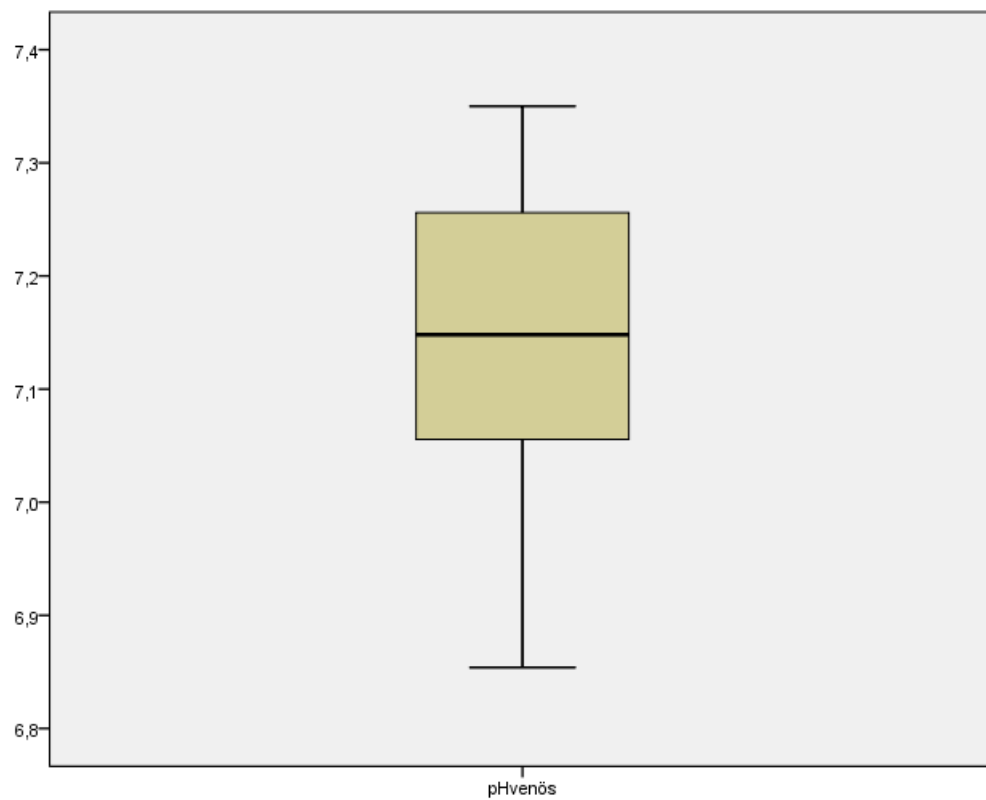
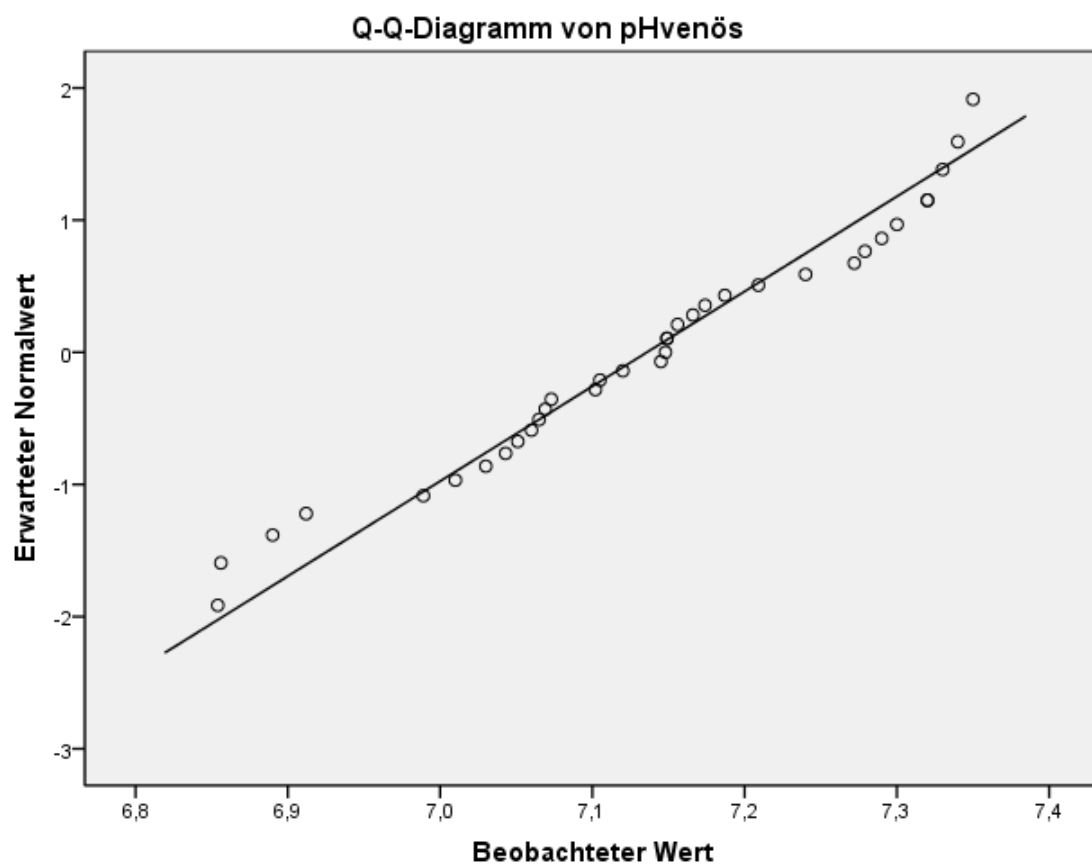
f)



g)



h)



i)

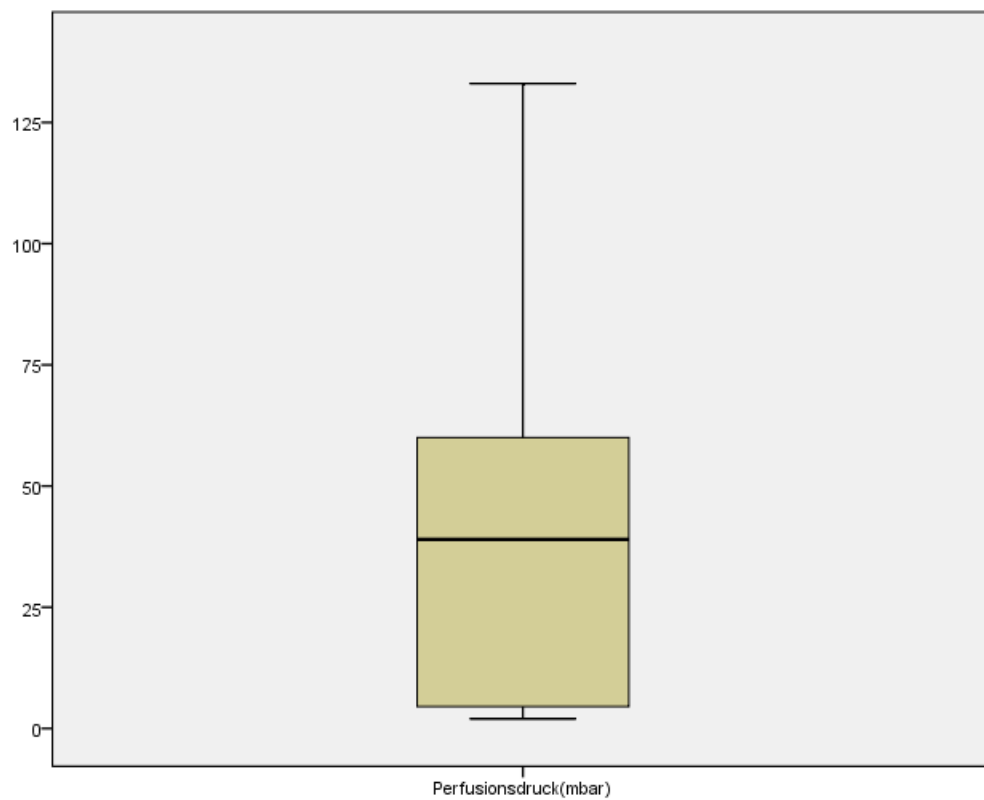
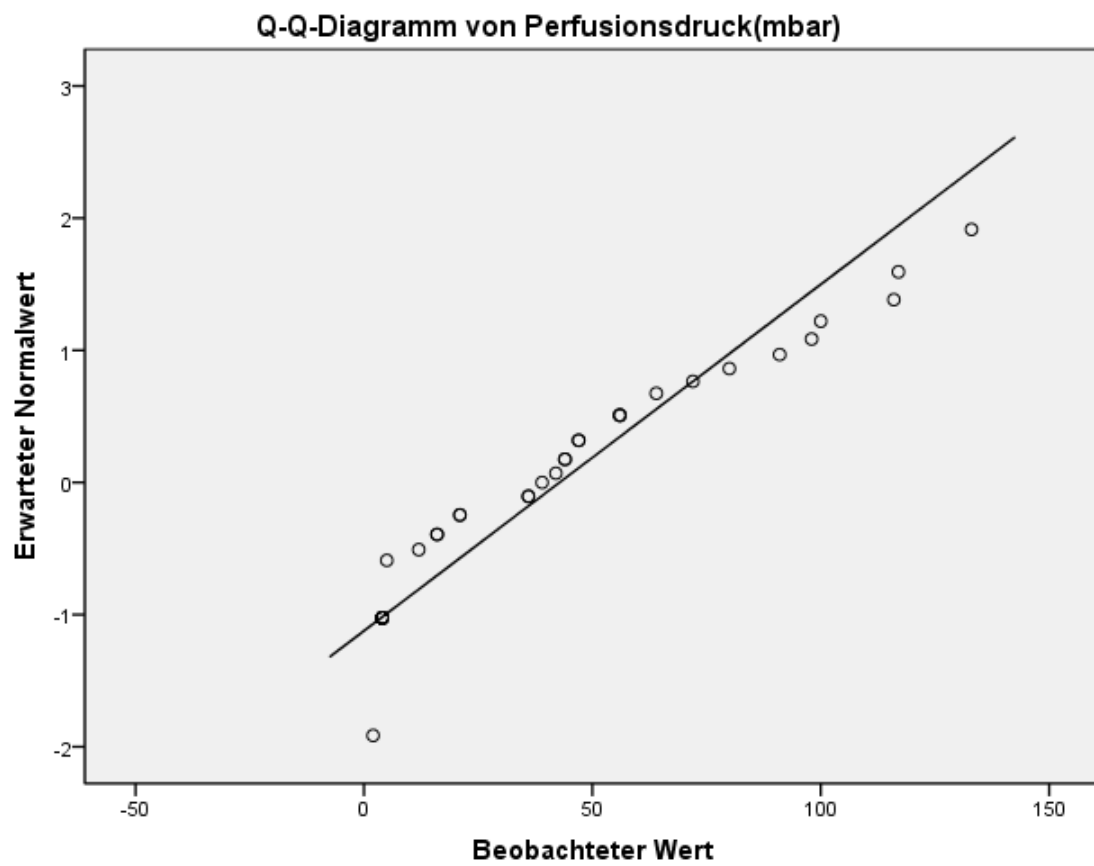


