

Diplomarbeit

**Transplazentarer Transfer von fetalem HDL-
Cholesterin in der „ex vivo“ Plazentaperfusion**

eingereicht von

Frank Manasek

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Universitätsklinikum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

unter der Anleitung von

Ass.-Prof. Dr. Christian Wadsack

Ort, Datum

(Unterschrift)

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

Unterschrift

Zusammenfassung

Das Verstehen des Zusammenwirkens Mutter – Plazenta und ungeborenes Kind stellt für die Grundlagenforschung eine große Herausforderung dar. Vor allem die Interaktionen, Transport- und Austauschvorgänge zwischen mütterlicher und fetaler Seite über die Plazentaschranke sind für Mediziner, Forscher, aber auch für die Pharmakologen auf molekularer Ebene von großem Interesse. Die duale „*ex vivo*“ Methode der Plazentaperfusion ist hierbei die beste ethisch vertretbare Labormethode, um diese Vorgänge möglichst lebensnah und aussagekräftig zu untersuchen. Dabei wird sowohl die mütterliche, als auch die fetale Seite des Plazentakreislaufes mit einem Nährmedium perfundiert und eine zu untersuchende Substanz bekannter Konzentration hinzugefügt und anschließend ihre Verteilung in beiden Kompartimenten gemessen. In dieser Studie, in der nur die fetale Zirkulation der Plazenta perfundiert wurde, wurde das fetale HDL (high-density-lipoprotein), das bei gewissen Krankheiten der Schwangerschaft, wie zum Beispiel Präeklampsie, HELLP-Syndrom (hypertensive Störung mit Hämolyse, erhöhten Leberenzymen und niedriger Thrombozytenzahl) oder Diabetes, wichtige antioxidative und antiinflammatorische Funktionen im fetalen Stoffwechsel übernimmt, näher untersucht. Ausgelöst durch oxidativen Stress kann das fetale HDL durch das Enzym Myeloperoxidase, welches im Blut bei inflammatorischen Prozessen erhöht nachweisbar ist, oxidiert werden, wodurch es dysfunktional auf das fetale Gefäßsystem wirkt.

Die Hypothese, die aufgestellt und bearbeitet wurde, war, dass das fetale oxidierte HDL veränderte Eigenschaften in Bezug auf den fetalen Stoffwechsel aufweist. Die wesentliche Frage war, ob das oxidierte, d.h. pathophysiologische HDL aus der fetalen Zirkulation schneller aus der Plazenta entfernt werden kann (=Clearance), als im Vergleich zum physiologisch vorkommenden HDL. Diese Hypothese wurde verifiziert, nachdem für das oxidierte HDL eine deutlich raschere Clearance nachgewiesen werden konnte. Diese rasche Abnahme an pathophysiologischen HDL in der fetalen Zirkulation kann als „Schutzmechanismus“ des Fötus interpretiert werden und ist durch eine höhere Ligandenaffinität des oxidierten HDL an den Rezeptoren des plazento-fetalen Endothels erklärbar.

Abstract

To understand the cooperating mechanisms between the mother, placenta and the unborn child is a major challenge for basic medical research. Especially interactions, transport- and exchange-procedures between fetal and maternal side over the placental barrier is of great interest for physicians, researchers and on a molecular level even for pharmacists. The dual “*ex vivo*” method of placental perfusion is the most ethically justifiable lab-method, that provides the best chance of a lifelike and reproductive result. This model includes the perfusion of the fetal and maternal circulation with a nutrient solution and a substance of interest of known concentration. The distribution of this substance is then measured in both compartments. In this perfusion-study, where just the fetal circulation of the placenta was being perfused, HDL (high-density-lipoprotein), having important antioxidative and anti-inflammatory functions in some pregnancy-related diseases like diabetes, pre-eclampsia or HELLP-Syndrome (= abbreviation for *Hemolysis, Elevated Liver-enzymes, Low Platelet Count*), was subjected to a closer examination. Oxidative stress, caused by the enzyme myeloperoxidase, detectable in increased concentrations during inflammatory processes, can oxidize HDL, which has a dysfunctional effect on the fetal vascular system.

The prepared hypothesis was that fetal oxidized HDL would show different characteristics regarding the fetal metabolism. The main question was whether oxidized HDL would experience a faster removal from the fetal circulation by the placenta (= clearance) than the physiologically occurring HDL. That hypothesis was verified after a quicker clearance for oxidized HDL could be proved. That can be interpreted as a mechanism of protection of the fetus, which was explained by a higher ligand-affinity of the oxidized HDL to the receptors of the placental-fetal endothelium.

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

Zusammenfassung	ii
Abstract	iii
Inhaltsverzeichnis	iv
Abkürzungen	vi
Abbildungsverzeichnis.....	vii
Tabellenverzeichnis.....	ix
1 Einleitung	10
1.1 Fragestellung	10
1.2 Hypothese	11
1.3 Die Plazenta.....	12
1.3.1 Aufbau der menschlichen Plazenta	12
1.3.2 Aufgaben und Funktionen der Plazenta.....	15
1.4 Lipoproteine in der Schwangerschaft	17
1.4.1 Funktionen der Lipoproteine in der Schwangerschaft.....	17
1.4.2 Veränderungen des Lipoproteinhaushalts in der Schwangerschaft..	19
1.5 High-Density-Lipoprotein (HDL)	20
1.5.1 Funktionen des fetalen HDL	20
1.5.2 Unterschiede zwischen fetalem und adultem HDL	21
1.5.3 Oxidiertes HDL	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Material	22
2.1.1 Perfusionsmedium	22
2.1.2 Alexa Fluor® 568 bzw. 488 Protein Markierung	23
2.1.3 Isolierung und Messung von fetalem HDL	24
2.2 Präparation der Plazenta und Versuchsaufbau.....	24
2.2.1 Ein-/Ausschlusskriterien der Plazenten	28
2.3 Probenauswertung	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Versuchsauswahl	30
3.2 Auswertung	30
3.2.1 Perfusionsdruck – Überblick	31

3.2.2	Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks während der Perfusion	38
3.2.3	Verlauf des Kohlendioxidpartialdruckes während der Perfusion	42
3.2.4	Verlauf des pH-Werts während der Perfusion	46
3.2.5	Verlauf des Lactat-Wertes während der Perfusion	49
3.2.6	Vergleich der Clearance des arteriellen und venösen oxidierten HDL.....	52
3.2.7	Vergleich der Clearance von nativem und oxidiertem HDL	53
3.2.8	Vergleich der absoluten Fluoreszenzkonzentrationen von nativem und oxidiertem HDL	59
4	Diskussion.....	61
5	Literaturverzeichnis	64

Abkürzungen

A./Aa = Arteria/Arteriae

a.u. = apparatus units

ABCA = ATP-binding cassette transporter

ApoA/E = Apolipoprotein A/E

Clearance = Entfernen von Substanzen aus einem Kreislauf

$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ = Gramm pro Kubikzentimeter

d.h. = das heißt

ΔpH = pH-Wert-Änderung

HDL = High Density Lipoprotein

l = Liter

kDa = Kilodalton

LDL = Low Density Lipoprotein

M = Molar [mol/l]

mg = Milligramm

ml = Milliliter

mmol/l = Millimol pro Liter

MPO = Myeloperoxidase

MW = Molecular weight = Molekulargewicht

nm = Nanometer

PBS = Phosphat Buffered Saline = Phosphat-Puffer in Kochsalzlösung

pCO_2 = Kohlenstoffdioxidpartialdruck

pO_2 = Sauerstoffpartialdruck

rpm = Rounds per Minute

SSW = Schwangerschaftswoche

t = Zeitpunkt

μg = Mikrogramm

μl = Mikroliter

V./Vv = Vena/Venae

VLDL = Very Low Density Lipoprotein

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Morphologischer Aufbau der humanen Plazenta mit Verteilung der Gefäße	12
Abbildung 2 – (A): Korrelation von Plazentagewicht (Placental weight) und logarithmischer Triglyceridkonzentration (Fetal log TG); (B): Korrelation von mütterlichem Cholesterin (Maternal cholesterol) und fetalem HDL	19
Abbildung 3 – Alexa Absorptionsmaxima	23
Abbildung 4 – Maternale Seite der oberflächlich intakten Plazenta mit Thrombenauflagerungen	25
Abbildung 5 – Schematische Darstellung der Plazentaperfusion (geschlossener Kreislauf)	27
Grafik 1 – Versuch 1 Perfusionsdrücke	33
Grafik 2 – Versuch 2 Perfusionsdrücke	34
Grafik 3 – Versuch 3 Perfusionsdrücke	35
Grafik 4 – Versuch 4 Perfusionsdrücke	36
Grafik 5 – Versuch 5 Perfusionsdrücke	37
Grafik 6 – Versuch 1: pO_2 -Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck.....	39
Grafik 7 – Versuch 2: pO_2 -Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck.....	40
Grafik 8 – Versuch 3: pO_2 -Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck.....	40
Grafik 9 – Versuch 4: pO_2 -Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck.....	41
Grafik 10 – Versuch 5: pO_2 -Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck.....	41
Grafik 11 – Versuch 1: pCO_2 -Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck.....	43
Grafik 12 – Versuch 2: pCO_2 -Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck.....	44
Grafik 13 – Versuch 3: pCO_2 -Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck.....	44

Grafik 14 – Versuch 4: pCO ₂ -Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck.....	45
Grafik 15 – Versuch 5: pCO ₂ -Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck.....	45
Grafik 16 – Versuch 1: pH-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit	47
Grafik 17 – Versuch 2: pH-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit	47
Grafik 18 – Versuch 3: pH-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit	48
Grafik 19 – Versuch 4: pH-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit	48
Grafik 20 – Versuch 5: pH-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit	49
Grafik 21 – Versuch 1: Lactat-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit	50
Grafik 22 – Versuch 2: Lactat-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit	50
Grafik 23 – Versuch 3: Lactat-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit	51
Grafik 24 – Versuch 4: Lactat-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit	51
Grafik 25 – Versuch 5: Lactat-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit	52
Grafik 26 – Versuch 1: Vergleich der arteriellen und venösen Clearance des oxidierten HDL.....	53
Grafik 27 – Versuch 2: Vergleich der arteriellen und venösen Clearance des oxidierten HDL.....	53
Grafik 28 – Versuch 3: Arterielle Clearance des nativen und oxidierten HDL.	56
Grafik 29 – Versuch 3: Venöse Clearance des nativen und oxidierten HDL.	56
Grafik 30 – Versuch 4: Arterielle Clearance des nativen und oxidierten HDL.	57
Grafik 31 – Versuch 4: Venöse Clearance des nativen und oxidierten HDL.	57
Grafik 32 – Versuch 5: Arterielle Clearance des nativen und oxidierten HDL.	58
Grafik 33 – Versuch 5: Venöses Clearance des nativen und oxidierten HDL.....	58
Grafik 34 – Versuche 1-5: Vergleichende Darstellung von nativem und oxidiertem HDL	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Plazenta als Multiorgansystem	15
Tabelle 2 – Unterschiedliche Austauschfunktionen der humanen Plazenta	16
Tabelle 3 – Einteilung der Lipoproteine nach Dichte, Durchmesser, Masse und Apolipoproteinen	18
Tabelle 4 – Zusammensetzung des Earl's Puffer	22
Tabelle 5 – Zusammensetzung der Perfusionslösung.....	22

1 Einleitung

Die Plazenta (auch Mutterkuchen) hat zahlreiche Aufgaben, die die Entwicklung und das Überleben des menschlichen Kindes garantieren. Zu diesem Zweck übernimmt sie für das sich im Uterus entwickelnde Kind über eine bestimmte Zeit die Funktion von Lungen, Nieren, Darm, Leber und Haut. Insbesondere der Austausch von Substanzen und Gasen zwischen Mutter und dem Ungeborenen zählt zu den Hauptaufgaben des Organs Plazenta[1].

1.1 Fragestellung

Die Austauschvorgänge zwischen Mutter und Ungeborenem in der Schwangerschaft sind Bereiche der Medizin, die bislang wenig erschlossen und erforscht sind. Dabei ist es gerade in der Schwangerschaft für den behandelnden Mediziner von Interesse zu wissen, welche Arzneimittel bzw. auch körpereigenen Substanzen, sowohl physiologischen als auch pathologischen Ursprungs, in der Lage sind die Mutterkind-Barriere, d.h. die Plazentaschranke zu überwinden. Um dies quantitativ zu erfassen, gibt es verschiedene Möglichkeiten, die allerdings oftmals eine nur beschränkte Aussagekraft besitzen, oder andererseits ethisch nicht vertretbar sind.

So ist es zum Beispiel nicht möglich die tatsächliche Verteilung einer Testsubstanz, nach Applikation in den mütterlichen Blutstrom, im fetalen Kreislauf zu messen, da dies, um an Proben zu gelangen, invasiv geschehen müsste, was sowohl Kind, als auch Mutter schaden könnte. Dies wäre zwar die genaueste Testvariante, um die Kinetik eines Medikaments - bezogen auf die Plazentagängigkeit - zu bestimmen, jedoch ist sie aufgrund der Gefährdung von Mutter und Kind ethisch untragbar. Eine andere naheliegende Möglichkeit ist die Erforschung an Tieren, durch die man Rückschlüsse auf die menschliche Plazenta ziehen kann. Auch hier findet sich aber ein unüberwindbares Problem, denn die Plazenta ist das „Spezies-spezifischste Organ der Säugetiere“ [2], und Plazentastudien an Tieren daher kaum auf den Mensch übertragbar.

In Vitro-Studien, wie beispielsweise an Zellkulturen von Plazentagewebe und -gefäßen, können nur Aussagen über den kleinen untersuchten Bereich selbst treffen (spezifische Transfermechanismen, aktiver Transport von Substanzen

etc.). Aufgrund des Fehlens von Blutfluss und anatomischer Integrität [2] ist die Aussagekraft jedoch sehr limitiert.

Schlussendlich gibt es noch die duale Perfusion der Plazenta außerhalb des Körpers („*ex vivo*“) nach Geburtsende. Ethisch ist dies unbedenklich, da die Plazenta nach der Geburt, als medizinisches Abfallprodukt gilt und in der Regel verworfen wird. Dieser Methode wird die größte Vorhersagbarkeit für den plazentaren Transfer von Substanzen und die damit möglicherweise zusammenhängende fetale Belastung zugesprochen.

Nicht nur exogen der Mutter zugeführte Substanzen können einen schädigenden Einfluss auf das Ungeborene haben. So entstehen bei vielen Krankheiten während der Schwangerschaft, wie z.B. Diabetes oder Präeklampsie inflammatorische Prozesse und damit verbunden potentiell schädliche Substanzen, wie zum Beispiel die Myeloperoxidase (MPO), die - unter anderem - eine Oxidierung von Lipoproteinen (LDL, HDL) verursacht [26]. Hierbei kann die Schädigung für den Fetus auch darin liegen, dass die so modifizierten Stoffe in ihrer Funktion beeinträchtigt werden.

Die oxidierte Form des HDL steht dabei in dieser Diplomarbeit im Fokus. So ist es interessant zu wissen, wie sich diese Form, verglichen mit dem physiologischen, nativen HDL, im fetalen Kreislauf verhält, bzw. ob es Unterschiede in der Wiederaufnahme durch die Plazenta (=Clearance) über die Dauer eines Plazentaperfusionsversuchs in der fetalen Seite gibt.

1.2 Hypothese

Die zu Grunde liegende Annahme dieser Arbeit ist, dass das fetale oxidierte HDL, in der Plazentaperfusion eingesetzt, veränderte Eigenschaften bei der Interaktion mit dem feto-plazentaren Endothel aufweist, als im Vergleich natives (=Kontrolle) HDL. Weiterhin wird angenommen, dass durch die HDL-Modifikation und die damit einhergehende Veränderung der Bindungsfunktionalität am Endothel, die Konzentration in der fetalen Zirkulation im Vergleich zum nativen HDL sich verändert.

1.3 Die Plazenta

1.3.1 Aufbau der menschlichen Plazenta

1.3.1.1 Allgemeiner Aufbau

Die Plazenta ist ein auf Zeit angelegtes, scheibenförmiges Ernährungsorgan, das kontinuierlich wächst und sich differenziert, sodass in jedem Entwicklungsstadium die aktuellen Ernährungsbedürfnisse des humanen Keimlings befriedigt werden [3]. Weiterhin wird im Waldeyer für die nachgeburtliche (38-40 Wochen alte) Plazenta der Durchmesser mit 17-20 cm angegeben, die Dicke mit ca. 2,5 cm (spontan entblutet) und das Gewicht mit ca. 500 g [4].

Aufgrund der baumartigen Verzweigungen des Trophoblastengewebes der Plazenta wird diese auch als Zottenplazenta bezeichnet. Dabei werden die fetalen Gefäßschlingen multivillös, also in unterschiedlichen Winkeln von mütterlichem Blutstrom gekreuzt. Die Grenzfläche zwischen mütterlichem und fetalem Kreislauf ist dabei etwa bis zum 4. Monat hämo-dichorial (2 Schichten) und besteht zum einen aus dem Synzytiotrophoblasten und zum anderen aus dem Zytotrophoblasten, der jedoch ab dem 4. Monat abgebaut wird, woraufhin nur noch eine Synzytiotrophoblastschicht zwischen fetalem Endothel und mütterlichem

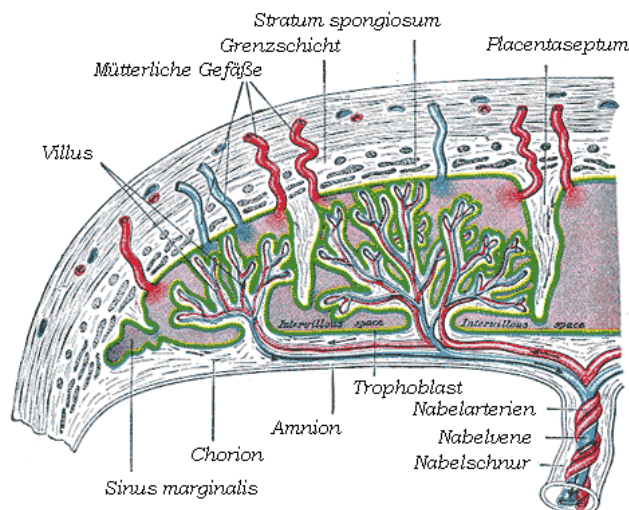


Abbildung 1 – Morphologischer Aufbau der humanen Plazenta mit Verteilung der Gefäße

villösem Raum liegt (hämochorial). Man kann die Plazenta in drei Gewebsschichten unterteilen. Von fetaler nach mütterlicher Seite geordnet wären das das Chorion- und Zottengewebe sowie die Basalplatte. Die Chorionplatte des Choriongewebes besteht aus der Zytotrophoblastschicht (bis 4. Monat noch zusätzlich Synzytiotrophoblastschicht) und dem Chorionmesoderm, dem sich das Amnion anlagert. Auch die fetalen Gefäße führen durch dieses Gewebe und teilen sich anschließend in den Zottenbäume auf. Diese Zottenstrukturen sind Bestandteil der Zottenschicht, indem sich alle

Plazentazotten mit den fetalen und mütterlichen Gefäßen im intervillösen Raum zum maternal-fetalen Substanztausch vereinen. Auf der mütterlicher Seite befindet sich die Basalplatte (= Dezidualplatte) die der fetalen Chorionplatte spiegelbildlich gegenüberliegt. In der dem Myometrium anhaftenden Decidua basalis liegen die mütterlichen Arterien (Spiralarterien), die den intervillösen Raum mit Blut versorgen, sowie die mütterlichen Venen, die für den Blutrückfluss sorgen. Der Decidua angelagert ist wieder eine Schicht aus Synzytiotrophoblasten und Zytotrophoblasten, die die Basalplatte von der Zottenschicht trennt (Abbildung 1). Außerdem gehen von der Basalplatte Septen aus, die in die Zottenschicht hineinragen und die Plazenta so auf mütterlicher Seite in 10-38 Läppchen (= Kotyledonen) teilen. Diese Kotyledonen beinhalten zwei oder mehr Zottenbäume. Die Septen reichen jedoch nicht bis zur Chorionplatte, sodass die Kotyledonen untereinander in Verbindung stehen [4,5].

1.3.1.2 Plazentaschranke

Als Plazentaschranke (auch Plazentabarriere) bezeichnet man die Schichten, die eine Substanz oder ein Gas überwinden muss, um zwischen dem Blut der Mutter im intervillösen Raum und dem Blut des Kindes im fetalen Kapillarnetz der Zottenoberfläche zu wechseln. Zum Zeitpunkt der Geburt liegen die fetalen Gefäße nahe am Synzytium. Damit wird eine sehr kurze maternal-fetale Transferstrecke für den Austausch gewährleistet. Möchte ein Stoff die Plazentaschranke vom Fetus zur Mutter überwinden, muss es folgende unterschiedliche Gewebe/Zellstrukturen durchqueren: die fetale Endothelwand, sowie deren Basallamina, das faserarme Bindegewebe der Zotten, die Basallamina der Trophoblasten und zudem das dünne Synzytium. Diese hämochoriale Konfiguration der menschlichen Plazenta erleichtert den Stoff- und Gasaustausch erheblich.

Über folgende Substanzen/Partikel ist bekannt, dass sie in der Lage sind, die Plazentaschranke zu überqueren:

- Die Atemgase O_2 , CO_2 und das Atemgift CO , das bei unvollständiger Verbrennung entsteht (durch einfache Diffusion)
- Mütterliche Immunglobuline der Klasse IgG (durch rezeptorvermittelte Endozytose)
- Mütterliche Antikörper gegen das Rhesus-D-Antigen

- Glukose: Der (insulinabhängige) Glukosetransporter GLUT-1 sorgt für eine erleichterte Diffusion der Glukose und gewährt so eine ständige Glukoseaufnahme in die Plazentazellen. Der fetale Glukosespiegel korreliert dadurch mit dem mütterlichen.
- Alkohol (mittels Diffusion)
- Infektionserreger (wie z.B. Rötelnviren, Zytomegalieviren, Herpes-simplex-Viren, Humane-Immundefizienz-Viren, Treponema pallidum->Syphilis, Toxoplasmen) [6]

1.3.2 Aufgaben und Funktionen der Plazenta

Funktion	Ersetztes Organ
Resorptionsorgan	Darm
Ausscheidungsorgan	Niere
Gasaustauschorgan	Lunge
Stoffwechselorgan	Leber
Blutbildungsorgan	Knochenmark
Hormonbildungsorgan	
Transportfunktion	

Tabelle 1 – Plazenta als Multiorgansystem

Die Plazenta erfüllt viele Aufgaben und hat speziell die Funktion, die kindlichen, noch unreifen Organe zu ersetzen und deren Aufgabe vorübergehend zu übernehmen. In Tabelle 1 wird dies nach Waldeyer [7] zusammengefasst.

Durch den Transfer von Nährstoffen, wie z.B. Glukose, Vitamine und Lipide, ersetzt die

Plazenta die Funktion des Darms, der die Aufgabe hat, aus der Nahrung die benötigten Substanzen herauszufiltern. Da im Stoffwechsel des Fetus gewisse Stoffwechselabbauprodukte entstehen (z.B. Harnsäure, Stickstoffverbindungen), werden diese zum Teil über die fetalen Nieren in die Amnionhöhle als Urin ausgeschieden, aber andererseits auch über die Plazenta in den mütterlichen Kreislauf transportiert. Diese Funktion und die Regulierung des Säure-Base-Haushalts durch die Plazenta (Protonen-, Bicarbonat-, CO₂-Transport) werden nach der Geburt von den Nieren übernommen. Ein weiteres Stoffwechselabbauprodukt, das Atemgas Kohlenstoffdioxid, wird ebenfalls über die Plazenta aus dem fetalen Kreislauf entfernt, welche dadurch – ebenso wie die fetale Versorgung mit Sauerstoff – die spezifischen Organfunktionen der Lunge übernimmt. Eine weitere wichtige Organersatzfunktion ist die Blutbildung durch die Plazenta. Da der Fetus nicht von mütterlichen Erythrozyten durchflossen wird, ist er auf die Bildung von eigenen Blutzellen angewiesen, die den Sauerstoff der mütterlichen Erythrozyten aufnehmen können. Dies übernimmt zumindest bis zum 3. Embryonalmonat die Plazenta [8].

Austauschfunktion der Plazenta

Neben dem Gasaustausch hat die Plazenta noch weitere Austauschfunktionen, die in der Tabelle aus der dualen Reihe von Stauber und Weyerstahl [9] beschrieben und unter Berücksichtigung des Austauschmechanismus zusammengefasst werden:

<i>Vorgang</i>	<i>Substanz</i>
aktive Austauschmechanismen	
Aktiver, energieverbrauchender Transport (z.T. enzymatisch)	Anorganische Ionen, Fettsäuren, Aminosäuren, Vitamine, Hormone
Pinozytose (Aufnahme hochmolekularer Substanzen über eine Einstülpung der Trophoblastmembran, Transport durch das Zytoplasma, Abgabe in das fetale Blut)	Proteine, Lipide, Immunglobuline (IgG)
passive Austauschmechanismen	
einfache Diffusion (entlang eines Konzentrationsgefälles, d.h. vom Ort der höheren Konzentration eines Stoffes zum Ort niedriger Konzentration)	O ₂ , CO ₂ , Kreatinin, Harnstoff, Bilirubin, Wasser, Medikamente, Alkohol, CO
erleichterte Diffusion (nach Bindung an Trägermoleküle/Carrier)	Glukose, Laktat
Diapedese (Durchtritt über Lücken in der Gefäßwand, z.T. nach Mikrotrauma)	Erythrozyten, Leukozyten, Medikamente mit Molekulargewicht über 600 (auch Viren, Bakterien, Protozoen)

Tabelle 2 – Unterschiedliche Austauschfunktionen der humanen Plazenta

1.3.2.1 Anatomie und Physiologie des pränatalen Kreislaufes

Der pränatale Kreislauf, bzw. der fetale Kreislauf über die Plazenta, sorgt dafür, dass sauerstoffreiches Blut aus dem mütterlichen Kreislauf dem fetalen Kreislauf zugeführt wird. Die Plazenta erhält über die paarige A. umbilicalis, welche aus Ästen der fetalen Aa. iliacae internae hervorgeht, das sauerstoffarme Blut des Fetus. Im intervillösen Raum der Plazenta (Abbildung 1) findet die Oxygenierung statt und das nun sauerstoffreiche Blut wird über die unpaarige V. umbilicalis zum Fetus zurückgeleitet. Diese mündet über den Ductus venosus in die fetale V. cava inferior und umgeht somit den Leberkreislauf, der einen recht hohen Strömungswiderstand besitzt. Über eine Anastomose zur V. portae hepatis aus der V. umbilicalis wird stattdessen die Sauerstoffversorgung der Leber gesichert [10,11].

