

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Prof. Dr. med. Kurt Ullrich

Sektion Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin
Prof. Dr. med. Dominique Singer

Mikrorespirometrische und mikrokalorimetrische Untersuchungen an humanen Plazentaprobe:

Grundlegende Untersuchungen zur Nachweisbarkeit und zum
Zustandekommen einer erhöhten Ischämietoleranz

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

André Feldmann
aus Walsrode

Hamburg 2013

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
am: 27.08.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. D. Singer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. B. Hüneke

Inhaltsverzeichnis

1 Arbeitshypothese	1
2 Einleitung	2
2.1 Die Plazenta.....	2
2.1.1 Entwicklung und Funktionen	2
2.1.2 Atemgas- und Nährstoffaustausch.....	4
2.1.2.1 Austausch der Atemgase.....	5
2.1.2.2 Austausch von Nährstoffen.....	6
2.1.3 Hormonproduktion.....	8
2.1.4 Energiegewinnung.....	9
2.1.5 Hypoxie-/Ischämietoleranz.....	11
2.2 Methoden zur Untersuchung des Gewebstoffwechsels.....	13
2.2.1 Prinzip der Mikrorespirometrie.....	13
2.2.2 Prinzip der Mikrokalorimetrie.....	16
2.3 Fragestellungen.....	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Material.....	20
3.1.1 Geräte.....	20
3.1.2 Reagenzien.....	21
3.1.3 Plazentaprobe.....	22
3.2 Gewinnung der Biopsate.....	22
3.3 Durchführung der Messungen.....	24
3.3.1 Mikrorespirometrische Messungen.....	24
3.3.2 Vergleichende mikrorespirometrische und mikrokalorimetrische Messungen.....	25
3.4 Herstellung der Medien.....	26
3.5 Messung des Sauerstoffverbrauches.....	27
3.5.1 Ablauf der „High resolution – Respirometrie“.....	27
3.5.2 Kalibrierung des Sauerstoffsensors.....	29
3.5.3 Auswertung der Ergebnisse der mikrorespirometrischen Messungen.....	30
3.6 Messung der Wärmeproduktion.....	31
3.6.1 Ablauf der Mikrokalorimetrie.....	31
3.6.2 Kalibrierung der Peltier-Elemente.....	31
3.6.3 Auswertung der Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen.....	32
3.7 Ermittlung des Trockengewichtes.....	32
3.8 Ethikvotum.....	32
4 Ergebnisse	33
4.1 Sauerstoffverbrauch von Plazentaprobe in Ringer-Lösung.....	33

4.2 Sauerstoffverbrauch von Plazentaprobe in Ringer-Lösung unter Glukosezusatz.....	34
4.3 Sauerstoffverbrauch von Plazentaprobe in Ringer-Lösung unter Glukosezusatz nach Langzeitischämie	35
4.4 Sauerstoffverbrauch und Wärmeproduktion von Plazentaprobe in PBS-Lösung.....	36
4.4.1 Sauerstoffverbrauch.....	37
4.4.2 Wärmeproduktion.....	38
4.5 Relativer Trockengewichtsanteil am Feuchtgewicht.....	39
5 Diskussion.....	40
5.1 Methodenkritik.....	40
5.1.1 Probengewinnung.....	40
5.1.2 Probengröße („crowding effect“).....	41
5.1.3 Inkubationsbedingungen.....	42
5.2 Mikrorespirometrische Messungen.....	44
5.2.1 Kurvenverläufe und „crowding effect“.....	44
5.2.2 Einfluss von Glukosezusatz und Ischämiedauer.....	46
5.2.3 Vergleich der Messergebnisse mit Literaturdaten.....	49
5.3 Vergleichende respirokalorimetrische Messungen.....	52
5.3.1 Mikrokolorimetrische Kurvenverläufe und Einfluss von Glukosezusatz.....	52
5.3.2 Vergleich der mikrokolorimetrischen Messwerte mit Literaturdaten.....	55
5.3.3 Vergleich zwischen Wärmeproduktion und Sauerstoffverbrauch.....	56
6 Zusammenfassung.....	60
7 Literaturverzeichnis.....	62
8 Anhang.....	67
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	67
8.2 Abbildungsverzeichnis.....	69
8.3 Lebenslauf.....	71
8.4 Danksagungen.....	72
8.5 Eidesstattliche Versicherung	73

1 Arbeitshypothese

Die menschliche Plazenta spielt als Barriere zwischen mütterlichem und kindlichem Kreislauf eine wichtige Rolle für die ungestörte Entwicklung des Embryos bzw. Feten. Gleichzeitig erfüllt sie eine Reihe von Transport- und Synthesefunktionen, die mit einer hohen Stoffwechselaktivität einhergehen. Trotz dieser hohen Energieumsatzrate ist in der Vergangenheit wiederholt aufgefallen, dass die Plazenta eine überraschend hohe Toleranz gegenüber Mangelversorgung aufweist und auch nach längeren Phasen von Hypoxie/Ischämie in der Lage ist, ihre Funktionen weitgehend ungestört wieder aufzunehmen. Die Mechanismen dieser Hypoxietoleranz sind jedoch noch weitgehend ungeklärt. Vereinzelte Literaturbefunde deuten darauf hin, dass sie zumindest teilweise auf der Fähigkeit beruhen könnte, den Sauerstoffverbrauch als Reaktion auf ein reduziertes Sauerstoffangebot „aktiv“ zu drosseln. Damit wäre die Plazenta das erste menschliche Gewebe, das zu einem „hypoxischen Hypometabolismus“ befähigt wäre, wie er in früheren Arbeiten beispielsweise auch als Mechanismus der erhöhten Hypoxietoleranz bei neonatalen Kleinsäugetern (Ratten, Mäusen) postuliert wurde.

Nachdem diese früheren Arbeiten u.a. mit respirometrischer (Messung des O₂-Verbrauchs) und kalorimetrischer (Messung der Wärmeproduktion) Methodik durchgeführt worden waren, sollte hier untersucht werden, ob dieselben Methoden auch zur Untersuchung menschlicher Plazentaprobe geeignet sind. Dabei sollte zusätzlich darauf geachtet werden, inwieweit sich aus der absoluten Höhe und dem zeitlichen Verlauf der Energieumsatzraten, aus der Reaktivität des Stoffwechsels auf Glukosezusatz und aus dem Verhältnis von Sauerstoffverbrauch und Wärmeproduktion bereits Hinweise auf die erhöhte Hypoxie-/Ischämietoleranz von menschlichem Plazentagewebe und den möglicherweise zugrundeliegenden Mechanismus gewinnen lassen. Wenn die Plazentaprobe tatsächlich eine besondere Überlebensfähigkeit aufweisen, sollte sich dies in einer entsprechend langsamen „Absterbekurve“, einer lange erhaltenen Reaktivität auf Glukosezufuhr, einem niedrigen, aber stabilen Sauerstoffverbrauch und einer hohen anaeroben Wärmeproduktion äußern.

2 Einleitung

2.1 Die Plazenta

Die Plazenta ist der Regulator zwischen dem mütterlichen Kreislauf und dem Kreislauf des ungeborenen Kindes. Dabei erfüllt die Plazenta nicht nur die Funktion der Sauerstoffversorgung, sondern dient auch der Aufrechterhaltung einer stabilen fetalen Stoffwechselsituation und der Produktion verschiedener Hormone. Ohne eine funktionsfähige Plazenta ist eine regelrechte Schwangerschaft und Entwicklung nicht möglich.

2.1.1 Entwicklung und Funktionen

Zum besseren Verständnis der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse soll hier zunächst die Entwicklung und Physiologie der menschlichen Plazenta kurz beschrieben werden.

Die Blastozyste beginnt etwa an Tag 6 mit der Implantation in das mütterliche Endometrium. Zu diesem Zeitpunkt besteht die Blastozyste aus einer äußeren Hülle, dem Trophoblasten und dem darin liegendem Embryoblasten. Der Trophoblast wiederum besteht aus einem zweischichtigen Epithel, dem Synzytiotrophoblasten (äußere Zellschicht) und dem Zytotrophoblasten (innere Zellschicht). Etwa am 13. bis 14. Tag (Gude et al. 2004) beginnt der Synzytiotrophoblast in das mütterliche Endometrium einzuwachsen und Lakunen zu bilden, in welche arterielles, mütterliches Blut einfließt (primäre Zotten). Der venöse Abfluss findet über Venen des mütterlichen Endometriums statt. In die so entstandenen Plazentatrabeln wächst nun auch der Zytotrophoblast ein und kleidet den Synzytiotrophoblasten aus. In die primären Zotten dringt das embryonale Mesoderm ein (sekundäre Zotten). Innerhalb des embryonalen

Mesodermes entwickeln sich, etwa in der vierten Schwangerschaftswoche, erste Blutkapillaren (tertiäre Zotten). Ebenfalls von Mesoderm ausgekleidet ist die Blastozyste (Chorionhöhle). Die Zotten bilden ein sich verzweigendes System, in welchem einige Äste stoffwechselaktiv in den blutgefüllten Lakunen enden, andere, die sogenannten Haftzotten, reichen bis an das maternale Endometrium heran und verankern so die Plazenta und den Embryo.

Nach etwa 10 Wochen beginnt die Amnionhöhle sich stark zu vergrößern und die Chorionhöhle zu verdrängen. Während die Zotten an der Uterus zugewandten Seite sich weiter vergrößern und sich zur reifen Plazenta entwickeln (Chorion frondosum) bilden sich die Zotten auf der gegenüberliegenden Seite zum Chorion laeve zurück. In der 13. Schwangerschaftswoche ist die Plazenta dann vollständig entwickelt.

Die ausgereifte, menschliche Plazenta ist ein etwa 500 Gramm schweres Organ, wobei das Gewicht bei termingerechter Geburt eine hohe Schwankungsbreite aufweist. Bei Untersuchungen von Laga et al. wurden 18 Plazenten mit einem Gewicht zwischen 275 g und 566 g gemessen. Das durchschnittliche Gewicht war hier 469 g (Laga et al. 1973). Ihre Größe beträgt im Durchmesser etwa 20 cm bei einer Dicke von etwa 2-3 cm (Welsch 2005).

Als Bindeglied zwischen Mutter und Kind übernimmt die Plazenta für den Feten lebenswichtige Funktionen. Hauptsächlich kann man dabei folgende Funktionen unterscheiden (Gude et al. 2004):

- Transport von Sauerstoff und Nährstoffen (Mutter → Kind)
- Transport von Kohlendioxid und Abfallprodukten (Kind → Mutter)
- Abschirmung des Kindes vor Infektionen
- Produktion von Hormonen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem placentaren Stoffwechsel.

Daher soll hier zunächst ein besonderes Augenmerk auf die Funktion der Plazenta als Schaltzentrale des Atemgas- und Nährstoffaustausches gelegt werden.

2.1.2 Atemgas- und Nährstoffaustausch

Der Austausch von Atemgasen und Nährstoffen zwischen Mutter und Kind erfolgt im Bereich der Plazentazotten; die gesamte für den Gasaustausch zur Verfügung stehende Austauschfläche beträgt etwa 1,8 m² und ergibt sich aus der an die Kapillaren angrenzende Zottenoberfläche (Aherne und Dunnill 1966).

Ähnlich wie in Lunge oder Gehirn (Blut-Luft-Schranke, Blut-Hirn-Schranke) findet sich auch in der Plazenta zwischen dem arteriellen Blut der Mutter im intervillösen Raum und dem fetalen Blut in den Kapillaren eine Schranke, die sogenannte Plazentaschranke, die sich aus verschiedenen Strukturen zusammensetzt. Diese Abgrenzung ist notwendig, um den Fetus vor exogenen Noxen aus dem Blut der Mutter zu schützen.

Für alle Substanzen gilt, dass sie folgende Strukturen überwinden müssen (Welsch 2005):

- die Synzytiotrophoblastenschicht,
- lokal vereinzelte Zytotrophoblasten,
- die Basallamina der Trophoblasten,
- das faserarme Bindegewebe der Zotten,
- die Basallamina der Kapillarendothelien und
- die Endothelzellen der Zottenkapillaren.

Der Austausch unterscheidet sich für Atemgase und für (Nähr-)Stoffe darin, dass die ersteren durch physikalische Diffusion, die letzteren durch aktiven Transport die Plazenta passieren.

2.1.2.1 Austausch der Atemgase

Für den Übertritt von O₂ und CO₂ berücksichtigt das Modell von Laga et al. (1973) die Tatsache, dass die Atemgase zusätzlich durch die Membran der maternalen Erythrozyten, das maternale Blutplasma, das fetale Plasma und die fetale Erythrozytenmembran diffundieren müssen (Laga et al. 1973). Da jedes dieser Kompartimente einen Widerstand darstellt, erhöht sich dementsprechend, mit steigender Anzahl, auch der Gesamtwiderstand gemäß der Formel: $R_{ges} = R_1 + R_2 + R_3 + R_n$.

Durch den vergleichsweise hohen Diffusionswiderstand kommt es über der Plazenta zu einem stärkeren Partialdruckabfall, sodass der mittlere pO₂ im fetalen Kreislauf lediglich 25-30 mmHg (gegenüber 95-100 mmHg im arteriellen mütterlichen Blut) beträgt. Dieser Umstand ist früher (vor allem im Vergleich zur Lunge, in der sich der Partialdruckabfall über der Blut-Luft-Schranke auf wenige mmHg beläuft) als „Insuffizienz“ der Plazenta gewertet worden. Heute wird dagegen vermutet, dass der Säugetierfet in der Evolution „absichtlich“ in ein hypoxisches Kompartiment verlagert wurde, um ihn (angesichts seiner noch unausgereiften Entgiftungssysteme für toxische Sauerstoffradikale) vor den schädlichen Effekten von Sauerstoff zu schützen (Ar und Mover 1994; Singer 2002; Burton 2009; Maltepe und Saugstad 2009). Im Gegenzug verfügen Säugetierfeten über die bekannten Adaptationsmechanismen (erhöhter Hämoglobingehalt im fetalen Blut und Linksverschiebung mit erhöhter Sauerstoffaffinität des fetalen Hämoglobins), die sicherstellen, dass trotz des niedrigen Partialdruckes eine ausreichende Menge an Sauerstoff zu den Organen und Geweben gelangt.

2.1.2.2 Austausch von Nährstoffen

Der Austausch von Nährstoffen soll hier exemplarisch am Beispiel des Transportes von Glukose behandelt werden, die den Hauptenergielieferanten für den Feten darstellt; für andere Substrate gelten diese Verhältnisse in analoger Weise.

Glukose wird durch vereinfachte Diffusion mittels verschiedener Transporter, entlang des bestehenden Konzentrationsgradienten, zwischen Mutter und Kind transportiert. Hierbei sind eine Vielzahl von Carrierproteinen am Glukosetransport beteiligt, deren Lokalisation und Ausprägungszeitpunkt während der Schwangerschaft variiert.

Nach Gude et al. (2004) handelt es sich im Einzelnen um folgende Transporter:

Glut1-Transporter: Der Glut1-Transporter ist nach aktuellen Erkenntnissen der Hauptträger des Glukosestoffwechsels. Er befindet sich zum Zeitpunkt der Geburt sowohl in der mütterlichen Membran wie auch in der fetalen, den Kapillaren zugewandten, Membran (Illsley 2000)

Glut3-Transporter: Dieser Transporter ist hauptsächlich in den arteriellen Endothelzellen lokalisiert. Es wird vermutet, dass er eine wichtige Rolle in der Regulation der Glukosekonzentrationen spielt (Illsley 2000).

Glut4-Transporter: Dieser Transporter befindet sich zum Zeitpunkt der Geburt hauptsächlich in den intravillösen Stromazellen. Sie treten in Zusammenhang mit Insulinrezeptoren auf und reagieren ebenfalls auf Insulin (Xing et al. 1998).

Glut8-Transporter: Limesand et al. wiesen 2004 das Vorhandensein des Glut8-Transporters im Plazentagewebe von Schafen nach. Obwohl er sowohl in der Frühschwangerschaft wie auch am Termin exprimiert wird, scheint er in der frühen Phase der Schwangerschaft keine wichtige Rolle zu spielen (Limesand et al. 2004).