Tabelle 15: T-Test

Statistik bei gepaarten Stichproben					
		Mittelwert	N	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Paaren 1	pO2(mmHg)arteriell	103,66	35	31,762	5,369
	pO2(mmHg)venös	71,486	35	24,9332	4,2145
Paaren 2	pCO2(mmHg)arteriell	38,78	35	17,211	2,909
	pCO2(mmHg)venös	47,126	35	17,6674	2,9863
Paaren 3	cLac(mmol/l)arteriell	6,197	35	4,6953	,7936
	cLac(mmol/l)venös	7,000	35	4,1763	,7059
Paaren 4	pHarteriell	7,2375	35	,17788	,03007
	pHvenös	7,1358	35	,13924	,02354

Korrelationen bei gepaarten Stichproben				
		N	Korrelation	Signifikanz
Paaren 1	pO2(mmHg)arteriell & pO2(mmHg)venös	35	,338	,047
Paaren 2	pCO2(mmHg)arteriell & pCO2(mmHg)venös	35	,696	,000
Paaren 3	cLac(mmol/l)arteriell & cLac(mmol/l)venös	35	,945	,000
Paaren 4	pHarteriell & pHvenös	35	,676	,000

Test bei gepaarten Stichproben					
		Gepaarte Differenzen			
				Standardfehler des Mittelwertes	95% Konfidenzintervall der Differenz
					Untere
Paaren 1	pO2(mmHg)arteriell - pO2(mmHg)venös	32,1743	33,0975	5,5945	20,8049
Paaren 2	pCO2(mmHg)arteriell - pCO2(mmHg)venös	-8,3457	13,5995	2,2987	-13,0173
Paaren 3	cLac(mmol/l)arteriell - cLac(mmol/l)venös	-,8029	1,5570	,2632	-1,3377
Paaren 4	pHarteriell - pHvenös	,10174	,13251	,02240	,05622

Test bei gepaarten Stichproben

		Gepaarte Differenzen	T	df	Sig. (2-seitig)
		95% Konfidenzintervall der Differenz			
		Obere			
Paaren 1	pO2(mmHg)arteriell - pO2(mmHg)venös	43,5437	5,751	34	,000
Paaren 2	pCO2(mmHg)arteriell - pCO2(mmHg)venös	-3,6741	-3,631	34	,001
Paaren 3	cLac(mmol/l)arteriell - cLac(mmol/l)venös	-,2680	-3,050	34	,004
Paaren 4	pHarteriell - pHvenös	,14726	4,542	34	,000

Zwischensubjektfaktoren für 3 Perfusionsn

	N
Zeit(min) 0	3
15	3
30	3
45	3
60	3
80	3
95	3
125	3
185	3
245	3
305	3
365	2

Tabelle 16: Bonferroni-Test

Bonferroni-Test

Abhängige Variable	(I)Zeit(min)	(J)Zeit(min)	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig.	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
pO ₂ (mmHg)arteriell	0	15	73,37	18,691	,045	,84	145,89
		30	80,70	18,691	,017	8,18	153,22
		45	89,60	18,691	,005	17,08	162,12
		60	46,60	18,691	1,000	-25,92	119,12
		80	57,33	18,691	,360	-15,19	129,86
		95	71,47	18,691	,057	-1,06	143,99
		125	83,13	18,691	,012	10,61	155,66
		185	73,70	18,691	,043	1,18	146,22
		245	88,60	18,691	,006	16,08	161,12
		305	92,63	18,691	,003	20,11	165,16
		365	89,42	20,898	,019	8,33	170,50
	15	0	-73,37	18,691	,045	-145,89	-,84
		30	7,33	18,691	1,000	-65,19	79,86
		45	16,23	18,691	1,000	-56,29	88,76
		60	-26,77	18,691	1,000	-99,29	45,76
		80	-16,03	18,691	1,000	-88,56	56,49
		95	-1,90	18,691	1,000	-74,42	70,62
		125	9,77	18,691	1,000	-62,76	82,29
		185	,33	18,691	1,000	-72,19	72,86
		245	15,23	18,691	1,000	-57,29	87,76
		305	19,27	18,691	1,000	-53,26	91,79
		365	16,05	20,898	1,000	-65,03	97,13
	30	0	-80,70	18,691	,017	-153,22	-8,18
		15	-7,33	18,691	1,000	-79,86	65,19
		45	8,90	18,691	1,000	-63,62	81,42
		60	-34,10	18,691	1,000	-106,62	38,42
		80	-23,37	18,691	1,000	-95,89	49,16
		95	-9,23	18,691	1,000	-81,76	63,29
		125	2,43	18,691	1,000	-70,09	74,96
		185	-7,00	18,691	1,000	-79,52	65,52
		245	7,90	18,691	1,000	-64,62	80,42
		305	11,93	18,691	1,000	-60,59	84,46
		365	8,72	20,898	1,000	-72,37	89,80
	45	0	-89,60	18,691	,005	-162,12	-17,08
		15	-16,23	18,691	1,000	-88,76	56,29
		30	-8,90	18,691	1,000	-81,42	63,62
		60	-43,00	18,691	1,000	-115,52	29,52
		80	-32,27	18,691	1,000	-104,79	40,26
		95	-18,13	18,691	1,000	-90,66	54,39
		125	-6,47	18,691	1,000	-78,99	66,06
		185	-15,90	18,691	1,000	-88,42	56,62
		245	-1,00	18,691	1,000	-73,52	71,52
		305	3,03	18,691	1,000	-69,49	75,56
		365	-,18	20,898	1,000	-81,27	80,90
	60	0	-46,60	18,691	1,000	-119,12	25,92
		15	26,77	18,691	1,000	-45,76	99,29
		30	34,10	18,691	1,000	-38,42	106,62