Von mütterlicher Seite erreicht das sauerstoffreiche Blut über die Spiralarterien, die die Dezidualplatte durchdringen, den intervillösen Raum der Plazenta. Durch den hohen Druck in den Spiralarterien strömt das Blut bis zur Chorionplatte und fließt dann entlang der Zottenoberfläche (10-15m²), die das fetale Kapillarnetz beinhalten, zurück zu den ebenfalls in der Dezidualplatte befindlichen mütterlichen Venen. Die mütterliche Plazentadurchblutung beträgt etwa 1 ml/min pro 1 g Plazentagewebe, d.h. bei der Geburt ungefähr 500 ml/min. Allerdings haben die mütterlichen Gefäße keine Fähigkeit zur Autoregulation, sodass die Durchblutung allein vom Blutdruck der Schwangeren abhängt [12].

Das fetale Kapillarnetz geht aus den Nabelschnurgefäßen (Aa. umbilicales) hervor und wird vom Blutstrom des intervillösen Raumes umspült und so an den Grenzflächen (→ Plazentaschranke) mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. So findet etwa 3-4mal pro Minute ein kompletter Gasaustausch statt [13]. Dabei haben die Nabelschnurgefäße einen mittleren Blutdruck von 50-60 mmHg arteriell und etwa 10-20 mmHg venös.

1.4 Lipoproteine in der Schwangerschaft

1.4.1 Funktionen der Lipoproteine in der Schwangerschaft

Das sich über die Schwangerschaft entwickelnde Kind benötigt für das Zell- bzw. Gewebewachstum und für die Steroidbiosynthese (z.B. Östrogene, Progesteron) zunehmende Mengen an Cholesterin. Dieses Cholesterin kann einerseits direkt

vom Fetus endogen und andererseits exogen, also von der Mutter, bzw. von der Plazenta synthetisiert werden, um nachfolgend in die fetale Zirkulation transportiert zu werden [14]. Für den Transport dieser lipophilen Substanzen werden Proteine benötigt, die einerseits Lipide aufnehmen können und andererseits selbst eine Hydrophilie besitzen. Diese Aufgabe, Lipide im wässrigen Milieu zu transportieren, übernehmen die Lipoproteine, wie Very-Low-Density-Lipoprotein (VLDL), Low-Density-Lipoprotein (LDL) und High-Density-Lipoprotein (HDL) [15], die vor allem nach ihrer Dichte und Größe eingeteilt werden. Tabelle 3 zeigt die Unterschiede auf [16].

Klasse	Chylomikronen	VLDL	LDL	HDL
Dichte [g*cm⁻³]	<0,95	0,95 – 1,006	1,019 – 1,063	1,063 – 1,210
Durchmesser [nm]	75 – 1200	30 – 80	18 – 25	5 – 12
Masse [kDa]	ca. 400.000	10.000 – 80.000	ca. 2300	175 – 360
Apolipoproteine	AI,II; B48 ; CI-III; E	B100 ; CI-III; E	B100	AI,II ; CI-III; D; E

Tabelle 3 – Einteilung der Lipoproteine nach Dichte, Durchmesser, Masse und Apolipoproteinen

Die Aufgabe der Plazenta hierbei ist, vor allem das LDL – neben anderen Lipoproteinen, und damit das darin enthaltene Cholesterin, von der mütterlichen auf die fetale Seite zu transportieren. LDL-Rezeptoren, exprimiert an den apikalen Synzytiotrophoblasten, die das LDL endozytotisch in die Zellen aufnehmen und das Cholesterin entweder intrazellulär speichern oder in Richtung des fetalen Endothels weiter transportieren (Retroendozytose: in der Plazenta noch nicht nachweisbar), unterstützen diese Lipidaufnahme. Die ebenfalls für die Energiebedürfnisse des Kindes wichtigen mütterlichen Triglyceride (TG) nehmen hierbei einen etwas anderen Weg. Die TG-reichen Lipoproteine werden durch Enzyme, den sogenannten Lipoproteinlipasen, am Synzytium hydrolysiert und anschließend über die Plazenta mithilfe von Fettsäure bindenden Proteinen weiter aufgenommen. Bei gesunden Schwangerschaften lässt sich sogar eine Korrelation

zwischen Plazentagewicht und fetalem TG- und Totalcholesterin (TC)-Gehalt, gemessen im Nabelschnurblut postpartal, feststellen (Abbildung 2(A)) [17].

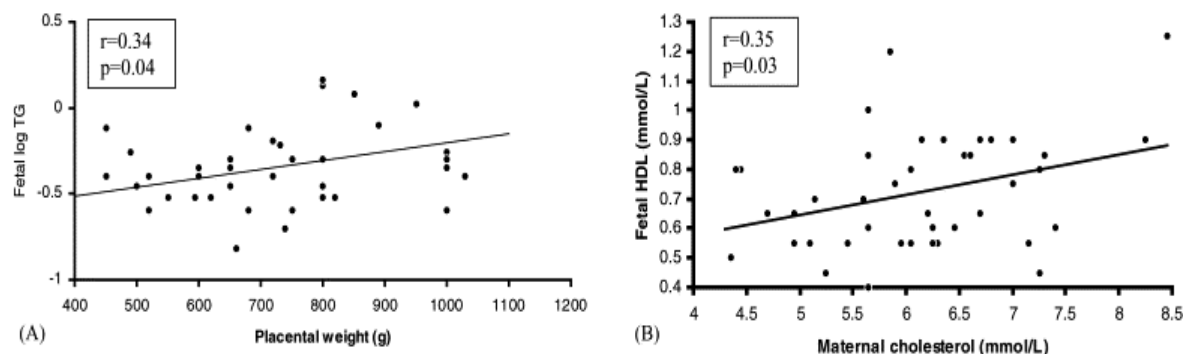


Abbildung 2 – (A): Korrelation von Plazentagewicht (Placental weight) und logarithmischer Triglyceridkonzentration (Fetal log TG); (B): Korrelation von mütterlichem Cholesterin (Maternal cholesterol) und fetalem HDL

1.4.2 Veränderungen des Lipoproteinhaushalts in der Schwangerschaft

Die in Abbildung 2 gezeigte Korrelation der TG mit dem Wachstum des Feten bedingt auch eine Veränderung der einzelnen Lipoproteinfraktionen während der Schwangerschaft. Eine direkte kontinuierliche Messung des Lipidprofils im Blutplasma ist nur bei der Mutter möglich, da es beim Fetus während der Schwangerschaft eine große Gefahr darstellen würde und ethisch nicht vertretbar wäre. Die einzige Möglichkeit das kindliche Blut zu untersuchen ist nach der Schwangerschaft durch Blutentnahme aus der Nabelschnur.

Bei unkomplizierten Schwangerschaften zeigen Studien einen linear verlaufenden Anstieg der TG (+300%), ebenso des TC (+25-50%), sowie Anstiege aller Lipoproteinklassen: VLDL, LDL und HDL[17]. Dem charakteristischen bis zur Entbindung linearen quantitativen Anstieg der TG und des TC folgt ein postpartales Absinken der mütterlichen Lipidkonzentrationen, die sich dann nach ca. 6 Wochen auf die Konzentrationen vor der Schwangerschaft einpendeln. Neben quantitativen deuten auch qualitative Veränderungen in der Zusammensetzung der Lipoproteine auf funktionelle Unterschiede hin. So erhöht sich im Verlauf der Schwangerschaft der Anteil des TG und des Cholesteringehalts in den Lipoproteinen im Vergleich zu vor der Schwangerschaft.

Das TC steigt dabei direkt proportional zum Cholesteringehalt in den LDL-Partikeln an, wobei hier nach der Geburt noch für weitere 8 Wochen diese quantitativen Unterschiede in der Zusammensetzung der Lipoproteine beobachtet wurden [18].

1.5 High-Density-Lipoprotein (HDL)

Das HDL ist anfangs discoidal und besteht hauptsächlich aus dem Apolipoprotein A-I, Cholesterin und Phospholipiden. Durch Austausch mit VLDL und Chylomikronen nimmt HDL weitere Apolipoproteine Typ C und E, sowie Cholesterinester und weitere Phospholipide auf, wodurch das HDL eine kugelige Form erhält. Je nach proportionaler Verteilung der Lipide und Apolipoproteine wird das HDL noch in weitere Klassen nach Dichte unterteilt (HDL₂, HDL₃) [19].

Das HDL-Cholesterin selbst wird allgemein auch als „gutes“ Cholesterin bezeichnet. Dies liegt in seiner Funktion und Struktur begründet, die sich von anderen Lipoproteine bedeutend unterscheiden. Charakteristisch ist der relativ hohe Proteinanteil des HDL's von fast 50%. LDL hat mit ca. 23% einen vergleichsweise niedrigen Proteinanteil [20]. Die Rolle des HDL's liegt im Rücktransport des überschüssigen Cholesterins aus peripheren Gewebezellen (z.B. Adipocyten) zur Leber [21].

1.5.1 Funktionen des fetalen HDL

Nach den bis heute vorliegenden Studien konnte ein direkter Transport von mütterlichem Cholesterin über die Plazenta noch nicht nachgewiesen werden. Das fetale HDL dient in erster Linie für die Bereitstellung von Cholesterin im Stoffwechsel des heranwachsenden Kindes. Neben dem endogenen Cholesterin, wird vermutet, dass über das HDL und über exogen bereitgestelltes Cholesterin der Fetus zusätzlich versorgt werden kann. Cholesterin ist im Fetus weiters wichtig, um die Steroidhormone zu synthetisieren, andererseits wird es für den Bau der Phospholipidmembranen benötigt, wo sie vor allem eine Stützfunktion der sonst recht flexiblen Biomembranen erfüllen. Um Cholesterin aufzunehmen, und mit Zellen funktionell zu interagieren, besteht das fetale HDL in seiner Hülle vor allem aus dem Apolipoprotein I (ApoA-I) und Apolipoprotein E (ApoE) [22].

1.5.2 Unterschiede zwischen fetalem und adultem HDL

Die Lipidkonzentration im fetalen Plasma ist signifikant geringer als im adulten Plasma. Im Gegensatz dazu trägt das fetale HDL ca. 40-50% des Gesamtcholesterins und ist daher durch einen relativ höheren Cholesteringehalt, verglichen mit adultem HDL, charakterisiert. Außerdem enthält das fetale HDL bis zu 33% mehr des wichtigen funktionellen Proteins ApoE [17].

Das maternale HDL-C steigt anders als andere Lipoproteine während der Schwangerschaft nicht kontinuierlich an, sondern erreicht die höchste Konzentration im 2. Trimenon der Schwangerschaft. Vor allem ein Subfragment, das HDL₂, steigt hierbei bis zur Schwangerschaftshälfte bis auf den 2-fachen Ausgangswert an und fällt danach wieder bis zur Geburt ab, bleibt aber um etwa 15% erhöht [18].

1.5.3 Oxidiertes HDL

Oxidiertes HDL entsteht häufig durch enzymatische Reaktionen – aktiviert durch Entzündungsprozesse – am nativen HDL. Das Enzym Myeloperoxidase (MPO), ein Plasmamarker der bei inflammatorischen Prozessen in hohen Konzentrationen nachweisbar ist, modifiziert prioritär und zunächst den Proteinanteil am HDL [23]. In der Schwangerschaft gibt es verschiedene typische Erkrankungen, welche mit Entzündungsvorgängen, bzw. mit Gefäßendothelverletzungen assoziiert sind, wie z.B. Diabetes mellitus (Entzündung der kleinen Gefäße), HELLP-Syndrom und Präeklampsie (Hochdruck der plazentaren Gefäße).

Durch das Enzym MPO entsteht aus Wasserstoffperoxid und Chlorid-Ionen Hypochlorid (HOCL), welches oxidierenden Einfluss auf Biomoleküle, wie HDL, LDL etc. ausübt. Den größten Einfluss auf die Funktionalität des fetalen HDL hat die Oxidierung des Apolipoprotein-I. Das oxidierte HDL ist dadurch, verglichen zum nativen, ein schwächerer Cholesterinakzeptor und kann so dem Fetus nicht in gleichem Ausmaß Cholesterin liefern, welches dieser für den Stoffwechsel und die Bildung von Phospholipidmembranen benötigt. Durch die Veränderung des Proteinanteils am HDL ist auch eine eingeschränkte Interaktion mit Lipoproteinrezeptoren an verschiedenen Zellen untersucht worden. Die MPO-vermittelte Oxidation modifiziert neben den Apolipoproteinen auch das Cholesterin und insbesondere die ungesättigten Fettsäuren der Lipoproteine, sowie die Membranlipide [24].

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Perfusionsmedium

Das Perfusionsmedium (Tabelle 5) besteht aus Earl's Puffer, dessen Zusammensetzung in Tabelle 4 aufgelistet ist, aus dem Zellzuchtmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 40 g/l Bovinalbumin, 1,33 g/l D-Glukose, 250 mg/l Amoxicillin, 500 µg/l Heparin und 10 g/l Dextran. Bei Raumtemperatur wird die Perfusionslösung mit NaOH (1molar) auf pH 7,4 eingestellt und anschließend bis zur Verwendung im Perfusionsversuch gekühlt gelagert.

Komponenten für 1 l Earl's Puffer	
NaCL	6,8 g
KCl	0,4 g
NaH ₂ PO ₄	0,14 g
CaCl ₂	0,2 g
MgSO ₄	0,2 g
NaHCO ₃	1,8 g

Tabelle 4 – Zusammensetzung des Earl's Puffer

Komponenten für 1,5 l Perfusionslösung	
DMEM (ohne Phenolrot)	1 l
Earl's Puffer	0,5 l
Albumin	60 g
D-Glukose	2 g
Amoxicillin	375 mg
Heparin	750 µg
Dextran	15 g

Tabelle 5 – Zusammensetzung der Perfusionslösung

2.1.2 Alexa Fluor® 568 bzw. 488 Protein Markierung

Um die dem Plazentakreislauf in unserem Versuch zugesetzten HDL-Moleküle qualitativ und quantitativ nachzuweisen, wurden die HDL-Proteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Zu diesem Zweck wurde der Markierungskit der Firma Molecular Probes® (Eugene, Oregon, USA) verwendet, mit dem die entsprechenden Proteine über eine Kopplungsreaktion der primären Aminen mit den Succinimidyl-Estern des Alexa Fluor 568, sowie des 488-Farbstoffs einen Komplex bildeten. Dieser fluoreszierende Farbstoff hatte seine Absorptions- bzw. Emissionsmaxima bei 568/488 nm. Bei pH 4-7 waren die Farbstoffe pH-unempfindlich.

Um das fetale native und das oxidierte HDL nach der Perfusion unterscheiden und messen zu können wurden zwei unterschiedliche Farbstoffe mit verschiedenen Absorptionsmaxima eingesetzt. Das oxidierte HDL wurde mit Alexa 568, das native mit Alexa 488 markiert. Das in unseren Versuchen verwendete – fetale – HDL wurde aus Plasma von Nabelschnurblut isoliert, und ein Teil, für die Versuchsreihe mit oxidiertem HDL, mit MPO behandelt.

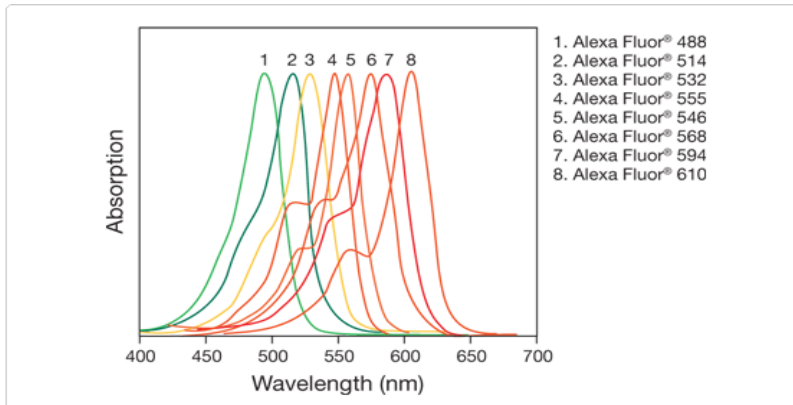


Abbildung 3 – Alexa Absorptionsmaxima

50 µL der 1 M Natrium-Bicarbonat Lösung wurden mit 0,5 mL der Proteinlösung vermischt, um den pH (7,5 und 8,5) anzuheben; diese Reaktionslösung wurde unter Raumtemperatur 1h gerührt. Um den restlichen freien Farbstoff vom Alexa-HDL zu trennen, wurde das Reaktionsgemisch mittels einer Größenausschlußsäule (Reinigungsharz: Bio-Rad BioGel P-30) gereinigt. Diese Säule trennt freie, ungebundene Farbstoffe von Proteinen, die ein Molekulargewicht über 40,000 MW hatten. Aufgrund des höheren MW des

Das nach Zentrifugation isolierte HDL wurde in eine Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gebracht, und auf eine Proteinkonzentration von 2mg/ml eingestellt.

markierten HDL's eluierte das Protein vor dem freien Farbstoff und konnte dadurch vom Rest getrennt werden.

2.1.3 Isolierung und Messung von fetalem HDL

Im ersten Schritt wurde kurz nach der Geburt das Nabelschnurplasma von den Blutbestandteilen durch Zentrifugation getrennt. Anschließend folgte die sequentielle Ultrazentrifugation, welche die verschiedenen Lipoproteinfraktionen aufgrund ihrer Dichte trennte. Um die HDL-Fraktion zu erhalten wurde mit einer konzentrierten Kaliumbromidlösung die entsprechende Dichte (für HDL: 1,21g/ml) des Serums eingestellt. Nach DichteEinstellung und darauffolgender Verteilung des Lipoproteincentrifugats auf mehrere Röhrchen wurde in eines davon ein Farbstoff zur Markierung von LDL- und HDL-Molekülen hinzugegeben. Nach Zentrifugation bei 15°C und 100.000 rpm für 30 Minuten erkannte man in dem Farbstoffröhrchen, welches als Vorlage diente, 2 gefärbte Banden, die obere enthielt nicht benötigte Lipoproteine bzw. Lipoproteinfragmente, die untere das gewünschte HDL. Oberhalb Höhe der HDL-Bande wurde dann aus den anderen Röhrchen der darüber befindliche Inhalt mit einer Spritze entfernt und verworfen. Die HDL-Fraktion konnte nun ebenfalls mit einer frischen Spritze abgehoben und mittels Kit der Cholesterin- und Proteingehalt bestimmt werden. Anschließend erfolgte das Entsalzen von HDL, wofür ein Sephadexsäulchen PD 10 verwendet wurde, welches bereits mit PBS gefüllt war. Nach Durchlauf und Spülen mit PBS enthielt man zuerst das Protein, in dem Fall das entsalzte HDL, und anschließend die Salze.

2.2 Präparation der Plazenta und Versuchsaufbau

Für die Versuche wurden sowohl Plazenten aus Kaiserschnitt-Entbindungen, als auch aus vaginalem Geburten verwendet (s.a. 2.2.1). Nach Abklemmen und Durchtrennen der Nabelschnurgefäße durch den betreuenden Arzt, sorgte eine vor Ort befindliche Study-Nurse für den zügigen Transport ins Perfusionslabor, wo die Plazenta innerhalb von ca. 15min nach Entbindung entgegengenommen wurde.

Zunächst erfolgte die Begutachtung sowohl der mütterlichen (Abbildung 4) als auch der fetalen Seite der Plazenta auf Intaktheit der Kotyledone. Hinweise auf Beschädigung waren Einrisse, blutige Flächen, die jedoch von Thromben durch

zartes Abtupfen zu unterscheiden waren, sowie andere Läsionen, die sich mit freiem Auge erkennen ließen. Weiterhin wurden intakte Kotyledone aufgesucht, die für einen Perfusionsversuch geeignet waren, um dann im Anschluss auf fetaler Seite die Gefäßkonfiguration zu prüfen. Als Gefäße kamen dabei möglichst parallel angeordnete Arterien/Venen-Paare in Frage, die gemeinsam ein einziges Kotyledon versorgten und keine Aufzweigungen zu anderen Kotyledonen besaßen.

Waren dennoch winzige Gefäßabgänge vorhanden, wurden diese per Naht ligiert. Hatte man ein passendes Gefäßpaar samt intaktem Kotyledon gefunden, wurden

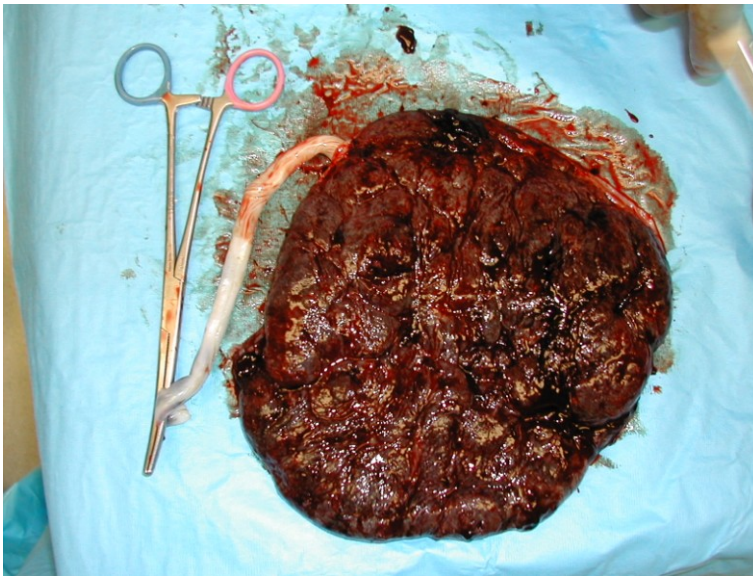


Abbildung 4 – Maternale Seite der oberflächlich intakten Plazenta mit Thrombenauflagerungen

diese proximal der Stelle, an der der Einschnitt für die Kanülierung gesetzt werden sollte, ligiert. Das Ziel war, dass keine Verbindung mehr zu den Gefäßästen der Nabelschnur bestanden, und man so das zu perfundierende Kotyledon isolierte. Als nächster Schritt folgte jeweils die Untertunnellung der

beiden Gefäße mit einer Naht. Diese wurden so nah wie möglich am Gefäß durch die Adventitia gelegt, um damit später die Kanüle dicht zu fixieren. Dann wurde zuerst die Arterie quer eingeschnitten und mit einer Gefäßpinzette fixiert, um die arterielle Kanüle, an die eine 20 ml Spritze mit Perfusionsmedium angeschlossen war, einzuführen. Nachdem man dann die Fixationsnaht fest zugeknüpft hatte, spülte man probeweise unter leichtem Druck an, um zu sehen ob zum einen das Gefäß intakt, und zum anderen die Kanülierung dicht ligiert war. Anschließend wurde der gleiche Vorgang am venösen Gefäß durchgeführt, und auch dieses kurz angespült.

Dadurch wurden der venöse und der arterielle Anschluss für den Perfusionskreislauf hergestellt, und es konnte mit der manuellen Injektion des Perfusionsmediums aus der an der arteriellen Seite angeschlossenen Spritze

begonnen werden. Aus der venösen Seite, an der ein Schlauch zu einem Auffanggefäß führte, begann es daraufhin zu tropfen. Zuerst blutig, durch das noch in den Gefäßlumina befindliche Blut, mit zunehmender Dauer immer heller werdend, da das Blut durch das Perfusionsmedium ausgewaschen wurde. Die Tropfen und der Auswascheffekt waren zudem Indikatoren für ein intaktes und korrekt perfundiertes Kotyledon. Nach Spülung mit etwa 20 ml Perfusionsmedium wurde die Plazenta zum Einspannen in die aus Plexiglas[®] bestehende Perfusionskammer vorbereitet und zurechtgeschnitten. Dazu wurde sie im Perfusionsring fixiert. Dieser besaß metallene Schrauben, welche die Plazenta im Bereich der nicht perfundierten Gewebe perforierte, und einen zweiten obenauf liegenden Ring, der mithilfe der zugehörigen Schraubenmutter fixiert wurde. Dabei war darauf zu achten, dass das perfundierte Kotyledon selbst nicht durchbohrt, oder durch einen zu eng anliegendem Ring gequetscht wurde. Ein „Spacer“, der sich zwischen den beiden Ringen befand und zwei parallele Kanäle zur Fixierung der Silikonschläuche besaß, wurde zwischen den Ringen befestigt. Dies garantierte einen Schutz vor dem Verrutschen der Schläuche und schützte sie zudem vor dem Abknicken. Im Anschluss wurde der Ring, indem die Plazenta fixiert war, gedreht und auf die Perfusionskammer mit dem Wärmereservat und dem Auffangbecken geschraubt. Durch diese Konstellation lag die mütterliche Seite nun oben, sodass diese zum einen beobachtet werden konnte, vor allem hinsichtlich einer möglichen Flüssigkeitsspiegelbildung, und zum anderen ermöglichte es eine Perfusion der maternalen Seite, die in dem hier beschriebenen Versuchsaufbau allerdings nicht durchgeführt wurde. Weiterhin wurden die Silikonschläuche, welche mit der arteriellen und venösen Kanüle der fetalen Seite verbunden waren, an den Perfusionskreislauf angeschlossen. Angetrieben wurde dieser von einer Schlauchpumpe mit einer Flussgeschwindigkeit von 6ml/min. Zusätzlich zum Perfusionsmedium wurde eine Begasungsmembran in den Kreislauf eingebaut, über die kontinuierlich reiner Stickstoff strömte. Zeitgleich mit Starten der Schlauchpumpe wurde eine Software gestartet, die die Perfusionsdaten aufzeichnete. Die Perfusionskammer besaß oben ein Fenster über das man das perfundierte Kotyledon begutachten konnte. Bedingt durch die Perfusion mit dem Perfusionsmedium war im Normalfall eine Aufhellung des Kotyledons zu beobachten, ohne dass sich dabei ein Flüssigkeitsspiegel bildete. War dies der Fall, sprach das für eine Leckage, was

dokumentiert und gemessen wurde. Unterhalb des eingespannten Kotyledons befand sich ein Auffangbecken, das sich bei einer Leckage ebenfalls langsam zu füllen begann. Durch einen zentralen mittigen Abfluss wurde die abtropfende Flüssigkeit aufgefangen und quantitativ erfasst. Die ringförmigen Perfusionskammern selbst, in deren Mitte die Plazenta eingespannt war, wurde mit 37°C warmen Wasser durchspült, welches aus beheizten Wasserbädern über Schlauchverbindungen in die Kammern floss, ohne jedoch direkt mit der Plazenta oder dem Perfusionsmedium in Kontakt zu kommen. Dadurch sollte um die Plazenta herum eine möglichst physiologische Temperatur geschaffen werden.