Glut12-Transporter: Im ersten Trimester findet man den Glut12-Transporter bevorzugt im Synzitiotrophoblasten sowie im extravillösen Trophoblasten. Im Verlauf der Schwangerschaft verändert sich die Expression. Am Termin wird der Glut12-Transporter in der glatten Muskulatur der villösen Gefäße und in den villösen

Stromazellen exprimiert (Gude et al. 2003).

2.1.3 Hormonproduktion

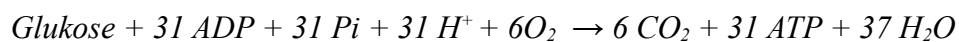
Neben dem Gas- und Stoffaustausch erfüllt die Plazenta auch wichtige endokrine Funktionen. Zu den von der Plazenta gebildeten Hormonen gehört das humane Choriongonadotropin (hCG), das die Progesteronausschüttung im Corpus luteum stimuliert. Die β -Untereinheit wird im Rahmen der Schwangerschaftstestung verwendet und kann bereits etwa eine Woche nach Schwangerschaftsbeginn im Blut der Mutter nachgewiesen werden (Welsch 2005). Die Blutkonzentration erreicht ihren Höhepunkt etwa nach 8 Wochen, fällt nach 12 Wochen wieder auf Minimalwerte ab, steigt aber in der Spätschwangerschaft wieder an (Gude et al. 2004). Progesteron ist durch seine Funktion, die Uteruskontraktion zu unterdrücken sowie durch Unterdrückung der hypophysären LH-Ausschüttung, für eine Fortführung der Schwangerschaft unabdingbar. Im Laufe der Schwangerschaft nimmt die Funktion des Corpus luteums ab. Daraufhin übernimmt die Plazenta die Produktion des im Kreislauf zirkulierenden Progesterons (Gude et al. 2004). Ein weiteres essentielles Hormon ist das Östrogen.

Die Plazenta produziert neben den oben genannten Hormonen noch viele weitere endokrin, parakrin oder autokrin wirkende Substanzen: Human Placental Lactogen, diverse Wachstumsfaktoren, Corticotropin Releasing Hormone, Thyreotropin-Releasing Hormone, Gonadotropin-Releasing Hormone sowie verschiedene Cytokine, Chemokine und Eicosanoide (Gude et al. 2004).

2.1.4 Energiegewinnung

Wie jede Zelle des menschlichen Körpers ist auch die Plazenta auf Produktion von Energie in Form von ATP angewiesen. Hauptsächlich wird diese Energie durch den Verbrauch von Sauerstoff und Glukose in Glykolyse, Citratzyklus und oxidativer Phosphorylierung bereitgestellt.

Das Prinzip der Energiegewinnung ist die Übertragung von Elektronen der energiereichen Verbindungen NADH und FADH₂ aus der Glykolyse, der Fettsäureoxidation und dem Citratzyklus in der oxidativen Phosphorylierung. NADH und FADH₂ besitzen ein Elektronenpaar, welches über die Proteinkomplexe I (NADH-Dehydrogenase), III (Cytochrom-c-Reduktase) und IV (Cytochrom-c-Oxidase) der Atmungskette durch die Träger Coenzym Q10 und Cytochrom c transportiert und durch den letzten Komplex auf ein Sauerstoffatom übertragen wird. Dieses wird unter Bildung von H₂O reduziert. Ein Teil der von Komplex I auf Coenzym Q10 übertragenden Energie stammt von der Succinat-Dehydrogenase aus der Reduktion von Succinat zu Fumarat (Komplex II). Die bei der Übertragung der Elektronen freiwerdende Energie wird genutzt, um Protonen über die Membran aus der mitochondrialen Matrix gegen einen Konzentrationsgradienten heraus zu pumpen. Daraus resultiert ein pH-Gradient, welcher wiederum einen weiteren Enzymkomplex (ATP-Synthase) antreibt, der beim Durchtritt der Protonen ATP aus ADP bildet (Berg et al. 2007). Dieser Ablauf wird auch als Mitchell-Hypothese bezeichnet (Mitchell 1966). Die zugehörige Formel lautet:



Insgesamt läuft die Reaktion mit einem Gewinn von 30 – 32 mol ATP pro mol Glukose ab (Rolfe und Brown 1997). Die allgemeingültige Aussage von Mitchell, dass pro Molekül NADH₂ 3 ATP und pro Molekül FADH₂ 2 ATP gebildet werden, kann nicht als vollständig korrekt angesehen werden, da Protonen durch die Membran zurück in

die Matrix gelangen, ohne an der Energiebildung beteiligt zu sein.

Berücksichtigt man die Masse und den Sauerstoffverbrauch der menschlichen Plazenta, befindet sich die durchschnittliche ATP-Synthese einer 400 g schweren Plazenta bei etwa 2 mmol/min. Hierfür verbraucht die Plazenta etwa 40% des vom Uterus aufgenommenen Sauerstoffes (Carter 2000).

Den Hauptenergielieferanten nicht nur für den Feten, sondern auch für die Plazenta, bildet die Glukose. Ohne eine ausreichende Glukoseversorgung ist eine normale embryonale Entwicklung nicht möglich. In der Entstehung der „Intrauterinen Wachstumsretardierung“ wird neben vielen anderen endogenen und exogenen Faktoren auch eine Störung in der plazentaren Glucoseversorgung (Belkacemi et al. 2010) bzw. -verwertung (Limesand et al. 2004) vermutet. Ebenso ist eine Störung des Plazentastoffwechsels an der Präeklampsie beteiligt (Bloxam et al. 1987). Die größte Glukosequelle der Plazenta ist der mütterliche Kreislauf. Im Fetus selbst findet noch keine Glukoneogenese statt, während die plazentare Glukoneogenese für die Versorgung nicht ausreichend ist (Illsley 2011). Von der Glukose, welche über den mütterlichen Kreislauf in die Plazenta transportiert wird, verbraucht die Plazenta den größten Anteil für sich. Insgesamt verbraucht sie etwa 50 % in der Glykolyse, 2 % im Pentosephosphatweg und etwa 2 % in Nicht-Triosephosphatwegen. Nur etwa 45 % werden an den Fetus weitergegeben (Illsley 2011).

2.1.5 Hypoxie-/Ischämietoleranz

Die Plazenta ist, wie vorstehend beschrieben, ein hoch stoffwechselaktives Organ mit einer Vielzahl von Funktionen, die für einen komplikationslosen Ablauf der Schwangerschaft notwendig sind. Darüber hinaus scheint die Plazenta aber auch in der Lage zu sein, eine temporäre Mangelversorgung im Interesse des Überlebens der Schwangerschaft teilweise zu kompensieren. So konnten Broad und Keverne zeigen, dass die Plazenta von Mäusen bei mangelnder Nahrungsaufnahme des Muttertieres, durch Drosselung des eigenen Stoffwechsels und Apoptose, die für die Hirnentwicklung beim Feten essentiellen Proteine bereitstellen kann (Broad und Keverne 2011).

Noch eindrucksvoller erscheint die Fähigkeit der Plazenta, längere Phasen von Hypoxie- bzw. Ischämie zu überdauern. So stellten Simmonds et al. (1982) fest, dass der Gehalt an Adenosinnukleotiden in Plazentagewebe auch nach über 30 Minuten Ischämiezeit stabil blieb. Bloxam (1985) untersuchte Plazentagewebe, welches er 20-45 Sekunden nach Abklemmen vom Blutkreislauf tiefgefroren hatte. Bei der Untersuchung der Adenosinnukleotide zeigte sich ein früher Abfall sowohl der ATP-Konzentration wie auch der sog. Energieladung (Verhältnis der höher phosphorylierten zu den Gesamt-Adenosinnucleotiden). Allerdings stellte sich nach dem schnellen Abfall ein Plateau ein, welches ungefähr 40-70% des Ausgangswertes betrug. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwar die Bildung von neuem ATP zunächst nicht ausreicht, aber ab ungefähr 10 Minuten Energieverbrauch und Energiebereitstellung ein neues (vorübergehendes) Gleichgewicht erreichen. Gleichzeitig wurden ein Abfall von Glykogen und ein Anstieg von Laktat, als Zeichen der anaeroben Glykolyse, beobachtet, welche allem Anschein nach jedoch auch nicht ausreicht, um den Verbrauch von ATP dauerhaft auszugleichen. Ähnliche Beobachtungen machten auch Malek et al. (1995, 1996a). Sie ermittelten den ATP-Spiegel sowie den Gehalt an anorganischem Phosphat in ex-vivo perfundierten Gewebeproben. Nach einer Kontrollphase von 2 Stunden, in der die Ausgangswerte für ATP und Pi ermittelt

wurden, lief die Messung noch insgesamt 10 Stunden, wobei eine Ischämiezeit von 2-4 Stunden in die Messung integriert wurde. Während dieser Ischämiezeit nahm, ähnlich wie bei Bloxam, der ATP-Gehalt ab und zwar um etwas mehr als die Hälfte, ehe er sich auf ein stabiles Plateau einpendelte. In etwa dem gleichen Verhältnis stieg auch das anorganische Phosphat an. Nach Wiederanschalten der Perfusion nahmen sowohl ATP wie auch Pi wieder ihre Ausgangswerte an. Weitere Untersuchungen von Illsley et al. (1984) zeigten den Vergleich des Energiegehaltes zwischen frischem Plazentagewebe, reperfundiertem Gewebe unter oxygenierten Bedingungen und unter nicht oxygenierten Bedingungen. Die Messungen ergaben, dass der Energiegehalt unter oxygenierten Bedingungen, wenn auch nur geringfügig, höher war als der der anderen Proben; danach folgte die nicht oxygenierte Plazenta vor der frischen, nicht perfundierten Probe.

Bei diesen Zusammenhängen ist, worauf Schneider (2011) hingewiesen hat, zu bedenken, dass derjenige Oxygenierungszustand, der für eine ausreichende Versorgung von Plazenta und Fetus benötigt wird, sich je nach Zeitpunkt der Schwangerschaft verändert: Während in der Frühschwangerschaft noch wenig Sauerstoff benötigt wird, würde das gleiche Angebot zu einem späteren Zeitpunkt bereits eine Hypoxie bedeuten. Welche Mechanismen der bemerkenswert hohen Hypoxietoleranz, die der Plazenta eine vollständige Funktionsaufnahme auch nach längeren Ischämiezeiten erlaubt, im Einzelnen zugrundeliegen, ist nicht abschließend geklärt: Neben der oben genannten anaeroben Glykolyse scheint auch die Fähigkeit zur aktiven Drosselung des Sauerstoffverbrauches bei Sauerstoffmangel beteiligt sein (Schneider 2009). Damit würde die menschliche Plazenta über eine Fähigkeit verfügen, die unter der Bezeichnung „Oxykonformismus“ oder „hypoxischer Hypometabolismus“ bislang nur als Adaptationsmechanismus bei bestimmten Hypoxie-exponierten Tieren und auch bei einigen besonders hypoxietoleranten Säugerneonaten (z.B. neugeborenen Ratten) beschrieben wurde (Boutilier et al. 1997; Mortola 2004; Singer 2004; Singer und Mühlfeld 2007).

2.2 Methoden zur Untersuchung des Gewebstoffwechsels

Zur Untersuchung des Gewebstoffwechsels stehen – neben den vorstehend erwähnten biochemischen Methoden – zwei biophysikalische Messverfahren zur Verfügung, die in dieser Arbeit zur Anwendung kommen und daher hier kurz in ihren Grundprinzipien vorgestellt werden sollen; nämlich die (Mikro-)Respirometrie und die (Mikro-)Kalorimetrie. Bei der Respirometrie handelt es sich um die Messung des Sauerstoffverbrauchs, bei der Kalorimetrie um die Messung der Wärmeproduktion; der Zusatz „Mikro-“ bedeutet jeweils, dass die Verfahren die Auflösung sehr niedriger Sauerstoffverbrauchs- bzw. Wärmeproduktionsraten erlauben.

2.2.1 Prinzip der Mikrorespirometrie

Das Prinzip der Mikrorespirometrie besteht darin, dass eine Probe in einem Medium mit vorgegebenem Sauerstoffgehalt inkubiert und der Sauerstoffverbrauch der Probe indirekt über den Abfall des Sauerstoffgehaltes in der hermetisch abgeschlossenen Messkammer bestimmt wird.

Das in der vorliegenden Arbeit genutzte Mikrorespirometer, der Oxygraph-2k (Oroboros, Innsbruck, Austria) – ein Doppelkammergerät, das zwei parallele Messungen erlaubt – zeichnet sich darüber hinaus durch einige besondere Merkmale aus, durch die die Messgenauigkeiten stark erhöht wird (**Abb. 1**). Hierzu zählen neben der Verwendung von Materialien (Glas, Titan), die durch ihre geringe Reaktivität mit Sauerstoff die Messung so wenig wie möglich verfälschen, der Verschluss der Messkammern mittels PVDF-Dichtungen (Polyvinylidenfluorid), durch die die Rückdiffusion (von Sauerstoff aus der Umgebung bei abnehmendem Sauerstoffgehalt in der Messkammer) auf ein Mindestmaß begrenzt wird. Darüber hinaus wird durch einen (ebenfalls aus dem weitgehend inertem PVDF gefertigten) Magnetrührer, der mit 300 bis 900 Umdrehungen pro Minute betrieben werden kann, eine besonders homogene Verteilung des Sauerstoffs in der Messkammer gewährleistet (Gnaiger

2010).

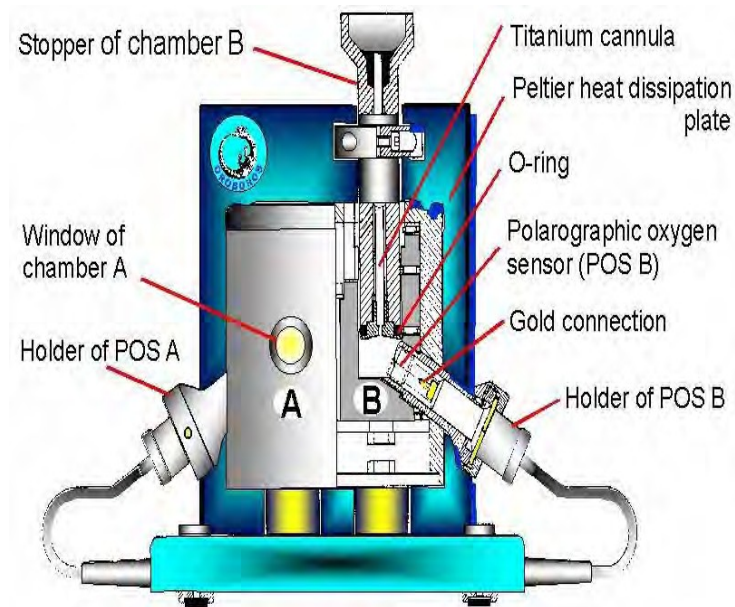


Abb. 1: Schematische Darstellung des Oxygraph-2k (Gnaiger 2010).

Die Messung des Sauerstoffgehaltes erfolgt mittels eines miniaturisierten, 2 mm im Durchmesser betragenden POS (polarographic oxygen sensor), der nach dem Prinzip der Clark-Elektrode (Clark et al. 1953) arbeitet (**Abb. 2**). Diese besteht aus einer Gold- oder Platin-Kathode und einer Silber-Anode, die über eine Elektrolytlösung miteinander in Verbindung stehen. Die angelegte Spannung beträgt 0,6 – 0,8 V. Durch eine dünne semipermeable Teflonmembran, durch die der Sensor vom Messmedium getrennt ist, diffundiert Sauerstoff zur Kathode, wo er reduziert wird. Dadurch entsteht ein Stromfluss, welcher erfasst und aufgezeichnet wird. Da der Fluss durch die Membran und damit die Anzahl an reduzierten Sauerstoffverbindungen proportional zum Sauerstoffpartialdruck im Messmedium ist, lässt sich ein Rückschluss auf die Sauerstoffkonzentration ziehen. Bedingt durch dieses Funktionsprinzip hat die Clark-Elektrode einen gewissen „Eigensauerstoffverbrauch“, der jedoch – von Ausnahmen

abgesehen – im Vergleich zur Atmungsaktivität der Proben vernachlässigbar gering ist (Gnaiger 2008).