	45	43,00	18,691	1,000	-29,52	115,52
	80	10,73	18,691	1,000	-61,79	83,26
	95	24,87	18,691	1,000	-47,66	97,39
	125	36,53	18,691	1,000	-35,99	109,06
	185	27,10	18,691	1,000	-45,42	99,62
	245	42,00	18,691	1,000	-30,52	114,52
	305	46,03	18,691	1,000	-26,49	118,56
	365	42,82	20,898	1,000	-38,27	123,90
80	0	-57,33	18,691	,360	-129,86	15,19
	15	16,03	18,691	1,000	-56,49	88,56
	30	23,37	18,691	1,000	-49,16	95,89
	45	32,27	18,691	1,000	-40,26	104,79
	60	-10,73	18,691	1,000	-83,26	61,79
	95	14,13	18,691	1,000	-58,39	86,66
	125	25,80	18,691	1,000	-46,72	98,32
	185	16,37	18,691	1,000	-56,16	88,89
	245	31,27	18,691	1,000	-41,26	103,79
	305	35,30	18,691	1,000	-37,22	107,82
	365	32,08	20,898	1,000	-49,00	113,17
95	0	-71,47	18,691	,057	-143,99	1,06
	15	1,90	18,691	1,000	-70,62	74,42
	30	9,23	18,691	1,000	-63,29	81,76
	45	18,13	18,691	1,000	-54,39	90,66
	60	-24,87	18,691	1,000	-97,39	47,66
	80	-14,13	18,691	1,000	-86,66	58,39
	125	11,67	18,691	1,000	-60,86	84,19
	185	2,23	18,691	1,000	-70,29	74,76
	245	17,13	18,691	1,000	-55,39	89,66
	305	21,17	18,691	1,000	-51,36	93,69
	365	17,95	20,898	1,000	-63,13	99,03
125	0	-83,13	18,691	,012	-155,66	-10,61
	15	-9,77	18,691	1,000	-82,29	62,76
	30	-2,43	18,691	1,000	-74,96	70,09
	45	6,47	18,691	1,000	-66,06	78,99
	60	-36,53	18,691	1,000	-109,06	35,99
	80	-25,80	18,691	1,000	-98,32	46,72
	95	-11,67	18,691	1,000	-84,19	60,86
	185	-9,43	18,691	1,000	-81,96	63,09
	245	5,47	18,691	1,000	-67,06	77,99
	305	9,50	18,691	1,000	-63,02	82,02
	365	6,28	20,898	1,000	-74,80	87,37
185	0	-73,70	18,691	,043	-146,22	-1,18
	15	-,33	18,691	1,000	-72,86	72,19
	30	7,00	18,691	1,000	-65,52	79,52
	45	15,90	18,691	1,000	-56,62	88,42
	60	-27,10	18,691	1,000	-99,62	45,42
	80	-16,37	18,691	1,000	-88,89	56,16
	95	-2,23	18,691	1,000	-74,76	70,29
	125	9,43	18,691	1,000	-63,09	81,96
	245	14,90	18,691	1,000	-57,62	87,42
	305	18,93	18,691	1,000	-53,59	91,46
	365	15,72	20,898	1,000	-65,37	96,80
245	0	-88,60	18,691	,006	-161,12	-16,08

		15	-15,23	18,691	1,000	-87,76	57,29
		30	-7,90	18,691	1,000	-80,42	64,62
		45	1,00	18,691	1,000	-71,52	73,52
		60	-42,00	18,691	1,000	-114,52	30,52
		80	-31,27	18,691	1,000	-103,79	41,26
		95	-17,13	18,691	1,000	-89,66	55,39
		125	-5,47	18,691	1,000	-77,99	67,06
		185	-14,90	18,691	1,000	-87,42	57,62
		305	4,03	18,691	1,000	-68,49	76,56
		365	,82	20,898	1,000	-80,27	81,90
	305	0	-92,63	18,691	,003	-165,16	-20,11
		15	-19,27	18,691	1,000	-91,79	53,26
		30	-11,93	18,691	1,000	-84,46	60,59
		45	-3,03	18,691	1,000	-75,56	69,49
		60	-46,03	18,691	1,000	-118,56	26,49
		80	-35,30	18,691	1,000	-107,82	37,22
		95	-21,17	18,691	1,000	-93,69	51,36
		125	-9,50	18,691	1,000	-82,02	63,02
		185	-18,93	18,691	1,000	-91,46	53,59
		245	-4,03	18,691	1,000	-76,56	68,49
		365	-3,22	20,898	1,000	-84,30	77,87
	365	0	-89,42	20,898	,019	-170,50	-8,33
		15	-16,05	20,898	1,000	-97,13	65,03
		30	-8,72	20,898	1,000	-89,80	72,37
		45	,18	20,898	1,000	-80,90	81,27
		60	-42,82	20,898	1,000	-123,90	38,27
		80	-32,08	20,898	1,000	-113,17	49,00
		95	-17,95	20,898	1,000	-99,03	63,13
		125	-6,28	20,898	1,000	-87,37	74,80
		185	-15,72	20,898	1,000	-96,80	65,37
		245	-,82	20,898	1,000	-81,90	80,27
		305	3,22	20,898	1,000	-77,87	84,30
cLac(mmol/l)arteriell	0	15	-2,700	2,3451	1,000	-11,799	6,399
		30	-3,700	2,3451	1,000	-12,799	5,399
		45	-4,567	2,3451	1,000	-13,665	4,532
		60	-3,833	2,3451	1,000	-12,932	5,265
		80	-3,167	2,3451	1,000	-12,265	5,932
		95	-4,200	2,3451	1,000	-13,299	4,899
		125	-6,167	2,3451	,989	-15,265	2,932
		185	-8,400	2,3451	,104	-17,499	,699
		245	-10,367	2,3451	,013	-19,465	-1,268
		305	-12,000	2,3451	,002	-21,099	-2,901
		365	-15,133	2,6219	,000	-25,306	-4,961
	15	0	2,700	2,3451	1,000	-6,399	11,799
		30	-1,000	2,3451	1,000	-10,099	8,099
		45	-1,867	2,3451	1,000	-10,965	7,232
		60	-1,133	2,3451	1,000	-10,232	7,965
		80	-,467	2,3451	1,000	-9,565	8,632
		95	-1,500	2,3451	1,000	-10,599	7,599
		125	-3,467	2,3451	1,000	-12,565	5,632
		185	-5,700	2,3451	1,000	-14,799	3,399
		245	-7,667	2,3451	,222	-16,765	1,432
		305	-9,300	2,3451	,040	-18,399	-,201

	365	-12,433	2,6219	,006	-22,606	-2,261
30	0	3,700	2,3451	1,000	-5,399	12,799
	15	1,000	2,3451	1,000	-8,099	10,099
	45	-,867	2,3451	1,000	-9,965	8,232
	60	-,133	2,3451	1,000	-9,232	8,965
	80	,533	2,3451	1,000	-8,565	9,632
	95	-,500	2,3451	1,000	-9,599	8,599
	125	-2,467	2,3451	1,000	-11,565	6,632
	185	-4,700	2,3451	1,000	-13,799	4,399
	245	-6,667	2,3451	,608	-15,765	2,432
	305	-8,300	2,3451	,116	-17,399	,799
	365	-11,433	2,6219	,015	-21,606	-1,261
45	0	4,567	2,3451	1,000	-4,532	13,665
	15	1,867	2,3451	1,000	-7,232	10,965
	30	,867	2,3451	1,000	-8,232	9,965
	60	,733	2,3451	1,000	-8,365	9,832
	80	1,400	2,3451	1,000	-7,699	10,499
	95	,367	2,3451	1,000	-8,732	9,465
	125	-1,600	2,3451	1,000	-10,699	7,499
	185	-3,833	2,3451	1,000	-12,932	5,265
	245	-5,800	2,3451	1,000	-14,899	3,299
	305	-7,433	2,3451	,282	-16,532	1,665
	365	-10,567	2,6219	,034	-20,739	-,394
60	0	3,833	2,3451	1,000	-5,265	12,932
	15	1,133	2,3451	1,000	-7,965	10,232
	30	,133	2,3451	1,000	-8,965	9,232
	45	-,733	2,3451	1,000	-9,832	8,365
	80	,667	2,3451	1,000	-8,432	9,765
	95	-,367	2,3451	1,000	-9,465	8,732
	125	-2,333	2,3451	1,000	-11,432	6,765
	185	-4,567	2,3451	1,000	-13,665	4,532
	245	-6,533	2,3451	,693	-15,632	2,565
	305	-8,167	2,3451	,133	-17,265	,932
	365	-11,300	2,6219	,017	-21,473	-1,127
80	0	3,167	2,3451	1,000	-5,932	12,265
	15	,467	2,3451	1,000	-8,632	9,565
	30	-,533	2,3451	1,000	-9,632	8,565
	45	-1,400	2,3451	1,000	-10,499	7,699
	60	-,667	2,3451	1,000	-9,765	8,432
	95	-1,033	2,3451	1,000	-10,132	8,065
	125	-3,000	2,3451	1,000	-12,099	6,099
	185	-5,233	2,3451	1,000	-14,332	3,865
	245	-7,200	2,3451	,357	-16,299	1,899
	305	-8,833	2,3451	,066	-17,932	,265
	365	-11,967	2,6219	,009	-22,139	-1,794
95	0	4,200	2,3451	1,000	-4,899	13,299
	15	1,500	2,3451	1,000	-7,599	10,599
	30	,500	2,3451	1,000	-8,599	9,599
	45	-,367	2,3451	1,000	-9,465	8,732
	60	,367	2,3451	1,000	-8,732	9,465
	80	1,033	2,3451	1,000	-8,065	10,132
	125	-1,967	2,3451	1,000	-11,065	7,132
	185	-4,200	2,3451	1,000	-13,299	4,899