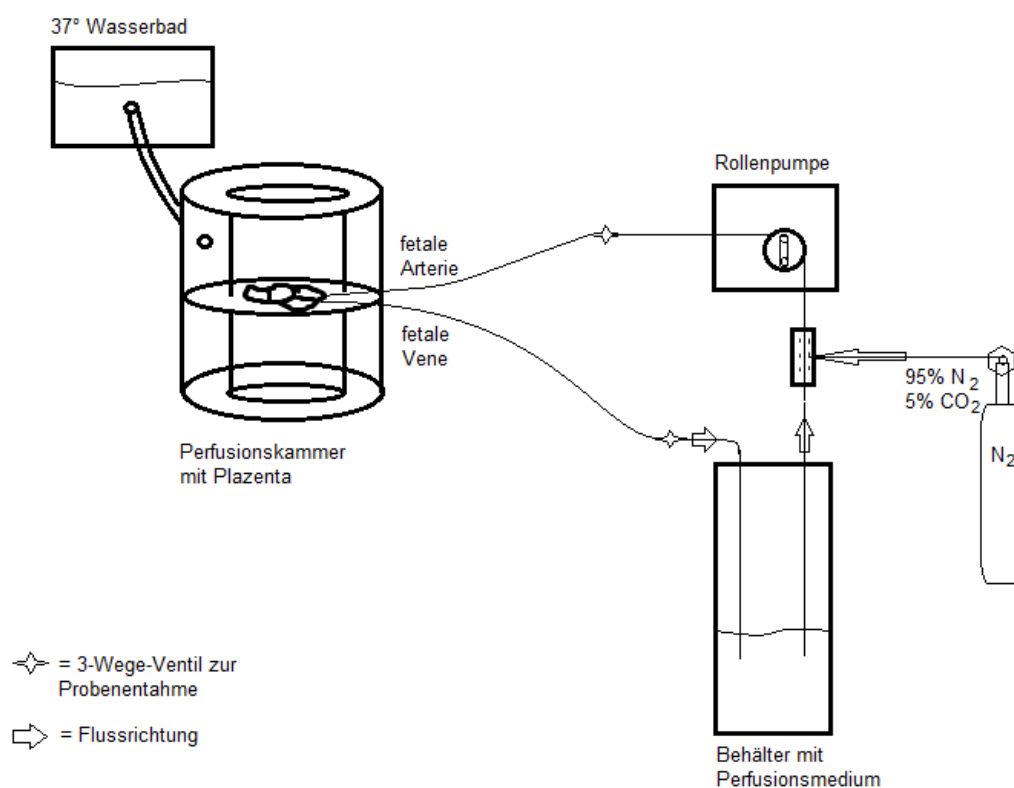


Abbildung 5 – Schematische Darstellung der Plazentaperfusion (geschlossener Kreislauf)

Der zur arteriellen Kanüle führende Schlauch war mit dem Vorratsbehälter für das Medium verbunden, wobei die an diesem Schlauch befindliche Pumpe für den plazentawärts gerichteten Fluss des Perfusionsmediums sorgte. Die Begasung fand ebenfalls auf arterieller Seite statt. Der venöse Schenkel des Perfusionskreislaufs führte die aus der Plazenta kommende Flüssigkeit zurück zum Behälter mit dem Perfusionsmedium, wo sie sich mit dem dortigen Inhalt durchmischte und den Kreislauf abschloss. Ein im Behälter befindlicher magnetischer Kreisel sorgte für eine kontinuierliche Durchmischung. Weiterhin

wurde das Ausgangsvolumen des Perfusionsmediums notiert und in der Folge regelmäßig anhand einer auf dem Behälter befindlichen Meßskala kontrolliert und ebenso notiert, um eventuelle Flüssigkeitsverluste zu quantifizieren.

Dieser Kreislauf wurde für 45 Minuten, nach Start des geschlossenen Kreislaufs, mit dem Perfusionsmedium fortgesetzt. Dabei fanden kontinuierlich Probenentnahmen sowohl auf arterieller, als auch auf venöser Seite statt. Nach dieser Zeit erfolgte ein Austausch der Perfusionsflüssigkeit, wobei der Kreislauf möglichst nicht unterbrochen werden sollte. Das so nun angeschlossene Medium beinhaltete neben dem Perfusionsmedium Alexa-markierte HDL-Moleküle: das fetale native HDL (Alexa-488-markiert) und das oxidierte HDL (Alexa-568-markiert) jeweils in äquimolarem Stoffmengenverhältnis. Hierbei war es jedoch wichtig, den Raum zu verdunkeln, da der Fluoreszenzfarbstoff des Alexa-Gemischs sehr lichtempfindlich war. Dieser Versuchsaufbau lief anschließend für weitere fünf Stunden, wobei weiter regelmäßige Proben genommen, sowie Volumensverluste dokumentiert wurden. Danach wurde die Aufzeichnungssoftware gestoppt, die Perfusion lief allerdings noch 5 Minuten mit 0,9% NaCl-Lösung weiter, und anschließend noch weitere 20 Minuten mit Formaldehyd, um das perfundierte Kotyledon zu konservieren. War dies geschehen wurde die Perfusion beendet und das perfundierte Kotyledon, welches durch die Formaldehydbehandlung hart geworden sein sollte, entlang der beiden kanülierten Gefäße zurechtgeschnitten, um sie molekularpathologisch auswerten zu lassen.

2.2.1 Ein-/Ausschlusskriterien der Plazenten

Nicht alle Plazenten konnten für die Versuche verwendet werden. Die Einschlusskriterien waren:

- Plazenten reifgeborener Kinder (von vollendeter 37. bis 41. SSW)
- Geburtsmodus vaginal und operativ (Sectio caesarea)
- Lebendgeburten
- Fehlende Pathologien
- Morphologisch unzerstörte Plazenta mit abgeklemmter Nabelschnur (Gefäßlumen bleibt gefüllt)
- Intakte Oberfläche
- Regelrechte Größe (Kind und Plazenta)

Definierte Ausschlusskriterien waren:

- Pathologische Schwangerschaften/Plazenten: HELLP-Syndrom (Hämolyse, erhöhte Leberwerte, Lipoproteinurie, Thrombozytopenie), Diabetes mellitus der Mutter, Eklampsie etc.
- Frühgeburtliche Schwangerschaft, Totgeburten, pathologische Plazentagröße
- Zerstörte oder geteilte Plazenta, großflächiger Gewebeschaden, völlig kollabierte Gefäße

2.3 Probenauswertung

Um Rückschlüsse auf die Plazentafunktion und -tätigkeit, sowie später die Verwertung des markierten HDL ziehen zu können, wurden regelmäßig geringe Volumina des Perfusats entnommen. Dazu wurden in den Versuchsaufbau auf venöser und auf arterieller Seite, nach Begasung, 3-Wege-Hähne eingebaut, durch die man geringe Mengen – pro Probe etwa 1mL – entnehmen konnte. Diese wurden dann direkt (Radiometer ABL800Basic, Willich, Deutschland) analysiert. Infrage kamen dafür pCO₂, pO₂, Lactat und der pH-Wert – im Zusammenhang mit den Werten des Infusionsdrucks – nachdem diese Aufschluss über die Stoffwechselaktivität der Plazenta geben. Bereits vor Beginn des Versuchs wurde eine Probe des Perfusionsmediums genommen und dann kurz nach Kanülierung der Plazenta und der ersten Injektion (ca. 20 ml) des Perfusionsmediums durch die Handspritze eine weitere aus der venösen Kanüle. Nachdem diese Probe entnommen wurde, wird die Plazenta wie vorher beschrieben in die Perfusionskammer eingespannt, und dann alle 15 min sowohl eine arterielle, als auch eine venöse Probe genommen. Nach Anschluss des HDL-Perfusionsmediums wurde nach einer halben Stunde wieder arteriell/venös eine Probe entnommen, sowie nach einer weiteren halben Stunde und im Anschluss stündlich bis der Versuch beendet war. Die Proben aus der HDL-Perfusionsphase wurden mit Alufolie verpackt, um sie vor Licht zu schützen und danach sofort bei ca. 4°C gelagert. Diese Proben wurden nach dem Versuch möglichst direkt an das molekularbiologische Labor zwecks Auswertung und Messung weitergereicht.

3 Ergebnisse

3.1 Versuchsauswahl

Die in dieser Diplomarbeit vorgestellten Versuche hatten gewisse Voraussetzungen erfüllt, um einbezogen werden zu können. Die Auswahlkriterien für die Plazenta sind unter 2.2.1 beschrieben.

Eine Voraussetzung für den Versuch war, dass der einzelne Versuch über die volle Dauer von fünf Stunden in Alexa-HDL-Perfusion lief. Dies erfüllten 6 Versuche, jedoch war bei einem Versuch die N₂-Gasflasche defekt, sodass dieser Versuch aufgrund der fehlenden Begasung nicht berücksichtigt wurde. Weiterhin war es wichtig, dass während des Perfusionsexperiments keine Flüssigkeitsverluste über 4ml pro Stunde zu messen waren, was auf eine Beschädigung des Kotyledons hinweist und damit als Ausschlusskriterium gilt. Vor Einbringen des kanülierten Kotyledons in den maschinellen Perfusionskreislauf wurde per manueller Perfusion in den arteriellen Schenkel bereits geprüft, ob einerseits aus dem venösen Schenkel - in etwa der infundierten Menge entsprechende - Flüssigkeitsmengen herauströpfen, und ob sich andererseits unterhalb des Kotyledons auf mütterlicher Seite eine unerwünschte Flüssigkeitsansammlung bildete.

3.2 Auswertung

Alle Messwerte der gesammelten Proben wurden in Excel-Tabellen gesammelt und zusammengefasst. Gegliedert wurden sie nach den zu untersuchenden Parametern (CO₂, O₂, Lactat, pH, Alexa-HDL-Fluoreszenz) und dazu diskriminiert nach arterieller und venöser Probe. Zusätzlich wurden noch die Standardabweichungen und die Mittelwerte errechnet. Nach Umrechnungen auf vergleichbare literaturbekannte Einheiten (z.B. mbar → mmHg), wurden die folgenden Graphen erstellt.

Die unterschiedlichen Messwerte der Proben wurden im Verlauf über die Perfusionszeit und den Perfusionsdruck in Zusammenhang gestellt, um Aussagen über den Einfluss der Substanzen auf die Perfusionsparameter treffen zu können. Speziell der Vergleich von oxidiertem und nativem HDL war für diese Arbeit von Interesse. Daher wurde aus den Fluoreszenzwerten der Proben für das oxidierte und native HDL die Konzentration zu den Probenzeitpunkten errechnet und dann

eine relative Clearance (= Aufnahme der Lipoproteine in die Plazenta) der beiden HDL-Formen zueinander über die Zeit grafisch dargestellt. Das native HDL galt dabei, entsprechend der Hypothese, als Bezugspunkt.

3.2.1 Perfusionsdruck – Überblick

In allen Versuchen (Grafik 1-5) war der Perfusionsdruck zu Beginn der Konditionierungsphase am höchsten und fiel dann kontinuierlich über die Perfusionszeit ab. In Versuch 5 startete der Druck sogar bei ca. 150 mbar, in Versuch 4 bei 130 mbar. In Versuch 1 war der Startdruck 70mbar, in Versuch 2 90mbar und in Versuch 3 80 mbar. Vor allem während der Konditionierungsphase in den ersten 45-50 Minuten war ein linearer Abfall (bei Versuchen 1 und 2) zu beobachten. In Versuch 1 konnte ein Druckabfall um fast 40 mbar (70 → 30 mbar), in Versuch 2 um 50 mbar (90 → 40 mbar) gemessen werden. Versuch 5 hielt für etwa die ersten 20 Minuten den Druck von 150 mbar, fiel danach jedoch ebenfalls bis zum Ende der Konditionierungsphase linear auf 120 mbar ab. Die Probenentnahmen in der Konditionierungsphase führten in allen Versuchen zu einem kurzzeitigen Druckabfall (durch Öffnen des Drei-Wege-Ventils für wenige Sekunden), ohne aber erkennbaren Einfluss auf die Druckverlaufskurve zu haben. Bedingt durch die Versuchskonfiguration führten der Wechsel des Perfusionsmediums mit Alexa-HDL-Zusatz zum Abfallen des Druckes in allen fünf Versuchen, denn der Kreislauf wurde dadurch unterbrochen, bis der Behälter gewechselt und die Schläuche neu angeschlossen wurden.

In der Alexa-HDL-Perfusionsphase blieb Versuch 1 (Grafik 1) in den ersten 2 Stunden auf einem sehr niedrigen Druckniveau unter 5 mbar. Erst nach Entnahme der 2-Stunden-Probe kam es in Versuch 1 zum Druckanstieg. Direkt nach Probenentnahme erreichte der Perfusionsdruck bis zu 20 mbar und blieb bis zur 3-Stunden-Probe relativ konstant bei 20 mbar (+/- 3 mbar). Nach der dritten Stunde HDL-Perfusion fiel hier der Druck innerhalb einer halben Stunde wieder auf Werte unter 5 mbar, nach kurzem Öffnen des Kreislaufs (wegen Bildung einer Luftblase) stieg der Druck wieder auf etwa 15 mbar an. Nach der 4-Stunden-Probe blieb der Druck bis zum Ende der fünfstündigen Alexa-Perfusionsphase zwischen 10 und 15 mbar.

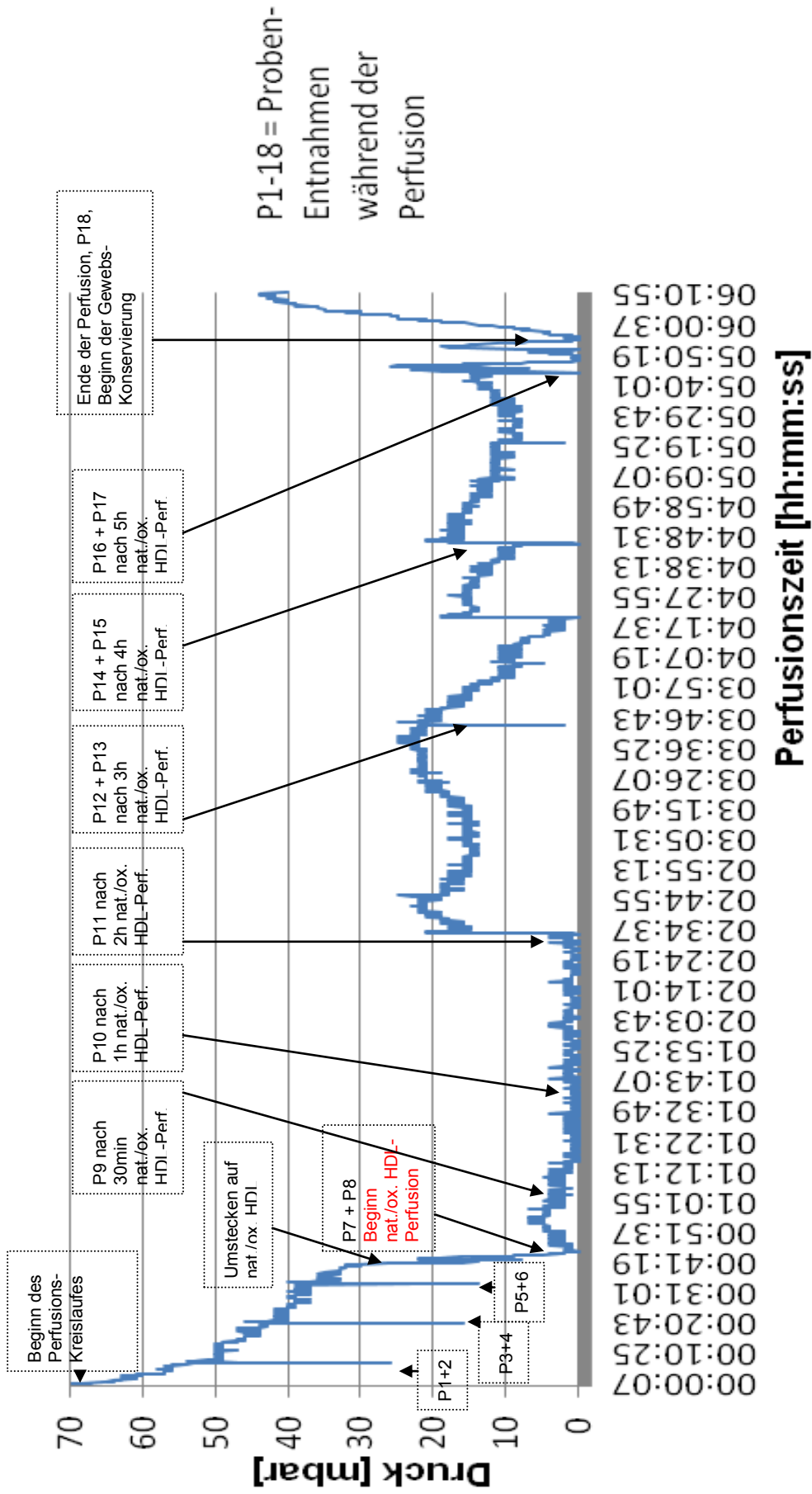
Bei Versuch 2 (Grafik 2) konnte keine dauerhafte Druckabsenkung beobachtet werden; während der Perfusionszeit wurde ein Druck zwischen 20-50 mbar

gemessen. Nach Beginn der Alexa-HDL-Perfusion stieg der Druck von 0 mbar bis zur 30. Minute auf 50 mbar an und fiel danach wieder etwas ab, sodass er nach einer Stunde etwa 35 mbar erreichte. Am Ende der zweiten Stunde waren noch 20 mbar, kurz nach der 3-Stunden-Probe 30 mbar zu messen. Nach 4 Stunden fiel der Druck linear bis auf 8 mbar ab und stieg nach der Probenentnahme, ähnlich der 3-Stunden-Probenentnahme auf 30 mbar an. Nach 5 Stunden HDL-Perfusion hatte der Perfusionsdruck noch Werte um die 15 mbar.

Beim dritten Versuch (Grafik 3) war der Perfusionsdruck während der Perfusion mit Alexa-HDL niedrig und blieb stetig unter 5 mbar. Lediglich nach den Probenentnahmen stieg der Druck an (auf 20 mbar +/- 2 mbar) und fiel dann, unterschiedlich schnell, wieder linear ab. Nach der 30-Minuten-Probe war der größte Druckabfall zu verzeichnen (nach bereits 10 Minuten <5 mbar). Die Zeitspanne vom Beginn des Druckanstiegs bis zum Wiederreichen des niedrigen Drucks von <5 mbar wurde bis zur 4-Stunden-Probe (ca. 50 Minuten) zunehmend länger. Nach 5 Stunden Perfusion lag der Perfusionsdruck weiterhin bei <5 mbar, was darauf hinweist, dass das Gefäßsystem keinen Druck gegen die Pumpe aufbaute und daher von einem undichten System oder einer totalen Gefäßrelaxation ausgegangen werden kann.

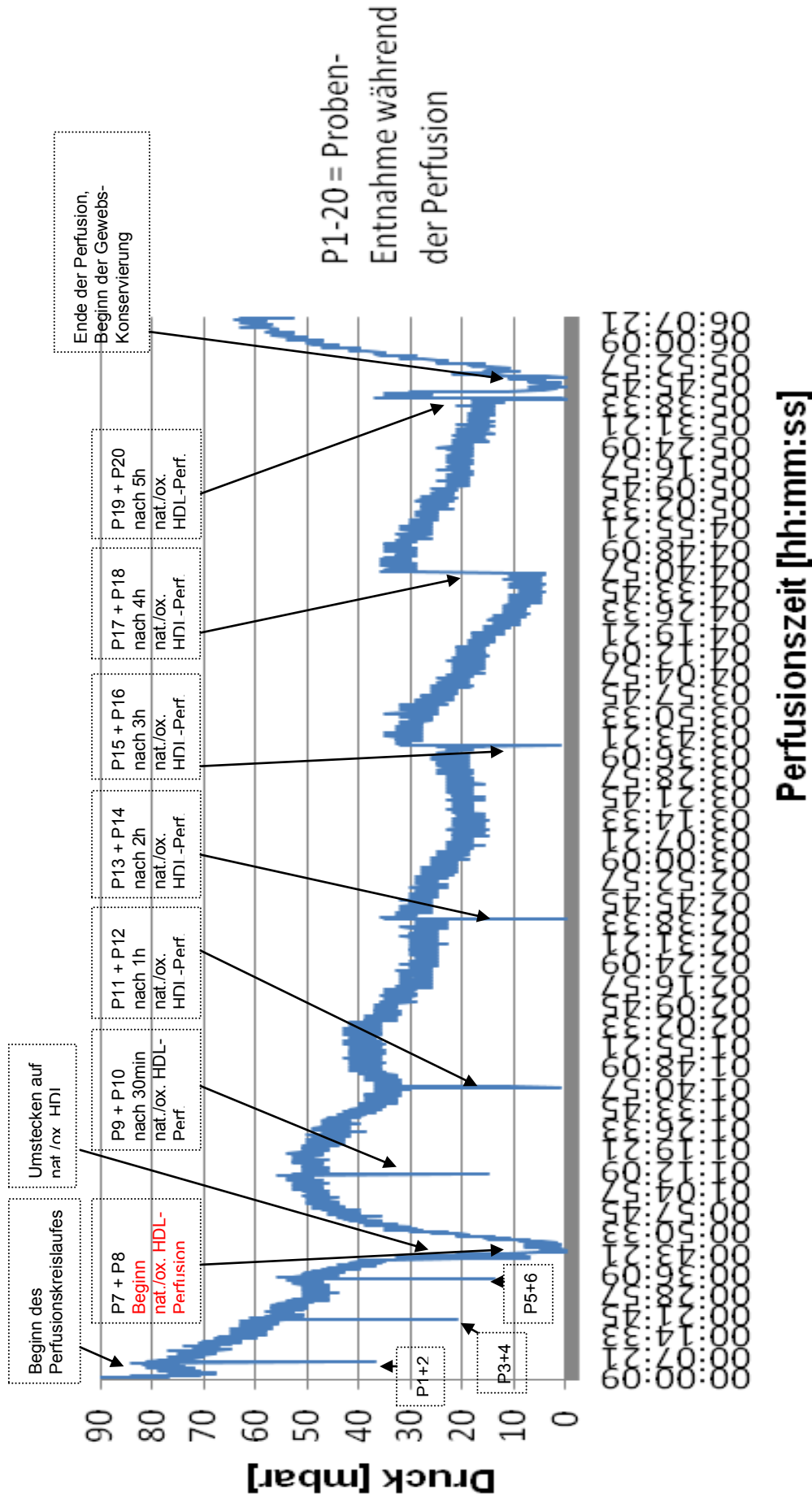
Auch bei den Versuchen 4 und 5 (Grafik 4, 5) konnte ein ähnlicher pulsierender Druckverlauf – mit einem Druckanstieg nach dem Zeitpunkt einer Probenentnahme – über die Perfusionszeit beobachtet und gemessen werden was die Erklärung stützt, dass das Gefäßsystem total relaxiert und sich damit im Gefäßsystem kein Gegendruck aufbauen kann. Der auch noch zu beobachtende Druckaufbau nach ca. 4h Perfusion, also langer Zeit, bei Versuch 5 (von 20 bis ca. 40 mbar) ist mit diesen Daten nicht erklärbar.