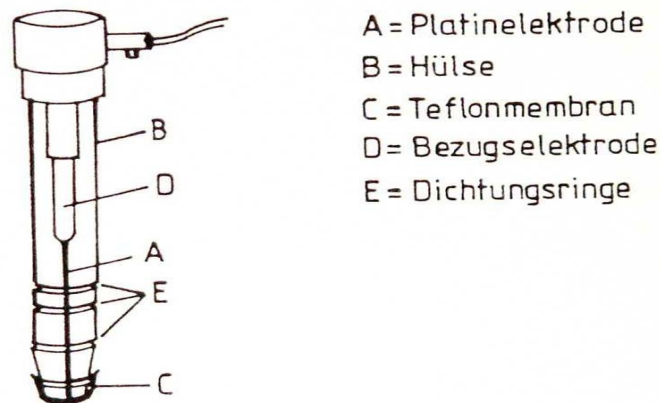


Abb. 2: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Clark-Elektrode (Bugger 2006).

Durch das Anbringen eines „volume calibration ring“ kann das Kammervolumen des Oxygraph-2k zwischen 1,5 ml und 3,2 ml variiert und den jeweiligen Bedürfnissen angepasst werden. Durch eine integrierte Kapillare ist es zudem möglich, auch während eines laufenden Experimentes direkten Einfluss auf den Verlauf zu nehmen. Die Messtemperatur wird über ein eingebautes Peltier-Element konstant gehalten; der einstellbare Temperaturbereich beträgt 2 – 45°C, die Temperaturstabilität $\pm 0,01$ °C (Gnaiger 2010).

2.2.2 Prinzip der Mikrokalorimetrie

Die Messung der Wärmeproduktion erfolgte in einem „isothermen Wärmeflusskalorimeter“. Dieses besteht im Prinzip aus einem großen, hochgenau thermostatisierten Wasserbad („Wärmesenke“), in das eine kleine Messkammer mit der darin befindlichen Probe eingetaucht ist („Wärmequelle“). Dadurch, dass jegliche in der Probe produzierte Wärme unmittelbar in das Wasserbad abgeleitet wird, bleibt die Temperatur in der Messkammer konstant („isotherm“). Der Wärmefluss von der „Wärmequelle“ zur „Wärmesenke“, der der Stoffwechselaktivität der Probe entspricht, wird über ein dazwischenliegendes Peltier-Element erfasst („Wärmeflusskalorimetrie“).

Bei dem eingesetzten Gerät handelt es sich um einen mit vier Messzylindern ausgestatteten 2277 ThermalActivityMonitor (TAM; Thermometric, Järfälla, Schweden), der sich aufgrund einer mehrstufigen Thermostatisierung (mit einem externen Kühl- und zwei internen Heizthermostaten) und dem sog. Zwillingsmessprinzip (bei dem sich in jedem Messzylinder neben der Mess- zusätzlich eine Referenzampulle befindet) durch eine besondere Empfindlichkeit und Langzeitstabilität auszeichnet (**Abb. 3 und 4**).

In Abhängigkeit von der Ausstattung ist das Gerät mit Probenvolumina von 1 bis 20 ml bei Temperaturen von 15 bis 80 °C mit verschlossenen Glas- bzw. Edstahllampullen (batch mode) oder Titrier- und Rührvorrichtungen einsetzbar. Dadurch, dass die mit der Probe bestückten Messampullen zunächst in einer Zwischenposition die Temperatur des umgebenden Wasserbades annehmen müssen („thermische Äquilibration“), vergehen zwischen der Präparation der Proben und den ersten verwertbaren Messdaten allerdings ca. 20-30 Minuten.

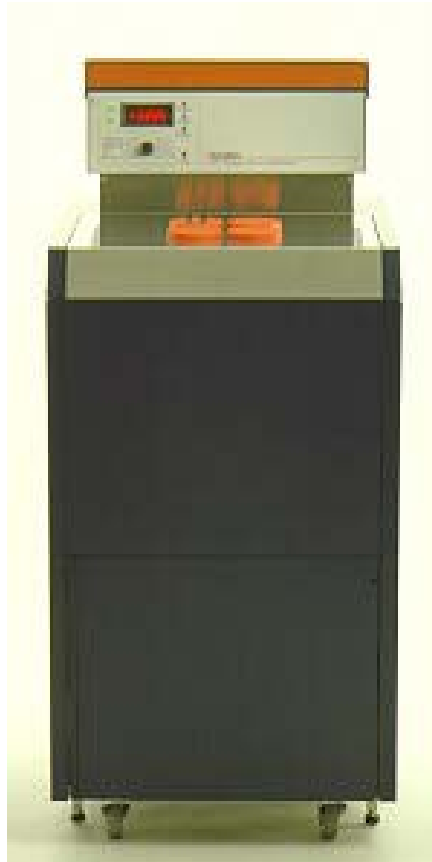


Abb. 3: Mit dem Mikrokalorimeter (TAM 2277) war es möglich, die Wärmeproduktion der Plazentaprobe in bis zu vier Messzylindern gleichzeitig zu untersuchen (Instruction Manual - 2277 Thermal Activity Monitor 2005).

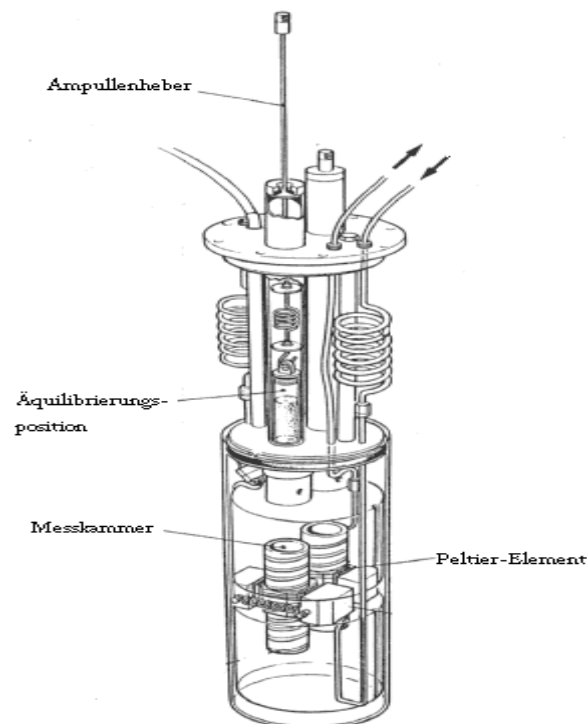


Abb. 4: Aufbau eines Messzylinders: Aus der thermischen Äquilibrierungsposition wird die Ampulle in die Messkammer am Boden des Zylinders abgesenkt; die Temperatur wird durch das umgebende Wasserbad konstant gehalten. Über die Peltier-Elemente in der Wand der Messkammer wird die Wärmeabgabe als elektrisches Signal an den PC übertragen (Instruction Manual - 2277 Thermal Activity Monitor 2005).

Im Gegensatz zur Mikrorespirometrie, bei der die Stoffwechselrate anhand des Sauerstoffverbrauches bestimmt wird („indirekte Kalorimetrie“), wird bei der Mikrokolorimetrie die gesamte Stoffwechselwärme unmittelbar erfasst („direkte Kalorimetrie“). Sie umfasst nicht nur auf den aeroben (durch Sauerstoffverbrauch erklärbaren), sondern auch auf den anaeroben Anteil, der sich der Respirometrie entzieht. Daher eignet sich die Kombination aus Respiro- und Kalorimetrie zur Beurteilung des relativen Beitrages aerober und anaerober Prozesse zu der gesamten Stoffwechselaktivität einer Probe.

2.3 Fragestellungen

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Pilotstudie, in der das Stoffwechselverhalten der menschlichen Plazenta unter ischämischen Bedingungen mit mikrorespirometrischer und -kalorimetrischer Methodik untersucht werden soll. Im Einzelnen sollen die Fragen beantwortet werden,

- ob sich die Hypoxietoleranz der menschlichen Plazenta anhand eines protrahierten Abfalls der Stoffwechselrate unter ischämischen (nicht-perfundierten) Bedingungen belegen lässt;
- in welchem Verhältnis der ischämische Energieumsatz zu den aus Perfusionsexperimenten bekannten „normalen“ Stoffwechselrate der menschlichen Plazenta steht;
- welche Anteile an dem ischämischen Energieumsatz der Verwertung von Restsauerstoff und der anaeroben Glykolyse zukommen; sowie
- ob sich der ischämische Energieumsatz durch Glucosezusatz zum Inkubationsmedium beeinflussen lässt.

Damit soll nicht nur geprüft werden, inwieweit sich respirometrische und kalorimetrische Methoden überhaupt zum Studium von menschlichem Plazentagewebe eignen. Es soll darüber hinaus ausgelotet werden, ob sich eventuell bereits mit diesem einfachen methodischen Ansatz weitere Hinweise auf den oben beschriebenen „hypoxischen Hypometabolismus“, d.h. die aktive Reduktion des Sauerstoffverbrauches bei Hypoxie als besondere adaptive Fähigkeit der menschlichen Plazenta gewinnen lassen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Folgende Geräte wurden für die respiratorischen bzw. kalorimetrischen Messungen genutzt:

Geräte	Hersteller
Mikrorespirometer	Oxygraph-2k, Oroboros, Innsbruck, Österreich
Mikrokalorimeter	ThermoMetric 2277 Thermal Activity Monitor, Järfälla, Schweden

Für die Herstellung der Plazentaprobe wurden verwendet:

Material	Hersteller
Skalpell	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
chirurgische Pinzette	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Präzisionswaage	BP221S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
10 ml Spritzen	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sterican Einmalkantile	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Trockenschrank Heraeus, Hanau, Deutschland
Petrischale

3.1.2 Reagenzien

Als Medium für die Messung bzw. zur Herstellung der 83 mg/dl Glukoselösung wurde verwendet:

Reagenzien	Hersteller
NaCl 0,9%	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Glu-5%	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ringer-Lösung	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
PBS (phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aqua ad iniectabilia	Baxter healthcare, Deerfield, Illinois, USA
Ethanol 99% → 70%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eis	

3.1.3 Plazentaprobe

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden im Kreißsaal des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf nach unten stehendem Schema gewonnen. Dabei wurden sowohl Plazenten nach Spontangeburt, als auch nach Sectio caesarea verwendet. Plazenten von Kindern mit pathologischen Hypoxiephasen unter, oder respiratorischen Anpassungsstörungen nach der Geburt, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

3.2 Gewinnung der Biopsate

Zunächst wurde im Labor der Transport der Proben vorbereitet. Mittels einer 10 ml Einmalspritze wurden 4 Reaktionsgefäße à 2ml mit dem Medium gefüllt, welches später auch für die Messung im Mikrokolorimeter bzw. Oxygraphen benutzt wurde. Zur Zusammensetzung der Messmedien s.u..

Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und in einer mit Eis gefüllten Isolierbox in den ungefähr fünf Minuten entfernten Kreißsaal transportiert. Die eigentliche Probenentnahme erfolgte direkt nach Geburt der Plazenta: Zunächst wurde die fetale Seite der Plazenta aufgesucht. Um eine Probe mit möglichst guter Nährstoffsättigung zu gewinnen, wurde in unmittelbarer Nähe zu einem Zweig der oberflächlichen Choriongefäßen das Chorion laeve und das Amnion entfernt und vier, im Durchmesser etwa 1,5 cm große Proben gewonnen. Dies geschah mittels Einmalskalpell und einer chirurgischen Pinzette, um das Gewebetrauma möglichst gering zu halten. Die gewonnenen Proben wurden jeweils in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß gegeben und gekühlt in das Labor transportiert. Die Kühlung der Proben war notwendig, um die Stoffwechselaktivität der Probe zu reduzieren, um die ungefähr 35 Minuten zwischen Probengewinnung und Beginn der Messung zu überbrücken und um der befürchteten, durch Ischämie verursachten, Gewebszerstörung entgegenzuwirken. Direkt nach Ankunft im Labor wurden die Proben mit einer Feinwaage gewogen und mittels

Skalpell und chirurgischer Pinzette auf die gewünschte Größe zugeschnitten. Nach erneutem Wiegen waren die Proben für die Messung bereit.

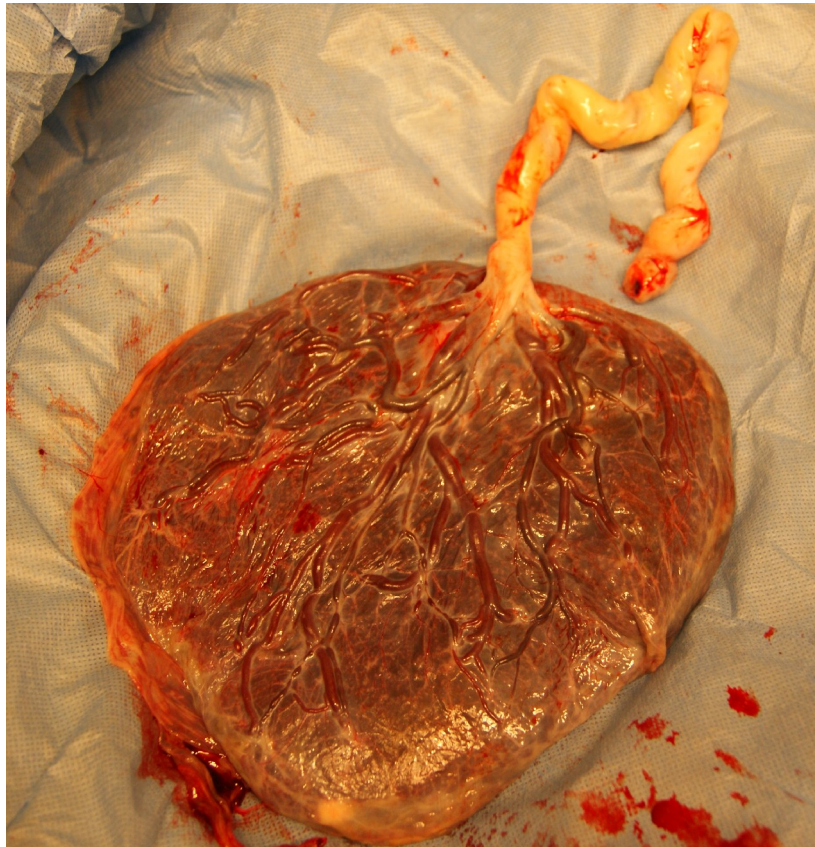


Abb. 5: Fetale Seite der Plazenta. Eihäute erhalten.

3.3 Durchführung der Messungen

3.3.1 Mikrorespirometrische Messungen

In dieser Arbeit wurden insgesamt vier Messreihen durchgeführt. In den ersten drei Messreihen wurde der Sauerstoffverbrauch unterschiedlich großer Plazentaprobe mittels „High Resolution Respirometrie“ in verschiedenen Medien gemessen. Für jede Messung wurde eine Probe aus einer anderen Plazenta benutzt. Die Proben in Messreihe 1+2 wurden direkt nach der Geburt entnommen. Um den Unterschied der Sauerstoffverbrauchsaktivität zwischen verschiedenen Medien festzustellen, wurde in Messreihe 1 Ringer-Lösung und in Messreihe 2 Ringerlösung mit einem Glukosezusatz von etwa 83 mg/dl benutzt. 83 mg/dl entspricht in etwa den physiologischen Verhältnissen im Nabelschnurblut, wo der Glukosegehalt etwa 70% des mütterlichen Blutes beträgt (Sitzmann 2007). Grundsätzlich gelten Blutzuckerwerte bei Neugeborenen von ca. 50-60 mg/dl als normal (Sitzmann 2007). In der dritten Messreihe wurden die Proben aus Plazenten entnommen, deren Geburt bereits 1,5 – 2 Stunden zurücklag, sich also in einer Langzeit-Ischämie befanden. Bis zum Messbeginn wurden sie bei Zimmertemperatur gelagert. Die anschließende Messung erfolgte ebenfalls in Ringer-Lösung mit einem zugesetzten Glukosegehalt von 83 mg/dl.