	245	-6,167	2,3451	,989	-15,265	2,932
	305	-7,800	2,3451	,194	-16,899	1,299
	365	-10,933	2,6219	,024	-21,106	-,761
125	0	6,167	2,3451	,989	-2,932	15,265
	15	3,467	2,3451	1,000	-5,632	12,565
	30	2,467	2,3451	1,000	-6,632	11,565
	45	1,600	2,3451	1,000	-7,499	10,699
	60	2,333	2,3451	1,000	-6,765	11,432
	80	3,000	2,3451	1,000	-6,099	12,099
	95	1,967	2,3451	1,000	-7,132	11,065
	185	-2,233	2,3451	1,000	-11,332	6,865
	245	-4,200	2,3451	1,000	-13,299	4,899
	305	-5,833	2,3451	1,000	-14,932	3,265
	365	-8,967	2,6219	,155	-19,139	1,206
185	0	8,400	2,3451	,104	-,699	17,499
	15	5,700	2,3451	1,000	-3,399	14,799
	30	4,700	2,3451	1,000	-4,399	13,799
	45	3,833	2,3451	1,000	-5,265	12,932
	60	4,567	2,3451	1,000	-4,532	13,665
	80	5,233	2,3451	1,000	-3,865	14,332
	95	4,200	2,3451	1,000	-4,899	13,299
	125	2,233	2,3451	1,000	-6,865	11,332
	245	-1,967	2,3451	1,000	-11,065	7,132
	305	-3,600	2,3451	1,000	-12,699	5,499
	365	-6,733	2,6219	1,000	-16,906	3,439
245	0	10,367	2,3451	,013	1,268	19,465
	15	7,667	2,3451	,222	-1,432	16,765
	30	6,667	2,3451	,608	-2,432	15,765
	45	5,800	2,3451	1,000	-3,299	14,899
	60	6,533	2,3451	,693	-2,565	15,632
	80	7,200	2,3451	,357	-1,899	16,299
	95	6,167	2,3451	,989	-2,932	15,265
	125	4,200	2,3451	1,000	-4,899	13,299
	185	1,967	2,3451	1,000	-7,132	11,065
	305	-1,633	2,3451	1,000	-10,732	7,465
	365	-4,767	2,6219	1,000	-14,939	5,406
305	0	12,000	2,3451	,002	2,901	21,099
	15	9,300	2,3451	,040	,201	18,399
	30	8,300	2,3451	,116	-,799	17,399
	45	7,433	2,3451	,282	-1,665	16,532
	60	8,167	2,3451	,133	-,932	17,265
	80	8,833	2,3451	,066	-,265	17,932
	95	7,800	2,3451	,194	-1,299	16,899
	125	5,833	2,3451	1,000	-3,265	14,932
	185	3,600	2,3451	1,000	-5,499	12,699
	245	1,633	2,3451	1,000	-7,465	10,732
	365	-3,133	2,6219	1,000	-13,306	7,039
365	0	15,133	2,6219	,000	4,961	25,306
	15	12,433	2,6219	,006	2,261	22,606
	30	11,433	2,6219	,015	1,261	21,606
	45	10,567	2,6219	,034	,394	20,739
	60	11,300	2,6219	,017	1,127	21,473
	80	11,967	2,6219	,009	1,794	22,139

		95	10,933	2,6219	,024	,761	21,106
		125	8,967	2,6219	,155	-1,206	19,139
		185	6,733	2,6219	1,000	-3,439	16,906
		245	4,767	2,6219	1,000	-5,406	14,939
		305	3,133	2,6219	1,000	-7,039	13,306
cLac(mmol/l)venös	0	15	1,300	2,3394	1,000	-7,777	10,377
		30	,633	2,3394	1,000	-8,443	9,710
		45	-,333	2,3394	1,000	-9,410	8,743
		60	,033	2,3394	1,000	-9,043	9,110
		80	1,300	2,3394	1,000	-7,777	10,377
		95	,367	2,3394	1,000	-8,710	9,443
		125	-1,333	2,3394	1,000	-10,410	7,743
		185	-3,567	2,3394	1,000	-12,643	5,510
		245	-5,733	2,3394	1,000	-14,810	3,343
		305	-7,167	2,3394	,363	-16,243	1,910
		365	-10,333	2,6155	,042	-20,481	-,185
	15	0	-1,300	2,3394	1,000	-10,377	7,777
		30	-,667	2,3394	1,000	-9,743	8,410
		45	-1,633	2,3394	1,000	-10,710	7,443
		60	-1,267	2,3394	1,000	-10,343	7,810
		80	,000	2,3394	1,000	-9,077	9,077
		95	-,933	2,3394	1,000	-10,010	8,143
		125	-2,633	2,3394	1,000	-11,710	6,443
		185	-4,867	2,3394	1,000	-13,943	4,210
		245	-7,033	2,3394	,415	-16,110	2,043
		305	-8,467	2,3394	,095	-17,543	,610
		365	-11,633	2,6155	,012	-21,781	-1,485
	30	0	-,633	2,3394	1,000	-9,710	8,443
		15	,667	2,3394	1,000	-8,410	9,743
		45	-,967	2,3394	1,000	-10,043	8,110
		60	-,600	2,3394	1,000	-9,677	8,477
		80	,667	2,3394	1,000	-8,410	9,743
		95	-,267	2,3394	1,000	-9,343	8,810
		125	-1,967	2,3394	1,000	-11,043	7,110
		185	-4,200	2,3394	1,000	-13,277	4,877
		245	-6,367	2,3394	,803	-15,443	2,710
		305	-7,800	2,3394	,190	-16,877	1,277
		365	-10,967	2,6155	,023	-21,115	-,819
	45	0	,333	2,3394	1,000	-8,743	9,410
		15	1,633	2,3394	1,000	-7,443	10,710
		30	,967	2,3394	1,000	-8,110	10,043
		60	,367	2,3394	1,000	-8,710	9,443
		80	1,633	2,3394	1,000	-7,443	10,710
		95	,700	2,3394	1,000	-8,377	9,777
		125	-1,000	2,3394	1,000	-10,077	8,077
		185	-3,233	2,3394	1,000	-12,310	5,843
		245	-5,400	2,3394	1,000	-14,477	3,677
		305	-6,833	2,3394	,507	-15,910	2,243
		365	-10,000	2,6155	,058	-20,148	,148
	60	0	-,033	2,3394	1,000	-9,110	9,043
		15	1,267	2,3394	1,000	-7,810	10,343
		30	,600	2,3394	1,000	-8,477	9,677
		45	-,367	2,3394	1,000	-9,443	8,710