Versuch 1: HDL-abhängiger Verlauf des fetalen Perfusionsdruckes



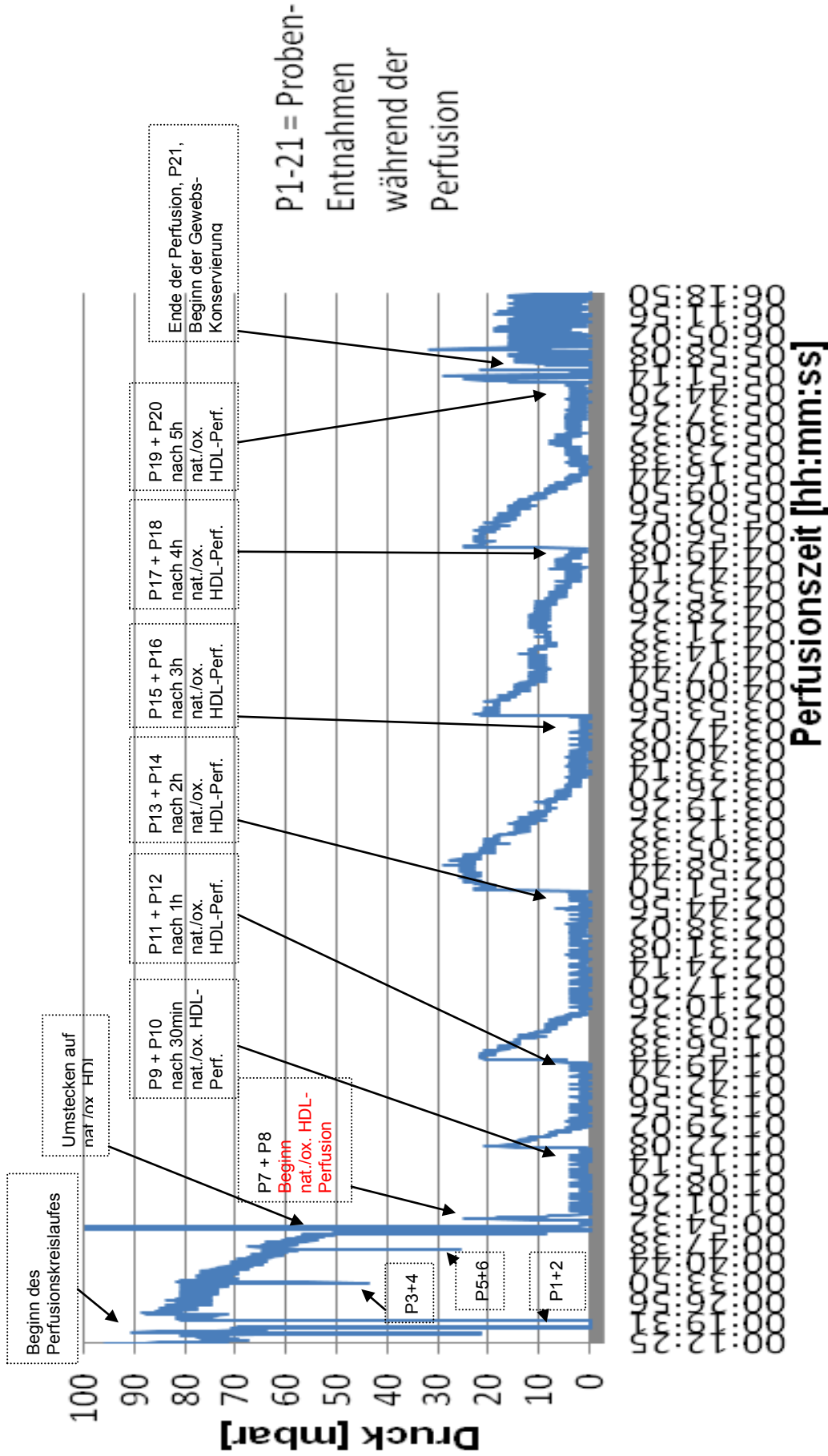
Grafik 1 – Versuch 1 Perfusionsdrücke

Versuch 2: HDL-abhängiger Verlauf des fetalen Perfusionsdruckes



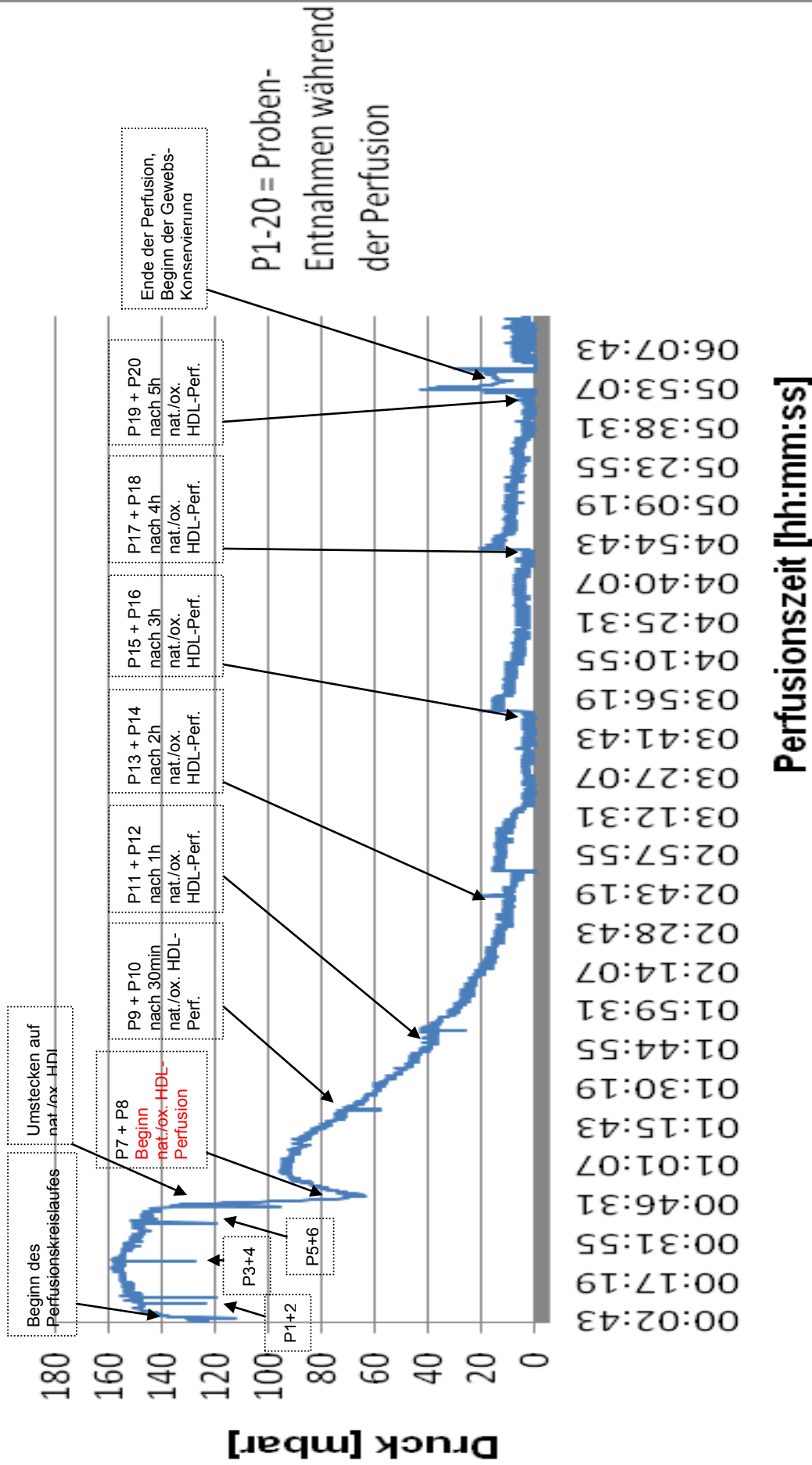
Grafik 2 – Versuch 2 Perfusionsdrücke

Versuch 3: HDL-abhängiger Verlauf des fetalen Perfusionsdruckes



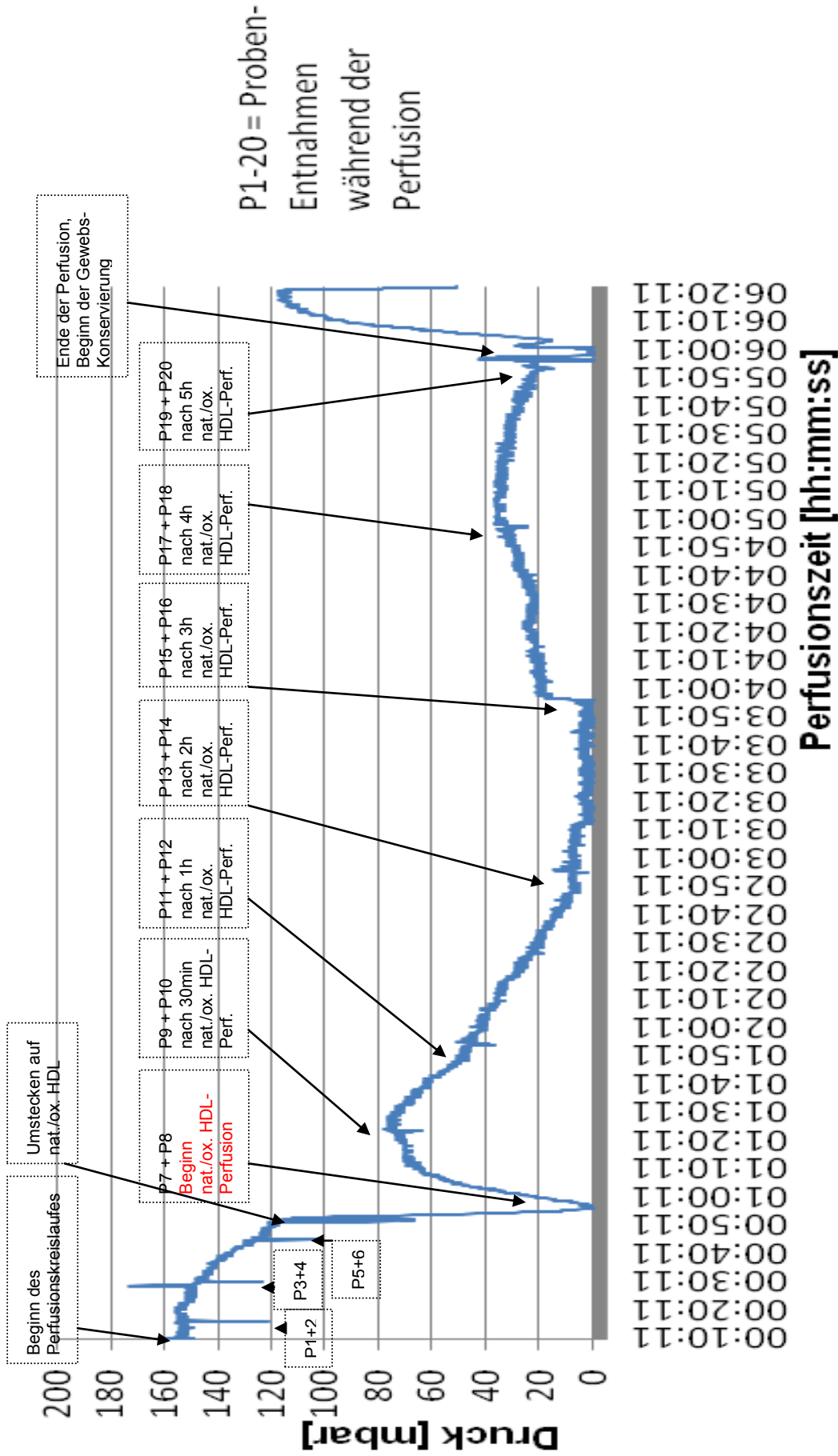
Grafik 3 – Versuch 3 Perfusionsdrücke

Versuch 4: HDL-abhängiger Verlauf des fetalen Perfusionsdruckes



Grafik 4 – Versuch 4 Perfusionsdrücke

Versuch 5: HDL-abhängiger Verlauf des fetalen Perfusionsdruckes



Grafik 5 – Versuch 5 Perfusionsdrücke

3.2.2 Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks während der Perfusion

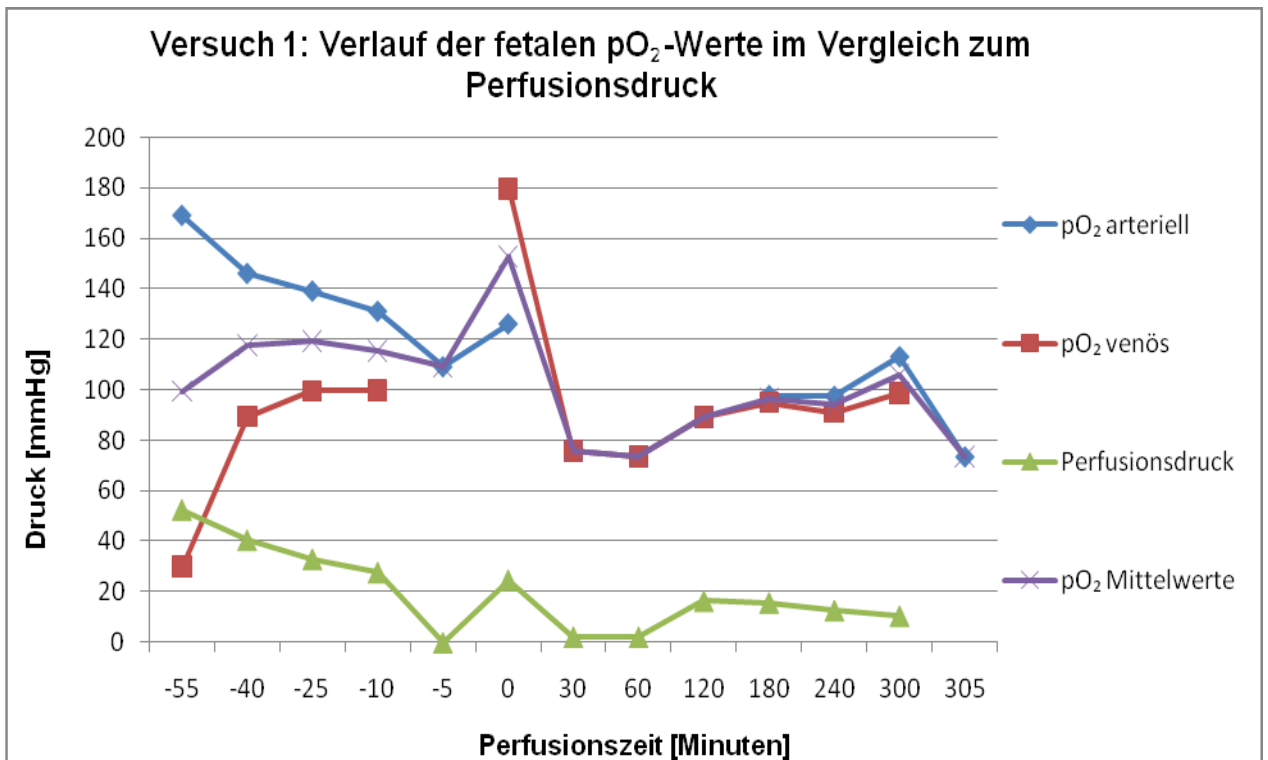
Der gelöste Blutsauerstoff (pO_2), zusammen mit den pCO_2 Werten im Blutstrom (Perfusionsmedium), dienen als wichtige Messgrößen, um über die Vitalität, also den Energieumsatz eines Gewebes, Auskunft zu erhalten. Sauerstoff ist zu einem geringen Teil auch im Blutserum bzw. im Perfusionsmedium gelöst. Dieser gelöste Sauerstoff übt einen gewissen Druck aus, der messbar ist. Die ermittelte Größe nennt man Blutsauerstoffwert. Der Blutsauerstoffwert stellt somit neben dem Hämoglobin und dessen Sauerstoffsättigung einen weiteren wichtigen Parameter zur Beurteilung des Sauerstoffgehalts im Blut dar. In diesem Versuchsaufbau, nachdem nur die fetale Seite perfundiert und mit N_2 begast und damit die mütterliche Seite nicht eingebunden wurde, die als O_2 -Quelle dient, sind Aussagen über die Aktivität des perfundierten Plazentagewebes nur bedingt möglich.

Dies wird auch einer der Gründe gewesen sein, weshalb sich in allen Versuchen (Grafik 6-10) die arteriellen und venösen pO_2 -Werte nach einer Weile angeglichen hatten (0 – <10 mmHg pO_2 -Differenz: Versuche 1, 2, 4 nach ca. 30 Minuten HDL-Perfusion; Versuch 3 bereits 15 Minuten nach Beginn des Versuchs; Versuch 5 nach 45 Minuten der Konditionierungsphase), was demnach als Zeichen des geringen Sauerstoffumsatzes im fetalen Gewebe gewertet werden konnte. Die Angleichung der arteriovenösen Partialdrücke blieb bis zum Ende des jeweiligen Versuchs bestehen.

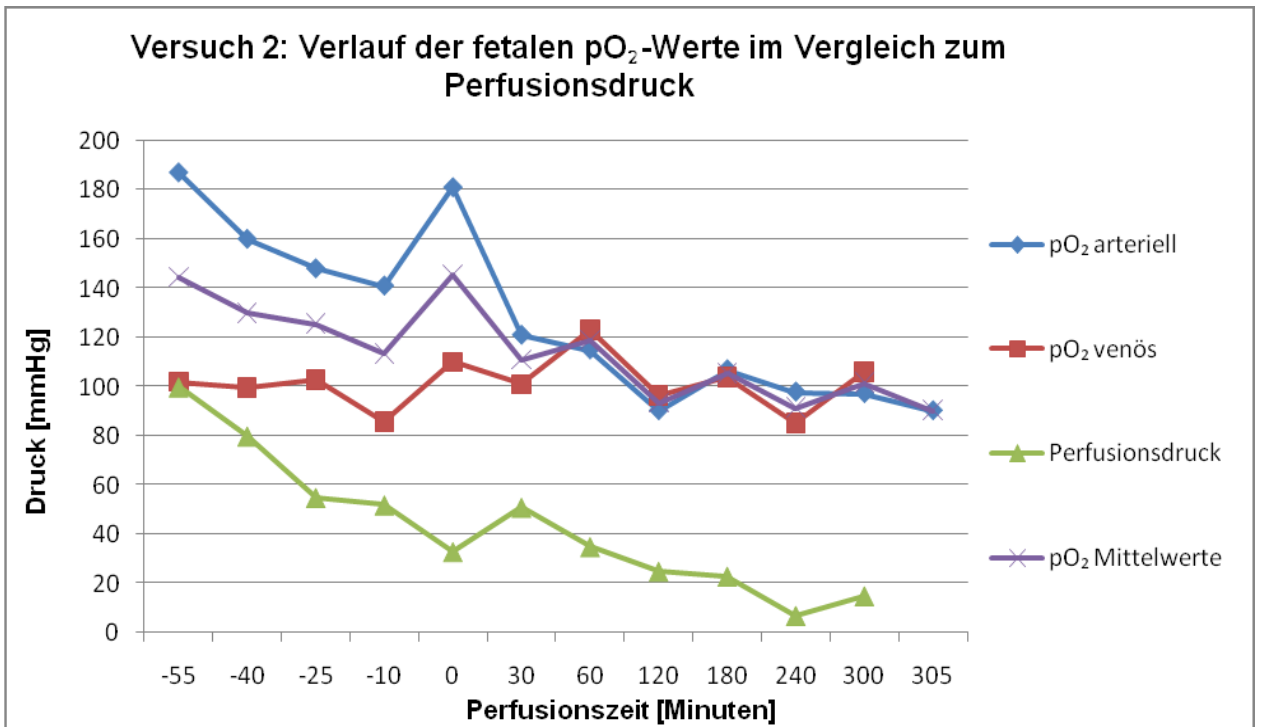
Zuvor konnte jedoch in allen Versuchen zu Beginn der Konditionierungsphase ein recht deutlicher Unterschied zwischen arteriellem und venösem pO_2 gemessen werden (zwischen maximal 140 mmHg arterio-venöse pO_2 -Differenz in Versuch 1 und mindestens 30 mmHg in Versuch 5).

Eine weitere Gemeinsamkeit war ein hoher Sauerstoffpartialdruck in der ersten Probe ($t=0$) nach Umstieg auf die HDL-Perfusion, lediglich in Versuch 3 war – auch kein kurzzeitiger – messbarer Einfluss durch den Wechsel des Mediums zu erkennen. Eine Erklärung für die hohen Werte zu diesem Zeitpunkt könnte der höhere Gehalt an physikalisch gelöstem Sauerstoff im frischen HDL-Perfusionsmedium gewesen sein, verglichen zum Konditionierungsmedium, dessen Sauerstoff schon zum Teil durch die Plazenta verstoffwechselt wurde.

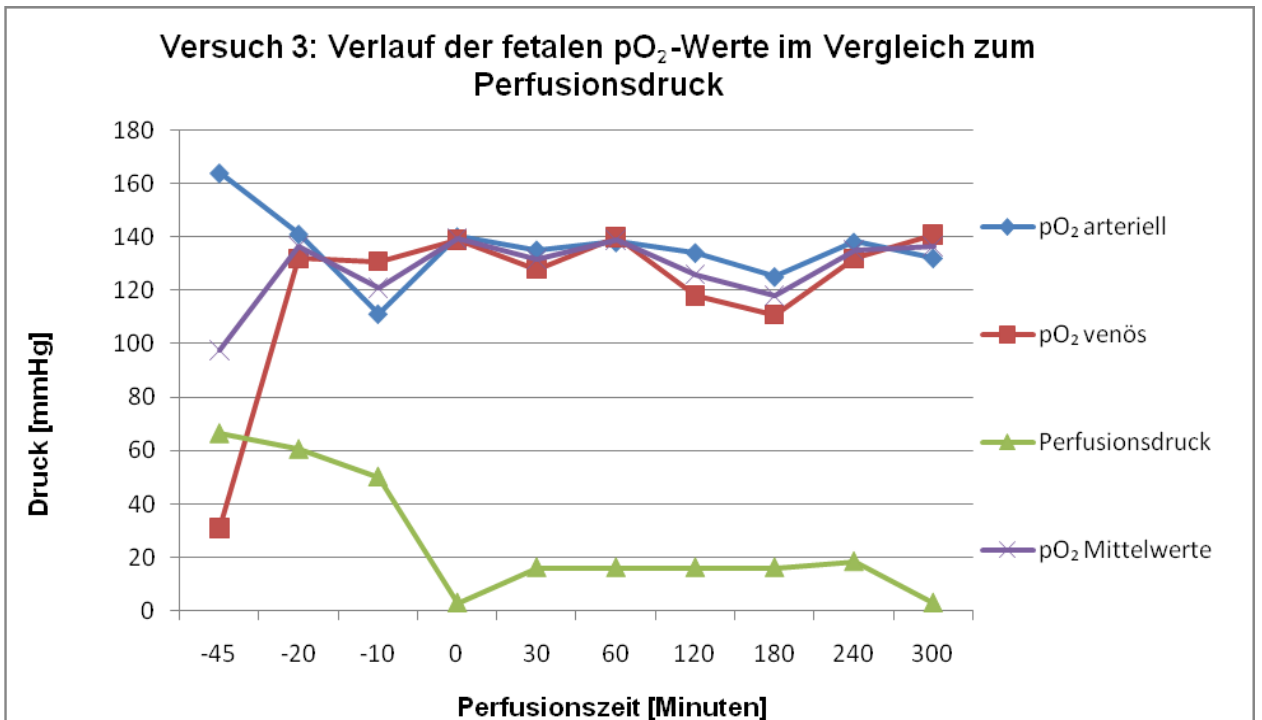
In den Versuchen 1, 2, 4 und 5 korrelierte der Verlauf des Perfusionsdruckes mit dem allgemeinen Druckniveau der arteriovenösen Sauerstoffmittelwerte. Besonders deutlich war dies in den Versuchen 1 und 5 zu erkennen (Grafik 6, 10).



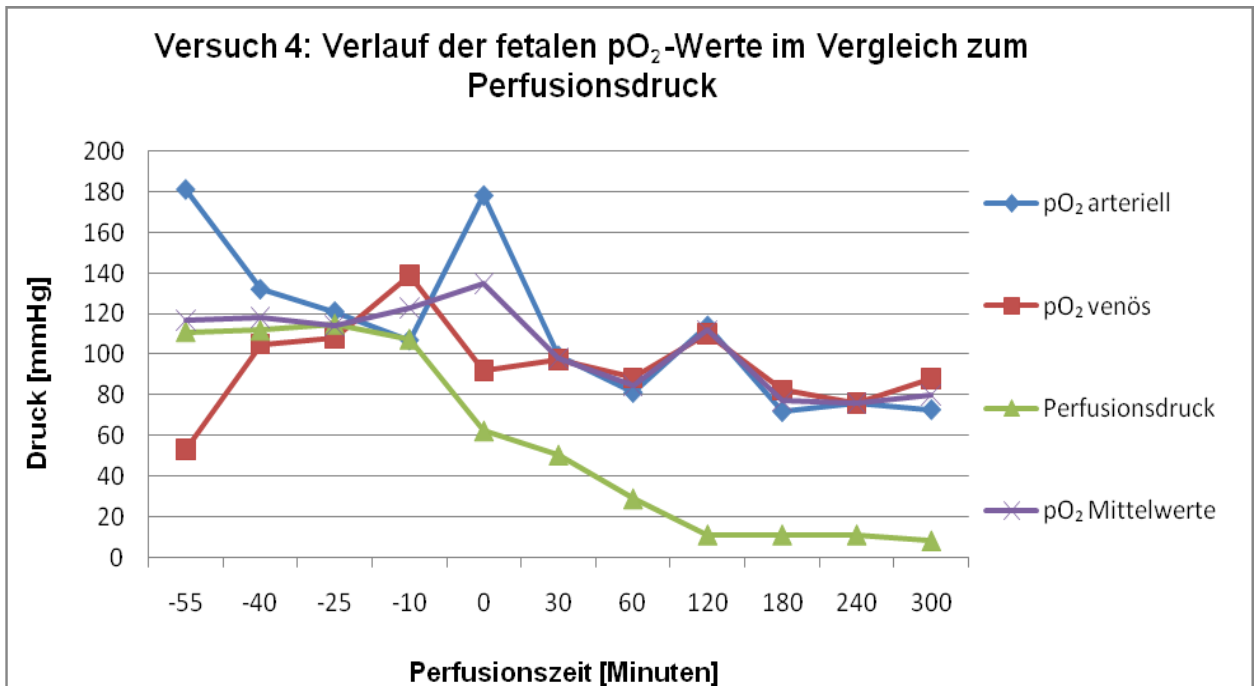
Grafik 6 – Versuch 1: pO₂-Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



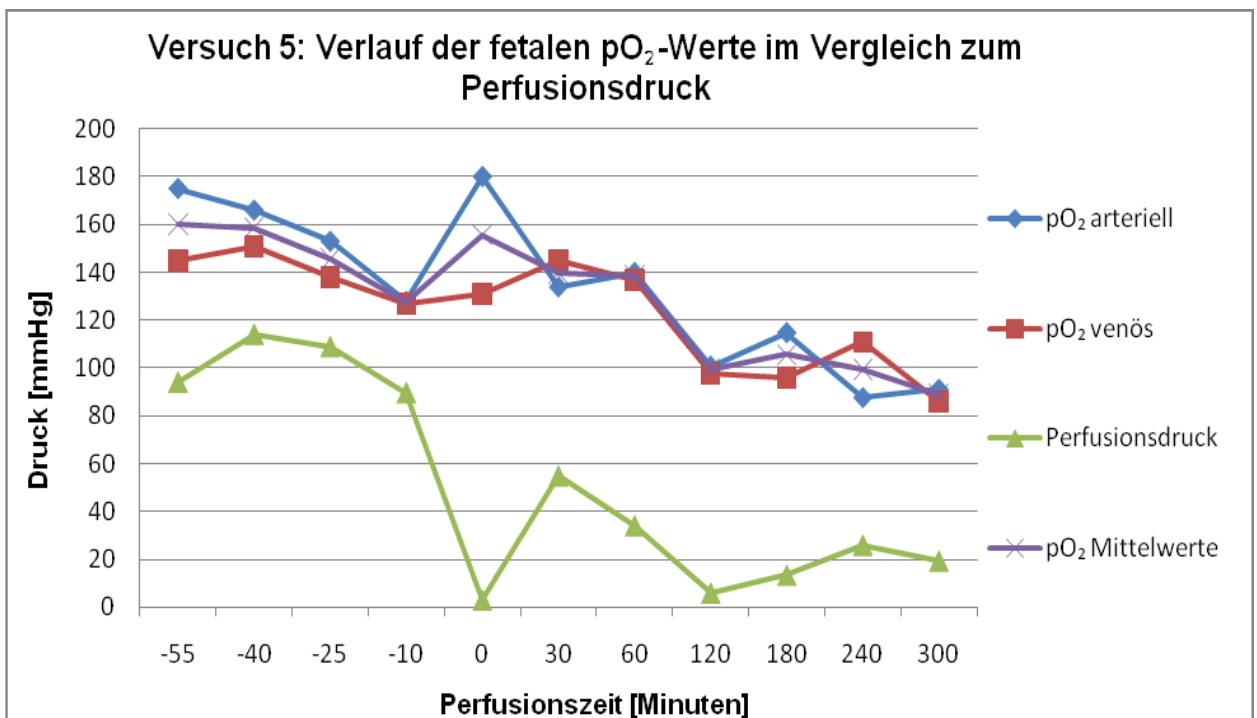
Grafik 7 – Versuch 2: pO₂-Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



Grafik 8 – Versuch 3: pO₂-Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck; -45 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



Grafik 9 – Versuch 4: pO₂-Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



Grafik 10 – Versuch 5: pO₂-Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase

3.2.3 Verlauf des Kohlendioxidpartialdruckes während der Perfusion

CO₂, als Marker für den Verbrauch von O₂ im Gewebe, diente als weiterer Vitalitätsparameter für die Plazenta. In den Versuchen (Grafik 11-15) war meist der venöse Wert für pCO₂ höher als der arterielle, was auf eine kontinuierliche Synthese in der Zelle (Zellatmung: Glukose + Sauerstoff → Wasser + Kohlenstoffdioxid) und anschließender Diffusion ins fetale Gefäßnetz hinweist.