Messreihe	Medium	Status
1 (n=8)	Ringer (G-)	Frisch
2 (n=11)	Ringer+Glukose (G+)	Frisch
3 (n= 8)	Ringer+Glukose (G+)	Ischämisch (1,5-2 Stunden postpartal (p.p.))

3.3.2 Vergleichende mikrorespirometrische und mikrokalorimetrische Messungen

In einer weiteren Messreihe sollte der Zusammenhang zwischen der respiratorischen und der kalorimetrischen Aktivität als Marker für die Stoffwechselaktivität der Plazenta gemessen werden. Hierzu wurden vier Aliquots derselben Plazenta entnommen. Jeweils zwei Proben wurden respirometrisch, die anderen beiden kalorimetrisch untersucht. Das Messmedium war pro Methode einmal PBS und einmal PBS mit Zusatz von Glukose (83 mg/dl). Entnommen wurden die Proben direkt nach der Geburt.

Messreihe	Medium	Status
4 (n=6)	PBS (G-)	Frisch
4 (n=6)	PBS + Glukose (G+)	Frisch

3.4 Herstellung der Medien

Bei der Ringer-Lösung handelte es sich um eine Fertiglösung der Firma Braun mit folgender Zusammensetzung:

- Natriumchlorid: 4,3 g
- Kaliumchlorid: 0,15 g
- Calciumchlorid 2 H₂O: 0,17 g
- Wasser für Injektionszwecke

Entsprechend gilt:

- Natrium 147 mmol/l
- Kalium 4,0 mmol/l
- Calcium 2,2 mmol/l
- Chlorid 156 mmol/l

Die Ringer/Glukose-Lösung wurde folgendermaßen vorbereitet. 100 ml G5% (entsprechend 5 g Glukose) wurde auf 500 ml Ringerlösung gegeben. Aufgrund der Verdünnung durch Zugabe der G5% ergab sich eine andere Elektrolytzusammensetzung. Natrium 122,01 mmol/l, Kalium 3,32 mmol/l, Calcium 1,83 mmol/l und Chlorid 129,48 mmol/l.

Die PBS-Lösung lag in zehnfach konzentrierter Form vor. Es wurden 100 ml einer einfach konzentrierten Lösung hergestellt. Auch die PBS/Glukose-Lösung wurde auf einfach konzentrierte PBS und G1 % verdünnt. Hier wurden ebenfalls immer 100 ml Lösung hergestellt.

3.5 Messung des Sauerstoffverbrauches

Die Messung des Sauerstoffverbrauches erfolgte mit dem Oxygraph-2k der Firma Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich. Die Datenaufzeichnung erfolgte mit dem mitgelieferten Programm DatLab (Version 4.3.2.7).

3.5.1 Ablauf der „High resolution – Respirometrie“

Da während der Messpausen die Kammern mit Ethanol 70% gefüllt waren, wurde die Kammer vor der Messung zunächst durch dreimaliges Spülen mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gereinigt und anschließend noch zweimalig mit dem jeweiligen Messmedium gespült, um auch geringfügigste Verdünnung durch das Aqua dest. zu vermeiden. Anschließend wurde die Kammer übervoll mit Messmedium gefüllt und mittels Magnetrührer gerührt. Der Magnetrührer sorgt für eine gleichmäßige Verteilung des Sauerstoffes im auf 37 °C temperierten Medium.

Die Proben wurden nun in die Messkammer gegeben. Zunächst musste das Gerät äquilibrieren. Die Äquilibration dauert etwa 15 – 20 Minuten. Wenn sich die O₂-Verbrauchskurve sowie die Temperatur (Peltier-Anzeige) eingependelt hatten, konnte die Kammer komplett geschlossen werden. Zur Äquilibration wurde der Verschluss ganz herunter gedrückt (Kammer geschlossen) und anschließend in Äquilibrationsposition gebracht. Da die Kammer übervoll gefüllt wurde, wurde durch kurzzeitiges Herunterdrücken des Verschlusses das entsprechende Kammervolumen eingestellt und eine Gasphase, entsprechend der Umgebungsluft, zwischen Verschluss und Messmedium gebildet.

Erste Probemessungen hatten gezeigt, dass eine Messung mit den mitgelieferten Rührern nicht möglich ist, da die Proben durch diesen zerstört werden. Daher wurde in allen Messungen auf den Magnetrührer verzichtet, auch wenn dadurch die Sauerstoffversorgung der Probe verschlechtert wurde.

Die Messung wurde dann für mindestens 2 Stunden aufgezeichnet. Nach Ablauf der

Messzeit wurde die Messung gespeichert und das Programm beendet. Die Probe wurde aus der Kammer entnommen, das Medium abgesaugt und die Kammer dreimalig mit Aqua dest. und anschließend dreimalig mit Ethanol 70% gespült. Die Lagerung bis zur nächsten Messung erfolgte wieder in Ethanol 70%.

3.5.2 Kalibrierung des Sauerstoffsensors

Vor jeder neuen Messreihe wurde eine Kalibrierung mit dem neuen Messmedium durchgeführt. Nach der oben beschriebenen Reinigung mit Ethanol und Aqua dest. wurde die Kammer mit Medium gefüllt, verschlossen und mit dem mitgelieferten Schlüssel in „air calibration (Äquilibrierung)“ Stellung gebracht. Wenn die Sauerstoffverbrauchskurve sowie die Peltier-Anzeige (Temperatur) stabil waren (abgeschlossene air calibration, R1-Markierung), wurde die Kammer verschlossen. Aufgrund der Manipulation der Kammer musste einige Minuten abgewartet werden, bis sich die O₂-Kurve stabilisiert hat.

Um die 0-Kalibrierung, also eine möglichst maximale Sauerstoffausschöpfung zu erreichen, wurde Hefe als sauerstoffverbrauchender Organismus über die Kapillare hinzugefügt. Wenn die O₂-Konzentration nicht weiter fiel und stabil bei 0 war, wurde die zweite Markierung gesetzt (R0). Die R0 und R1 Markierungen sind für die automatische Korrektur und damit zur genauen Bestimmung des tatsächlichen Sauerstoffverbrauches von Bedeutung. Ebenfalls wurde der Faktor der Sauerstofflöslichkeit des Mediums eingestellt. Es wurde in diesem Fall der Faktor 0,966 gewählt. Dieser wurde für alle Messreihen beibehalten und entspricht dem Löslichkeitsfaktor von PBS, einem Nährmedium für Mitochondrien. In der Annahme, dass der Löslichkeitsfaktor das Messergebnis für unsere Zwecke nur unwesentlich beeinflusst, ist dieser vernachlässigt worden.

3.5.3 Auswertung der Ergebnisse der mikrorespirometrischen Messungen

Während der online-Messung konnte der Versuchsablauf kontinuierlich verfolgt werden. Nach Aufzeichnung der Messung, mittels der mitgelieferten DatLab Software (Version 4.3.2.7), konnten die Daten als Excel-Datei heruntergeladen werden. Um die „Unruhephase“ nach Verschluss der Messkammer als mögliche Fehlerquelle auszuschließen, wurden zur Auswertung nur die Werte zwischen Minute 30 und Minute 120 benutzt.

Da die Messungen, wie sich zeigen wird, einen vergleichsweise konstanten Sauerstoffverbrauch ergaben, wurde zunächst dessen Mittelwert bestimmt. Anschließend wurde, um die Werte auf das Gewicht zu beziehen, die Einheit von [pmol/(s*ml)] in [pmol/(min*mg)] umgerechnet. Auf diese Weise wurde in den Messreihen 1-3 der spezifische Sauerstoffverbrauch pro mg Feuchtgewicht bestimmt. In Messreihe 4 wurde der Verbrauch auf das Trockengewicht bezogen.

3.6 Messung der Wärmeproduktion

Die Ermittlung der Wärmeproduktion erfolgte mit dem isothermen Wärmeflusskalorimeter 2277 Thermal Activity Monitor (TAM; Thermometric, Järfälla, Schweden) im sogenannten batch mode (verschlossene 4 ml - Edstahllampullen).

3.6.1 Ablauf der Mikrokolorimetrie

Zunächst wurde die Probe in eine Messampulle gegeben und diese mit 4 ml Inkubationsmedium aufgefüllt. Sodann wurde die Ampulle verschlossen, äußerlich sorgfältig mit Ethanol gereinigt und zunächst für 20 Minuten in die thermische Äquilibrierungsposition des Kalorimeters eingebracht. Nach Erwärmung auf 37 °C wurde sie schließlich langsam in die Messkammer abgesenkt. Die gemessene Wärmeflussrate wurde über einen Zeitraum von 6 Stunden aufgezeichnet. Nach Abschluss der Messung wurde die Ampulle wieder aus dem Messzylinder entfernt, die Probe aus der Ampulle entnommen und diese sorgfältig innerlich und äußerlich gereinigt.

3.6.2 Kalibrierung der Peltier-Elemente

Die Kalibrierung des Kalorimeters erfolgte über den am Boden des Messzylinders eingebauten elektrischen Eichwiderstand. Hierzu wurde eine lediglich mit Medium (ohne Probe) gefüllte Ampulle in die Messkammer abgesenkt und eine stabile Baseline abgewartet (0-Eichung). Sodann wurde der Eichstrom eingeschaltet und – wiederum nach Abwarten eines stabilen Wärmeflusssignals – der Messbereich auf 1000 μW geeicht.

3.6.3 Auswertung der Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen

Die Messungen wurden auf mittels der zugehörigen Digitam Software (Version 1.0) auf einem PC aufgezeichnet. Das Auswertungsprogramm registriert den Wärmefluss (in μWatt) und errechnet zudem die bis zu einem beliebigen Zeitpunkt kumulativ freigesetzte Wärmemenge (in mJoule), entsprechend dem Integral der Wärmeflusskurve. Auch diese Ergebnisse wurden als Excel-Daten heruntergeladen.

3.7 Ermittlung des Trockengewichtes

Um das Verhältnis von Trocken- zu Feuchtgewicht zu erhalten, wurden die Proben, die vor Messbeginn ausgewogen wurden, für 24 Stunden in einer Petrischale in einen Trockenschrank gegeben. Dieser hat eine konstante Temperatur von 37 °C. Nach 24 Stunden wurde mittels Präzisionswaage erneut das Gewicht bestimmt.

Viele Untersuchungen in der Literatur beziehen sich, anders als unsere eigenen Ergebnisse der Messreihen 1-3, auf das Trockengewicht der jeweiligen Proben. Die Ergebnisse von Messreihe 4 wurden daher ebenfalls auf das jeweilig gemessene Trockengewicht bezogen.

3.8 Ethikvotum

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg als unbedenklich eingestuft (WF031/11). Es handelt sich um eine Studie an „biologischem Abfallmaterial“, welches anonymisiert im Rahmen der Grundlagenforschung untersucht wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Sauerstoffverbrauch von Plazentaprobe in Ringer-Lösung

In Tabelle 1 wird der spezifische, d.h. (feucht)gewichtbezogene Sauerstoffverbrauch von Plazentaprobe in Ringer-Lösung in pmol/min pro mg bzw. in ml/min pro kg, sortiert nach Feuchtgewichten in aufsteigender Reihenfolge, gezeigt.

<u>FG in mg</u>	<u>O₂-Verbrauch in pmol/(min*mg)</u>	<u>O₂-Verbrauch in ml/(min*kg)</u>
6,10	31,32	4,53
12,60	28,38	4,10
42,90	18,72	2,71
60,60	14,91	2,16
94,50	9,15	1,32
210,00	4,22	0,61
230,00	6,30	0,91
280,00	1,20	0,17

Tab. 1: Feuchtgewichte und spezifische Sauerstoffverbrauchsraten von Plazentaprobe in Ringer-Lösung (G-).

Man erkennt eine tendenzielle Abnahme des spezifischen Sauerstoffverbrauches mit zunehmendem Feuchtgewicht, der für diese Art der Messungen – Gewebeprobe in einer geschlossenen Messkammer – charakteristisch ist (sog. crowding effect, siehe Kapitel 5.1.2).

4.2 Sauerstoffverbrauch von Plazentaprobe in Ringer-Lösung unter Glukosezusatz

In der zweiten Messreihe wurde der Einfluss von Glukose auf den Sauerstoffverbrauch von Plazentaprobe untersucht. Dazu wurde dem Medium vor Versuchsbeginn Glukose in einer Konzentration von etwa 83 mg/dl zugegeben. Tabelle 2 zeigt den spezifischen Sauerstoffverbrauch von Plazentaprobe, wiederum geordnet nach aufsteigenden Feuchtgewichten, in Ringer-Lösung unter Glukosezusatz.

<u>FG in mg</u>	<u>O₂-Verbrauch in pmol/(min*mg)</u>	<u>O₂-Verbrauch in ml/(min*kg)</u>
5,70	43,26	6,26
16,00	24,24	3,51
23,10	27,69	4,00
33,40	21,04	3,04
34,00	35,88	5,19
43,60	24,70	3,57
49,60	18,35	2,65
59,60	16,31	2,36
108,00	9,93	1,44
240,00	5,00	0,72
354,00	5,61	0,81

Tab. 2: Feuchtgewichte und spezifische Sauerstoffverbrauchsdaten von Plazentaprobe in Ringer-Lösung mit Glucosezusatz (G+).

Auch hier ist die tendenzielle Abnahme des spezifischen Sauerstoffverbrauches mit zunehmendem Feuchtgewicht erkennbar („crowding effect“, siehe Kapitel 5.1.2).

4.3 Sauerstoffverbrauch von Plazentaprobe in Ringer-Lösung unter Glukosezusatz nach Langzeitischämie

Die dritte Messreihe unterschied sich von Messreihe 2 dahingehend, dass die verwendeten Plazentabiopsate erst etwa 1,5 – 2 Stunden nach der Geburt, ebenfalls unter Zusatz von ca. 83 mg/dl Glukose, untersucht wurden. Durch den verzögerten Messbeginn wurde eine verlängerte Ischämiezeit simuliert. Tabelle 3 zeigt den spezifischen Sauerstoffverbrauch in Ringer-Lösung unter Glukosezusatz bei solchen langzeitischämischen Plazentaprobe.

<u>FG in mg</u>	<u>O₂-Verbrauch in pmol/(min*mg)</u>	<u>O₂-Verbrauch in ml/(min*kg)</u>
4,5	53,93	7,80
16,9	31,15	4,50
36,0	25,11	3,63
52,0	16,88	2,44
68,0	15,70	2,27
104,5	13,80	2,00
156,8	8,26	1,20
264,8	5,41	0,78

Tab. 3: Feuchtgewichte und spezifische Sauerstoffverbrauchsrate von Plazentaprobe in Ringer-Lösung mit Glucosezusatz (G+) nach einer Ischämieperiode.

Bemerkenswerterweise liegen die Sauerstoffverbrauchsrate trotz der längeren warmen Ischämiezeit in der gleichen Größenordnung wie bei den unmittelbar postpartal untersuchten Probe. Im übrigen zeigt sich auch hier – wie in den vorangegangenen Messreihen – wieder die tendenzielle Abnahme der spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate mit zunehmenden Feuchtgewichten (“crowding effect”, siehe Kapitel 5.1.2).

4.4 Sauerstoffverbrauch und Wärmeproduktion von Plazentaprobe in PBS-Lösung

In einer vierten, gesonderten Messreihe wurden Plazentaprobe sowohl (mikrorespirometrisch) auf ihren Sauerstoffverbrauch als auch (mikrokalorimetrisch) auf ihre Wärmeabgabe untersucht. Die kombinierte Respirokalorimetrie erlaubt eine bessere Differenzierung zwischen aeroben und anaeroben Stoffwechselfvorgängen. Mit beiden Methoden wurde auch wieder der Einfluss von Glukosezusatz zum Inkubationmedium überprüft, das in diesem Fall aus phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bestand, einer isotonen Lösung, welche den Proben aufgrund ihrer Zusammensetzung und ihres konstanten pH-Wertes ein stabileres Umgebungsmilieu bieten sollte.