	80	1,267	2,3394	1,000	-7,810	10,343
	95	,333	2,3394	1,000	-8,743	9,410
	125	-1,367	2,3394	1,000	-10,443	7,710
	185	-3,600	2,3394	1,000	-12,677	5,477
	245	-5,767	2,3394	1,000	-14,843	3,310
	305	-7,200	2,3394	,351	-16,277	1,877
	365	-10,367	2,6155	,041	-20,515	-,219
80	0	-1,300	2,3394	1,000	-10,377	7,777
	15	,000	2,3394	1,000	-9,077	9,077
	30	-,667	2,3394	1,000	-9,743	8,410
	45	-1,633	2,3394	1,000	-10,710	7,443
	60	-1,267	2,3394	1,000	-10,343	7,810
	95	-,933	2,3394	1,000	-10,010	8,143
	125	-2,633	2,3394	1,000	-11,710	6,443
	185	-4,867	2,3394	1,000	-13,943	4,210
	245	-7,033	2,3394	,415	-16,110	2,043
	305	-8,467	2,3394	,095	-17,543	,610
	365	-11,633	2,6155	,012	-21,781	-1,485
95	0	-,367	2,3394	1,000	-9,443	8,710
	15	,933	2,3394	1,000	-8,143	10,010
	30	,267	2,3394	1,000	-8,810	9,343
	45	-,700	2,3394	1,000	-9,777	8,377
	60	-,333	2,3394	1,000	-9,410	8,743
	80	,933	2,3394	1,000	-8,143	10,010
	125	-1,700	2,3394	1,000	-10,777	7,377
	185	-3,933	2,3394	1,000	-13,010	5,143
	245	-6,100	2,3394	1,000	-15,177	2,977
	305	-7,533	2,3394	,250	-16,610	1,543
	365	-10,700	2,6155	,030	-20,848	-,552
125	0	1,333	2,3394	1,000	-7,743	10,410
	15	2,633	2,3394	1,000	-6,443	11,710
	30	1,967	2,3394	1,000	-7,110	11,043
	45	1,000	2,3394	1,000	-8,077	10,077
	60	1,367	2,3394	1,000	-7,710	10,443
	80	2,633	2,3394	1,000	-6,443	11,710
	95	1,700	2,3394	1,000	-7,377	10,777
	185	-2,233	2,3394	1,000	-11,310	6,843
	245	-4,400	2,3394	1,000	-13,477	4,677
	305	-5,833	2,3394	1,000	-14,910	3,243
	365	-9,000	2,6155	,147	-19,148	1,148
185	0	3,567	2,3394	1,000	-5,510	12,643
	15	4,867	2,3394	1,000	-4,210	13,943
	30	4,200	2,3394	1,000	-4,877	13,277
	45	3,233	2,3394	1,000	-5,843	12,310
	60	3,600	2,3394	1,000	-5,477	12,677
	80	4,867	2,3394	1,000	-4,210	13,943
	95	3,933	2,3394	1,000	-5,143	13,010
	125	2,233	2,3394	1,000	-6,843	11,310
	245	-2,167	2,3394	1,000	-11,243	6,910
	305	-3,600	2,3394	1,000	-12,677	5,477
	365	-6,767	2,6155	1,000	-16,915	3,381
245	0	5,733	2,3394	1,000	-3,343	14,810
	15	7,033	2,3394	,415	-2,043	16,110

		30	6,367	2,3394	,803	-2,710	15,443
		45	5,400	2,3394	1,000	-3,677	14,477
		60	5,767	2,3394	1,000	-3,310	14,843
		80	7,033	2,3394	,415	-2,043	16,110
		95	6,100	2,3394	1,000	-2,977	15,177
		125	4,400	2,3394	1,000	-4,677	13,477
		185	2,167	2,3394	1,000	-6,910	11,243
		305	-1,433	2,3394	1,000	-10,510	7,643
		365	-4,600	2,6155	1,000	-14,748	5,548
	305	0	7,167	2,3394	,363	-1,910	16,243
		15	8,467	2,3394	,095	-,610	17,543
		30	7,800	2,3394	,190	-1,277	16,877
		45	6,833	2,3394	,507	-2,243	15,910
		60	7,200	2,3394	,351	-1,877	16,277
		80	8,467	2,3394	,095	-,610	17,543
		95	7,533	2,3394	,250	-1,543	16,610
		125	5,833	2,3394	1,000	-3,243	14,910
		185	3,600	2,3394	1,000	-5,477	12,677
		245	1,433	2,3394	1,000	-7,643	10,510
		365	-3,167	2,6155	1,000	-13,315	6,981
	365	0	10,333	2,6155	,042	,185	20,481
		15	11,633	2,6155	,012	1,485	21,781
		30	10,967	2,6155	,023	,819	21,115
		45	10,000	2,6155	,058	-,148	20,148
		60	10,367	2,6155	,041	,219	20,515
		80	11,633	2,6155	,012	1,485	21,781
		95	10,700	2,6155	,030	,552	20,848
		125	9,000	2,6155	,147	-1,148	19,148
		185	6,767	2,6155	1,000	-3,381	16,915
		245	4,600	2,6155	1,000	-5,548	14,748
		305	3,167	2,6155	1,000	-6,981	13,315
Perfusionsdruck(mbar)	0	15	-4,67	20,552	1,000	-84,41	75,07
		30	14,33	20,552	1,000	-65,41	94,07
		45	19,00	20,552	1,000	-60,74	98,74
		60	24,00	20,552	1,000	-55,74	103,74
		80	37,67	20,552	1,000	-42,07	117,41
		95	50,33	20,552	1,000	-29,41	130,07
		125	62,00	20,552	,405	-17,74	141,74
		185	79,00	20,552	,055	-,74	158,74
		245	81,33	20,552	,041	1,59	161,07
		305	81,67	20,552	,040	1,93	161,41
		365	82,67	22,978	,100	-6,49	171,82
	15	0	4,67	20,552	1,000	-75,07	84,41
		30	19,00	20,552	1,000	-60,74	98,74
		45	23,67	20,552	1,000	-56,07	103,41
		60	28,67	20,552	1,000	-51,07	108,41
		80	42,33	20,552	1,000	-37,41	122,07
		95	55,00	20,552	,890	-24,74	134,74
		125	66,67	20,552	,236	-13,07	146,41
		185	83,67	20,552	,031	3,93	163,41
		245	86,00	20,552	,023	6,26	165,74
		305	86,33	20,552	,023	6,59	166,07
		365	87,33	22,978	,061	-1,82	176,49

30	0	-14,33	20,552	1,000	-94,07	65,41
	15	-19,00	20,552	1,000	-98,74	60,74
	45	4,67	20,552	1,000	-75,07	84,41
	60	9,67	20,552	1,000	-70,07	89,41
	80	23,33	20,552	1,000	-56,41	103,07
	95	36,00	20,552	1,000	-43,74	115,74
	125	47,67	20,552	1,000	-32,07	127,41
	185	64,67	20,552	,298	-15,07	144,41
	245	67,00	20,552	,227	-12,74	146,74
	305	67,33	20,552	,219	-12,41	147,07
	365	68,33	22,978	,448	-20,82	157,49
45	0	-19,00	20,552	1,000	-98,74	60,74
	15	-23,67	20,552	1,000	-103,41	56,07
	30	-4,67	20,552	1,000	-84,41	75,07
	60	5,00	20,552	1,000	-74,74	84,74
	80	18,67	20,552	1,000	-61,07	98,41
	95	31,33	20,552	1,000	-48,41	111,07
	125	43,00	20,552	1,000	-36,74	122,74
	185	60,00	20,552	,509	-19,74	139,74
	245	62,33	20,552	,390	-17,41	142,07
	305	62,67	20,552	,376	-17,07	142,41
	365	63,67	22,978	,718	-25,49	152,82
60	0	-24,00	20,552	1,000	-103,74	55,74
	15	-28,67	20,552	1,000	-108,41	51,07
	30	-9,67	20,552	1,000	-89,41	70,07
	45	-5,00	20,552	1,000	-84,74	74,74
	80	13,67	20,552	1,000	-66,07	93,41
	95	26,33	20,552	1,000	-53,41	106,07
	125	38,00	20,552	1,000	-41,74	117,74
	185	55,00	20,552	,890	-24,74	134,74
	245	57,33	20,552	,687	-22,41	137,07
	305	57,67	20,552	,662	-22,07	137,41
	365	58,67	22,978	1,000	-30,49	147,82
80	0	-37,67	20,552	1,000	-117,41	42,07
	15	-42,33	20,552	1,000	-122,07	37,41
	30	-23,33	20,552	1,000	-103,07	56,41
	45	-18,67	20,552	1,000	-98,41	61,07
	60	-13,67	20,552	1,000	-93,41	66,07
	95	12,67	20,552	1,000	-67,07	92,41
	125	24,33	20,552	1,000	-55,41	104,07
	185	41,33	20,552	1,000	-38,41	121,07
	245	43,67	20,552	1,000	-36,07	123,41
	305	44,00	20,552	1,000	-35,74	123,74
	365	45,00	22,978	1,000	-44,15	134,15
95	0	-50,33	20,552	1,000	-130,07	29,41
	15	-55,00	20,552	,890	-134,74	24,74
	30	-36,00	20,552	1,000	-115,74	43,74
	45	-31,33	20,552	1,000	-111,07	48,41
	60	-26,33	20,552	1,000	-106,07	53,41
	80	-12,67	20,552	1,000	-92,41	67,07
	125	11,67	20,552	1,000	-68,07	91,41