In den CO₂-Partialdruckkurven zeigte sich in allen Versuchen eine ähnliche Verlaufskurve. Versuch 5 ausgenommen (gleicher pCO₂ arteriell/venös), lag zu Beginn eine relativ große Differenz zwischen arteriellem und venösem CO₂-Partialdruck vor. Diese Partialdruckdifferenz war maximal zwischen 35 mmHg (venös 110 mmHg / arteriell 75 mmHg) in Versuch 4 und mindestens 20 mmHg (ven. 55 mmHg / art. 35 mmHg) in Versuch 2.

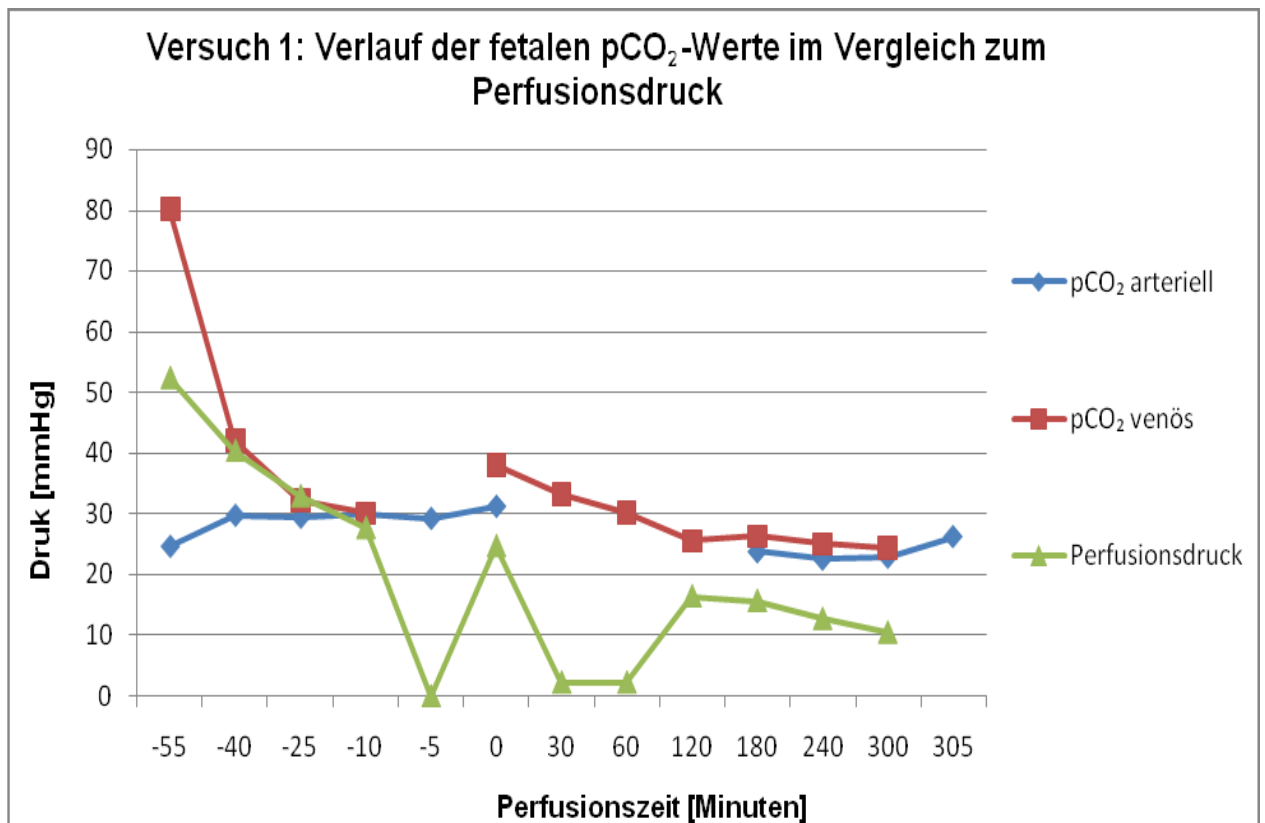
In den ersten 3 Versuchen (Grafik 11-13) glichen sich die arteriovenösen pCO₂-Werte dann allerdings bis spätestens nach einer halben Stunde, noch in der Konditionierungsphase, beinahe an. Der venöse Wert lag dann bis zum Ende des kompletten Perfusionsversuches lediglich zwischen 1 und 3 mmHg höher als der arterielle.

Die Versuche 4 und 5 (Grafik 14-15) zeigten über den gesamten Verlauf kontinuierlich höhere pO₂-Druckdifferenzen. Im 4. Versuch lag zwischen dem höheren venösen und dem arteriellem pCO₂ durchgehend eine Druckdifferenz von ca. 4-6 mmHg vor. Bis auf die erste Probe und die letzten beiden Proben nach 4 und 5 Stunden (annähernd gleicher pCO₂) fand sich im 5. Versuch zwischen 3-4 mmHg höhere Werte für den venösen CO₂-Partialdruck.

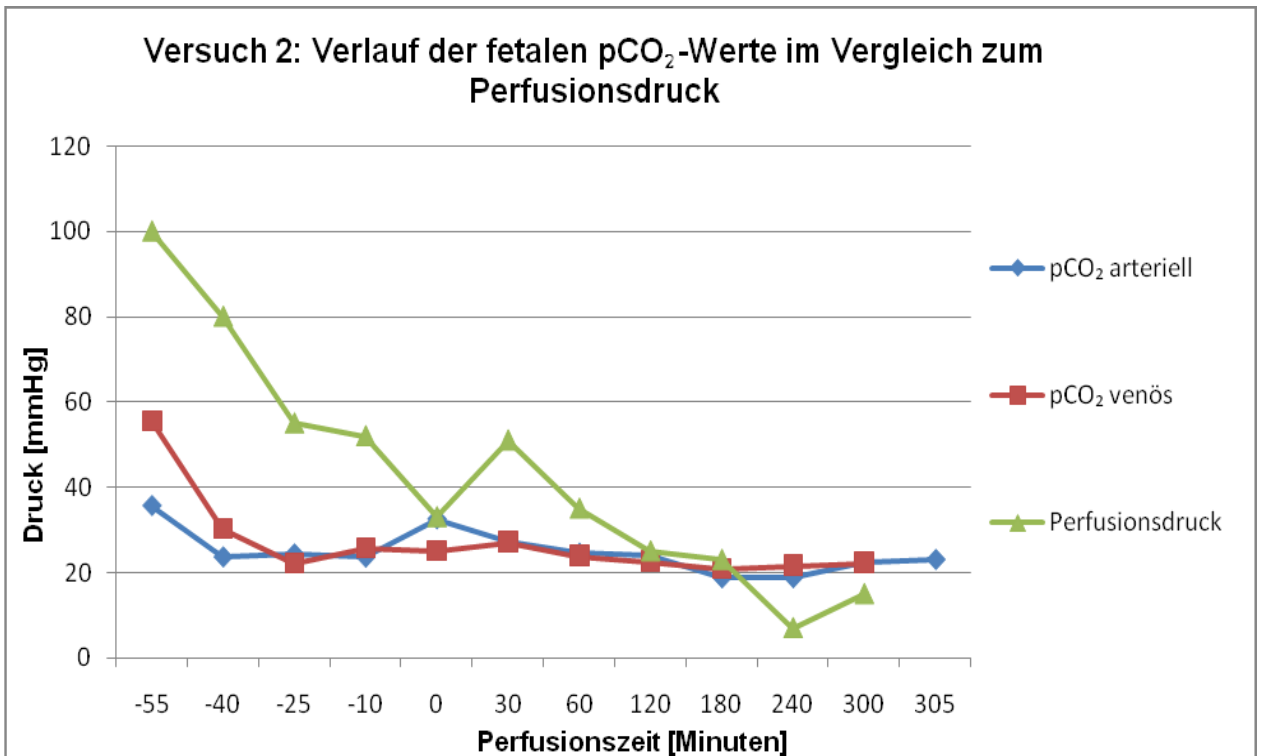
Was alle Versuche gemeinsam hatten, war die Konstanz im pCO₂-Druckniveau über den jeweiligen kompletten Versuch. Weder der Perfusionsdruck, noch der Wechsel des Perfusionsmediums zum HDL-Medium, schien einen Einfluss auf die CO₂-Partialdruckwerte zu haben. Der mittlere Partialdruck (aus arteriellem und venösem pCO₂) blieb für jeden Versuch, den Versuchsstart ausgenommen, auf fast dem gleichen Druckniveau. Versuch 1 lag bei 25-30 mmHg, Versuch 2 bei 22-23 mmHg, Versuch 3 zwischen 20-28 mmHg, Versuch 4 bei 22-24 mmHg und letztlich Versuch 5 zwischen 30 und 40 mmHg.

Der Grund für den anfangs hohen CO₂-Wert lag darin begründet, dass noch viel Blut aus der fetalen Zirkulation zum Zeitpunkt der Geburt in den Gefäßen stand,

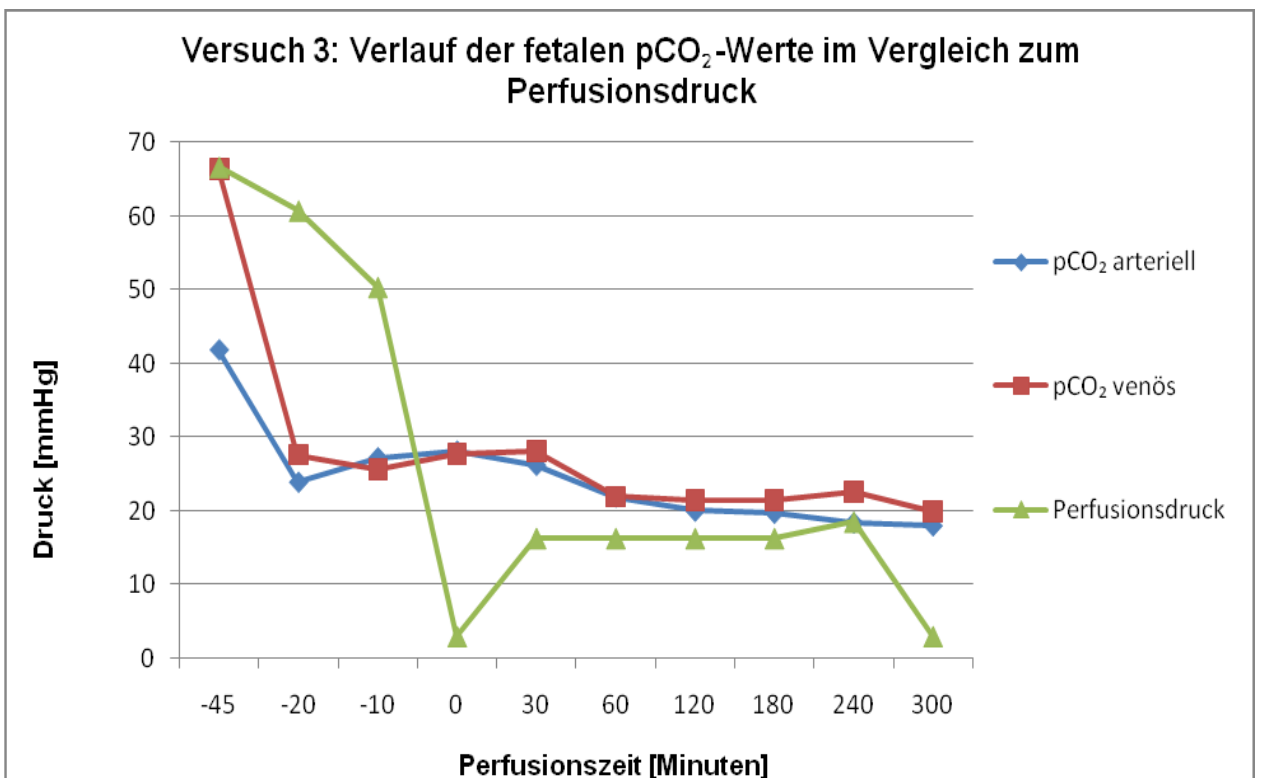
welches viel Zeit hatte sich mit dem CO_2 aus dem anaerob gewordenen Plazentagewebe (Ischämie der nicht mehr perfundierten Plazenta) anzufüllen. Der Anaerobe Zustand der Plazenta zeigte sich auch im anfänglich erhöhten Lactat- und sauren pH-Wert.



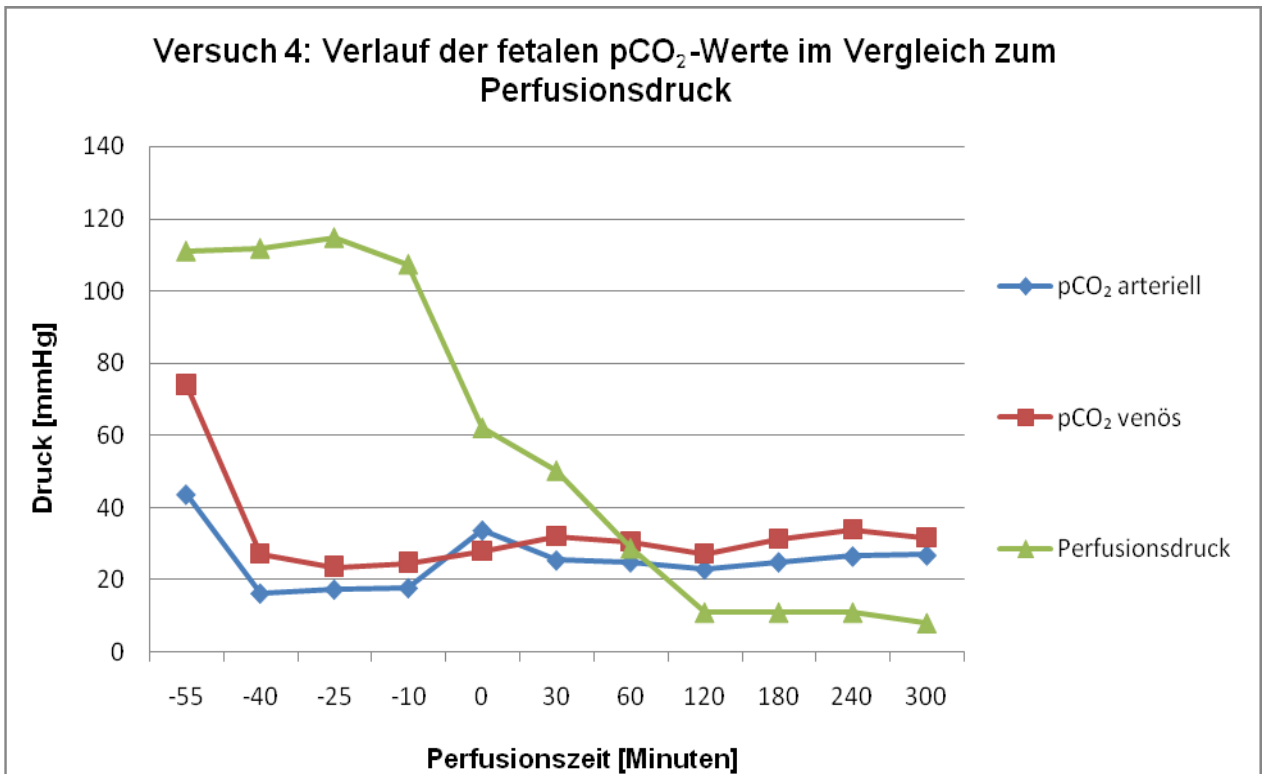
Grafik 11 – Versuch 1: pCO_2 -Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



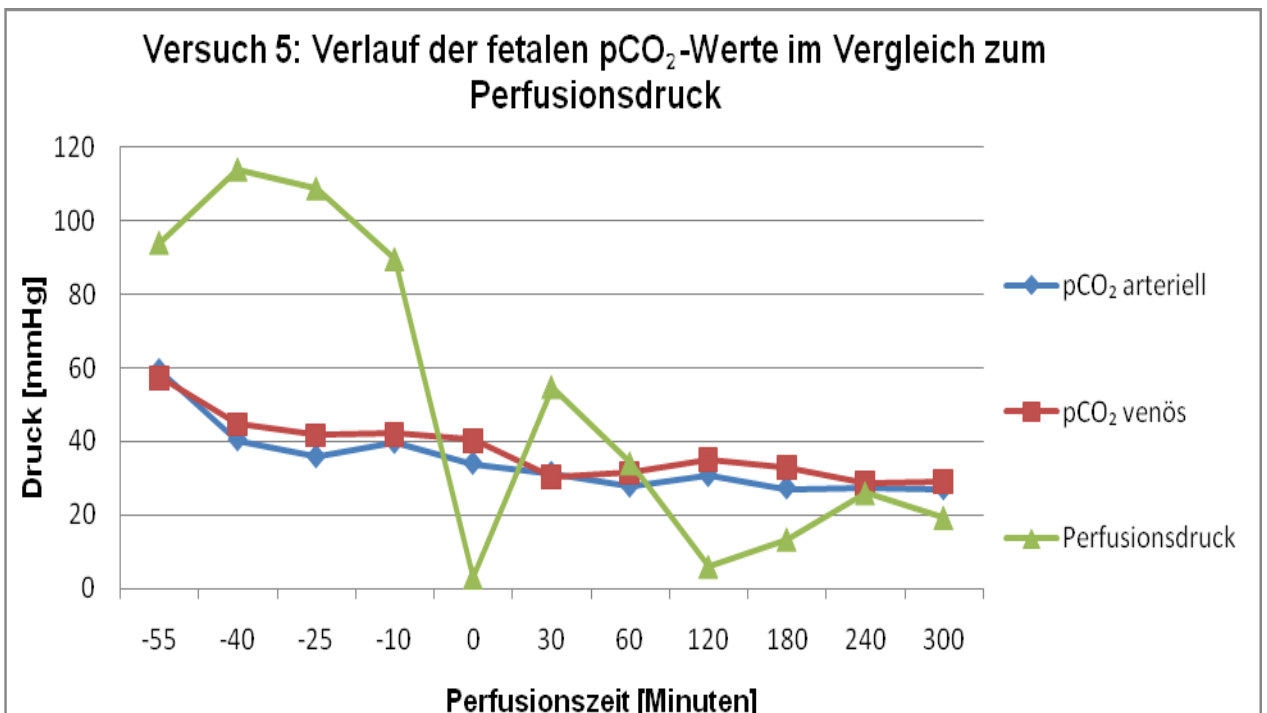
Grafik 12 – Versuch 2: pCO₂-Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



Grafik 13 – Versuch 3: pCO₂-Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck; -45 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



Grafik 14 – Versuch 4: pCO₂-Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



Grafik 15 – Versuch 5: pCO₂-Verlauf in HDL-Abhängigkeit und im Vergleich zum Perfusionsdruck; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase

3.2.4 Verlauf des pH-Werts während der Perfusion

Aufgrund des beschriebenen anaeroben Zustands der Plazenta zu Versuchsbeginn, war der venöse pH-Wert in allen Versuchen (Grafik 16-20) zu Beginn im sauren Bereich (zwischen pH 7 in Versuch 4 und 7,25 in Versuch 2). Der erste Wert für den arteriellen pH gab die Wasserstoffionenaktivität des Perfusionsmediums vor Versuchsstart wieder. Dieser wies, trotz voriger pH-Eichung des Mediums (auf dem Blut-Säure-Base-Haushalt entsprechende pH 7,4), sehr schwankende Werte auf, lediglich im dritten Versuch lag der pH-Wert bei 7,4. Im ersten Versuch lag der pH des Perfusionsmediums sogar bei basischen 7,6, im zweiten bei 7,5. Versuch 4 (pH 7,2) und 5 (pH 7,2) lagen unter dem erwünschten pH-Wert von 7,4. Da generell der pH-Wert auch vom CO₂-, wie auch vom Lactat-Gehalt des Blutes abhängt, war der venöse pH-Wert erwartungsgemäß niedriger als der arterielle.

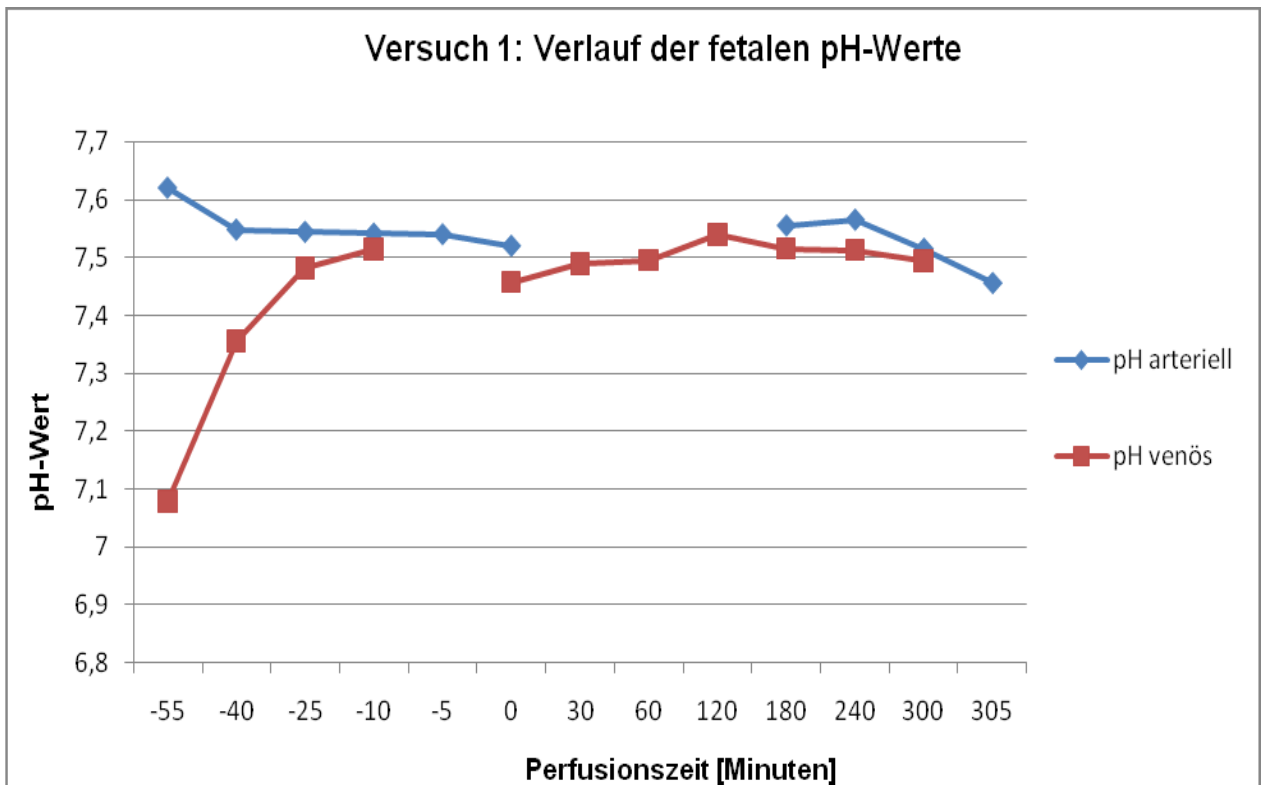
Lediglich Versuch 2 (Grafik 17) zeigte abwechselnd höhere Werte für den venösen und arteriellen pH, wobei hier lediglich pH-Unterschiede von unter 0,04 vorlagen. Dabei blieb der mittlere pH-Wert bis zum Perfusionsende bei Werten um 7,6 (+/- 0,05).

Im ersten Versuch (Grafik 16) blieb der mittlere pH-Wert durchgehend bei um die 7,5, wobei der venöse meist um Δ pH 0,02 – 0,03 niedriger war als der arterielle.

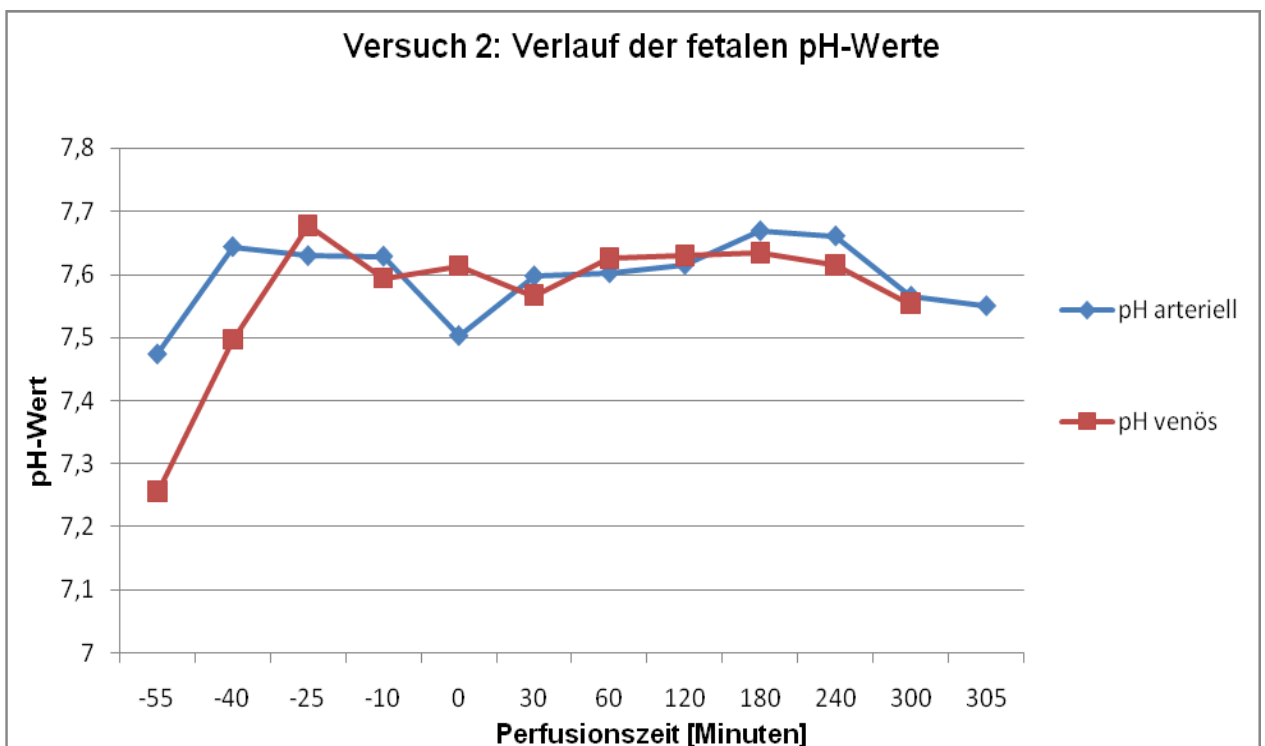
Auch im dritten Versuch (Grafik 18) war über die Dauer der Perfusion keine allzu große Änderung des pH-Werts zu beobachten. Er pendelte sich in der Konditionierungsphase bei pH 7,55 ein. Nach einer Stunde HDL-Perfusion war ein Anstieg auf einen mittleren Wert von 7,61 zu erkennen, der bis zum Rest der Perfusion konstant blieb. In dieser Phase blieb auch der Abstand zwischen dem niedrigeren venösen und arteriellen pH Wert mit 0,08 stabil.

Versuch 4 (Grafik 19) war der einzige Versuch bei dem ein absteigendes pH-Profil sichtbar wurde. Venöser und arterieller pH behalten dabei ihren Abstand zueinander bei (in der Konditionierungsphase etwa Δ pH 0,1; in der HDL-Phase etwa Δ pH 0,05). Der mittlere pH aus arteriellem und venösem pH-Wert sinkt von anfangs 7,5 auf 7,23 zum Ende des Versuchs ab.

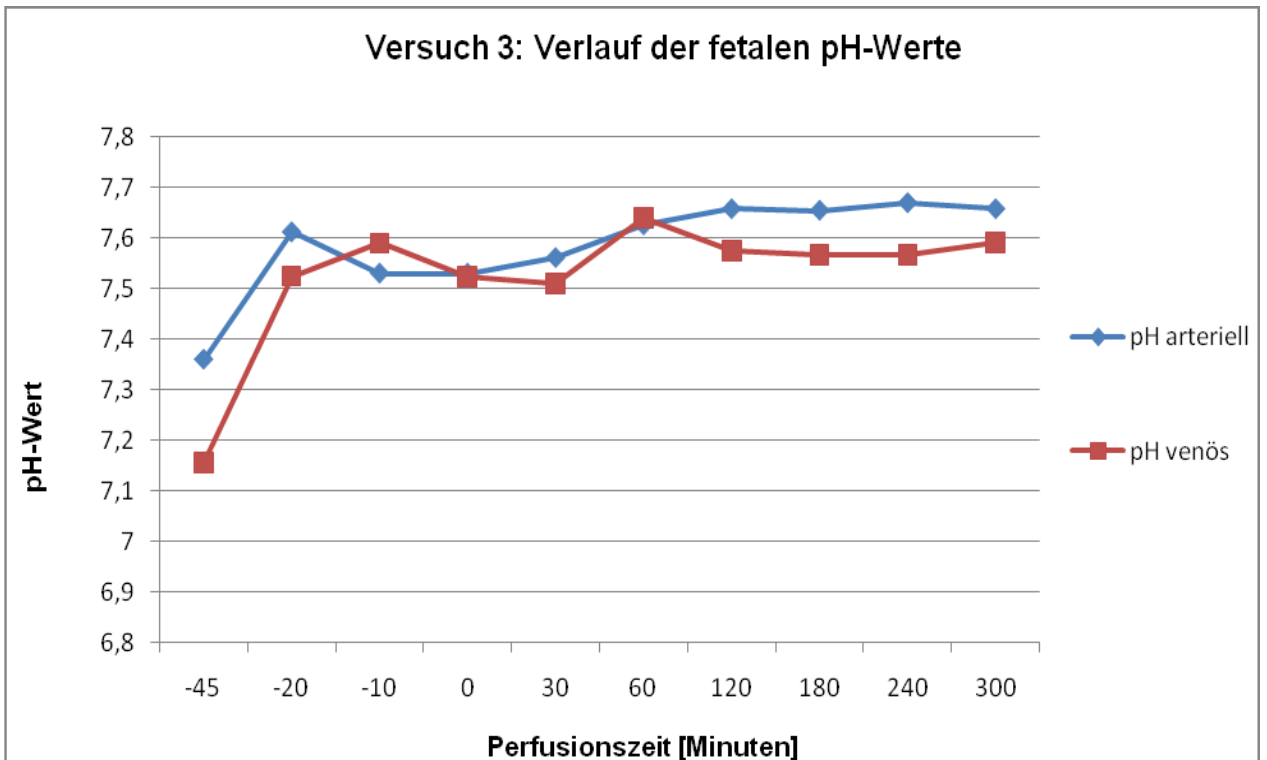
Im Gegensatz dazu zeigt Versuch 5 (Grafik 20) eine ansteigende pH-Wert-Kurve. Auch hier liegt der venöse pH durchgehend niedriger als arteriell (um Δ pH 0,02 bis maximal 0,09). Nach 15 min Konditionierungsphase war der mittlere pH noch bei 7,35, stieg dann aber bis zum Ende der HDL-Phase auf pH7,47 an.



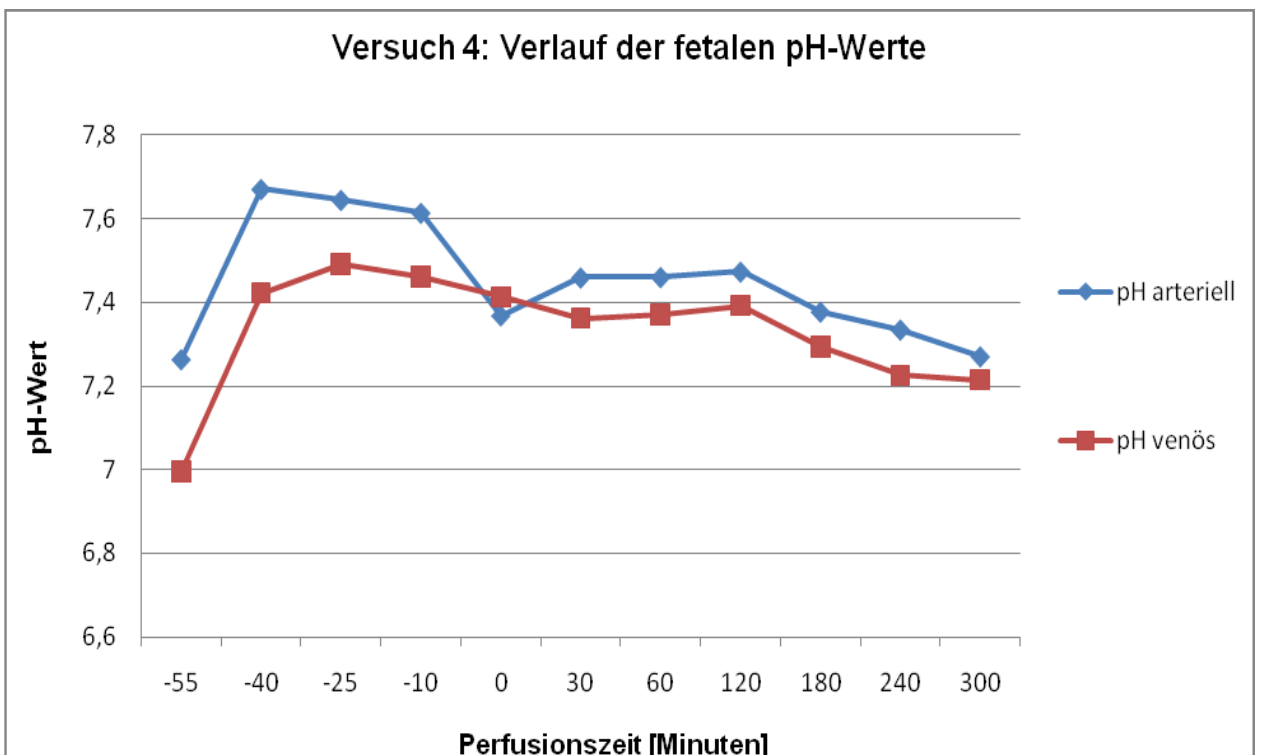
Grafik 16 – Versuch 1: pH-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



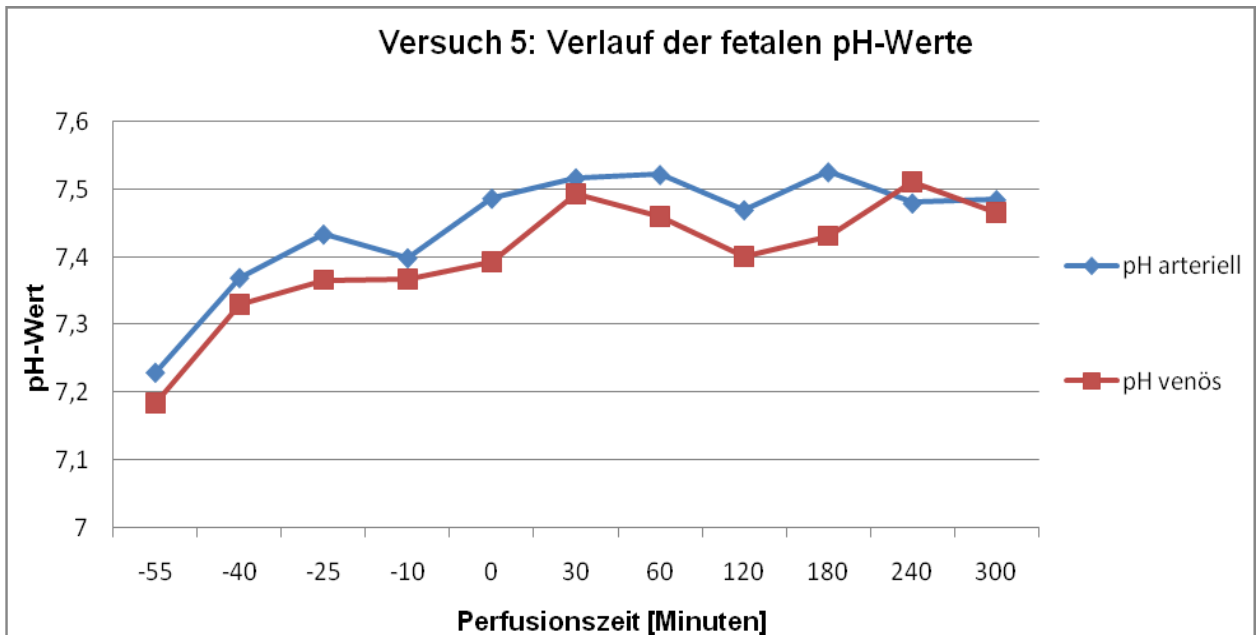
Grafik 17 – Versuch 2: pH-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



Grafik 18 – Versuch 3: pH-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



Grafik 19 – Versuch 4: pH-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



Grafik 20 – Versuch 5: pH-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase

3.2.5 Verlauf des Lactat-Wertes während der Perfusion

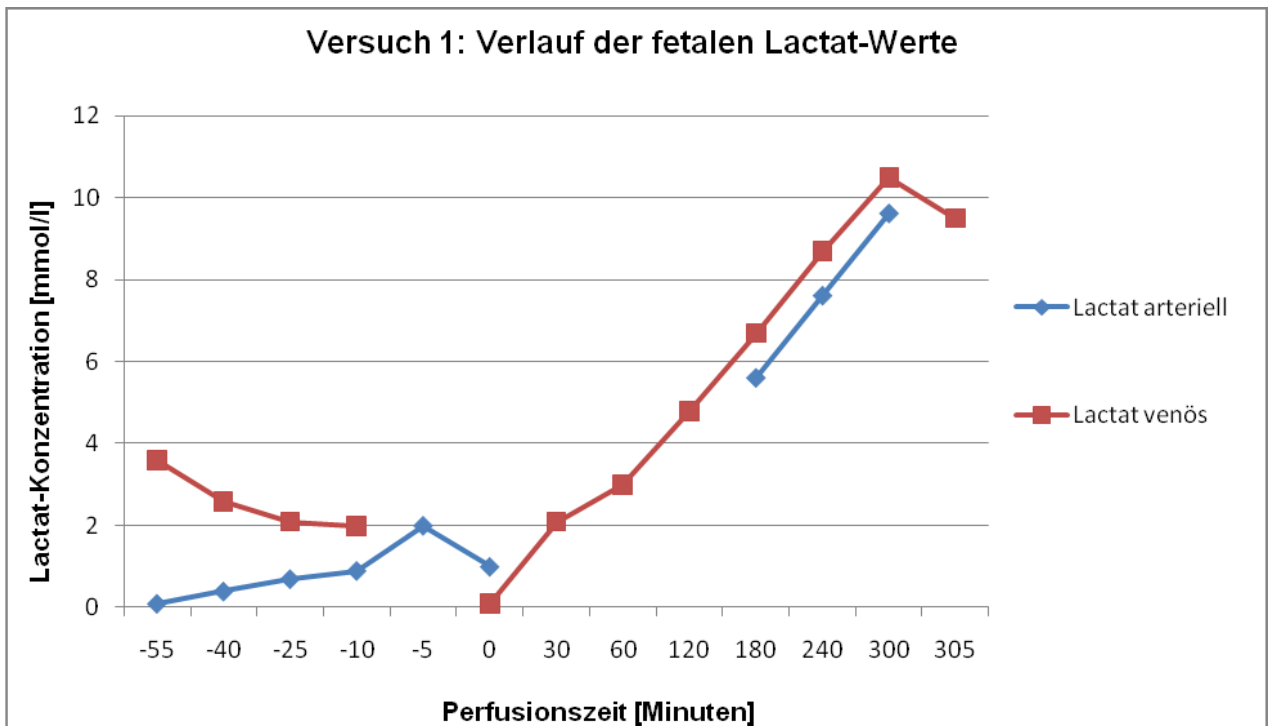
Das Lactat ist ebenfalls ein Marker für die Vitalität eines Gewebes. Entsteht eine Ischämie, bzw. eine anaerobe Situation in der Plazenta fällt vermehrt Lactat an. In den Versuchen wurde die mütterliche Seite nicht perfundiert, wodurch der Sauerstoff für einen aeroben Stoffwechsel in den Plazentazellen fehlte. Dadurch war zu erwarten, dass der Lactat-Wert über die Dauer der Perfusion ansteigen würde. Dies traf auch tatsächlich ein. Bis auf Versuch 3 stieg in allen Versuchen (Grafik 21-25) – etwa ab dem Zeitpunkt des Beginns der HDL-Perfusion – der Lactat Wert linear an. Dabei lag der venöse Wert immer leicht über dem arteriellen, was ebenfalls zu erwarten war.

Vor diesem Anstieg, also in der Konditionierungsphase, blieb das Lactat auf recht stabilem Niveau, nachdem es sich von der anfänglichen ischämischen Phase erholt hatte (erkennbar an den absinkenden Werten des venösen Lactat, nach Start des Versuchs).

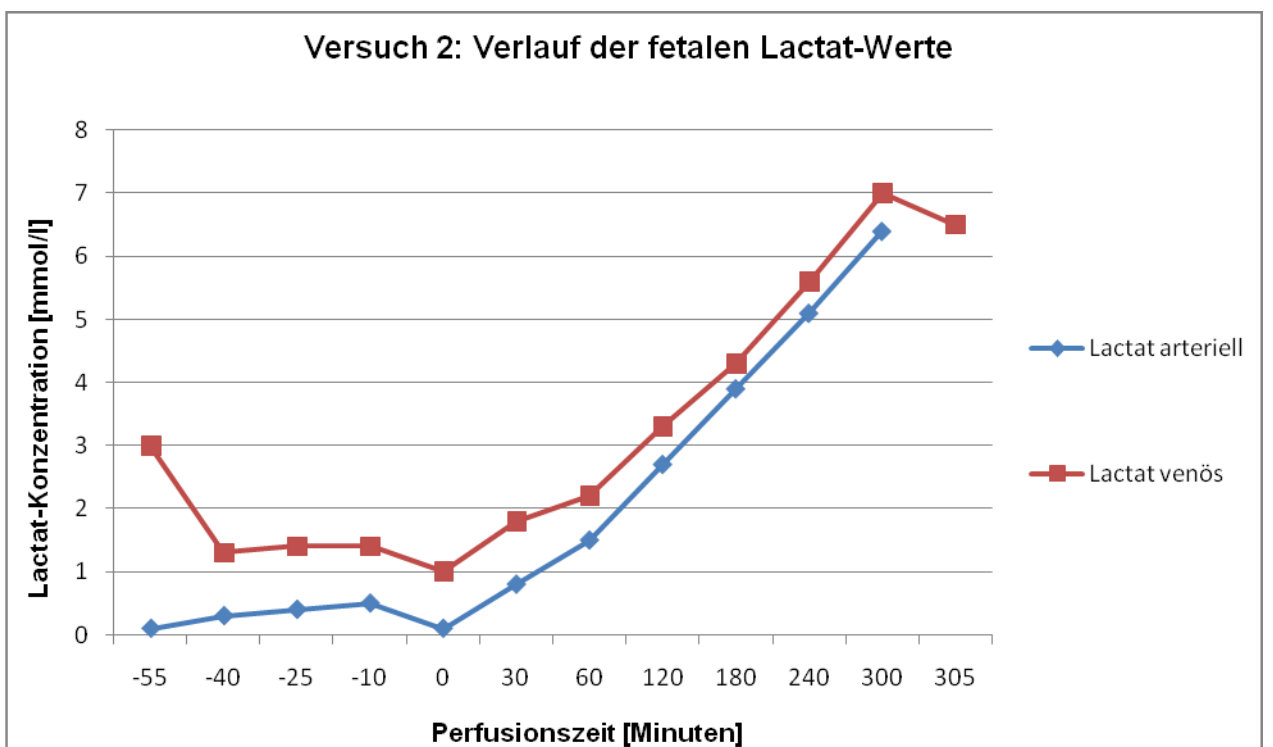
Es stellte sich nun die Frage ob der Anstieg des Lactats durch die Änderung des mit dem nativen und oxidierten HDL beladenen Perfusionsmediums bedingt war, oder ob einfach genau zu dieser Zeit die anaerobe Schwelle, aufgrund der fehlenden mütterlichen Sauerstoffversorgung, erreicht war.

Zu Versuch 3 (Grafik 23): Die Lactat-Werte dieses Versuches fielen völlig aus der Reihe, was durch einen Fehler im Messgerät bedingt war und nicht mehr

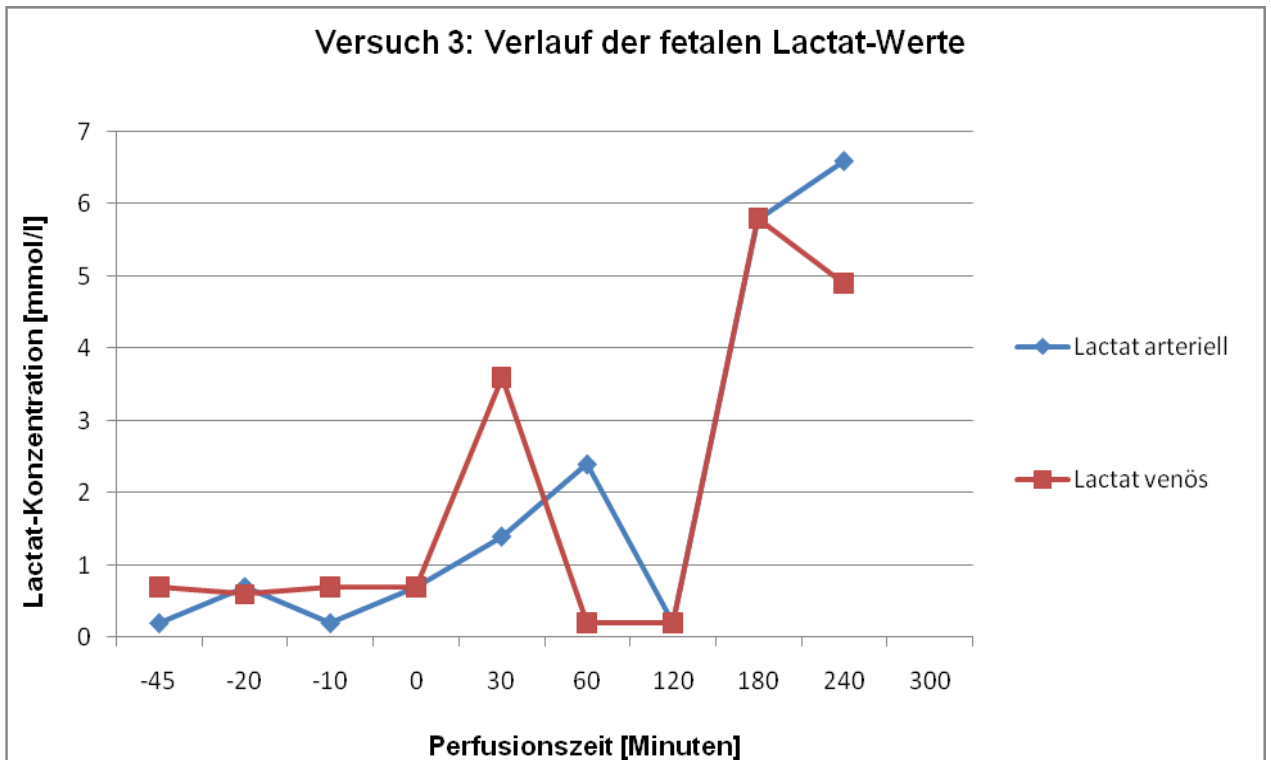
rechtzeitig behoben werden konnte. Daher wurden sie auch nicht in der Interpretation und Auswertung berücksichtigt.



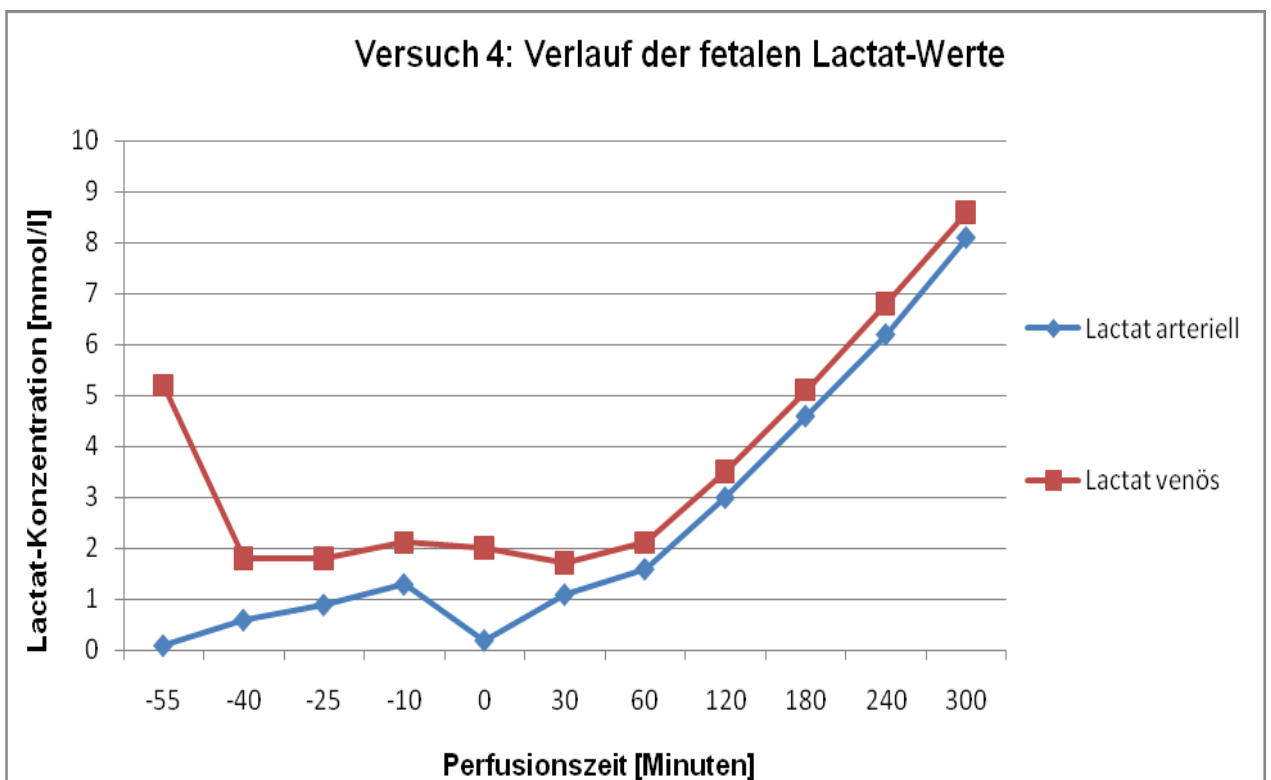
Grafik 21 – Versuch 1: Lactat-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



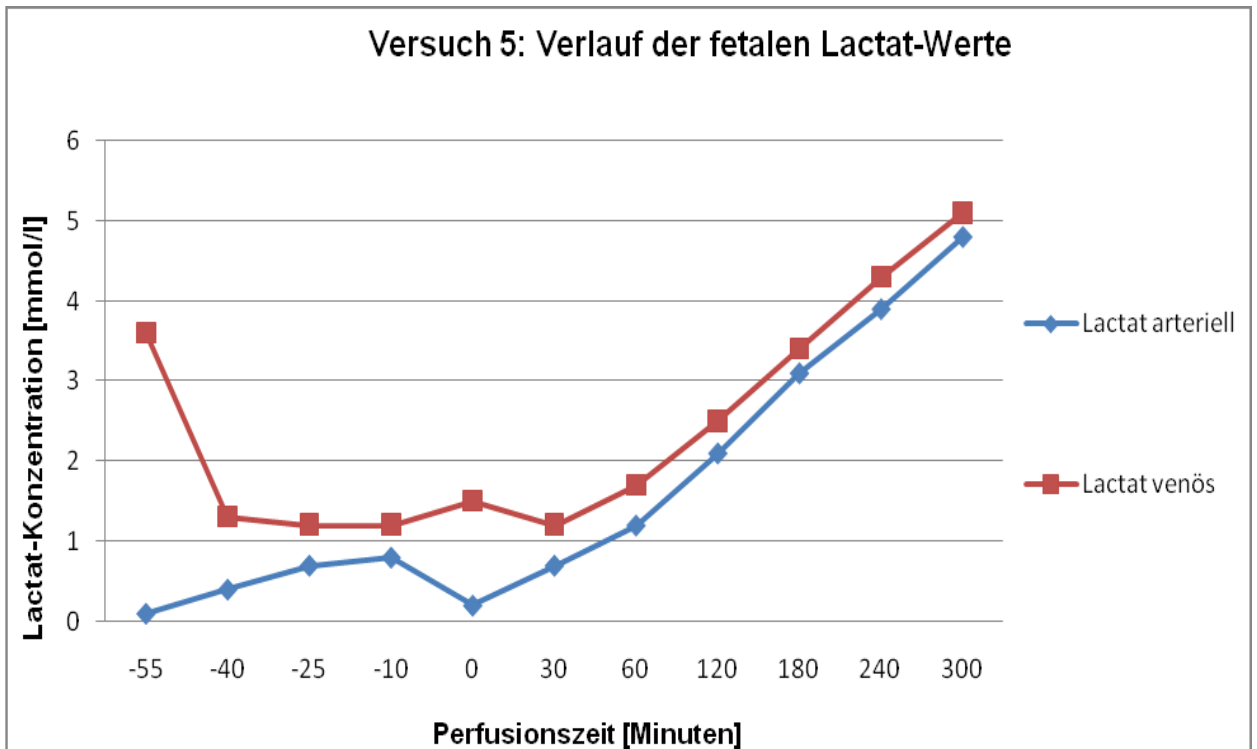
Grafik 22 – Versuch 2: Lactat-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



Grafik 23 – Versuch 3: Lactat-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



Grafik 24 – Versuch 4: Lactat-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase



Grafik 25 – Versuch 5: Lactat-Verlauf über die Zeit und in HDL-Abhängigkeit; -55 – 0 min: Konditionierungsphase ohne HDL; 0 – 300 min: HDL-Perfusionsphase

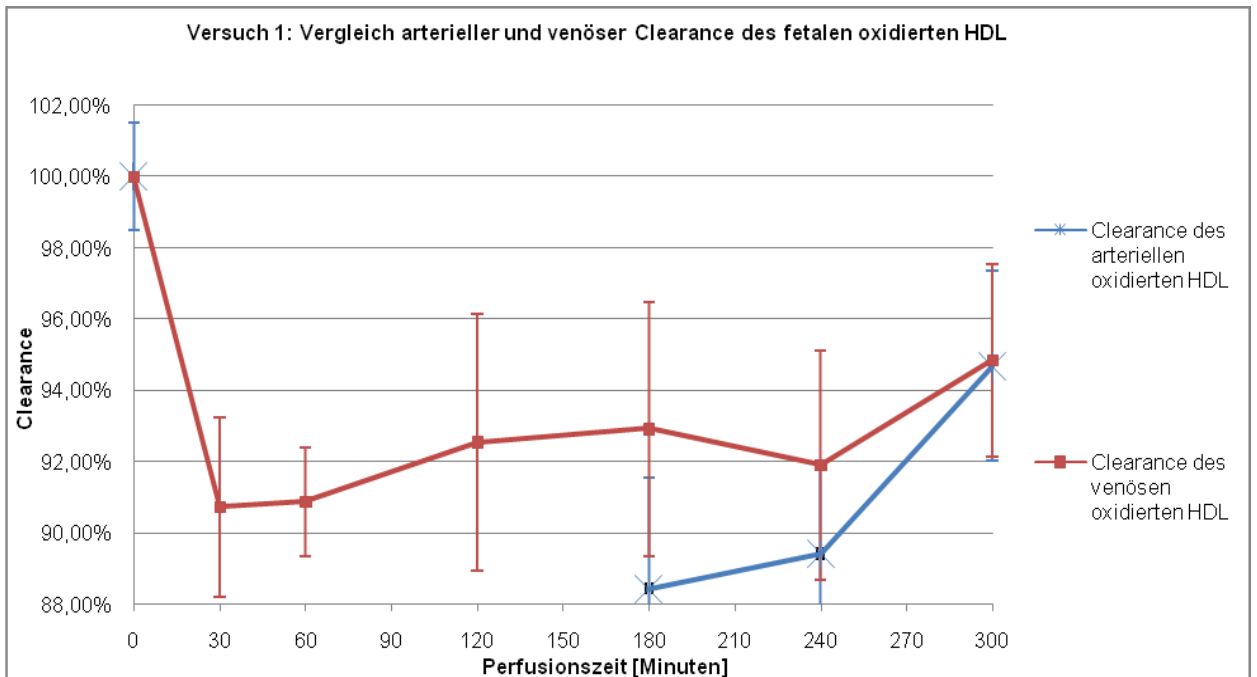
3.2.6 Vergleich der Clearance des arteriellen und venösen oxidierten HDL

In den ersten beiden Versuchen wurde nur mit oxidiertem HDL perfundiert. Daher wurde der Verlauf der Clearance arteriell und venös getrennt dargestellt. Die Konzentration (bzw. die Fluoreszenz-Intensität) des HDL vor Beginn der Perfusion wird zum Zeitpunkt $t=0$ angezeigt.

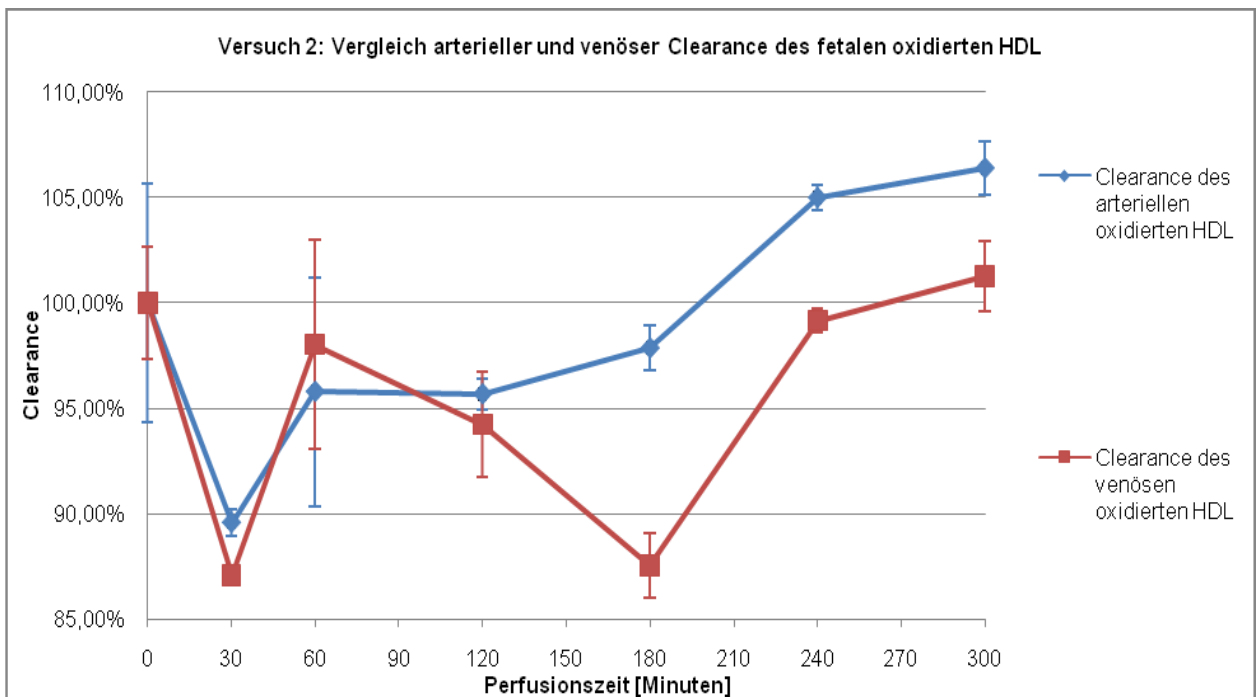
Leider fehlten in Versuch 1 (Grafik 26) die arteriellen Werte der Proben nach 30 Minuten, einer und zwei Stunden. Trotzdem ließ sich erkennen, dass das oxidierte HDL bis zur ersten venösen Probe nach 30 Minuten zu fast 10 % (von 100% auf unter 91%) von der Plazenta aufgenommen wurde. Im weiteren Verlauf stieg das oxidierte HDL im fetalen Kreislauf leicht wieder an, nach 5 Stunden Perfusion wurden 95% der ox-HDL-Ausgangskonzentration in der fetalen Zirkulation gemessen. Die gemessenen ox-HDL Konzentrationen in der Arterie waren zu jedem Zeitpunkt niedriger als in der Vene (89% vs. 93% nach 3 Stunden, 89% vs. 92% nach 4 Stunden).

Versuch 2 (Grafik 27) fiel deutlich aus der Reihe, was vor allem daran lag, dass arterielle und venöse Werte nach Ende der Perfusion höher waren, als zu Beginn. Da dies unmöglich ist und die Messungen darüber hinaus große Streuungen

aufweisen, lag am ehesten ein Messfehler vor, der eine Auswertung nicht möglich machte.



Grafik 26 – Versuch 1: Vergleich der arteriellen und venösen Clearance des oxidierten HDL



Grafik 27 – Versuch 2: Vergleich der arteriellen und venösen Clearance des oxidierten HDL

3.2.7 Vergleich der Clearance von nativem und oxidiertem HDL

In dieser Auswertungsreihe wurde verglichen wie sich die Konzentration (das heißt die Fluoreszenzintensitäten) des oxidierten und des nativen HDL ausgehend vom Anfangswert über die Zeit verändert. Da nur in den Versuchen 3-5 mit fetalem und

oxidiertem HDL (äquimolare Mengen) perfundiert wurde, konnten auch nur diese drei Versuche (Grafik 28-33) dargestellt werden.

Der erste Wert in den Versuchen war die Fluoreszenz-Intensität des HDL vor Perfusionsbeginn. Da dies der Bezugspunkt für die anderen Messungen der Clearance war, lag er bei 100%. Erwartungsgemäß zeigten die Kurven für die arterielle und venöse Auswertung der Clearance fast gleiche Verläufe. Ausnahmen waren jedoch vorhanden, meist aber nur innerhalb einer einzelnen Probe. So lag in Versuch 3 bei der 60-Minuten-Probe der venöse Wert des nativen HDL, anders als in der arteriellen Probe, unter dem Wert für das oxidierte HDL. Hier lag am wahrscheinlichsten eine Messungenauigkeit vor, denn bereits in der nächsten Probe nach 2 Stunden, sowie in der Probe zuvor, entsprach die venöse Kurve wieder der arteriellen, mit ca. 4-5% höherer Clearance für das oxidierte HDL.

In Versuch 5 erkannte man auch eine einzelne Diskrepanz zwischen venöser und arterieller Clearance-Kurve. Diese lag beim nativen HDL-Wert für 240 Minuten, denn der arterielle Wert war um etwa 8% höher als der venöse. Da hier aber für beide Werte eine recht hohe Standardabweichung (7%) vorlag, war ebenso eine Messungenauigkeit die wahrscheinlichste Ursache.

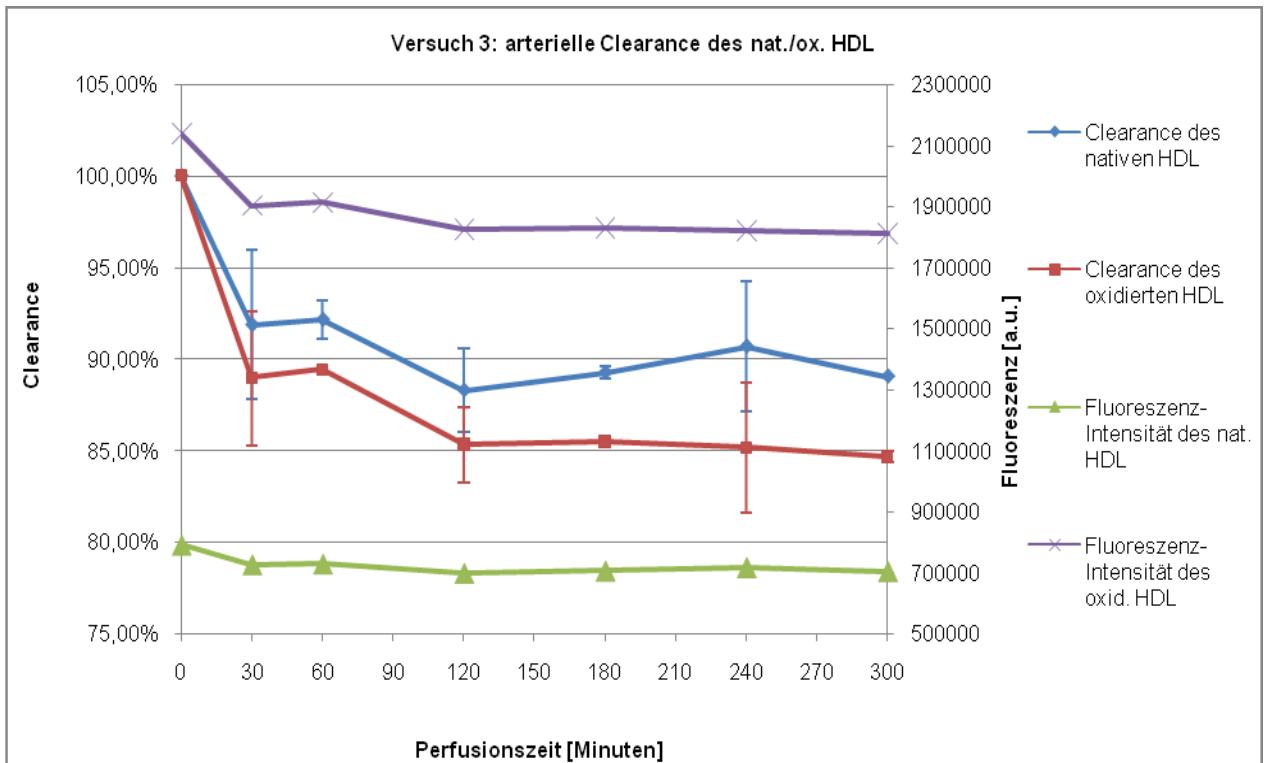
Was in allen Versuchen auffiel, war der deutlich zu erkennende Abfall der Fluoreszenz-Intensität des HDL innerhalb der ersten 30 Minuten. Das heißt der größte Anteil der Clearance, ob oxidiert oder nativ, fand zwischen dem Beginn der HDL-Perfusion und der Probe nach 30 Minuten statt, indem das oxidierte und native HDL von der Plazenta aufgenommen wurde. Ebenfalls fand direkt danach bis zur 1-Stunden-Probe wieder ein Anstieg der Konzentration statt.

In Versuch 3 (Grafik 28-29) sank das arterielle native HDL in den ersten 30 Minuten um 8% (92%), das arterielle oxidierte um 11% (89%). Anschließend fand keine so starke Abnahme mehr statt, jedoch war ein weiterer leichter Abwärtstrend der Werte zu erkennen. Schließlich waren zum Schluss noch 89% der Anfangsintensität des nativen HDL vorhanden, also nur 3% weniger als nach 30 Minuten HDL-Perfusion. Vom oxidierten HDL wurden nach den 5 Stunden noch 85% der Intensität vor Perfusionsbeginn gemessen, 4% weniger als nach 30 Minuten. Venös sahen die Werte, die Probe nach 60 Minuten ausgenommen, ähnlich aus. Sie lagen lediglich ein wenig unter den arteriellen Werten. Am

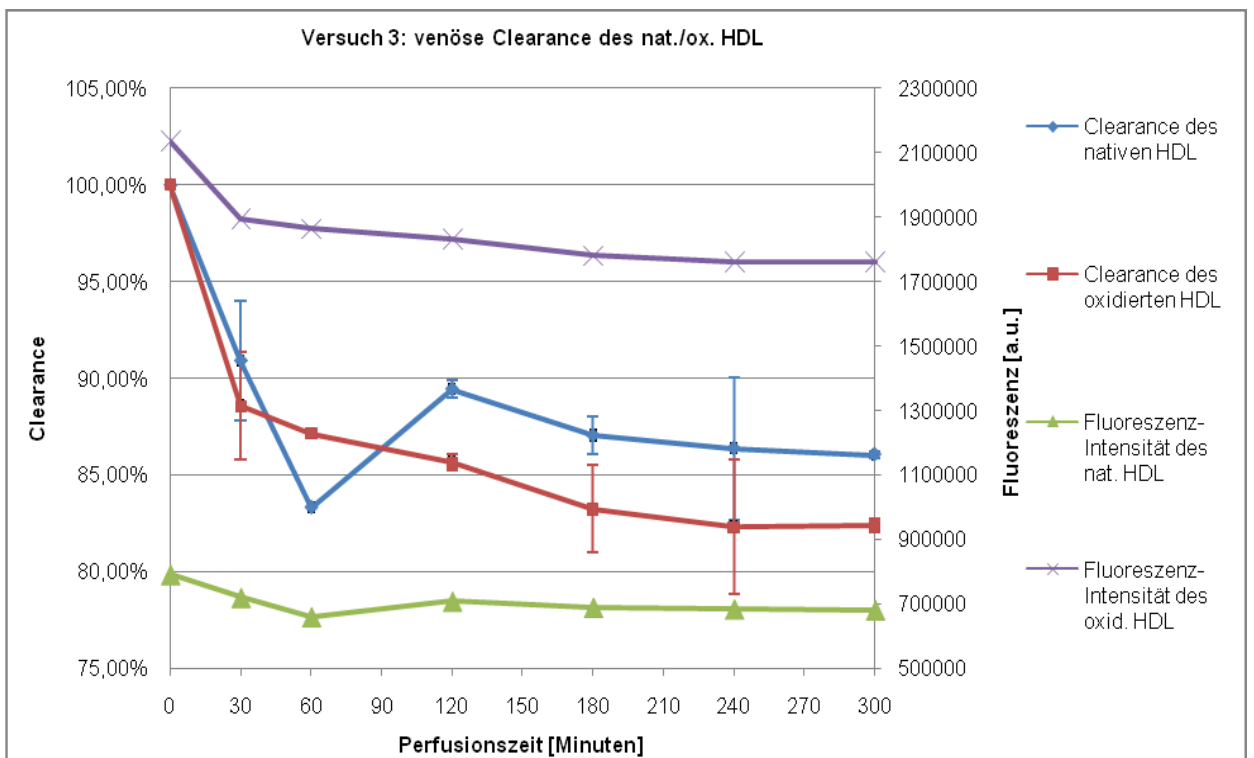
Schluss waren so für das native HDL noch 86%, für das oxidierte 83% messbar, jeweils 2% weniger als das arterielle Pendant.

Versuch 4 (Grafik 30-31) zeigte zu Beginn einen noch stärkeren Abfall für beide HDL-Varianten (nach 30 Minuten arteriell: natives HDL 70%, oxidiertes 82%; venös: natives HDL 76%, oxidiertes 83%), gefolgt von einem leichten Anstieg nach weiteren 30 Minuten (arteriell: natives HDL 75%, oxidiertes 83%; venös: natives HDL 81%, oxidiertes 85%). Anders als im dritten Versuch war hier also der native HDL-Anteil vom Ausgangswert während der ersten zwei Stunden unter dem oxidierten. Auch der weitere Verlauf der Clearancekurve unterschied sich vom dritten Versuch. Denn das oxidierte und das native HDL nahmen hier einen unterschiedlichen Verlauf. Während das oxidierte HDL im Verlauf bis zum Ende der Perfusion eine Abnahme erfuhr (auf 79% der Ausgangsintensität arteriell und venös), wurde das native HDL offenbar aus dem Plazentagewebe wieder in den fetalen Kreislauf zurücktransportiert, denn es stieg arteriell wieder um 13% bis auf 83% an (venös: von 76% auf 80%).

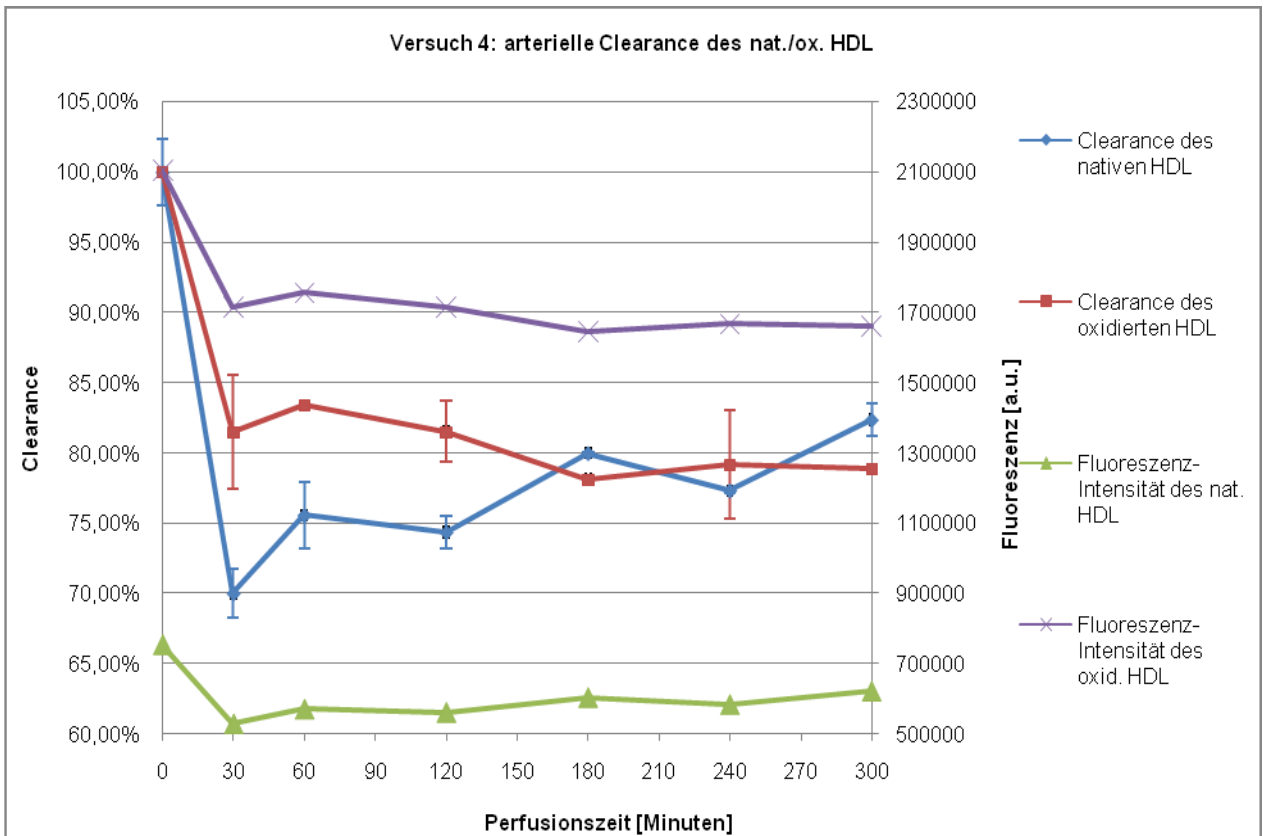
Versuch 5 (Grafik 32-33) zeigte ebenfalls einen recht steilen Abfall der HDL-Werte im fetalen Kreislauf innerhalb der ersten 30 Minuten (arteriell: natives HDL 81%, oxidiertes 77%; venös: natives HDL 85%, oxidiertes 83%). Direkt danach folgte bis zur 2-Stunden-Probe ein Anstieg (arteriell: natives HDL 95%, oxidiertes 88%; venös: natives HDL 95%, oxidiertes 86%) In diesem Versuch waren jedoch wieder die Abstände der Clearance-Werte zwischen nativem und oxidiertem HDL recht stabil (zwischen 3-8%), wobei der Anteil des nativen HDL vom Ausgangswert höher blieb als der des oxidierten HDL. Leider war in Versuch 5 die Streuung der Fluoreszenz-Messwerte recht hoch, sodass sich eine recht große Standardabweichung um die Mittelwerte ergab. Diese Messungenauigkeiten erklärten auch den recht ungleichmäßigen Verlauf des Graphen mit mehreren An- und Abstiegen der Clearance. Zum Ende der Perfusion sind noch 91% der nativen HDL-Anfangskonzentration (arteriell und venös) im fetalen Kreislauf zu finden und 84% der oxidierten (arteriell und venös).



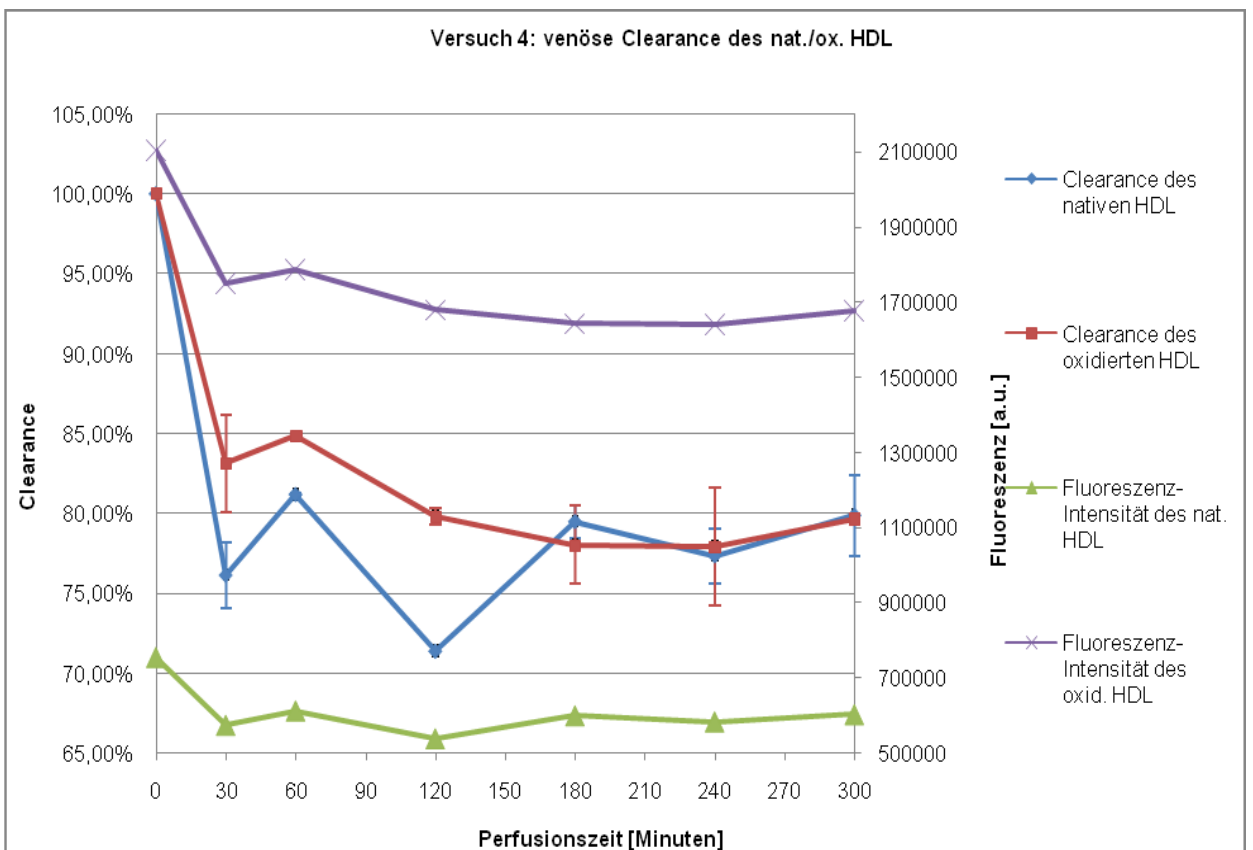
Grafik 28 – Versuch 3: Arterielle Clearance des nativen und oxidierten HDL.



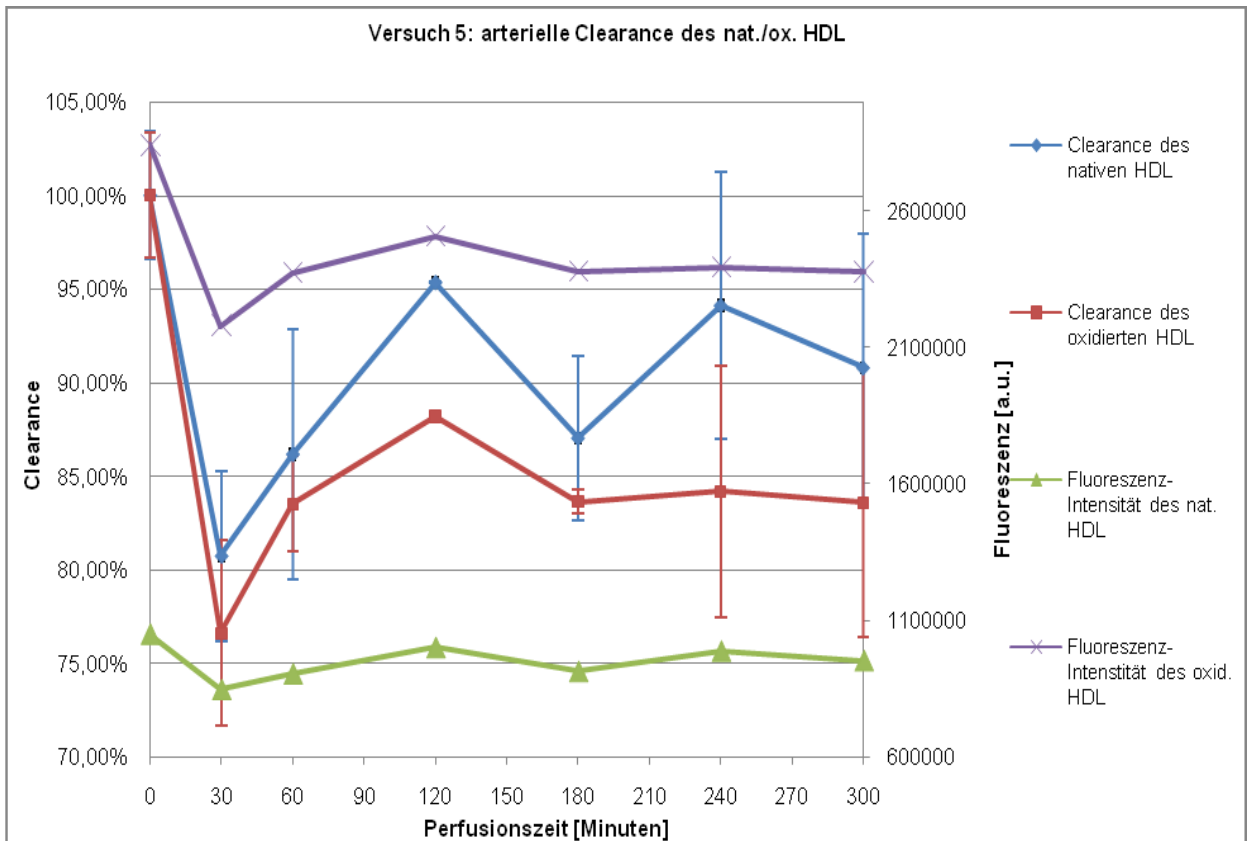
Grafik 29 – Versuch 3: Venöse Clearance des nativen und oxidierten HDL.



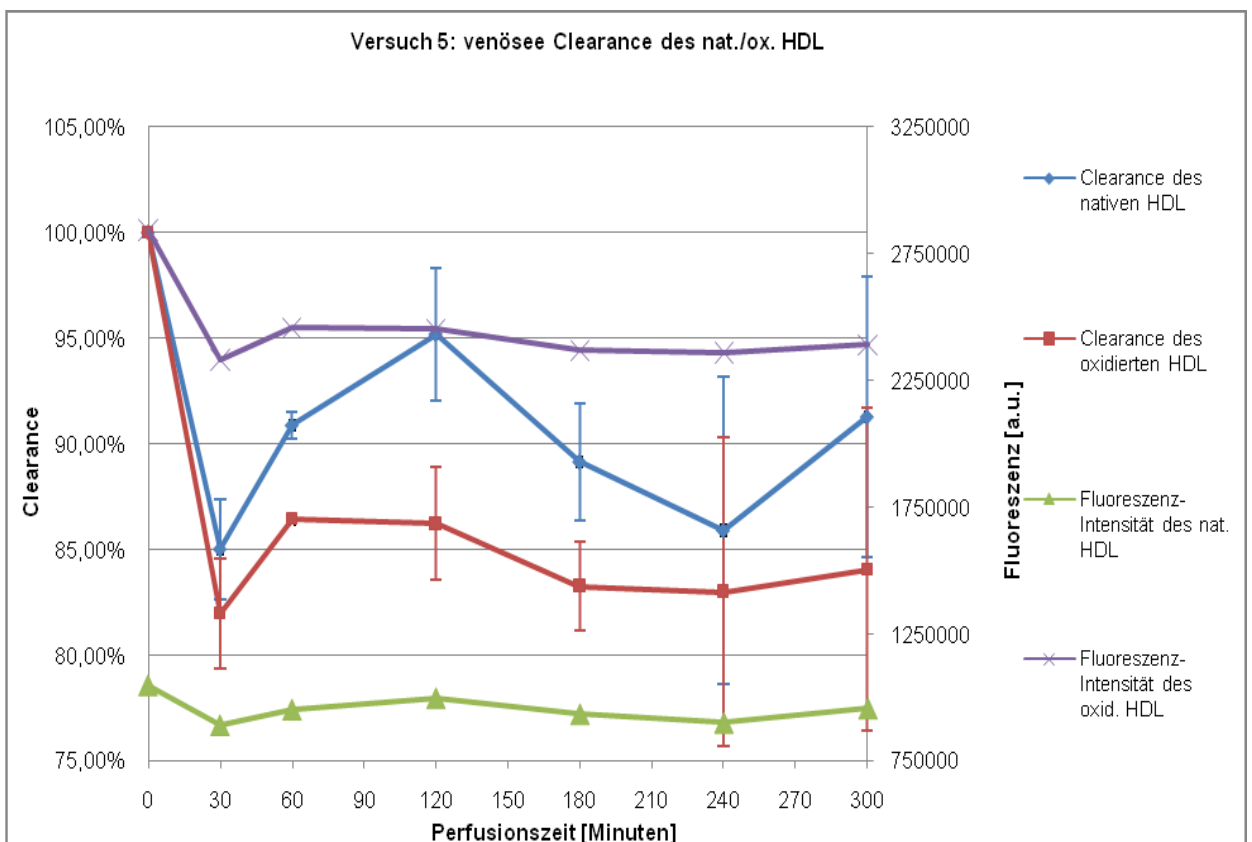
Grafik 30 – Versuch 4: Arterielle Clearance des nativen und oxidierten HDL.



Grafik 31 – Versuch 4: Venöse Clearance des nativen und oxidierten HDL.



Grafik 32 – Versuch 5: Arterielle Clearance des nativen und oxidierten HDL.



Grafik 33 – Versuch 5: Venöses Clearance des nativen und oxidierten HDL.

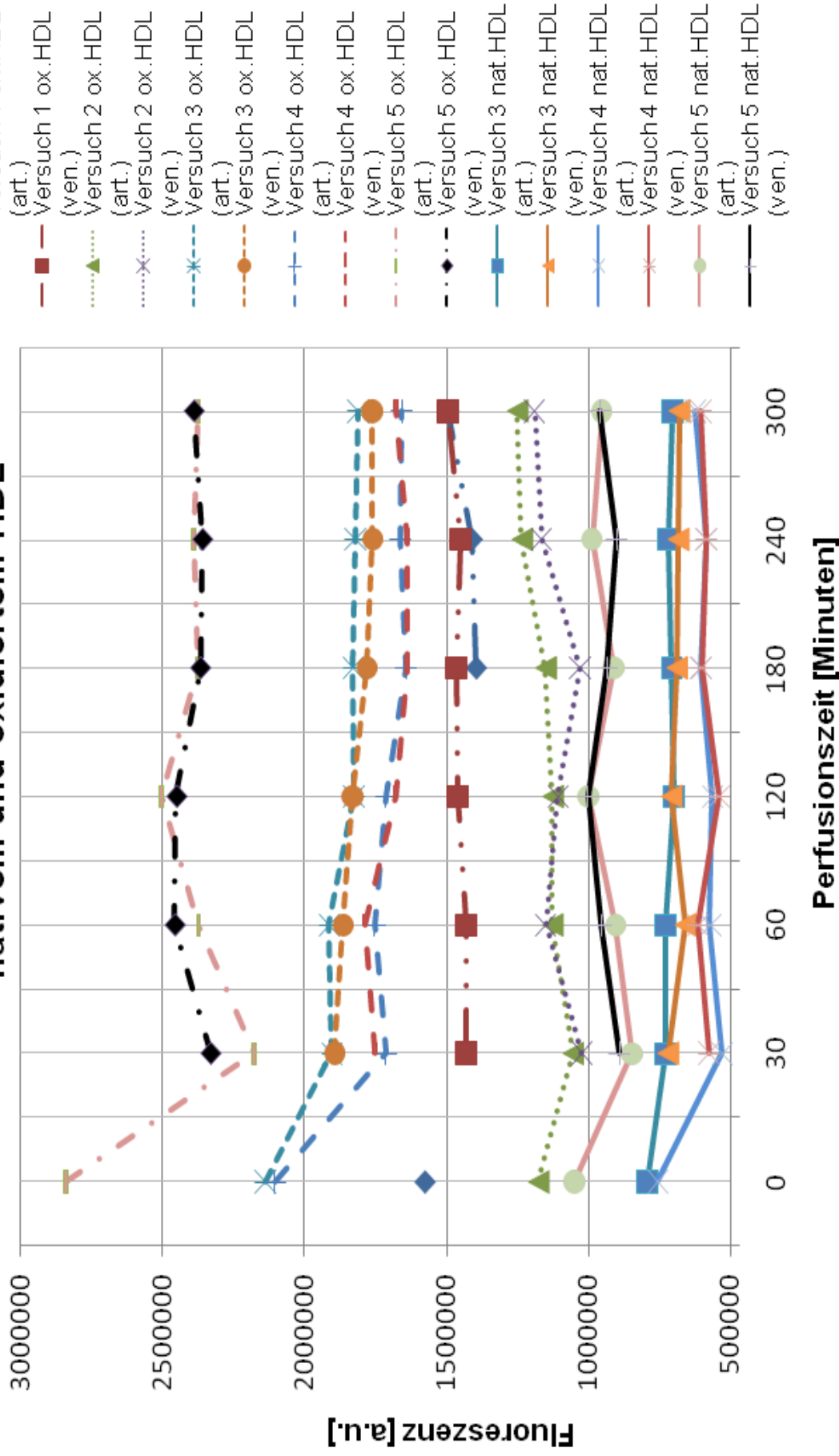
3.2.8 Vergleich der absoluten Fluoreszenzkonzentrationen von nativem und oxidiertem HDL

Die Interpretation der Grafik 34 war im Zusammenhang mit dem relativen Verhältnis der beiden HDL-Formen zueinander in 3.2.7 zu interpretieren. Sie lieferte jedoch einen Überblick über die absoluten Konzentrationsveränderungen während der Perfusionszeit. Gemessen wurde zu diesem Zweck die Intensität des an das HDL gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes, welcher damit ein indirektes Maß für die HDL-Konzentration darstellte.

Die venösen HDL-Messungen zum Zeitpunkt 0 wurden nicht berücksichtigt, da wie bereits weiter oben beschrieben, die Perfusionszeit mit dem HDL-Medium zu diesem Zeitpunkt zu kurz für eine aussagekräftige Interpretation war.

Aus den arteriellen Messungen direkt nach Zugabe des HDL's ($t=0$) ist ein sichtbares Absinken der Fluoreszenzintensität innerhalb von 30 Minuten erkennbar. Danach fielen die nat./ox.-HDL-Konzentrationsänderungen wesentlich geringer aus. Die Messungen nach 30 Minuten ergaben im Verlauf einen Anstieg des nat.-HDL in der fetalen Zirkulation, während das oxidierte HDL absteigende Messwerte (in Versuch 4 und 5 mit zwischenzeitlich kurzem Anstieg nach den ersten 30 Minuten) aufweisen konnte. Daher kann von einer erhöhten Aufnahme des ox.-HDL über die Plazenta ausgegangen werden.

Versuch 1-5: Gegenüberstellung der Fluoreszenzverläufe von nativem und oxidiertem HDL



Grafik 34 – Versuche 1-5: Vergleichende Darstellung von nativem und oxidiertem HDL

4 Diskussion

Die Annahme, dass es eine veränderte Interaktion am feto-plazentaren Endothel durch das modifizierte oxidierte HDL – verglichen zu nativem HDL – gibt, hat sich nach der Auswertung der Versuchsergebnisse bestätigt. Weiterhin wurde angenommen, dass eine veränderte Bindung des oxidierten HDL am fetalen-plazentaren Endothel zu einem Konzentrationsabfall in der fetalen Zirkulation (erhöhte Clearance) führen könnte. Auch diese Hypothese ließ sich durch die vorliegenden Daten bestätigen.

Die Gemeinsamkeiten, die alle HDL-Versuche – auch die ohne Perfusion nativen HDL's (Versuche 1 und 2) – vereinten, waren die großen Konzentrationsveränderungen in der fetalen Zirkulation innerhalb der ersten 30 Minuten. Der Großteil der oxidierten oder nativen HDL-Aufnahme, was einer Clearance über das feto-plazentare Endothel entspricht, konnte in der ersten halben Stunde gemessen werden. Danach kam es zwar durchaus noch zu Veränderungen der HDL-Konzentration, jedoch nicht mehr in solchem Ausmaß. Worüber sich – aufgrund der großen Zeitabstände zwischen den Proben – leider keine Aussage treffen ließ, war, in welcher Zeit genau das meiste HDL aufgenommen wurde. Möglicherweise gab die Plazenta bereits zum Zeitpunkt der 30-Minuten-Probe wieder mehr HDL an den fetalen Kreislauf ab, als sie aufnahm. Es war generell zu beobachten, dass nach einer Stunde das HDL in der Zirkulation vorläufig wieder anstieg, zum Teil sogar bis zu 2 Stunden nach Perfusionsbeginn, ohne aber den Ausgangswert der HDL-Konzentration zu erreichen. Vermutlich fand durch den anfänglich massiven HDL-Fluss ins Gewebe eine Übersättigung statt, die dann durch eine Wiederabgabe des HDL's in den Kreislauf kompensiert wurde. Diese ersten ein bis zwei Stunden könnten in weiteren Versuchen näher untersucht werden, um die in dieser Zeit stärksten HDL-Fluktuationen genauer zu betrachten. Kleinere Zeitabstände zwischen den einzelnen Proben, wären hier nötig, wobei durch die Probenentnahme, aufgrund des Versuchsaufbaus, der Kreislauf geöffnet werden muss, was zu einem temporären Druckabfall führt, der möglicherweise der Vitalität der Plazenta schadet. Daher sollte ein sinnvolles Zeitintervall gewählt werden.

Die Veränderungen des HDL nach den ersten 30-60 Minuten waren dann in den einzelnen Versuchen recht unterschiedlich und kein deutliches gemeinsames Muster zu erkennen. Es fiel auch auf, dass doch ein gewisser Unterschied zwischen den beiden perfundierten HDL Formen bestand. Das oxidierte HDL schien dabei verstärkt von der Plazenta aufgenommen worden zu sein. Zwar war dies im vierten Versuch anfangs umgekehrt, jedoch fand dafür in diesem Versuch im weiteren Verlauf eine Angleichung der Clearance statt, bis am Schluss des Versuchs die prozentuale Konzentration des oxidierten HDL in der Zirkulation wieder unter der des nativen HDL lag.

Das native HDL blieb nach den Schwankungen der ersten 60 Minuten dann recht stabil, schien also von der Plazenta nicht verstärkt aufgenommen, oder wieder abgegeben worden zu sein. Eventuell hielten sich die Aufnahme des nativen HDL und die Sekretion in die fetale Zirkulation die Waage. Da die Plazenta ja auch die Aufgabe hat, für eine exogene Cholesterin- – und damit verbunden – HDL-Quelle zu sorgen, wäre dies durchaus denkbar und eine konstante Regulierung des normal funktionierenden, nativen HDL sinnvoll. Die verstärkte Clearance des oxidierten HDL, die sich in den Versuchen darstellte, war möglicherweise auf die Funktionseinschränkung durch die oxidative Modifizierung zurückzuführen. Da oxidiertes HDL weniger in der Lage ist, die ABCA1-vermittelte Cholesterinaufnahme zu triggern [25,26], war eventuell auch die Lebensdauer des verwendeten oxidierten HDL verkürzt. Dies würde für den sich entwickelnden Fetus von Müttern mit Erkrankungen, die eine oxidative Veränderung des HDL bedingen (Diabetes, HELLP-Syndrom, Präeklampsie, etc.) eine mögliche Unterversorgung mit exogenem Cholesterin bedeuten. Dieses fehlt dann zum Wachstum und ist eventuell eine Ursache für Wachstumsstörungen des Feten.

Was bei diesen Versuchen generell in Frage gestellt werden musste, war wie vital die Plazenta letztlich gewesen ist, beziehungsweise wie lange sie lebendig blieb. Zwar wurden durchgehend Proben zur Beurteilung der Vitalität entnommen (pO₂, CO₂, pH, Lactat), jedoch musste auch berücksichtigt werden, dass der hier verwendete Versuchsaufbau an und für sich keine Vitalität garantiert. Die alleinige Perfusion der fetalen Seite (mit 100% N₂) bedeutete, dass der für die biologischen Energieprozesse nötige Sauerstoff, den normalerweise die maternale Seite der fetalen zuführt, nicht in der benötigten Menge zur Verfügung steht. Die nur geringen Mengen physikalisch gelösten Sauerstoffs im Perfusionsmedium waren

recht schnell, spätestens bis zum Ende der Konditionierungsphase verbraucht. Denn dies war auch etwa der Zeitpunkt, ab dem das bis dahin auf stabilem Niveau bleibende Lactat begann linear anzusteigen. Ab hier war vermutlich die anaerobe Schwelle erreicht, an dem auch die Lebensfähigkeit der Plazenta absank. Der CO_2 -Wert, und damit verbunden der pH-Wert, blieben stabil, auch wenn denkbar wäre, dass bei einem Vitalitätsverlust und einem anaeroben Stoffwechselstatus diese Werte eher ansteigen. Jedoch besitzt CO_2 bekanntermaßen eine sehr hohe Diffusionskapazität (bis 10x höher als für O_2), sodass das anfallende CO_2 über die Plazentaschranke die Zirkulation schnell wieder verlassen konnte und ein Anstieg so ausblieb.

Inwieweit die Vitalität der Plazentazellen auf die hier beschriebenen *ex vivo* Langzeitversuche Einfluss hatte, ließ sich nicht abschließend klären. Zwar fanden die größten HDL-Änderungen in den ersten ein bis zwei Stunden der HDL-Perfusionsphase statt, jedoch waren auch danach noch messbare Konzentrationsveränderungen in wesentlich geringerem Ausmaß (Anstieg des nat. HDL/Abfall des ox. HDL in der fetalen Zirkulation) zu registrieren. Ob die nur noch relativ geringen HDL-Konzentrationsveränderungen in der fetalen Zirkulation aber aufgrund einer verminderten Vitalität des Gewebes, einem Gleichgewichtszustand Liganden – Rezeptoren oder einer veränderten Rezeptorexpression am Plazentaendothel, erklärbar ist, konnte durch diese Studie nicht geklärt werden. Interessant wäre hier ein sich anschließender Versuchsaufbau mit der „dualen“ Plazentaperfusion. Dies bedeutet zusätzlich eine sauerstoffreiche Perfusion der maternalen Seite der Plazenta und dadurch lebensnähere Bedingungen, deren Auswertung noch mehr Interpretationsmöglichkeiten bieten könnte.

5 Literaturverzeichnis

1. Baumann R. Physiologie: 68 Tabellen. 6th ed. Stuttgart; New York, NY: Thieme; 2010, c 2010. S. 570ff
2. Hutson JR, Garcia-Bournissen F, Davis A, Koren G. The human placental perfusion model: a systematic review and development of a model to predict in vivo transfer of therapeutic drugs. *Clin. Pharmacol. Ther* 2011; 90(1):67–76.
3. Waldeyer A. Waldeyer Anatomie des Menschen: [Lehrbuch und Atlas in einem Band]. 18th ed. Berlin [u.a.]: de Gruyter; 2009. S.158
4. Waldeyer A. Waldeyer Anatomie des Menschen: [Lehrbuch und Atlas in einem Band]. 18th ed. Berlin [u.a.]: de Gruyter; 2009. S.159ff
5. Stauber M, Weyerstahl T. Gynäkologie und Geburtshilfe: 213 Tabellen ; [mit Video-CD-ROM: Filme zu Spontangeburt und Sectio]. 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2005. S. 463f
6. Welsch U. Lehrbuch Histologie. 3rd ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2010. S.452ff
7. Waldeyer A. Waldeyer Anatomie des Menschen: [Lehrbuch und Atlas in einem Band]. 18th ed. Berlin [u.a.]: de Gruyter; 2009. S.163
8. Mikkola HKA, Orkin SH. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 2006; 133(19):3733–44.
9. Stauber M, Weyerstahl T. Gynäkologie und Geburtshilfe: 213 Tabellen ; [mit Video-CD-ROM: Filme zu Spontangeburt und Sectio]. 3rd ed. Stuttgart: Thieme; 2007. S. 465
10. Sobotta J, Paulsen F, Waschke J. Atlas der Anatomie des Menschen. 23rd ed. München: Urban und Fischer; 2010. S. 210f
11. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Prometheus LernAtlas der Anatomie: Innere Organe. 2nd ed. Stuttgart: G. Thieme; 2009. S. 20f
12. Baumann R. Physiologie: 68 Tabellen. 6th ed. Stuttgart; New York, NY: Thieme; 2010, c 2010. S. 576f
13. Stauber M, Weyerstahl T. Gynäkologie und Geburtshilfe: 213 Tabellen ; [mit Video-CD-ROM: Filme zu Spontangeburt und Sectio]. 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2005. S. 464
14. Wadsack C, Hammer A, Levak-Frank S, Desoye G, Kozarsky KF, Hirschmugl B et al. Selective cholesteryl ester uptake from high density lipoprotein by human first trimester and term villous trophoblast cells. *Placenta* 2003; 24(2-3):131–43.
15. Lizenko MV, Regerand TI, Bakhirev AM, Petrovskii VI, Lizenko EI. [Content of the main lipid components in blood serum lipoproteins of human and of various animal species]. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol*; 43(2):155–61.
16. Karlson P, Doenecke D. Karlsons Biochemie und Pathobiochemie. 15th ed. Stuttgart, New York: Thieme; 2005. S. 307
17. Rodie VA, Caslake MJ, Stewart F, Sattar N, Ramsay JE, Greer IA et al. Fetal cord plasma lipoprotein status in uncomplicated human pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Atherosclerosis* 2004; 176(1):181–7.

-
18. Salameh WA, Mastrogiannis DS. Maternal hyperlipidemia in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 1994; 37(1):66–77.
 19. Karlson P, Doenecke D. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. 15th ed. Stuttgart, New York: Thieme; 2005. S.310
 20. Renz H. *Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin: Pathophysiologie, Pathobiochemie, Hämatologie*. Berlin [u.a.]: de Gruyter; 2003. S.68
 21. Biele C, Horton HR. *Biochemie*. 4th ed. München [u.a.]: Pearson Studium; 2008. S. 683ff
 22. Palinski W. Maternal-fetal cholesterol transport in the placenta: good, bad, and target for modulation. *Circ. Res* 2009; 104(5):569–71.
 23. Arnhold J, Furtmüller PG, Regelsberger G, Obinger C. Redox properties of the couple compound I/native enzyme of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *Eur. J. Biochem* 2001; 268(19):5142–8.
 24. Malle E, Buch T, Grone H. Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney Int* 2003; 64(6):1956–67.
 25. Shao B, Oda MN, Oram JF, Heinecke JW. Myeloperoxidase: an inflammatory enzyme for generating dysfunctional high density lipoprotein. *Curr. Opin. Cardiol* 2006; 21(4):322–8.
 26. Shao B, Oda MN, Oram JF, Heinecke JW. Myeloperoxidase: an oxidative pathway for generating dysfunctional high-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol* 2010; 23(3):447–54.

Bildquellen

Abbildung 1 <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/dd/Plazenta.png>

Abbildung 2 Rodie VA, Caslake MJ, Stewart F, Sattar N, Ramsay JE, Greer IA et al. Fetal cord plasma lipoprotein status in uncomplicated human pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Atherosclerosis* 2004; 176(1):181–7.

Abbildung 3 http://1.2.3.13/bmi/www.invitrogen.com/etc/medialib/en/images/ics_organized/References/the-handbook/Fluorophores-Amine-Reactive-Derivatives/Alexa-Fluor-Dyes.Par.87769.Image.559.310.1.s001432-Alexa-Fluor-Dyes-gif.gif

Abbildung 4 http://3.bp.blogspot.com/_rKvAmdl5y-8/TO5zFvdH_I/AAAAAAAAADM0/X3ld4UnLdVo/s1600/Placenta.jpg

Abbildung 5 selbst erstellt