Von n=6 Plazenten wurden je vier Aliquots vergleichbarer Größe entnommen. Je zwei dieser Proben wurden mikrorespirometrisch bzw. mikrokalorimetrisch untersucht, und zwar einmal mit (G+) und einmal ohne Glukosezusatz (G-).

Im Unterschied zu den Messreihen 1-3 wurde der Sauerstoffverbrauch und die Wärmeproduktion hier nicht auf das Feuchtgewicht, sondern auf das Trockengewicht (TG) bezogen.

4.4.1 Sauerstoffverbrauch

Tabelle 4 zeigt den spezifischen, d.h. gewichtsbezogenen Sauerstoffverbrauch der in PBS inkubierten Plazentaprobe in pmol/(min*mgTG) bzw. ml/(min*kgTG), jeweils mit (G+) und ohne (G-) Glukosezusatz.

<u>Messung</u>	<u>TG in mg</u>	<u>pmol/(min*mg)</u>	<u>ml/(min*kg)</u>
01 G+	26	37,22	5,38
01 G-	23	50,32	7,28
02 G+	54	13,76	1,99
02 G-	48	13,38	1,93
03 G+	11	63,44	9,17
03 G-	22	64,61	9,34
04 G+	25	6,22	0,90
04 G-	65	2,64	0,38
05 G+	12	157,60	22,79
05 G-	31	29,32	4,24
06 G+	29	48,10	6,96
06 G-	33	41,07	5,94

Tab. 4: Trockengewichte und spezifische Sauerstoffverbrauchsraten von Plazentaprobe in PBS mit Glucosezusatz (G+) und ohne Glucosezusatz (G-).

4.4.2 Wärmeproduktion

In Tabelle 5 ist die spezifische Wärmeproduktion in mJoule/mg TG der in PBS inkubierten Plazentaprobe mit (G+) und ohne (G-) Glucosezusatz aufgeführt. Da die Wärmeabgabe, wie weiter unten noch gezeigt werden wird, im Laufe der Messungen wesentlich stärker abfiel als der vergleichsweise konstante Sauerstoffverbrauch, wurde als Maß für die Stoffwechselaktivität hier zunächst die gesamte innerhalb des Messzeitraumes freigesetzte Wärmemenge gewählt.

<u>Messung</u>	<u>TG in mg</u>	<u>mJ/mg</u>
01 G+	47	7,38
01 G-	42	7,78
02 G+	38	29,00
02 G-	29	21,26
03 G+	37	47,13
03 G-	13	32,12
04 G+	29	32,78
04 G-	55	24,36
05 G+	33	38,69
05 G-	32	16,30
06 G+	42	28,60
06 G-	37	26,28

Tab. 5: Trockengewichte und spezifische Wärmeproduktionsraten von Plazentaprobe in PBS mit Glucosezusatz (G+) und ohne Glucosezusatz (G-).

Aufgrund der homogeneren Gewichtsverteilung ist in diesen Messungen – sowohl in den Sauerstoffverbrauchs- als auch in den Wärmeproduktionsraten – die übliche Abnahme des spezifischen Energieumsatzes mit zunehmendem Probengewicht („crowding effect“, siehe Kapitel 5.1.2) nicht ohne weiteres erkennbar.

4.5 Relativer Trockengewichtsanteil am Feuchtgewicht

Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurden die untersuchten Plazentaprobe(n) (n=24) über 24 Std. bei 37°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 dargestellt. Der relative Trockengewichtsanteil am Feuchtgewicht beträgt danach im Mittel 15,5%, was den hohen Wasseranteil von placentarem Gewebe von rund 85% widerspiegelt.

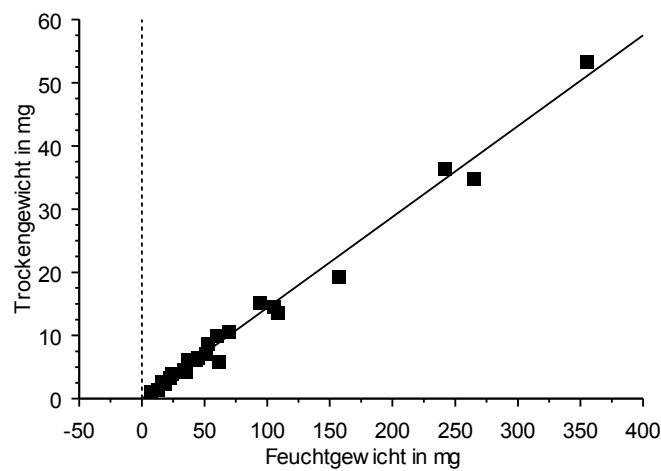


Abb. 6 Abhängigkeit des Trockengewichtes vom Feuchtgewicht bei 24 Plazentaprobe(n).

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden mikrorespirometrische und mikrokalorimetrische Untersuchungen an humanem Plazentagewebe durchgeführt. Dabei wurden mit dem Sauerstoffverbrauch und der Wärmeproduktion zwei wesentliche Kenngrößen des Energieumsatzes erfasst. Mit den respirokalorimetrischen Messungen an ischämischen Plazentaprobe sollte geprüft werden, inwieweit sich die in der Literatur beschriebene Hypoxietoleranz der Plazenta anhand einer lange erhaltenen Stoffwechselaktivität nachweisen lässt, und welchen Beitrag dazu aerobe und anaerobe Prozesse leisten.

5.1 Methodenkritik

5.1.1 Probengewinnung

Bedingt durch die Umstände der Geburt konnte in der hier vorgenommenen Pilotstudie kein ganz striktes zeitliches Protokoll eingehalten werden, sodass die Ischämiedauer der Plazentaprobe zu Beginn der Messungen in gewissen Grenzen variierte. Grundsätzlich wird hier zwischen zwei Gruppen unterschieden, nämlich a) unmittelbar postpartal gewonnenen und b) nach einer längeren „Lagerung“ der Plazenta von ca. 1,5 Stunden entnommenen Proben. Es muss jedoch bedacht werden, dass auch innerhalb dieser beiden Gruppen größere zeitliche Variationen als Ursache einer natürlichen Streuung der Messergebnisse vorliegen.

Die Gewinnung der Proben erfolgte mit Hilfe eines Skalpells von der dem Fetus zugewandten Seite der Plazenta, erkennbar am Ein- und Austritt der Nabelgefäße. Auch wenn dabei auf eine standardisierte Vorgehensweise geachtet wurde, ist dadurch keine „mikroskopisch präzise“ Präparation garantiert. Es ist daher denkbar, dass die gewonnenen Proben unterschiedliche Gewebeanteile der Plazenta in variierendem Ausmaß enthielten.

5.1.2 Probengröße („crowding effect“)

Bei Messungen an Gewebeproben ist weiterhin zu berücksichtigen, dass, auch wenn mit zunehmender Probengröße die Absolutwerte von Sauerstoffverbrauch bzw. Wärmeproduktion ansteigen, doch die spezifischen (d.h. auf das Probengewicht bezogenen) Sauerstoffverbrauchs- oder Wärmeproduktionsrate bei größeren Proben im Allgemeinen niedriger ausfallen als bei kleineren. Als Ursache für diesen zunächst an Zellkulturen beschriebenen (Hedekov und Esmann 1966; Sand et al. 1977) und später auch an Gewebeproben reproduzierten (Singer et al. 1991, 1995; Singer 2006) Effekt gelten die verschlechterten Diffusionsbedingungen in einer „überfüllten“ Messampulle, die zu einem Überwiegen von anaeroben gegenüber aeroben Stoffwechselanteilen führen („crowding effect“). Dadurch, dass anaerobe Stoffwechselraten grundsätzlich kleiner sind als aerobe, kommt es mit zunehmender Probengröße zwangsläufig zu einem Absinken des spezifischen Energieumsatzes.

Das Absinken des spezifischen Energieumsatzes mit zunehmender Probengröße konnte auch bei den hier untersuchten Plazentaprobe beobachtet werden, und zwar vor allem in den mikrorespirometrischen Messungen (bei den mikrokolorimetrischen Messungen wurde dieser Effekt durch eine möglichst einheitliche Probengröße minimiert) (**Abb. 7**). Damit entsprechen diese Befunde den früheren Ergebnissen von Malek et al. (1996b), die ebenfalls Plazentagewebe unterschiedlicher Größe (0,3 cm³ gegen 0,03 cm³) untersucht und dabei einen analogen Zusammenhang zwischen Probengröße und, in ihrem Fall, Glukoseverbrauch gefunden hatten. Um den „crowding effect“ zu berücksichtigen, werden die spezifischen Sauerstoffverbrauchsraten hier grundsätzlich über den zugehörigen Probengrößen aufgetragen, und zwar im doppeltlogarithmischen Plot, wo es dann typischerweise zu einer „Linearisierung“ der Daten kommt (siehe **Abb. 9**).

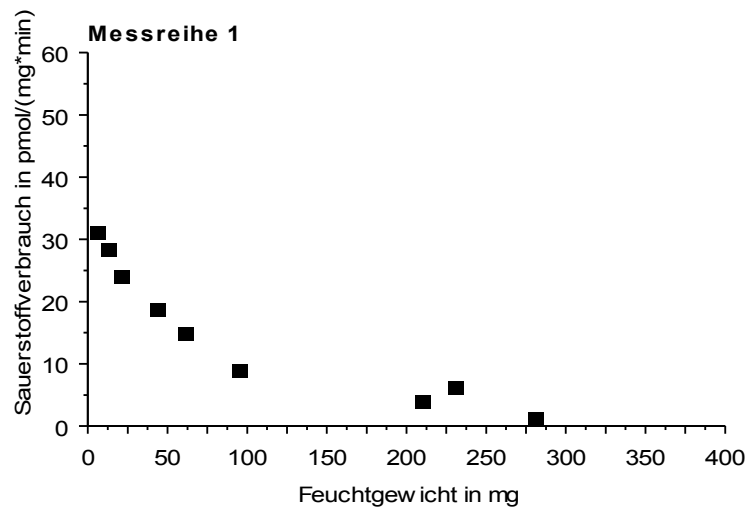


Abb. 7: Abnahme des spezifischen Sauerstoffverbrauches mit zunehmender Probengröße. Dargestellt sind die Ergebnisse der Messreihe 1 (frische, in Ringer-Lösung inkubierte Plazentaprobe ohne Glukose-Zusatz (G-)). Für den „crowding effect“ ist charakteristisch, dass er sich im doppeltlogarithmischen Plot linearisieren lässt (siehe **Abb. 9**).

5.1.3 Inkubationsbedingungen

Um eine Zerstörung der Gewebeprobe zu vermeiden, ist in den vorliegenden Versuchsreihen weder in der mikrorespirometrischen Messkammer, noch in den mikrokalorimetrischen Messampullen, ein Magnet- oder elektrischer Rührer verwendet worden. Da in einem ungerührten Medium jedoch schlechtere Diffusionsbedingungen herrschen, dürften die gemessenen Stoffwechselraten (Sauerstoffverbrauch bzw. Wärmeproduktion) niedriger ausgefallen sein, als sie bei Verwendung eines Rührers gewesen wären.

Sowohl in dem Oroboros Oxygraphen als auch in dem ThermalActivityMonitor wurden die Plazentaprobe also – unter Verwendung üblicher, mit Umgebungsluft-äquibrierter Medien (Ringer, PBS) – in hermetisch abgeschlossenen Messkammern bzw. Messampullen inkubiert („batch mode“). Infolge des Sauerstoffverbrauches der Proben kommt es dabei zu einer fortschreitenden O₂-Depletion, die in den größeren

Mikrokalorimetrie-Ampullen naturgemäß langsamer erfolgt als in der kleineren Mikrorespirometerkammer (wo sie Grundlage der Messung ist). Insofern sind also die Inkubationbedingungen nicht vollständig vergleichbar, wobei, nachdem der Sauerstoff schon in der (kleineren) Mikrorespirometerkammer während der Messdauer niemals vollständig aufgebraucht wurde, auch für die (größeren) Mikrokalorimetrie-Ampullen keine vollständige O₂-Depletion angenommen werden muss.

5.2 Mikrorespirometrische Messungen

5.2.1 Kurvenverläufe und „crowding effect“

Die mikrorespirometrischen Messkurven, der in der beschriebenen Weise gewonnenen und inkubierten Plazentaprobe, zeigten einen weitgehend einheitlichen Verlauf mit einem annähernd linearen Abfall des Sauerstoffgehaltes in der Messkammer, entsprechend einer mehr oder weniger konstanten O_2 -Verbrauchsrate (**Abb. 8**).

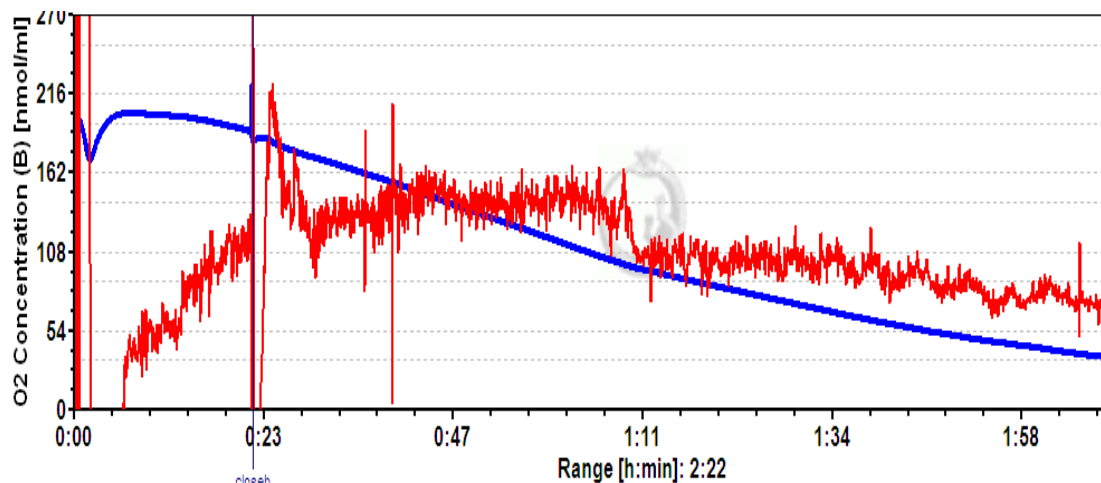


Abb. 8: Beispiel für den Kurvenverlauf der mikrorespirometrischen Messungen. Es sind sowohl die O_2 -Konzentration (blaue Linie) als auch der O_2 -Verbrauch (rote Linie) gegen die Zeit aufgetragen. Der für die Messung berücksichtigte Zeitraum erstreckt sich von Minute 30 bis Minute 120. Die Markierung „close“ kennzeichnet den Zeitpunkt, zu dem die Kammer nach Äquilibration geschlossen wurde.

Somit scheinen sich die Plazentaprobe bzw. – genauer – deren durch Diffusion aus dem Inkubationsmedium versorgten Außenschichten in einem (vorübergehenden) aeroben Gleichgewicht zu befinden. Dass dieser vergleichsweise konstante Sauerstoffverbrauch nur eine äußere Randschicht der Probe betrifft, die mit zunehmender Probengröße immer weniger ins Gewicht fällt, zeigt der ausgeprägte „crowding effect“, d.h. die Abnahme des spezifischen (gewichtsbezogenen)

Sauerstoffverbrauches mit ansteigendem Feuchtgewicht, die in **Abb.9** in typischer Weise (Linearisierung im doppeltlogarithmischen Plot) dargestellt ist.

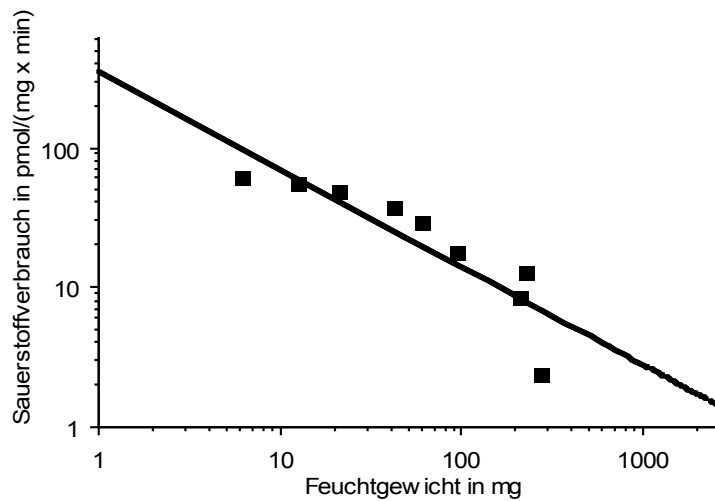


Abb. 9: Spezifischer Sauerstoffverbrauch in pmol/(min*mg Feuchtgewicht) von in Ringer-Lösung ohne Glukose-Zusatz (G-) inkubierten, frischen Plazentaprobe; es handelt sich um die gleichen Daten wie in **Abb. 7**, jedoch hier in doppeltlogarithmischer und dadurch linearisierter Darstellung.