	185	28,67	20,552	1,000	-51,07	108,41
	245	31,00	20,552	1,000	-48,74	110,74
	305	31,33	20,552	1,000	-48,41	111,07
	365	32,33	22,978	1,000	-56,82	121,49
125	0	-62,00	20,552	,405	-141,74	17,74
	15	-66,67	20,552	,236	-146,41	13,07
	30	-47,67	20,552	1,000	-127,41	32,07
	45	-43,00	20,552	1,000	-122,74	36,74
	60	-38,00	20,552	1,000	-117,74	41,74
	80	-24,33	20,552	1,000	-104,07	55,41
	95	-11,67	20,552	1,000	-91,41	68,07
	185	17,00	20,552	1,000	-62,74	96,74
	245	19,33	20,552	1,000	-60,41	99,07
	305	19,67	20,552	1,000	-60,07	99,41
	365	20,67	22,978	1,000	-68,49	109,82
185	0	-79,00	20,552	,055	-158,74	,74
	15	-83,67	20,552	,031	-163,41	-3,93
	30	-64,67	20,552	,298	-144,41	15,07
	45	-60,00	20,552	,509	-139,74	19,74
	60	-55,00	20,552	,890	-134,74	24,74
	80	-41,33	20,552	1,000	-121,07	38,41
	95	-28,67	20,552	1,000	-108,41	51,07
	125	-17,00	20,552	1,000	-96,74	62,74
	245	2,33	20,552	1,000	-77,41	82,07
	305	2,67	20,552	1,000	-77,07	82,41
	365	3,67	22,978	1,000	-85,49	92,82
245	0	-81,33	20,552	,041	-161,07	-1,59
	15	-86,00	20,552	,023	-165,74	-6,26
	30	-67,00	20,552	,227	-146,74	12,74
	45	-62,33	20,552	,390	-142,07	17,41
	60	-57,33	20,552	,687	-137,07	22,41
	80	-43,67	20,552	1,000	-123,41	36,07
	95	-31,00	20,552	1,000	-110,74	48,74
	125	-19,33	20,552	1,000	-99,07	60,41
	185	-2,33	20,552	1,000	-82,07	77,41
	305	,33	20,552	1,000	-79,41	80,07
	365	1,33	22,978	1,000	-87,82	90,49
305	0	-81,67	20,552	,040	-161,41	-1,93
	15	-86,33	20,552	,023	-166,07	-6,59
	30	-67,33	20,552	,219	-147,07	12,41
	45	-62,67	20,552	,376	-142,41	17,07
	60	-57,67	20,552	,662	-137,41	22,07
	80	-44,00	20,552	1,000	-123,74	35,74
	95	-31,33	20,552	1,000	-111,07	48,41
	125	-19,67	20,552	1,000	-99,41	60,07
	185	-2,67	20,552	1,000	-82,41	77,07
	245	-,33	20,552	1,000	-80,07	79,41
	365	1,00	22,978	1,000	-88,15	90,15
365	0	-82,67	22,978	,100	-171,82	6,49
	15	-87,33	22,978	,061	-176,49	1,82
	30	-68,33	22,978	,448	-157,49	20,82

45	-63,67	22,978	,718	-152,82	25,49
60	-58,67	22,978	1,000	-147,82	30,49
80	-45,00	22,978	1,000	-134,15	44,15
95	-32,33	22,978	1,000	-121,49	56,82
125	-20,67	22,978	1,000	-109,82	68,49
185	-3,67	22,978	1,000	-92,82	85,49
245	-1,33	22,978	1,000	-90,49	87,82
305	-1,00	22,978	1,000	-90,15	88,15

5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es nachzuweisen, ob fetales LDL den Gefäßtonus innerhalb der Plazenta beeinflussen kann. Dies wurde mit der Methode der dualen ex-vivo Plazentaperfusion untersucht.

In allen drei Versuchen ist der Perfusionsdruck zu Beginn sehr hoch, was aber laut Literatur im Normbereich für die Perfusionsexperimente ist. Der Druck sollte, laut Literatur, zwischen 70 und 100 mbar liegen (27). Das plazentare Gewebe hat eine Ischämieperiode von etwa 20 bis 30 Minuten hinter sich und muss sich nun zunächst an die Versuchsbedingungen anpassen. Diese Zeitspanne geht unter anderem mit dem Gerinnen des in den Blutgefäßen befindlichen Blutes einher, sodass möglicherweise zu Beginn der Perfusion kleinere Blutgerinnsel aus den Gefäßen gespült werden müssen. Solange sie sich in den Gefäßen befinden, stellen diese ein Hindernis für den ungestörten Fluss des Mediums dar, was sich in einem höheren Ausgangsdruck innerhalb der Gefäße auswirkt.

Der Druck verhält sich in allen drei Versuchen in den drei Phasen des Experiments ähnlich und die Tendenz ist grundsätzlich sinkend. Die Konditionierungsphase gestaltet sich relativ konstant. Auffällig ist die dritte Perfusion, die zwar niedrige Ausgangsdruckwerte von durchschnittlich 51,80 mbar zeigt, diese aber kaum schwanken (Tabelle 9). Hier liegt der Gefäßtonus deutlich unter dem Normbereich von 100 mbar. Mit dem Wechsel des Perfusionsmediums auf das LDL-enhaltende Medium beginnt die nächste zeitlich abgrenzbare Phase. Diese ist durch einen weiteren signifikant stärkeren Druckabfall pro Zeiteinheit gekennzeichnet. Die Drücke fallen in allen drei Versuchen unter den durchschnittlichen Wert der Konditionierungsphase. Zuletzt ist eine Phase zu beobachten, in der die Lipoproteine auf die Gefäße zu wirken scheinen. Das wiederum bewirkt einen signifikanten Druckabfall, der in allen drei Versuchen in der 125. Minute beginnt. Schließlich liegen die Perfusionsdruckwerte bei alle drei Perfusionen nur noch bei 2 bis 4 mbar (Tabelle 6, 8 und 10).

Da in den Versuchen besonders streng darauf geachtet wurde, dass kein Volumenverlust aufgrund von Undichtigkeiten innerhalb des Versuchsaufbaus oder im Plazentakotyledon vorliegt, kann man auf einen vasodilatatorischen Effekt des perfundierten LDLs schließen.

Der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) muss differenziert für den arteriellen und venösen Schenkel betrachtet werden. Der Verlauf der pO_2 -Kurve lässt sich ebenfalls in die drei verschiedenen zeitlichen Fenster einteilen. Zu Beginn der Versuche ist der arterielle pO_2 recht hoch, er liegt bei etwa 180 mmHg. Er fällt innerhalb der ersten 45 Minuten stark ab, um dann, nach Wechsel des Perfusionsmediums auf das frische, fluoreszenzmarkierte LDL enthaltende Perfusionsmedium, zunächst wieder ein wenig anzusteigen als Folge von im frischen Medium gelösten Sauerstoffs. Mit Fortschreiten des Experiments sinkt der pO_2 wieder, da auch der frisch hinzugekommene Sauerstoff verbraucht wird. Nach Mediumwechsel sinkt der pO_2 nicht mehr so stark wie vorher und pendelt sich dann auf einem Wert ein, der um die 80 mmHg liegt (Tabelle 6, 8 und 10). Auffällig ist zudem, dass der Perfusionsdruck bei jeder arteriellen Probenabnahme kurzzeitig ansteigt, da die erzeugten Druckschwankungen die fetale Zirkulation betreffen (Abbildungen 24, 30 und 40). Sind wieder normale Druckverhältnisse hergestellt, sinkt der Wert auf seinen Ausgangswert vor der Probenentnahme ab.

Venös liegt der Ausgangswert des pO_2 wesentlich tiefer bei etwa 70 mmHg. Das liegt daran, dass im venösen Schenkel der Sauerstoff bereits durch Stoffwechselprozesse verbraucht wurde. Sobald in der Konditionierungsphase mit Sauerstoff gesättigtes Medium die venöse Seite erreicht steigt der Wert hier, im Gegensatz zum arteriellen Wert, ein wenig an. Dieser Anstieg des pO_2 bleibt aber im Verhältnis wesentlich geringer als das Sinken des arteriellen pO_2 . Zum Zeitpunkt des Umsteckens auf das frische fluoreszenzmarkierte Medium erreicht allerdings auch der venöse pO_2 Wert einen Tiefpunkt, um dann zunächst wieder ein wenig anzusteigen. Schließlich sinkt auch der venöse pO_2 kontinuierlich ab, bleibt dabei stets etwa 20 mmHg unterhalb des arteriellen pO_2 -Wertes und pendelt sich bei etwa 60 mmHg ein (Tabelle 6, 8 und 10). Der Literatur nach sollten arterieller und venöser pO_2 im Bereich von 75-100 mmHg liegen (27). Über die gesamte Versuchsdauer betrachtet erfüllt das im Wesentlichen nur der arterielle pO_2 , der venöse pO_2 , besonders während der zweiten Perfusion, erreicht diese Werte kaum. Auch soll eine venös-arterielle Differenz bestehen, das heißt, der venöse pO_2 sollte höher sein als der arterielle. In den vorliegenden Experimenten ist aber eine genau gegenteilige arteriell-venöse Differenz zu beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass die Sauerstoffsättigung und der Partialdruck aus dem Medium wirken.

Das schnelle Absinken des arteriellen pO_2 lässt darauf schließen, dass das Gewebe versucht den Sauerstoffmangel, der während der Ischämieperiode auftritt, auszugleichen, indem es dem Medium schnell viel Sauerstoff entzieht bzw. indem zu Beginn viel Sauerstoff, aufgrund des geringeren pO_2 innerhalb des Gewebes, vermehrt aus den Gefäßen dorthin diffundiert. Der auffällige pO_2 -Peak zum Zeitpunkt des Umsteckens auf das fluoreszenzmarkierte Medium ist auf dessen höheren Sauerstoffgehalt zurückzuführen. Es handelt sich um frisches, unverbrauchtes Medium, welches somit noch einen höheren Sauerstoffgehalt hat, als das Medium, welches bereits seit 60 Minuten im Versuchskreislauf zirkuliert. Deswegen kann zu Beginn wieder mehr Sauerstoff aus dem Gefäß in das Plazentagewebe diffundieren.

Auch der Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) wird arteriell und venös einzeln betrachtet und bewertet. Erst einmal fällt auf, dass der pCO_2 venös höher ist als arteriell. Zu Beginn des Experiments ist der pCO_2 venös sehr hoch, er liegt bei etwa 70 mmHg. Dieser hohe Ausgangswert hängt wahrscheinlich mit dem Sauerstoffmangel während der Ischämiezeit zusammen. Der restliche im Gewebe vorhandene Sauerstoff wird verbraucht und das produzierte Kohlendioxid bleibt zurück, da es nicht abtransportiert werden kann. Mit der schnellen Sauerstoffaufnahme in den ersten 15 Minuten fällt auch der pCO_2 , da nun auch das Kohlendioxid wieder abgegeben und abtransportiert werden kann.

Der pCO_2 pendelt sich recht schnell ein und liegt venös um die 45 mmHg mit einer Spanne von ± 5 mmHg. Der arterielle pCO_2 -Wert liegt durchschnittlich 10 mmHg unter dem venösen Wert (Tabelle 6, 8 und 10).

Im Gegensatz zur Probenabnahme aus dem arteriellen Schenkel reagiert der Perfusionsdruck zum Zeitpunkt der Abnahme aus dem venösen Schenkel nicht mit einem Anstieg des Perfusionsdrucks, sondern bleibt gleich. Bei der venösen Probenabnahme wirken die Druckschwankungen auf die Plazenta, diese kann kurzzeitig adaptieren, so dass es zu keinen Druckschwankungen innerhalb der Zirkulation kommt.

Die Laktatkonzentration ist in allen Experimenten zu Beginn sowohl arteriell als auch venös niedrig, arteriell sogar fast vernachlässigbar gering. In der Konditionierungsphase steigt sie zunächst ein wenig an, um dann nach dem

Wechsel des Perfusionsmediums wieder leicht abzufallen. In der weiteren Folge während der Perfusion mit fluoreszenzmarkiertem LDL steigt die Laktatkonzentration dann aber fast linear an, wobei sich arterielle und venöse Werte kaum voneinander unterscheiden. Der Mittelwert des letzten gemessenen Wertes zu Perfusionsende arteriell und venös liegt bei 15,4 und 15,5 mmol/l (Tabelle 6, 8 und 10). Die Laktatkonzentration trägt zu Versuchsende in signifikantem Maße zur Azidität des Perfusionsmediums bei. Desweiteren handelt es sich bei den Laktatwerten um kumulierte Werte, da die Perfusion in einer geschlossenen Zirkulation erfolgt.

Erwähnt werden muss, dass in den vorliegenden Versuchen die fetale Zirkulation nicht, wie in der Literatur empfohlen (27), mit N₂ begast wurde. Die Begasung hat zur Folge, dass der pO₂ im physiologischen Bereich des Feten gehalten wird. Das Fehlen des zusätzlich eingebrachten N₂ in die fetale Zirkulation macht sich im schnellen Anstieg der Laktatkonzentration mit Beginn der LDL-Perfusion bemerkbar. Laktat wird bei Stoffwechselprozessen produziert, die durch den Zusatz von LDL in das Perfusionsmedium verstärkt werden.

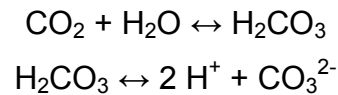
Mit Wechsel von der Konditionierungsphase in die Hauptphase des Versuchs, also von reinem Perfusionsmedium auf Perfusionsmedium mit zugesetztem LDL, kann man schließlich einen fast linearen Anstieg der Laktatkonzentration beobachten.

Der pH-Wert zeigt in allen Experimenten einen gleichförmigen Verlauf. Über die Versuchsdauer fällt er sowohl arteriell als auch venös, mit jeweils einer Ausnahme zum Zeitpunkt des Wechsels auf das fluoreszenzmarkierte Medium, ab.

Im arteriellen Schenkel ist ein stärkerer Abfall zu verzeichnen, da er von Anfang an sinkt. Im venösen Schenkel bewirkt die Sauerstoffaufnahme zu Beginn der Perfusion zunächst sogar einen Anstieg des pH-Wertes. Bis Minute 45 des Experiments sinkt der pH-Wert dann langsam ab um nach Wechsel des Perfusionsmediums erneut anzusteigen um schließlich sowohl arteriell als auch venös abzufallen (Tabelle 6, 8 und 10). Das Sinken des pH-Wertes ist sowohl mit den Ergebnissen der pO₂- als auch der pCO₂-Auswertung im Verlauf des Experiments vereinbar. Ein Sinken des pO₂ bzw. Steigen des pCO₂ bewirkt einen pH-Wert-Abfall.

Das liegt daran, dass Kohlendioxid in wässriger Lösung zu Kohlensäure reagiert und diese weiter zu H⁺- und CO₃²⁻ dissoziiert. Da nun weiterhin der pH-Wert den

negativen dekadischen Logarithmus der H^+ -Ionen-Konzentration in einer Lösung darstellt, ist der Zusammenhang zwischen hohem pCO_2 und niedrigem pH-Wert erklärt.



$$pH = -\log [H^+]$$

Ergänzend kommt hinzu, dass durch die Stoffwechselvorgänge innerhalb der Plazenta, Laktat produziert wird. Dieses hat ebenfalls einen Einfluss auf den pH-Wert. Je höher die Laktatkonzentration innerhalb des Mediums, desto niedriger dessen pH-Wert. Abschließend ist zum pH-Wert zu sagen, dass er mit den Angaben aus der Literatur weitestgehend übereinstimmt. Er soll sich im Bereich zwischen 7,2 und 7,4 bewegen, wo er sich größtenteils befindet.(27)

Die Perfusionen Nr.1 und Nr.2 wurden ausschließlich mit fetalem LDL perfundiert, dem Perfusionsmedium der Perfusion Nr.3 wurde zusätzlich noch adultes LDL zugesetzt. Die Konzentrationen des zugesetzten Lipoproteins betrugen jeweils 25 $\mu g/ml$. Arteriell und venös gibt es wenig Unterschiede in der Betrachtung der Fluoreszenz, allerdings ist diese über die Versuchsdauer nicht homogen. Das Perfusionsmedium setzt sich aus verschiedensten Komponenten zusammen und ist als Matrix sehr störanfällig. Zum einen wurden die Proben der verschiedenen Versuche unterschiedlich behandelt (siehe Kapitel 4 - Beschreibung der Perfusionsergebnisse), so dass in den nicht zentrifugierten Proben z.B. Endothelrückstände als Schwebstoffe die Fluoreszenz stören können. Zum anderen kann man nicht sagen, ob die Fluoreszenzmarkierung bei jedem Versuch gleichmäßig am Lipoprotein verbleibt, oder sich löst und möglicherweise an Enzyme oder ähnliche Substanzen anlagert.