5.2.2 Einfluss von Glukosezusatz und Ischämiedauer

Vergleicht man anhand der jeweiligen Beziehungen zum Feuchtgewicht den spezifischen Sauerstoffverbrauch mit und ohne Glukosezusatz im Inkubationsmedium, so zeigt sich eine tendenzielle (statistisch nicht signifikante) Erniedrigung der Stoffwechselrate in der zuckerfreien gegenüber der zuckerhaltigen Elektrolytlösung (**Abb. 10 und 11**).

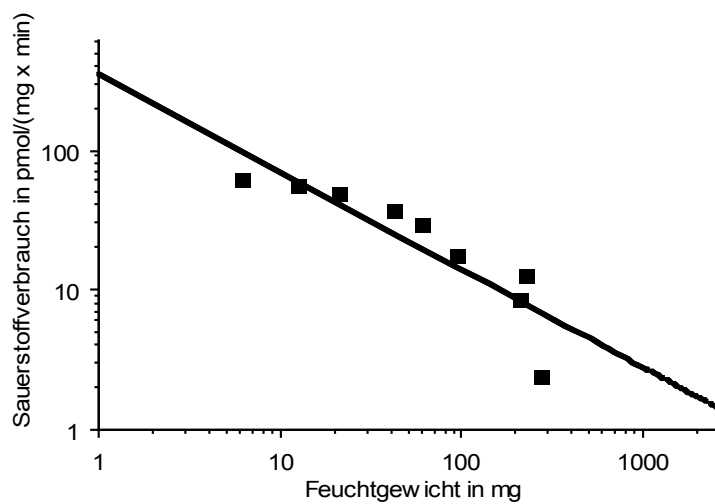


Abb. 10: Spezifischer Sauerstoffverbrauch in pmol/(min*mg Feuchtgewicht) von frischen, in Ringer-Lösung ohne Glukose-Zusatz (G-) inkubierten Plazentaprobe. Es zeigt sich eine tendenzielle Abnahme der Stoffwechselrate im glukosefreien gegenüber dem glukosehaltigen Inkubationsmedium.

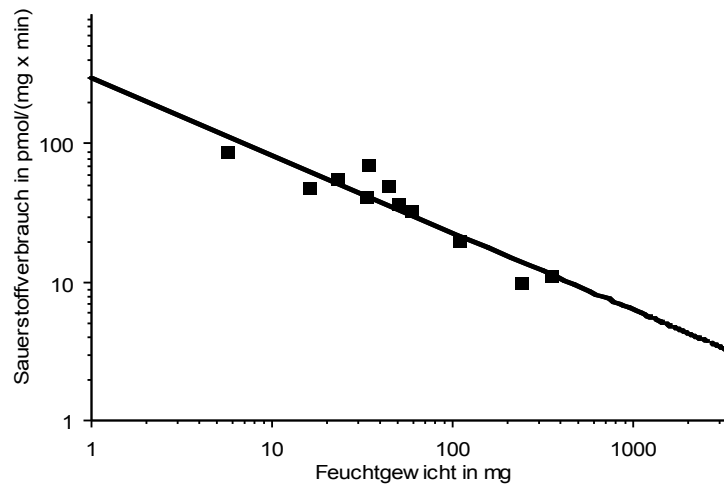


Abb. 11: Spezifischer Sauerstoffverbrauch in pmol/(min*mg Feuchtgewicht) von frischen, in Ringer-Lösung mit Glukose-Zusatz (G+) inkubierten Plazentaprobe. Es zeigt sich eine tendenzielle Abnahme der Stoffwechselrate im glukosefreien gegenüber dem glukosehaltigen Inkubationsmedium

Eine nahezu deckungsgleiche Beziehung zwischen spezifischem Sauerstoffverbrauch und Probengröße ergab sich auch in den Proben, die vor der Messung 1,5 bis 2 h ischämisch gelagert worden waren. Es ergaben sich rechnerisch ähnliche Sauerstoffverbrauchswerte wie bei frischen, in Ringer-Lösung mit Glukose-Zusatz (G+) inkubierten Plazentaprobe (**Abb. 12**).

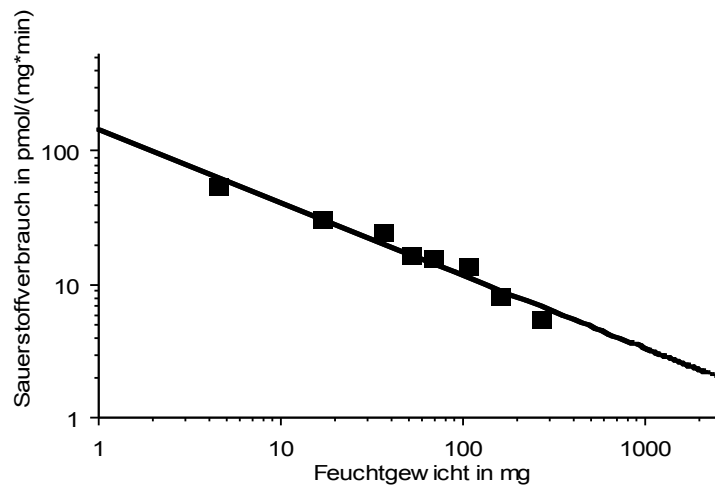


Abb. 12: Spezifischer Sauerstoffverbrauch in pmol/(min*mg Feuchtgewicht) von in Ringer-Lösung mit Glukose-Zusatz (G+) inkubierten Plazentaprobe, die nach ca 1,5-stündiger Ischämie untersucht wurden.

Aus diesen Befunden kann gefolgert werden, dass ischämisches Plazentagewebe offenbar in der Lage ist, bei entsprechendem Angebot (welches vermutlich auch in der Phase der Lagerung durch den Kontakt mit der Umgebungsluft fortbestand) über Stunden einen gleichbleibenden Sauerstoffverbrauch aufrechtzuerhalten.

5.2.3 Vergleich der Messergebnisse mit Literaturdaten

Zur Einordnung der hier erhobenen Befunde soll ein Vergleich mit Literaturdaten zum Sauerstoffverbrauch von Plazentagewebe vorgenommen werden.

Entsprechende Untersuchungen sind seit den 1950er Jahren durchgeführt worden, wobei grundsätzlich zwischen *in vivo*-Untersuchungen, in denen tierexperimentell der Sauerstoffverbrauch des graviden Uterus untersucht wurde, und *ex vivo*-Studien, in denen die meist menschliche Plazenta extrakorporal perfundiert wurde, unterschieden werden kann; hinzu kommen einige Untersuchungen, in denen – wie hier – Biopsien *in vitro* auf ihren Sauerstoffverbrauch untersucht wurden.

In vivo-Studien zeigten einen durchschnittlichen Sauerstoffverbrauch von 0,58 mmol/min (Carter 2000; Illsley 2011). Neuere Untersuchungen bestätigten dies und zeigten ähnliche Werte von 0,53 +/- 0,09 mmol/min (Postigo et al. 2009; Zamudio et al. 2007). Diese Werte sind also insgesamt etwas höher als die Ergebnisse der *in vitro* Studien (0,1 – 0,5 mmol/min), wobei bedacht werden muss, dass bei *in vivo* Messungen ebenfalls der Sauerstoffverbrauch des Uterus gemessen werden müsste (Illsley 2011). Insgesamt verbraucht die Plazenta dabei ungefähr 37 % (Illsley 2011) beziehungsweise 40 % (Carter 2000) des gesamten, den Uterus erreichenden Sauerstoffes.

Die Ergebnisse der **ex vivo/in vitro-Studien** sind in **Tab. 5** zusammengefasst. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden alle Ergebnisse in die Einheit mlO₂/min/kg umgerechnet. Dabei ist zu bedenken, dass bei *in vitro*-Messungen auch bei einem maximalen Sauerstoffangebot lediglich 1/3-1/2 des möglichen *in-vivo* Sauerstoffverbrauches erzielt werden kann (Schneider 2000). Außerdem weisen die Literaturangaben in Abhängigkeit von der jeweiligen Methodik erhebliche Schwankungen zwischen etwa 3 und 11 mlO₂/min/kg auf (Schneider 2000).

Autor	Methodik	Medium	mlO ₂ /min/kg
Villee 1953; MacKay 1958;	Tissue slices	Buffer, 95% O ₂	2,92 – 4,83
Challier et al. 1976	Perfusion, fetal and maternal side	Buffer 95% O ₂	5,3 +/- 0,7
Challier et al. 1976	Perfusion, maternal side	Blood, air	10,9 +/- 1,8
Challier et al. 1976	Perfusion, fetal side	Buffer 95% O ₂	2,2 +/- 0,3
Mover-Lev et al. 1996	Perfusion, fetal side	Perflourocarbon, 95% O ₂	6,6
Diese Arbeit	Tissue slices	PBS Buffer, air	0,17 – 9,34

Tab. 5 O₂-Verbrauchsdaten von humanem Plazentagewebe (n. Schneider 2000)

Einer der ersten Untersuchungen führte C.A.Villee im Jahr 1953 durch. Er nutzte humane Plazentaprobe am Termin mit einer Größe von 0,5 mm und einem Gewicht von 200 mg. Villee kam dabei ungefähr auf einen Sauerstoffverbrauch um 1,9 – 2 µl/h/mg (Villee 1953). MacKay wies eine durchschnittliche Verbrauchsrate am Termin von etwa 1,4 µl/kg/h (+/- 0,26) nach (MacKay 1958). Mit ~ 10 ml/min/kg haben Challier et al. bisher die höchsten Werte ermittelt (Challier et al. 1976; Schneider 2000). Jüngere Untersuchungen von Mover-Lev et al. zeigten Verbrauchsdaten von etwa 6,6 ml/min/kg (Mover-Lev et al. 1996).

Aus theoretischen Gründen wäre zu erwarten, dass die höchsten der hier gemessenen Sauerstoffverbrauchsdaten (an den kleinsten und daher am vollständigsten mit Sauerstoff versorgten Proben) den Verhältnissen an der perfundierten Plazenta am nächsten kommen sollten. Tatsächlich liegen die hier gemessenen Werte von bis zu 9,3 mlO₂/min/kg in der Größenordnung derjenigen Werte, die an perfundierten menschlichen Plazentapräparaten (unter hypoxischen Bedingungen) bestimmt wurden, sodass die mikrorespirometrische Methode trotz aller methodischen Einschränkungen eine realistische Vorstellung von den zu erwartenden Sauerstoffverbrauchsdaten liefert.

Insgesamt kann aus den hier erhobenen mikrorespirometrischen Messergebnissen im Vergleich mit den vorliegenden Literaturdaten also gefolgert werden, dass die untersuchten Plazentaprobe in ihren per diffusionem sauerstoffversorgten Randschichten offenbar eine Restaerobiose aufweisen, die nicht nur außergewöhnlich konstant verläuft, sondern – dazu passend – auch nach längerdauernder Ischämie des Gesamtorgans noch nahezu unverändert nachgewiesen werden kann.

5.3 Vergleichende respirokolorimetrische Messungen

5.3.1 Mikrokalorimetrische Kurvenverläufe und Einfluss von Glukosezusatz

Betrachtet man die mikrokalorimetrischen Messkurven der untersuchten Plazentaprobe, so erkennt man – nach einem kurzen, methodisch bedingten initialen Anstieg (Aufbau des thermischen Gradienten über den Peltier-Elementen in der Messkammer) – einen stetigen Abfall der Wärmeproduktionsraten (**Abb. 13**), der sich deutlich von den weitgehend stabilen mikrorespirometrischen Messkurven unterscheidet. Es handelt sich hierbei um den für ischämische Gewebeprobe typischen Kurvenverlauf, der den fortschreitenden Zusammenbruch des größtenteils anaeroben und daher nicht mehr im Gleichgewicht befindlichen Stoffwechsels („Absterbekurve“) anzeigt.

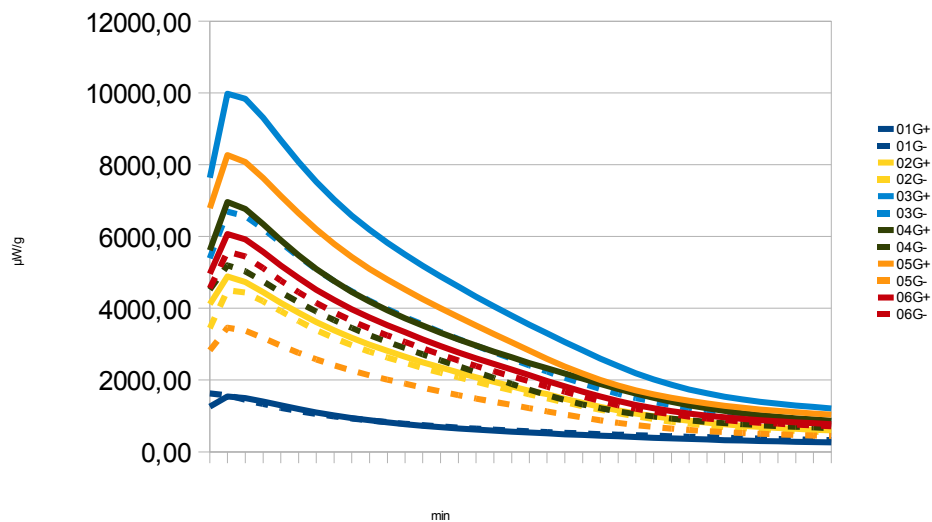


Abb. 13: Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen. Wird die Wärmeproduktion der Plazentaprobe gegen die Zeit aufgetragen, erkennt man den für ischämische Gewebe charakteristischen Kurvenverlauf; der initiale Anstieg dieser „Absterbekurve“ ist messmethodisch bedingt.

Da in dieser Versuchsreihe auf eine einheitliche Probengröße geachtet wurde, spielt der für mikrokalorimetrische und -respirometrische Messungen bedeutende „crowding effect“ (vgl. Kapitel 5.1.2) hier keine oder eine untergeordnete Rolle.

Durch den Zusatz von Glukose zum Inkubationsmedium kommt es zu einer geringfügigen „Parallelverschiebung“ der mikrokalorimetrischen Absterbekurven, ohne dass deren Verlauf dadurch grundsätzlich verändert (verlangsamt oder beschleunigt) würde (**Abb. 14**).

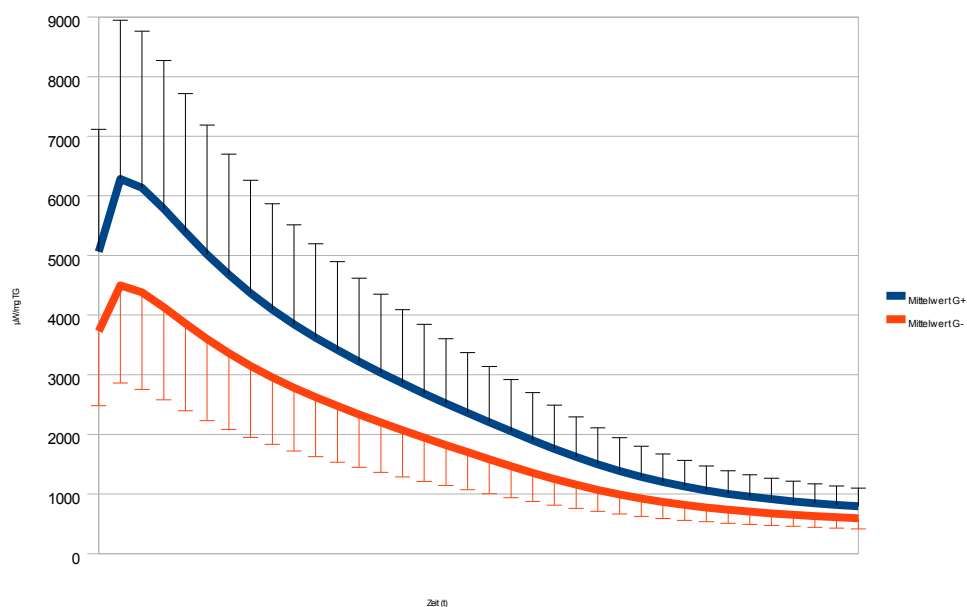


Abb. 14 Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen. Trägt man die Mittelwerte der Messungen mit und ohne Glukosezusatz gegen die Zeit auf, erhält man zwei „parallelverschobene“ Absterbekurven.

Dem steht eine durchschnittliche (wenn auch nicht in jedem Einzelversuch gleich ausgeprägte) Anhebung der Sauerstoffverbrauchsraten unter Glukosezusatz gegenüber (**Abb. 15**), die sich im übrigen in dieser vergleichenden respirokalorimetrischen Messserie nicht anders verhalten haben als in den vorstehend beschriebenen Versuchen.

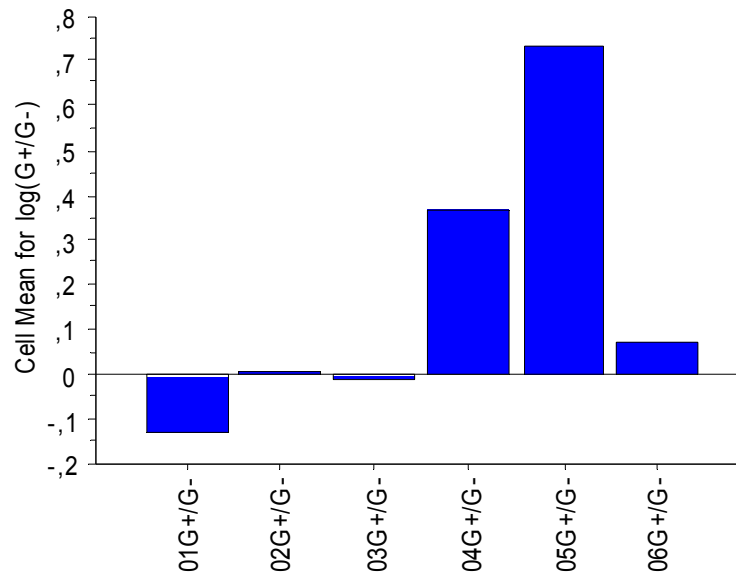


Abb. 15: Verhältnis der mittleren Sauerstoffverbrauchsrate mit (G+) und ohne Glukosezusatz (G-) bei den parallelen respirokolorimetrischen Messungen. In vier von sechs Messungen erkennt man einen erhöhten Sauerstoffverbrauch unter Zusatz von Glucose in das Messmedium.

Aus diesen Befunden kann vorsichtig gefolgert werden, dass die „Parallelverschiebung“ der mikrokalorimetrischen Absterbekurven möglicherweise lediglich die geringe Steigerung widerspiegelt, die der aerobe Stoffwechselanteil in den untersuchten Gewebeprobe durch den Glukosezusatz zu erfahren scheint. Dies wäre auch insofern plausibel, als vermutlich die gleichen Außenschichten der Probe, die per diffusionem mit Sauerstoff aus dem Umgebungsmedium versorgt werden, von der zugesetzten Glukose erreicht werden.

5.3.2 Vergleich der mikrokalorimetrischen Messwerte mit Literaturdaten

Ein echter Vergleich der hier gemessenen Wärmeproduktionsraten mit Literaturdaten ist nicht möglich, da weder von humanen noch von tierischen Plazentaprobe n bisher mikrokalorimetrische Messungen publiziert wurden. Vergleicht man die in dieser Arbeit erhobenen Werte jedoch mit den Ergebnissen mikrokalorimetrischer Arbeiten an ischämischen Geweben anderer Herkunft, so fällt die für die lange Ischämiedauer ungewöhnliche Höhe der Wärmeproduktion auf. Tatsächlich erreicht die humane Plazenta in der mikrokalorimetrischen Verlaufsmessung ischämische Wärmeproduktionsraten, wie sie vergleichsweise an protektioniertem (kardioplegischem) Hundemyokard gefunden wurden (**Abb. 16**) – was als indirekte Bestätigung ihrer von anderen Autoren beschriebenen, ungewöhnlich hohen Hypoxietoleranz angesehen werden kann.

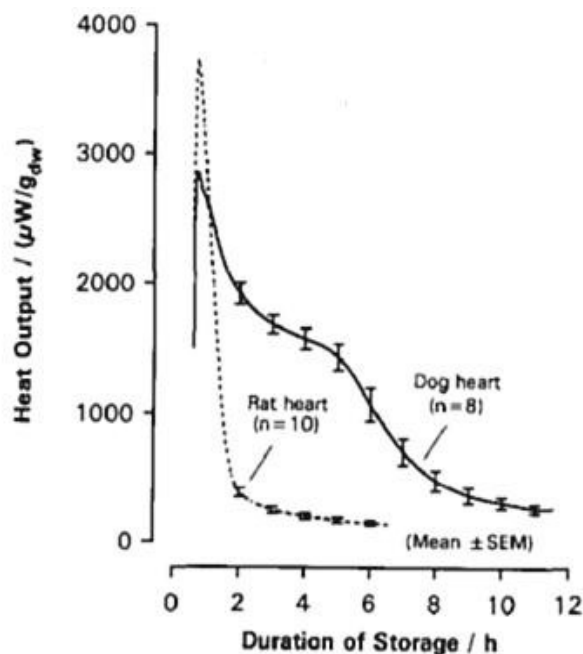


Abb. 16: Mikrokalorimetrische „Absterbekurven“ von protektioniertem (kardioplegischem) Hunde- und Rattenmyokard (Singer et al. 1995).

5.3.3 Vergleich zwischen Wärmeproduktion und Sauerstoffverbrauch

Vergleicht man die unter – soweit messmethodisch möglich – vergleichbaren Bedingungen bestimmten Wärmeproduktions- und Sauerstoffverbrauchsrate, so zeigt sich noch einmal der schon weiter oben angedeutete qualitative und quantitative Unterschied (**Abb. 17**):

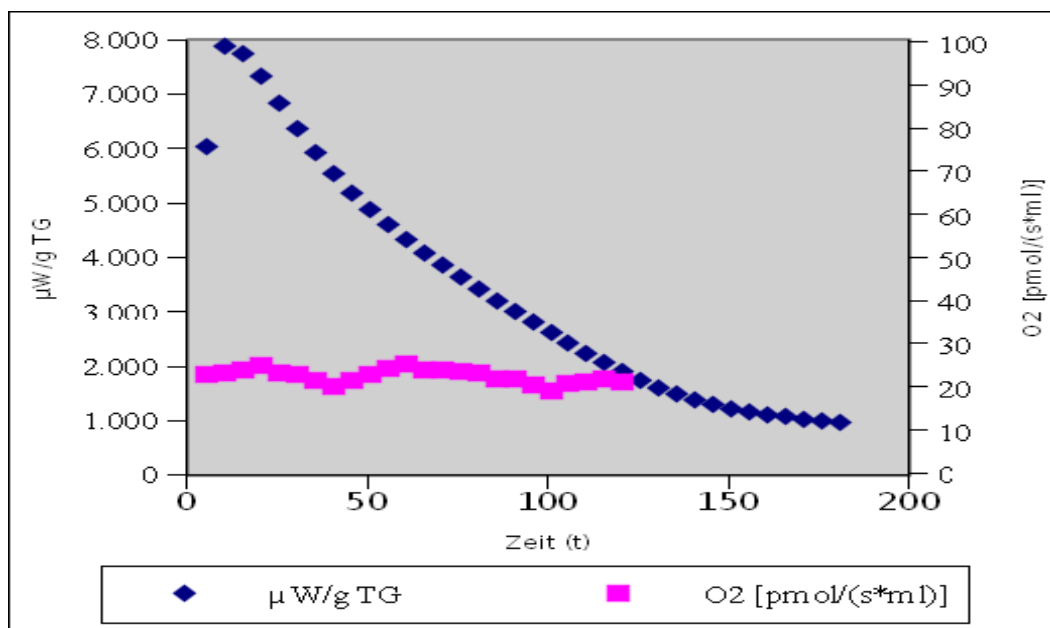


Abb. 17: Ergebnis der vergleichenden respirokolorimetrischen Messungen. Man erkennt, dass die (anaerobe) Wärmeabgabe (im Proben-„Kern“) stetig abfällt, während der Sauerstoffverbrauch (in der Proben-„Schale“) weitgehend konstant bleibt.

Qualitativ zeigt sich zum einen eine weitgehend konstante Sauerstoffverbrauchsrate, die vermutlich den anhaltenden aeroben Stoffwechsel in der – durch Diffusion aus dem Inkubationsmedium – mit Sauerstoff versorgten „Schale“ der Plazentaprobe widerspiegelt, zum anderen erkennt man eine stetig abfallende Wärmeproduktion, die den „Absterbevorgang“ des anaeroben Proben-„Kerns“ reflektiert und sich dennoch – vor allem angesichts der Tatsache, dass die Proben schon zuvor eine mindestens 30-minütige Ischämie von der erfolgten Nachgeburt bis zur Inkubation in der

Messkammer hinter sich gebracht hatten – in erstaunlicher Höhe bewegt (vgl. oben).

Quantitativ trägt die Sauerstoffverbrauchsrate von 1,0-1,5 pmol/(mg·s), wenn man sie mit einem mittleren oxykalendarischen Äquivalent von rund 450-480 kJ/mol O₂ umrechnet, nur 0,5-0,75 µW/mg zur Wärmeproduktion bei, sodass die aerobe Schale lediglich einen Bruchteil der Gesamtstoffwechselaktivität der Probe ausmacht. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass der Sauerstoffverbrauch notgedrungen auf das gesamte Probengewicht bezogen wurde, sich in Wirklichkeit aber nur in der äußeren Randzone abspielt, sodass er – wenn er korrekterweise durch das (unbekannte) Gewicht des aeroben Probenanteiles dividiert würde – auch entsprechend höher ausfallen würde.

Die Tatsache, dass diese Restaerobiose noch über das Absterben des anaeroben Kerns hinaus weitgehend konstant bleibt, lässt (im Gegensatz zu anderen hypoxischen Geweben, bei denen sie ebenfalls vergleichsweise rasch abfällt) indirekt erkennen, dass das Plazentagewebe optimal an die Verwertung von Restsauerstoff angepasst sein muss. Dies könnte mit dem von anderen Autoren vorgeschriebenen „hypoxischen Hypometabolismus“, d.h. der Fähigkeit zusammenhängen, den Eigensauerstoffbedarf variabel an das Sauerstoffangebot anzupassen.

Diese Fähigkeit ist unter dem Namen „Oxykonformismus“ für Amphibien und intertidale Invertebraten (wirbellose Bewohner der Gezeitenzone, z.B. bestimmte Würmer) beschrieben worden (Boutilier et al. 1997; Buchner et al. 2001) und unterscheidet sich von konventionellen physiologischen Vorstellungen, denen zufolge ein bestimmter Sauerstoffverbrauch zur Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion zwingend erforderlich ist und – wenn er nicht gedeckt wird – unweigerlich eine kritische Unterversorgung resultiert.

Allerdings scheint ein analoges Phänomen auch bei neonatalen Säugetieren

vorzukommen und zu deren erhöhter Hypoxietoleranz beizutragen, wie von Rohlicek et al. (1998) an neugeborenen Hunden und von Singer et al. (2002, 2004) an neugeborenen Mäusen und Ratten gezeigt wurde.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, lässt auch die menschliche Plazenta offensichtlich einen „hypoxischen Hypometabolismus“ erkennen, indem sie ihren Eigensauerstoffverbrauch bei abnehmenden Sauerstoffangebot weitgehend zu drosseln vermag (Schneider 2000, 2009, 2011). Dies erscheint angesichts des vergleichsweise hohen Anteils von ca. 40% des von der fetoplazentaren Einheit verbrauchten Sauerstoffs (Carter 2000; Illsley 2011) auch insofern „sinnvoll“, als im Falle einer kritischen Versorgungssituation der verbleibende Sauerstoff präferentiell für den Feten zur Verfügung stehen sollte, anstatt von der Plazenta selber verbraucht zu werden. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass beispielsweise bei Schwangerschaften im Hochgebirge die Synthesefunktionen der Plazenta – auch unter Inkaufnahme eines weniger guten fetalen Wachstums – eingeschränkt werden, wogegen die Durchleitung von Sauerstoff zum Feten weitgehend unbeeinträchtigt bleibt (Murray 2012).

Dieser „biochemische Schutzreflex“ wird, auch wenn er primär der Abschirmung des Feten gegenüber Sauerstoffmangel dient, doch auch die Hypoxietoleranz der Plazenta erhöhen, indem er, wie es von den „niederen“ Tieren bekannt ist, die Überdauerung von hypoxischen Phasen ohne Akkumulation einer hohen „Sauerstoffschuld“ erlaubt und zudem die Diffusionsbedingungen für Sauerstoff verbessert. Der letztgenannte Effekt gibt sich in den hier durchgeführten respirokolorimetrischen Versuchen an Plazentaprobe in der konstanten Verwertung von Restsauerstoff aus dem Umgebungsmedium zu erkennen.

Zusammenfassend dürfte die außergewöhnlich hohe Hypoxie-/Ischämietoleranz des humanen Plazentagewebes, die den Ausgangspunkt der hier vorgelegten Untersuchungen darstellte, also auf einer Kombination aus einer ungewöhnlich hohen anaeroben Glykolysekapazität (erkennbar an dem langamen Abfall mit entsprechend

hohen Wärmeproduktionsraten in der *Mikrokalorimetrie*) und einer besonders sparsamen Verwertung von Restsauerstoff (erkennbar an der weitgehend konstanten Verbrauchsrate in der *Mikrorespirometrie*) beruhen.

6 Zusammenfassung

Hintergrund und Fragestellung: Die Plazenta ist als Grenzfläche und Schaltzentrale zwischen maternalem und fetalem Kreislauf nicht nur für den Atemgas- und Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind verantwortlich, sondern erfüllt auch zahlreiche, z.B. endokrine Kontrollfunktionen für die intakte Schwangerschaft. Trotz der damit einhergehenden hohen Stoffwechselrate scheint die humane Plazenta eine außergewöhnlich hohe Ischämietoleranz aufzuweisen, die u.a. auf der Fähigkeit beruhen könnte, ihren Eigensauerstoffverbrauch in Anpassung an ein vermindertes O₂-Angebot aktiv zu drosseln (sog. „hypoxischer Hypometabolismus“). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich mittels mikrorespirometrischer und mikrokolorimetrischer Messungen an humanen Plazentaprobe Hinweise auf die gesteigerte Ischämietoleranz und den möglicherweise zugrundeliegenden Mechanismus finden lassen.

Material und Methoden: Zur Beantwortung dieser Frage wurde in insgesamt vier Messreihen die Stoffwechselaktivität von ex vivo entnommenen Plazentabiopsien untersucht. Die mikrorespirometrischen Messungen wurden mit dem Oxygraph-2K (Oroboros, Innsbruck, Österreich) durchgeführt. In Messreihe 1 und 2 wurde der spezifische Sauerstoffverbrauch, jeweils bezogen auf die Probengröße, in Ringer-Lösung ohne (n=8) bzw. mit Glukosezusatz (n=11) bestimmt, in Messreihe 3 (n=8) der Sauerstoffverbrauch nach einer ca. 1,5-stündigen Verzögerung zwischen Entnahme und Messbeginn („Langzeitischämie“, n=8) untersucht. In Messreihe 4 (n=12) wurden pro Plazenta jeweils vier Aliquots entnommen, von denen zwei ebenfalls mikrorespirometrisch auf ihren Sauerstoffverbrauch und die anderen beiden parallel dazu mikrokolorimetrisch auf ihre Wärmeproduktion untersucht wurden (2277 Thermal Activity Monitor, Thermometric, Järfälla, Schweden); als Inkubationsmedium wurde in diesem Fall PBS, wieder ohne und mit Glukosezusatz, verwendet.