Die Fluoreszenzergebnisse der zweiten Perfusion sind ab der 120. Minute der LDL-Perfusion nicht sinnvoll interpretierbar. Es ist weder ein Trend erkennbar noch eine sinnvolle Erklärung für die Entwicklung der Werte denkbar.

Betrachtet man Perfusionsdruck und Fluoreszenzergebnisse im Zusammenhang, so kann man sagen, dass der Abfall des Perfusionsdrucks nicht über die

Fluoreszenz erklärt werden kann. Die Markierung als chemisches Molekül ist nicht für den Druckabfall verantwortlich, da diese annähernd gleich bleibt, also nicht verbraucht wird. Diese Tatsache würde wiederum für einen vasodilatatorischen Effekt des LDLs sprechen.

Schließlich ist ein ähnlicher Effekt wie bei HDL denkbar, da sowohl fetales als auch adultes LDL, wie aus der dritten Perfusion erkennbar wird, den gleichen Effekt auf das plazentare Endothel zu haben scheint. Der Druckabfall erfolgt sehr schnell und in allen drei Versuchen recht verlässlich um die 30. Minute der Hauptphase des Versuchs (Tabelle 6, 8 und 10). Somit ist zu erwägen, dass über einen ähnlichen Weg, wie es HDL ermöglicht, LDL schließlich über die Freisetzung von endothelialer NO-Synthetase vasodilatatorisch auf den Gefäßtonus wirkt.

Der T-Test geht davon aus, dass die benutzten Daten einer Normalverteilung folgen und zeigt, dass über alle Perfusionen die Daten in den einzelnen untersuchten Gruppen miteinander korrelieren. Für alle vier miteinander verglichenen Paare ist ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Es wurden jeweils O₂, CO₂, Laktat und pH-Wert arteriell und venös miteinander gepaart. Dass diese Werte einen signifikanten Unterschied zeigen, ist somit nachvollziehbar und bestätigt die Richtigkeit der Daten.

Im Bonferroni-Test wurde die Veränderung bestimmter Werte im Zeitverlauf des Experiments gegen einen konstant gehaltenen Wert analysiert. Die signifikant veränderten Werte ($p < 0,05$) sind aufgrund der Fülle der Daten zur besseren Kenntlichkeit grau hinterlegt und fett markiert (Tabelle 16).

Der pO₂ verändert sich im Verlauf signifikant, solange die Perfusion konstant läuft. Nicht zum Beispiel zum Zeitpunkt des Mediumwechsels. Dieses Ergebnis auf der Analyse korreliert nun auch mit den erfassten Werten aus der Probenanalyse. Über die Zeit nimmt der pO₂ kontinuierlich ab, um zum Zeitpunkt des Mediumwechsels aufgrund des frischen Mediums wieder anzusteigen und in der Folge wieder kontinuierlich zu sinken.

Laut der Analyse verändert sich der Wert für das Laktat über die Zeit erst zum Perfusionsende signifikant.

Zum Perfusionsdruck ist zu sagen, dass sich dieser erst Wechsel des Perfusionsmediums auf das LDL-enthaltende Medium signifikant ändert.

6 Literaturverzeichnis

1. Pschyrembel W. Klinisches Wörterbuch: Mit klinischen Syndromen. 261., neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Berlin etc.: de Gruyter; 2007.
2. Datei: Blastozyste.svg – Wikipedia [zitiert am 09.09.2011].
URL:<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fd/Blastozyste.svg?uselang=de>.
3. Sadler TW, Langman J, Drews U. Medizinische Embryologie: Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. 10., korrigierte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2003.
4. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 2., komplett überarb. Stuttgart: Thieme; 2006.
5. Waldeyer A, Fanghänel J. Waldeyer Anatomie des Menschen: [Lehrbuch und Atlas in einem Band]. 18th ed. Berlin: de Gruyter; 2009.
6. Plazenta um den vierten Monat – [zitiert am 09.09.2011]
URL:<http://www.embryology.ch/allemand/fplacenta/villosite01.html>.
7. Datei:Plazenta.png – Wikipedia [zitiert am 09.09.2011]
URL:<http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Plazenta.png&filetimestamp=20070123210806>.
8. Moore KL, Persaud TVN, Viebahn C. Embryologie: Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik. 5th ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2007.
9. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R. Pathology of the Human Placenta. 5th ed. New York, NY: Springer Science+Business Media, Inc; 2006.
10. Klink R, Silbernagl S, Bauer C. Lehrbuch der Physiologie: 55 Tabellen., 4., korrigierte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2003.
11. Fetalen Kreislauf – [zitiert am 09.09.2011] URL:<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/heyne-claudia-2004-01-23/HTML/chapter2.html>.
12. Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schneider KM, Schultze-Mosgau A, Weiss JM. Gynäkologie und Geburtshilfe; 2007.
13. Horn F, Helferich S, Dospil A. Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium ; [Klinik, Stoffwechsel, Zellbiologie, Molekularbiologie, Signaltransduktion, Chemie]. 3., grundlegend überarb. und erw. Stuttgart: Thieme; 2005.

14. Voet D, Voet JG, Pratt CW, Beck-Sickinger A. Lehrbuch der Biochemie. Weinheim: Wiley-VCH; 2002.
15. Cholesterin – [zitiert am 09.09.2011]
URL:<http://www.namensreaktionen.de/cholesterin.html>.
16. Laura A. Woollett. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation; 2005. [zitiert am 09.09.2011] URL:<http://www.ajcn.org>.
17. Datei:Acetyl-CoA.svg. – Wikipedia [zitiert am 09.09.2011]
URL:<http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Acetyl-CoA.svg&filetimestamp=20070420232842>.
18. Datei:Cholesterinester.svg. – Wikipedia [zitiert am 09.09.2011] URL:
<http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Cholesterinester.svg>.
19. Lipoprotein. [zitiert am 09.09.2011] URL:
http://homepage.smc.edu/wissmann_paul/anatomy2textbook/1cholesterol.html.
Irene Cetin GAMC. Long chain fatty acids and dietary fats in fetal nutrition. In: The Journal of Physiology Available from: URL:www.jp.physoc.org.
20. Irene Cetin GAMC. Long chain fatty acids and dietary fats in fetal nutrition. In: The Journal of Physiology Available from:
URL:<http://jp.physoc.org/content/587/14/3441.full.pdf+html> .
21. Datei:Human placenta baby side.jpg. [zitiert am 09.09.2011]
URL:http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Human_placenta_baby_side.jpg&filetimestamp=20051110175625.
22. PD-10 Desalting Columns. [zitiert am 12.09.2011] URL:
[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/689F675DA7323088C1257628001CCFF3/\\$file/52130800BB.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/689F675DA7323088C1257628001CCFF3/$file/52130800BB.pdf).
23. PD-10 Desalting Columns.[zitiert am 09.09.2011]
URL:<http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/Products?OpenDocument&parentid=42273&moduleid=42278&zone=Labsep>.
24. Alexa Fluor 568 Carboxylsäure-Succinimidylester. [zitiert am 09.09.2011] URL:
<http://probes.invitrogen.com/media/structure/3633.jpg>.
25. Alexa Fluor® 568 Protein Labeling Kit. [zitiert am 12.09.2011]
URL:<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp10238.pdf>.
26. Line Mathiesen et al. Quality assessment of a placental perfusion protocol. In: Reproductive Toxicology 30 (2010) 138-146

27. Schneider H, Huch A. Dual in vitro perfusion of an isolated lobe of human placenta: method and instrumentation: Contrib Gynecol Obstet 1985; 13: 40-7.
28. T-Test. [zitiert am 09.09.2011] URL:
http://www.mitp.de/imperia/md/content/vmi/1634/1634_kapitel_20.pdf.
29. Varianzanalyse. [zitiert am 09.09.2011] URL: http://user.uni-frankfurt.de/~cswerner/multivariate/anova_manova.pdf.
30. [zitiert am 09.09.2011]
URL: <http://www.statsoft.de/glossary/P/PosthocComparisons.htm>.