Ergebnisse: In den mikrorespirometrischen Messungen zeigen die Plazentabiopsien einen mit steigender Probengröße abnehmenden (sog. „crowding effect“) spezifischen

Sauerstoffverbrauch, der sich mit zunehmender Ischämiedauer kaum verändert und durch Glukosezusatz zum Inkubationsmedium noch gesteigert werden kann. In den mikrokalorimetrischen Untersuchungen findet sich eine langsam abfallende spezifische Wärmeabgabe, die durch Glukosezusatz zum Inkubationsmedium nur geringfügig erhöht werden kann (vermutlich nur um den Betrag, um den sich der aerobe Stoffwechselanteil in der Probenschale steigern lässt) und – in Relation zu den gemessenen Sauerstoffverbrauchsraten – auf einen hohen anaeroben Stoffwechselanteil im Probenkern hindeutet.

Diskussion und Schlussfolgerung: Die auch im Vergleich zu anderen, protektionierten Warmblütergeweben ausnehmend langsamen mikrokalorimetrischen „Absterbekurven“ bestätigen die hohe Ischämietoleranz von humanem Plazentagewebe. Wie sich aus den vergleichenden respirokolorimetrischen Messungen ableiten lässt, beruht diese Ischämietoleranz offenbar auf der Kombination aus einer hohen anaeroben Stoffwechselkapazität (im Probenkern) und einer langanhaltenden Restaerobiose (in der Probenschale). Da die letztere von der Eindiffusion von Sauerstoff aus dem Umgebungsmedium abhängt, könnte sie durch die von anderen Autoren beschriebene, aktive Absenkung des Sauerstoffverbrauches bei abnehmendem Sauerstoffangebot („hypoxischer Hypometabolismus“) begünstigt werden. Insgesamt scheinen mikrorespirometrische und mikrokalorimetrische Methoden damit zur Untersuchung der metabolischen Eigenschaften von menschlichem Plazentagewebe geeignet zu sein.

7 Literaturverzeichnis

Aherne W and Dunnill MS (1966) Quantitative aspects of placental structure. *J Pathol Bacteriol* 91(1):123-139.

Ar A, Mover H (1994) Oxygen tensions in developing embryos: System inefficiency or system requirement? *Israel J Zool* 40(3-4):307-326.

Belkacemi L, Nelson DM, Desai M, Ross MG (2010) Maternal undernutrition influences placental-fetal development. *Biol Reprod* 83(3):325-331.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2007) Biochemie. 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 561-599.

Bloxam DL (1985) Human placental energy metabolism: its relevance to in vitro perfusion. In: In vitro perfusion of human placental tissue. Schneider H (Hrg.), Dancis J (Hrg.), 1. Auflage, Karger, Basel, 59-67.

Bloxam DL, Bullen BE, Walters BN, Lao TT (1987) Placental glycolysis and energy metabolism in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 157(1):97-101.

Boutilier RG, Donohoe PH, Tattersall GJ, West TG (1997) Hypometabolic homeostasis in overwintering aquatic amphibians. *J Exp Biol* 200(Pt 2):387-400.

Broad KD, Keverne EB (2011) Placental protection of the fetal brain during short-term food deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(37):15237-15241.

Buchner T, Abele D, Pörtner HO (2001) Oxyconformity in the intertidal worm *Sipunculus nudus*: the mitochondrial background and energetic consequences. *Comp Biochem Physiol Part B* 129(1):109-120.

Bugger H (2006) Der Einfluß veränderter Arbeitslast auf die Regulation der respiratorischen Kapazität isolierter Mitochondrien. Med. Dissertationsschrift. Universität Freiburg, 46.

Burton GJ (2009) Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J Anat* 215(1):27-35.

Carter AM (2000) Placental oxygen consumption. Part I: in vivo studies-a review. *Placenta* 21 Suppl A:S31-S37.

- Challier JC, Schneider H, Dancis J (1976) In vitro perfusion of human placenta. V. Oxygen consumption. *Am J Obstet Gynecol* 126(2):261-265.
- Clark Jr. LC, Wolf R, Granger D, Taylor Z (1953) Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol* 6(3):189-193.
- Gnaiger E (2008) Polarographic oxygen sensors, the oxygraph and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function. In: Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction. Dykens J (Hrg.), Will Y (Hrg.), 1. Auflage, John Wiley & Sons, Hoboken, 327-352.
- Gnaiger E (2010) The Oxygraph for High-Resolution Respirometry (HRR). *Mitochondrial Physiology Network* 06.01:1-18.
- Gude NM, Stevenson JL, Rogers S, Best JD, Kalionis B, Huisman MA, Erwich JJHM, Timmer A, King RG (2003) GLUT12 expression in human placenta in first trimester and term. *Placenta* 24(5):566-570.
- Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG (2004) Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res.* 114:397-407.
- Hedeskov CJ, Esmann V (1966) Respiration and glycolysis of normal human lymphocytes. *Blood* 28(2):163-174.
- Illsley NP (2000) Glucose transporters in the human placenta. *Placenta* 21(1):14-22.
- Illsley NP (2011) Placental metabolism. In: The Placenta-From Development to Disease. Kay HH (Hrg.), Nelson DM (Hrg.), Wang Y (Hrg.), 1. Auflage, Wiley-Blackwell, Hoboken, 50-56.
- Illsley NP, Aarnoudse JG, Penfold P, Bardsley SE, Coade SB, Stacey TE, Hytten FE (1984) Mechanical and metabolic viability of a placental perfusion system in vitro under oxygenated and anoxic conditions. *Placenta* 5(3):213-225.
- Instruction Manual (2005) *LKB 2277 BioActivity Monitor 90 01 2963*. LKB-Produkt AB Stockholm.
- Laga EM, Driscoll SG, Munro HN (1973) Quantitative studies of human placenta. I. Morphometry. *Biol Neonate* 23(3):231-259.
- Limesand SW, Regnault TRH, Hay Jr. WW (2004) Characterization of glucose transporter 8 (GLUT8) in the ovine placenta of normal and growth restricted fetuses. *Placenta* 25(1):70-77.

Mackay RB (1958) Studies of the oxygen consumption of fresh placenta tissue from normal and abnormal pregnancies. *J Obstet Gynecol Br Emp* 65(5):791-799.

Malek A, Miller RK, Mattison DR, Ceckler T, Panigel M, di Sant'Agnese PA, Jessee LN (1995) Continuous measurement of ATP by ³¹P-NMR in term human dually perfused placenta in vitro: response to ischemia. *J Appl Physiol* 78(5):1778-1786.

Malek A, Miller RK, Mattison DR, Kennedy S, Panigel M, di Sant'Agnese PA, Jessee LN (1996a) Energy charge monitoring via magnetic resonance spectroscopy ³¹P in the perfused human placenta: effects of cadmium, dinitrophenol and iodoacetate. *Placenta* 17(7):495-506.

Malek A, Sager R, Altermatt HJ, Gaeng D, Leiser R, Schneider H (1996b) Glucose consumption and lactate production of human placental tissue under different conditions of in vitro incubation. *J Soc Gynecol Investig* 3(3):113-120.

Maltepe E, Saugstad OD (2009) Oxygen in health and disease: Regulation of oxygen homeostasis - clinical implications. *Pediatr Res* 65:261-268.

Mitchell P (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc* 41(3):445-502.

Mortola JP (2004) Implications of hypoxic hypometabolism during mammalian ontogenesis. *Respir Physiol Neurobiol* 141:345-356.

Mover-Lev H, Dreval D, Zakut H, Ar A (1996) O₂ consumption in the in-vitro fetal side human placenta. *Respir Physiol* 106(2):199-208.

Murray AJ (2012) Oxygen delivery and fetal-placental growth: beyond a question of supply and demand? *Placenta* 33 Suppl 2:e16-22.

Postigo L, Heredia G, Illsley NP, Torricos T, Dolan C, Echalar L, Tellez W, Maldonado I, Brimacombe M, Balanza E, Vargas E, Zamudio S (2009) Where the O₂ goes to: preservation of human fetal oxygen delivery and consumption at high altitude. *J Physiol* 587(Pt 3):693-708.

Rohlicek CV, Saiki C, Matsuoka T, Mortola JP (1998) Oxygen transport in conscious newborn dogs during hypoxic hypometabolism. *J Appl Physiol* 84(3):763-768.

Rolfe DF, Brown GC (1997) Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77(3):731-758.

- Sand T, Condie R, Rosenberg A (1977) Metabolic crowding effect in suspension of cultured lymphocytes. *Blood* 50(2):337-346.
- Schneider H (2000) Placental oxygen consumption. Part II: in vitro studies-a review. *Placenta* 21 Suppl A:S38-S44.
- Schneider H (2009) Tolerance of human placental tissue to severe hypoxia and its relevance for dual ex vivo perfusion. *Placenta* 30 Suppl A:S71-S76.
- Schneider H (2011) Oxygenation of the placental-fetal unit in humans. *Respir Physiol Neurobiol* 178(1):51-58.
- Simmonds RJ, Coade SB, Harkness RA, Drury L, Hytten FE (1982) Nucleotide, nucleoside and purine base concentrations in human placentae. *Placenta* 3(1):29-38.
- Singer D (2002) Phylogenese des Stoffwechsels der Säugetiere. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 37(8):441-460.
- Singer D (2004) Metabolic adaptation to hypoxia: cost and benefit of being small. *Respir Physiol Neurobiol* 141(3):215-228.
- Singer D (2006) Metabolic size relationship: Oxygen availability as the "missing link" between structure and function? *Thermochimica Acta* 446:20-28.
- Singer D, Mühlfeld C (2007) Perinatal adaptation in mammals: the impact of metabolic rate. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 148(4):780-784.
- Singer D, Bach F, Bretschneider HJ, Kuhn HJ (1991) Microcalorimetric monitoring of ischemic tissue metabolism-influence of incubation conditions and experimental animal species. *Thermochimica Acta* 187:55-69.
- Singer D, Schunck O, Bach F, Kuhn HJ (1995) Size effects on metabolic rate in cell, tissue, and body calorimetry. *Thermochimica Acta* 251:227-240.
- Singer D, Ince A, Hallmann B (2002) Oxygen supply, body size, and metabolic rate at the beginning of mammalian life. *Thermochimica Acta* 394:253-259.
- Singer D, Engelhardt N, Ince A, Hallmann B (2004) Body size effects on tissue metabolic rate and ischemia tolerance in neonatal rat and mouse hearts. *Thermochimica Acta* 422:19-23.
- Sitzmann FC (2007) Duale Reihe Pädiatrie. 3. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 110-111.

Villee CA (1953) The metabolism of human placenta in vitro. *J Biol Chem* 205(1): 113-123.

Welsch U (2005) Sobotta Lehrbuch Histologie. 2. Auflage. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München, 523-535.

Xing AY, Challier JC, Lepercq J, Caüzac M, Charron MJ, Girard J, Hauguel-de Mouzon S (1998) Unexpected expression of glucose transporter 4 in villous stromal cells of human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 83(11):4097-4101.

Zamudio S, Postigo L, Illsley NP, Rodriguez C, Heredia G, Brimacombe M, Echalar L, Torricos T, Tellez W, Maldonado I, Balanza E, Alvarez T, Ameller J, Vargas E (2007) Maternal oxygen delivery is not related to altitude- and ancestry-associated differences in human fetal growth. *J Physiol* 582(Pt 2):883-895.

8 Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
aqua dest.	destilliertes Wasser
FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid
KCL	Kaliumchlorid
LH	luteinisierende Hormon
μ l	Mikroliter
mmol	Millimol
μ W/nW	Mikrowatt/Nanowatt
μ J	Mikrojoule
n	Anzahl der Messungen
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
PBS	phosphate buffered saline
Pi	anorganischer Phosphor
pmol	Picomol
p.p.	post partum/postpartal

POS	Polarographic Oxygen Sensor
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PVDF	Polyvinylidenfluorid
V	Volt

8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Schematische Darstellung des Oxygraph-2k. (S. 14)
- Abb. 2:** Schematische Darstellung des Aufbaus einer Clark-Elektrode. (S. 15)
- Abb. 3:** Das Mikrokalorimeter (TAM 2277). (S. 17)
- Abb. 4:** Aufbau eines Messzylinders des TAM 2277. (S. 18)
- Abb. 5:** Fetale Seite der Plazenta. Eihäute erhalten. (S. 23)
- Abb. 6:** Abhängigkeit des Trockengewichtes vom Feuchtgewicht bei 24 Plazentaprobe(n). (S. 39)
- Abb. 7:** Abnahme des spezifischen Sauerstoffverbrauches mit zunehmender Probengröße in Messreihe 1. (S. 42)
- Abb. 8:** Beispiel für den Kurvenverlauf der mikrorespirometrischen Messungen (S. 44)
- Abb. 9:** Spezifischer Sauerstoffverbrauch in $\text{pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg Feuchtgewicht})$ von in Ringer-Lösung ohne Glukose-Zusatz (G-) inkubierten, frischen Plazentaprobe(n) in doppeltlogarithmischer Darstellung. (S.45)
- Abb. 10:** Spezifischer Sauerstoffverbrauch in $\text{pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg Feuchtgewicht})$ von frischen, in Ringer-Lösung ohne Glukose-Zusatz (G-) inkubierten Plazentaprobe(n) in doppeltlogarithmischer Darstellung. (S. 46)
- Abb. 11:** Spezifischer Sauerstoffverbrauch in $\text{pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg Feuchtgewicht})$ von frischen, in Ringer-Lösung mit Glukose-Zusatz (G+) inkubierten Plazentaprobe(n) in doppeltlogarithmischer Darstellung. (S. 47)
- Abb. 12:** Spezifischer Sauerstoffverbrauch in $\text{pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg Feuchtgewicht})$ von in Ringer-Lösung mit Glukose-Zusatz (G+) inkubierten Plazentaprobe(n), die nach ca 1,5-stündiger Ischämie untersucht wurden. (S. 48)
- Abb. 13:** Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen. (S. 52)
- Abb. 14:** Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen mit „parallelverschobene“ Absterbekurven. (S. 53)
- Abb. 15:** Verhältnis der mittleren Sauerstoffverbrauchsraten mit (G+) und ohne Glukosezusatz (G-) bei den parallelen respirokalorimetrischen Messungen. (S. 54)

Abb. 16: Mikrokalorimetrische „Absterbekurven“ von protektioniertem (kardioplegischem) Hunde- und Rattenmyokard. (S. 55)

Abb. 17: Ergebnis der vergleichenden respirokalorimetrischen Messungen. (S. 56)

8.3 Lebenslauf

Entfernt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

8.4 Danksagungen

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst geht ein herzlicher Dank an meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Singer, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne ihn wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Mit seiner stets konstruktiven Art eröffnete er mir einen tiefen Einblick in das behandelte Fachgebiet und das wissenschaftliche Arbeiten.

Herrn Peter Schmidtke danke ich für seinen Einsatz, mich in die Feinheiten insbesondere der mikrorespirometrischen Messprinzipien einzuführen und dafür, dass er immer ein zuverlässiger und kompetenter Betreuer und Begleiter meiner Arbeit war. Des Weiteren geht mein Dank an Walid Fazeli für seine Begleitung in den ersten Stunden.

Ein Dank geht auch an das Institut der Humangenetik, insbesondere an Prof. Dr. A. Gal, Prof. Dr. rer. nat. K. Kutsche und PD Dr. rer. nat. H-J. Kreienkamp, deren Arbeitsgruppen mir während der experimentellen Phase der Arbeit freundlicherweise einen Arbeitsplatz in ihrem Labor, sowie Material zur Verfügung stellten.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe sowie des Kreißsaales des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Probengewinnung.

Gewidmet ist diese Dissertation meiner Familie. Ohne ihre uneingeschränkte Liebe und Unterstützung wäre nicht nur diese Arbeit, sondern auch das gesamte Studium nicht möglich gewesen.

8.5 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: