

**Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin
der
Ludwig Maximilians Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl

**Etablierung eines Entzündungsmodells an der isoliert perfundierten
humanen Plazenta**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Sebastian Walther

aus München

2010

**mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Georg Enders

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. Udo Jeschke
Prof. Dr. Johannes Hoffmann**

**Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. vet. E. Thein
Priv. Doz. Dr. med. A. Beiras Fernandez**

**Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,
FACR, FRCR**

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2010

Meinen Eltern

1.	Einleitung.....	6
1.1	Der Fall TGN 1412.....	6
1.2	Aktuelle Entwicklung in der Medizin: Biologische Arzneimittel.....	8
1.3	Vorklinische Entwicklung und Produktion biologischer Arzneimittel.....	10
1.4	Die humane Plazenta.....	14
1.5	Geschichte der Plazentaperfusion.....	18
1.6	Entzündung.....	20
2.	Ziel und Fragestellung.....	22
3.	Material und Methoden.....	23
3.1.	Plazenten.....	23
3.2.	Präparation der Plazenten.....	24
3.3.	Blutspender.....	25
3.4.	Versuchsgruppen.....	25
3.5.	Vorbehandlung des Vollblutes.....	26
3.6.	Perfusionssystem.....	26
3.7.	Intravitalmikroskopie.....	28
3.7.1.	Technisches Setup.....	28
3.8.	Messparameter.....	29
3.9.	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	31
3.9.1.	IL-1 β	32
3.9.2.	IL-6.....	33
3.9.3.	TNF- α	33
3.10.	Durchflusszytometrie.....	33
3.10.1.	Prinzip der Durchflusszytometrie und verwendete Antikörper.....	33
3.11.	Gewebeproben.....	36
3.11.1.	Konventionelle Färbungen.....	36
3.11.2.	Immunhistochemie.....	38
3.12.	Statistische Auswertung.....	41
4.	Ergebnisse.....	43
4.1.	Hämatologische Parameter.....	43
4.1.1.	Hämatokrit.....	43
4.1.2.	Thrombozyten.....	44
4.1.3.	Leukozyten.....	45
4.2.	Vitalparameter.....	46
4.2.1.	AVDO ₂	47
4.2.2.	Perfusionsdruck.....	48
4.3.	ELISA.....	49
4.3.1.	IL-1 β	50
4.3.2.	IL-6.....	50
4.3.3.	TNF- α	51
4.4.	FACS.....	53
4.4.1.	Lymphozyten.....	53
4.4.2.	Neutrophile Granulozyten.....	56
4.4.3.	Thrombozyten.....	59
4.5.	Histologie und Immunhistochemie.....	63
4.5.1.	HE-Färbung.....	64

4.5.2	Masson-Trichrom-Färbung.....	65
4.5.3	vWF.....	65
4.5.4	ICAM-1.....	66
4.5.5	VE-Cadherin.....	67
4.5.6	CD31 (PECAM-1).....	67
4.5.7	IL-1.....	68
4.5.8	IL-6.....	69
4.5.9	TNF- α	69
4.5.10	Thrombomodulin.....	70
4.5.11	PAN-T.....	71
4.5.12	L-Selectin, E-Selectin, P-Selectin, VCAM, CD3.....	71
4.6	Intravitalmikroskopie.....	71
5.	Diskussion.....	73
5.1.	Grundlegende Überlegungen zur Modellentwicklung.....	73
5.2.	Material und Methoden.....	75
5.2.1	Humanes Plazentamodell.....	75
5.2.2	Perfusionssystem.....	76
5.2.3	Intravitalmikroskopie.....	77
5.2.4	Versuchsdurchführung.....	78
5.3.	Ergebnisse.....	80
5.2.3	Hämatologische Parameter.....	80
5.2.3.1	Hämatokrit.....	80
5.2.3.2	Thrombozyten.....	81
5.2.3.3	Leukozyten.....	82
5.2.4	Vitalparameter.....	83
5.2.5	ELISA.....	84
5.2.6	FACS.....	86
5.2.7	Histologie und Immunhistochemie.....	88
6.	Zusammenfassung und Schlussfolgerung.....	94
7.	Literaturverzeichnis.....	97

1. Einleitung

1.1 Der Fall TGN 1412

Für heftiges Aufsehen hat im Jahre 2006 eine klinische Phase-I-Studie, durchgeführt am Londoner Northwick Park Hospital, gesorgt. Dabei wurden sechs männliche Probanden zwischen 20 und 40 Jahren mit dem Wirkstoff TGN 1412 der Firma TeGenero behandelt, erlitten daraufhin schwerste lebensbedrohliche Komplikationen und mussten mehrere Wochen intensivmedizinisch therapiert werden [1]. Alle Probanden reagierten im Sinne einer Entgleisung des Immunsystems mit einem Zytokin-Sturm und entwickelten ein Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) mit Multiorganversagen. In der Presse wurde das Bild des „Elefantenmenschen“ mit der Entwicklung eines generalisierten Ödems geprägt. Dem jüngsten Versuchsteilnehmer mussten Finger und Zehen amputiert werden. Ein Proband erkrankte in engem zeitlichem Zusammenhang zur Studie an Leukämie.

Bei dem Wirkstoff TGN 1412 handelt es sich um einen humanisierten superagonistischen monoklonalen Antikörper, der gegen das humane Molekül CD28 auf T-Lymphozyten gerichtet ist [2]. Dieser sollte zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden, die durch eine fehlgeleitete Immunabwehr entstehen, wie beispielsweise Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose oder Leukämie.

In Labor- und Tierversuchen konnte festgestellt werden, dass TGN 1412 die Anzahl regulatorischer T-Zellen um ein Vielfaches erhöht und ihre Aktivität steigert. In *The Journal of Experimental Medicine* (2005) berichten die Autoren, dass dies eine Kontrolle von fehlgeleiteten Immunreaktionen ermöglicht, die durch autoreaktive T-Lymphozyten ausgelöst werden, ohne offenbar auffällige Nebenwirkungen auszulösen [3].

Bemerkenswert ist, dass sich trotz aller Hinweise für Sicherheit und Wirksamkeit in präklinischen Studien für TGN 1412 im Versuchen an Ratten und vor allem an Primaten ein derartig desaströses Nebenwirkungsprofil bei der erstmaligen Anwendung am Menschen zeigte. Eine mögliche Erklärung ist, dass sich die Aminosäuresequenz des CD28-Antigens als Zielmolekül von TGN 1412 im Affen gering von der Aminosäuresequenz im Menschen unterscheidet. Diese geringen Abweichungen reichen aus, um beim Affen keinen Zytokin-Sturm auszulösen [4].

Dieses Ereignis aus dem Jahr 2006 hat nicht nur die wissenschaftliche sondern auch die wirtschaftliche Welt erschüttert und rückt ein grundsätzliches Dilemma der Medikamentenentwicklung in den Focus:

Können extrem wirksame monoklonale Antikörper überhaupt weiterentwickelt werden [5] und wie aussagekräftig sind Tiermodelle für Vorhersagen bei der Anwendung am Menschen?

Aus Sicht der Wissenschaft sind Tierversuche unerlässlich, um Erkenntnisse aus Experimenten in Zellkulturen am lebenden Organismus zu überprüfen. Dennoch lassen sich die Ergebnisse aus Tierversuchen nicht in Gänze auf den Menschen übertragen. Einerseits müssen bei spezies-spezifischen Medikamenten (z. B. antihumanen Antikörpern) abgewandelte Formen im Tierversuch eingesetzt werden, um keine unerwünschten Immunreaktionen auszulösen. Im Falle von TGN 1412 wurde bei Ratten der Antikörper JJ316 eingesetzt [6]. Auf der anderen Seite können mehr oder weniger große Unterschiede zum menschlichen Immunsystem, wenngleich diese, wie z. B. bei Makaken, nur gering ausgeprägt sein können, zu unvorhersehbaren Nebenwirkungen führen.

Eine unabdingbare Voraussetzung bei der Entwicklung neuer Medikamente besteht nun darin, sich vor der klinischen Anwendung (Phase-I-Studie) bestmöglich dem humanen System anzunähern.

Deshalb werden zunehmend Stimmen laut, die bessere Testsysteme im Rahmen der präklinischen Prüfung von biologischen Wirkstoffen, wie z. B. antihumanen Antikörpern, fordern, um Wirksamkeit und vor allem Sicherheit vor klinischer Applikation am Menschen besser einschätzen zu können.

1.2 Aktuelle Entwicklung in der Medizin: Biologische Arzneimittel

Ein biologisches/biotechnologisches Arzneimittel ist ein Arzneimittel zur Prophylaxe oder zur Therapie oder ein In-vivo-Diagnostikum, d.h. ein am/im Menschen angewendetes Diagnostikum. Sein Wirkstoff leitet sich von biologischem Gewebe oder Ausgangsmaterial von lebenden Zellen ab und besitzt eine große, komplexe, zwangsläufig heterogene Molekülstruktur. Ein biologisches Arzneimittel kann sehr spezifische Formulierungsbedingungen erfordern (z. B. Hilfsstoffe, Konjugationen oder spezielle chemisch-physikalische Bedingungen), um seine spezifische biologische Aktivität bei der Verabreichung zu entfalten [7].

Biopharmazeutische Produkte im therapeutischen Einsatz zur Behandlung von Krankheiten gewinnen in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Ihren Ursprung haben moderne biologische Medikamente in den frühen 80er Jahren mit der Zulassung von rekombinatem Humaninsulin 1982 in den USA [8]. Seither wurden mehr als 250 biotechnologisch hergestellte Medikamente einschließlich rekombinanter Vakzine, rekombinanter Proteine (verschiedene Antikörper, Zytokine und Hormone), sowie rekombinanter Blutprodukte, zur Zulassung gebracht. Viele weitere biologische Arzneimittel befinden sich in klinischer Entwicklung [9]. Mittlerweile sind ca. ein Drittel aller neu in den Markt eingeführten Medikamente biologische Wirkstoffe [10].

Wie bei chemisch hergestellten Arzneimitteln kann bei biologischen Medikamenten zum Zeitpunkt der Zulassung das volle Nebenwirkungsspektrum nicht in Gänze abgeschätzt werden, vor allem wegen der Erprobung an nur wenigen Probanden. Allerdings ist das Risiko für unvorhergesehene Ereignisse oder schwerwiegender Nebenwirkungen bei dem Einsatz von biotechnologisch hergestellten Wirkstoffen deutlich höher einzustufen. Der Grund dafür ist in einem deutlich komplexeren Herstellungsverfahren mit lebendem Gewebe bzw. lebenden Zellen als Ausgangsprodukt zu sehen [11]. Im Gegensatz zu herkömmlichen pharmazeutisch hergestellten Medikamenten mit genau definiertem Molekulargewicht sind biopharmazeutisch hergestellte Wirkstoffe wie Antikörper, Wachstumshormone oder Zytokine komplexe und heterogene Proteine mit bis zu drei mal höherem Molekulargewicht [10]. Zudem kann je nach Herstellungsverfahren und dem zugrunde liegenden Ausgangsprodukt (z. B. Zellkultur) das Molekulargewicht von biologischen Medikamenten innerhalb einer Produktlinie differieren [12, [13]. Dadurch können biologische Produkte bei verschiedenen Patienten in unterschiedlicher Weise das Immunsystem beeinflussen [12]. Daraus ergibt sich ein Hauptproblem bei der Anwendung von biologischen Medikamenten am Menschen, nämlich die Schwierigkeit geeignete Tiermodelle für die Vorhersage der Immunogenität im Rahmen der vorklinischen Testung zu finden [10]. Denn gerade Immuntoleranz als wichtiger Bestandteil der Immunantwort ist streng spezies-spezifisch [14]. Dennoch ist bereits bei der vorklinischen Entwicklung das Abschätzen der potentiellen Immunogenität des Medikamentes bei der Anwendung am Menschen von herausragender Wichtigkeit, um verlässliche Vorhersagen für Wirksamkeit und Sicherheit machen zu können. Für gewöhnlich wird eine starke Immunantwort bei der Testung von menschlichen oder humanisierten Proteinen im Tiermodell im Vergleich

zur klinischen Anwendung am Menschen beobachtet, was mit einem speziesspezifischen Unterschied der Molekülstruktur erklärt werden kann [15].

Es ist ersichtlich, dass an die Entwicklung und Testung biologischer Wirkstoffe vor der Anwendung am Menschen besonders hohe Ansprüche gestellt werden.

1.3 Vorklinische Entwicklung und Produktion biologischer Arzneimittel

Im Gegensatz zu chemisch synthetisierten Medikamenten sind biologische Arzneimittel Produkte lebender Materie wie Menschen oder Tieren, daraus gewonnenen Zellkulturen oder von Mikroorganismen, deren Herstellungsprozess sehr komplex ist. Zahlreiche Produktionsschritte sind notwendig, um das aufgereinigte Endprodukt zu erhalten [12] [13]. Die große Herausforderung der biopharmazeutischen Industrie besteht darin, gleich bleibend hohe Produktqualität bei größtmöglicher Sicherheit und Wirksamkeit im Rahmen der Entwicklung von biologischen Wirkstoffen zu zeigen. Trotz der aufwändigen vorklinischen Entwicklung, verbunden mit einem hohen Kostenaufwand, zeigt sich die Tendenz die Entwicklungszeit möglichst kurz zu halten, um frühzeitig das Produkt auf den Markt zu bringen und somit maximale Gewinnmargen einzufahren [16]. Zudem handelt es sich bei vielen Biotech-Firmen, die biologische Wirkstoffe entwickeln, um sog. Start-Up-Unternehmen, die in hohem Maße auf Fremdinvestoren angewiesen sind. Oft ist die Höhe der Investorengelder davon abhängig, ob neue Substanzen bereits am Menschen getestet werden. Daraus ergibt sich die Gefahr, dass Biotechfirmen von ihren Investoren zu schnell in die Klinik gedrängt werden, wie der Fall TGN 1412 gezeigt hat.

Um die größtmögliche Sicherheit bei der Anwendung von biologischen Medikamenten am Menschen zu gewährleisten, sind zahlreiche präklinische Testreihen zur Sicherheit des Medikaments vonnöten. In einer Leitlinienveröffentlichung vom März 2007 durch den Ausschuss für Humanarzneimittel (CHMP) bei der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) sind grundsätzliche Punkte zur Risikostratifizierung sowohl biologischer wie auch chemischer Arzneimittel vor der Erstanwendung am Menschen aufgeführt [17].

Diese Leitlinie soll einen möglichst hohen Sicherheitsstandard eines Medikaments vor der Erstanwendung am Menschen gewährleisten.

Bei vielen biomedizinischen Arzneimitteln handelt es sich nicht um sog. Hochrisikoarzneimittel, so dass von keinem erhöhten Risiko bei der Erstanwendung am Menschen ausgegangen werden muss. Abzugrenzen sind allerdings biotechnologisch hergestellte Wirkstoffe, deren Produkteigenschaften ein erhöhtes Risikoprofil nahe legen. Am Beispiel von monoklonalen Antikörpern lassen sich folgende Kriterien definieren, die Produkte mit hohem Risiko definieren mit der Notwendigkeit erweiterter präklinischer Testung vor Erstanwendung am Menschen [18]:

1. Monoklonale Antikörper mit neuartigem Wirkmechanismus, die zentrale Regelsysteme des Immunsystems beeinflussen (wie CD28 im Fall von TGN1412) oder pleiotrope Zytokine hemmen oder induzieren.
2. Monoklonale Antikörper für deren Testung keine geeigneten Tiermodelle existieren. Dazu zählen Antikörper, die nur menschliche Epitope erkennen, in Signalwege eingreifen, die nur beim Menschen vorhanden sind, oder für die es keine homologen Tiermodelle zur präklinischen Testung gibt.

3. Monoklonale Antikörper mit veränderter Molekülstruktur, so dass unter Umständen eine Wirkungsverstärkung durch einen veränderten Fc-Teil hervorgerufen werden kann.

Für Medikamente, die nach oben genannten Kriterien als Arzneimittel mit hohem Risikopotential eingestuft werden können, sollte ein ausgedehntes und individuell zugeschnittenes präklinisches Entwicklungsprogramm festgelegt werden.

Ein zentraler Punkt der präklinischen Testung monoklonaler Antikörper nach der Richtlinie 2001/83/EC bzw. der Arzneimittelprüfrichtlinie 2003/63/EC sind Toxizitätsstudien. Auch die ICH-Leitlinie S6 beschäftigt sich mit der präklinischen Sicherheitstestung biotechnologisch hergestellter Arzneimittel [19]. Darin wird die Forderung der Testung des Medikaments in einer „relevanten Spezies“ gestellt. Ein Tiermodell wird dann als „relevant“ definiert, wenn der Wirkstoff über einen exprimierten Rezeptor, oder im Falle von monoklonalen Antikörpern, über ein entsprechendes Epitop seine pharmakologische Aktivität entfalten kann. Wie der Fall TGN1412 gezeigt hat, ist der Nachweis einer 100%igen Homologie [20] zwischen dem Zielmolekül im gewählten Tiermodell und dem im Menschen nicht ausreichend, um die Relevanz des gewählten Modells zu beweisen. Vielmehr bedarf es genauer Kenntnisse der Bindungsaffinität, der funktionellen Potenz und der pharmakodynamischen Effekte zwischen Pharmakon und Zielmolekül [21] [22].

Festzuhalten ist, dass die im Tierversuch erhobenen Daten keine hundertprozentige Vorhersage bei der Anwendung am Menschen erlauben [23]. Dennoch steht in vielen Fällen bei der präklinischen Überprüfung von Toxizität und Immunogenität von Biopharmaka wegen der engen genetischen Verwandtschaft zum Menschen die Wahl eines Modells am Primaten an erster Stelle [24].

Existieren keine relevanten Tiermodelle, so müssen andere Testverfahren im Rahmen des vorklinischen Entwicklungsprogramms eingesetzt werden [25]. Eine

Alternative stellen in-vitro-Untersuchungen an z.B. humanen Zelllinien dar [26] [27]. Zudem kommen sog. Xenograft-Modelle bei präklinischen Sicherheitsstudien zum Einsatz [28]. Dabei werden immuninkompetenten Mäusen menschliche Gewebe oder hämatopoetische Stammzellen transplantiert, oder sie werden mit humanen Genen transfiziert, mit dem Ziel, komplexe biologische Vorgänge in-vivo zu studieren. In diesem Fall spricht man auch von Versuchen an humanisierten Mäusen, deren Ergebnisse dennoch kritisch bewertet werden müssen, da transgene Tiermodelle nicht zwingend die physiologischen Bedingungen im humanen Organismus widerspiegeln.

Zunehmend Bedeutung in präklinischen Versuchsreihen gewinnt die Testung von Surrogatantikörpern in einem homologen Tiermodell. Hierunter versteht man die parallele Testung eines Pendantes des humanen biologischen Wirkstoffes in einem geeigneten Maus- oder Rattenmodell [29]. Dazu wird bei z.B. einem antihumanen monoklonalen Antikörper, der ausschließlich ein humanes Epitop erkennt, speziell ein monoklonaler Antikörper entwickelt, der an das äquivalente z.B. murine Epitop bindet. Im Falle TGN1412 entspricht JJ316 dem superagonistischen Antikörper von CD28 im Rattenmodell [30] [3]. In einigen Fällen wird bereits im Rahmen der Entwicklung des gewünschten Biopharmazeutikums ein entsprechendes Surrogat zur Testung im Tiermodell mitentwickelt. Aber auch hierbei bleibt kritisch anzumerken, dass keine sicheren Aussagen zu Wirksamkeit oder unerwünschten Wirkungen vor der Erstanwendung am Menschen getroffen werden können.

Aus ethischen, moralischen und rechtlichen Gründen sind Versuche am Menschen nicht zulässig. Deshalb sind nach wie vor Tierversuche und besonders auch Versuche an Primaten bei der Entwicklung von biologischen Arzneimitteln unverzichtbar. Die gewonnenen Daten aus präklinischen Sicherheitsstudien sind stets kritisch zu hinterfragen, weil eine hundertprozentige Vorhersage zur Verträglichkeit

dieser Substanzen bei First-in-Man-Studien auf Grund von speziesspezifischen Unterschieden nicht möglich ist. Eine Erweiterung der präklinischen Testprogramme könnten Versuche an der humanen Plazenta darstellen, da es sich dabei um ein leicht verfügbares, menschliches Organ handelt, an dem mit nur geringen ethischen Vorbehalten Experimente durchgeführt werden können.

1.4 Die humane Plazenta

Die Plazenta dient während der Schwangerschaft der Aufnahme aller notwendigen Nährstoffe für den heranwachsenden kindlichen Organismus, wie z.B. Aminosäuren, Mineralien, Kohlenhydrate und Fette, und erfüllt die Aufgabe des Gasaustausches zwischen Mutter und Kind. Außerdem dient die Plazenta dem Schutz der fetoplazentaren Einheit und kann als endokrines Organ Hormone bilden.

Die reife Plazenta ist ein diskusförmiges Organ mit einem Durchmesser von 15-20 cm und einer Stärke von ca. 2,5 cm. Sie wiegt zwischen 400 und 600 g. Abhängig von der Art der Entbindung bestehen deutliche morphometrische Unterschiede. Die fetale Seite der Plazenta, die Chorionplatte, ist bedeckt von dem glatten, glasig spiegelnden Amnion. Das Amnion besteht aus einem einzelreihigen Epithel und einem avaskulären mesenchymalen Bindegewebe, das sich leicht von der Plazenta ablösen lässt. Auch die Nabelschnur wird von dem Amnion überzogen. Diese inseriert meist in einer etwas exzentrischen Position in die Chorionplatte. Das Chorionmesenchym enthält die fetalen Choriongefäße, die aus den Gefäßen der Nabelschnur gespeist werden. Ausgehend von den zwei umbilikalen Arterien breiten sich die Choriongefäße zentrifugal über die Plazenta aus und verzweigen sich dann in die Tiefe in ihre Endäste, die die Zottenbäume versorgen. Die Venen der Zottenbäume transportieren das fetale Blut in die Chorionvenen, die gewöhnlich die Chorionarterien unterkreuzen und dann in eine einzige Nabelschnurvene münden.

Die maternale Seite der Plazenta wird von der Basalplatte gebildet und besteht aus maternalem und fetalem Gewebe. Diese ist der uterinen Decidua zugewandt und enthält alle möglichen Zellen des mütterlichen Organismus, wie z.B. Bindegewebszellen, Makrophagen und andere Immunzellen, sowie viel strukturbildende extrazelluläre Matrix. Die Basalplatte ist nach Lösung der Plazenta durch netzartige Furchen in 10-40 leicht erhabene Lobuli unterteilt. Jeder Lobulus entspricht einem abgeschlossenen fetalen Zottenbaum und bildet einen sogenannten Kotyledon. Im Inneren der Plazenta setzen sich die Furchen in rudimentäre Septen fort. In einer reifen Plazenta zweigen 60-70 Zottenbäume (Villi) von Choriongefäßen auf der Chorionplatte in die Tiefe ab, so dass ein maternaler Kotyledon von ein bis vier fetalen Zottenbäumen oder so genannten Plazentonen belegt ist [31] [32].

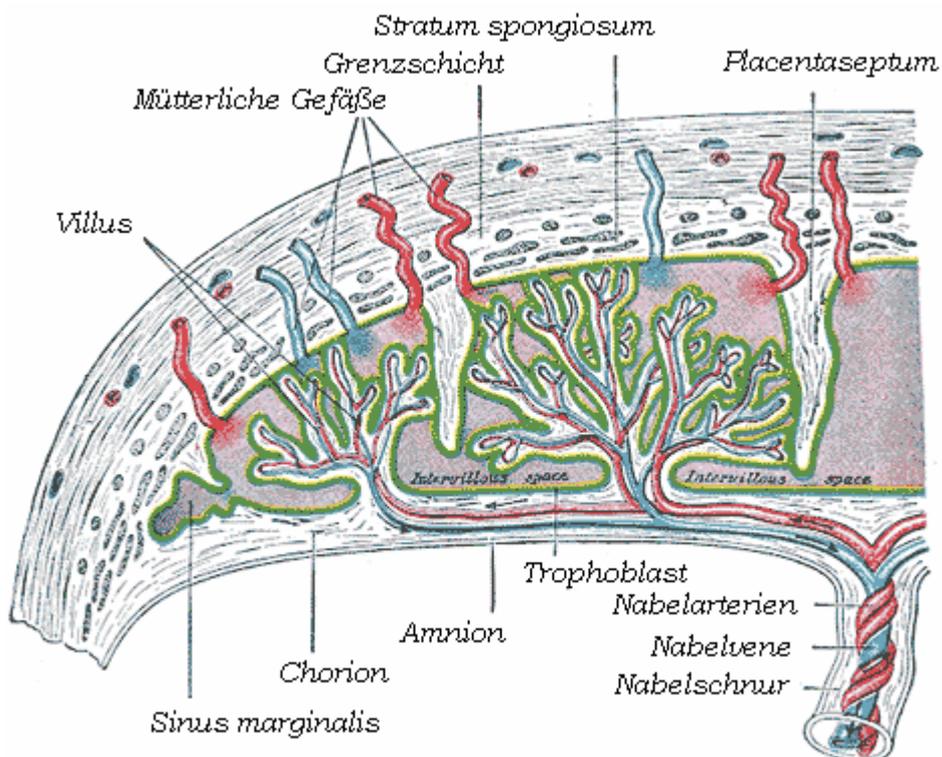


Abbildung 1: Makroskopisches Modell der Plazenta (aus Grey's Anatomy, 1918)

Obgleich es unterschiedliche Zottenarten mit unterschiedlicher funktioneller Differenzierung gibt, liegt jeder Zottenart die gleiche Grundstruktur zugrunde. Die Oberfläche besteht aus Synzytiotrophoblasten, einer Art epithelialen Zellschicht, die den maternalen Blutstrom von dem Zotteninneren trennt. In diesem Fall (bei Mensch und Affen) spricht man nach Grosser (1909) vom hämochorialen Typ der Plazenta [33] [34]. Anders als bei anderen epithelialen Zelllagen bildet der Synzytiotrophoblast einen zusammenhängenden Zytoplasmaschlauch ohne Zellgrenzen. Zwischen dem Synzytiotrophoblasten und der trophoblastischen Basalmembran liegt der Zytotrophoblast. Dieser besteht aus einzelnen oder in kleinen Gruppen gelegenen Zellen und dient der Proliferation und Regeneration des Synzytiotrophoblasten. Der Trophoblast wird durch die Basalmembran von dem Zottenbindegewebe getrennt. Dieses besteht aus ortsständigen Bindegewebszellen sowie aus Interzellulärschubstanz, retikulären und kollagenen Fasern. Darin befinden sich wenige freie Bindegewebszellen, wie Mastzellen, Plasmazellen und Makrophagen (Hofbauer-Zellen), sowie fetale Gefäße. In den größeren Stammzotten verlaufen hauptsächlich fetale Arterien und Venen, wohingegen in den peripheren Anteilen des Zottenbaums vor allem fetale Kapillare und Sinusoide zu finden sind (Abbildung 2).

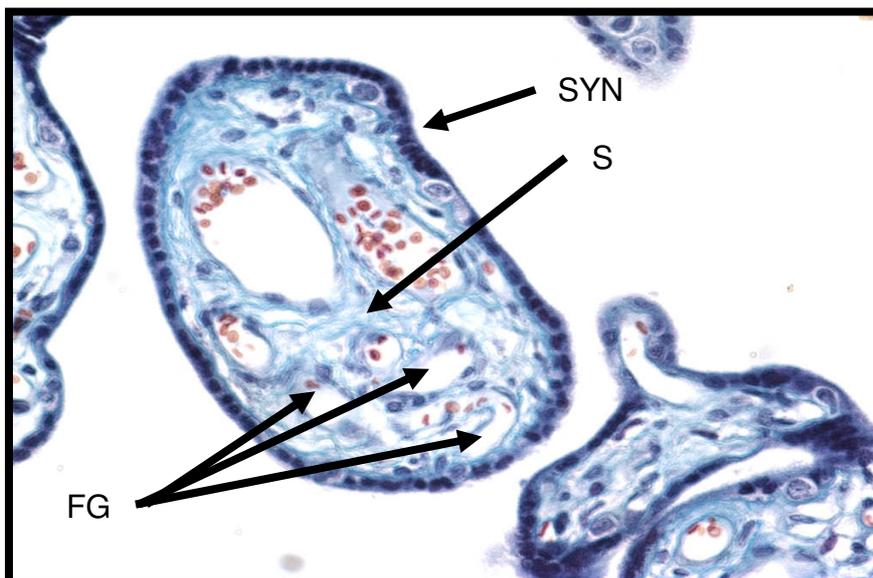


Abbildung 2: Schnitt durch eine Endzotte der reifen menschlichen Plazenta (Masson-Trichrom-Färbung).
SYN: Synzytiotrophoblast, S: fetales Stroma, FG: fetale Gefäße

In Abhängigkeit von Lage, Gefäßstruktur und Bindegewebsstruktur lassen sich verschiedene Zottenarten unterscheiden [35] [36] [37]. Aus der Chorionplatte gehen die *Stammzotten* hervor, die über Haftzotten mit der Basalplatte in Verbindung stehen. Sie enthalten vor allem zentral liegende fetale Arterien und Venen umgeben von dichtem Stroma [38] [39]. Die Tatsache der geringen Kapillardichte in den Stammzotten legt eine untergeordnete Rolle in Bezug auf den materno-fetalen Stoffaustausch nahe. Vielmehr haben sie eine mechanisch stabilisierende Funktion des Zottenbaums [35] und regeln über perivaskuläre kontraktile Fasern den Blutfluss in den Zottenbaum [40]. Nach histologischem Bau und demnach unterschiedlicher Beteiligung an Stoffaustauschprozessen wird weiter unterschieden. Die *unreifen Intermediärzotten* haben typischerweise ein retikuläres Stroma mit vielen Hofbauer-Zellen und sind vor allem in der unreifen Plazenta zu finden. In der reifen Plazenta treten sie in kleinen Gruppen auf und dienen als Wachstumszone. Im letzten Trimenon entwickeln sich vermehrt *reife Intermediärzotten* mit faserarmen lockerem Stroma. Die Ausstattung mit fetalen Kapillaren deutet auf eine Beteiligung am Stoffaustausch hin. Die Endverzweigungen des Zottenbaums stellen die *Endzotten* dar und sind für das histologische Bild bei Schnitten durch die reife Plazenta bezeichnend (siehe Abbildung 2). Wegen des fast vollständigen Fehlens von Bindegewebe bei gleichzeitig hoher fetaler Kapillardichte mit Bildung von Sinusoiden erfolgt hier der Hauptanteil des materno-fetalen Stoffaustauschs mit einer minimalen feto-maternalen Austauschstrecke von ca. 4 μm .

Das fetale Gefäßsystem in der Plazenta ist durch ein nicht fenestriertes Endothel ausgekleidet. Für die interzellulären Zellkontakte sind Adherens Junctions und Tight Junctions für den selektiven parazellulären Stoffaustausch bezeichnend [41]. Größere Moleküle können über vesikulären Transport durch die Endothelzellen in das fetale Gefäßsystem gelangen [42]. Elektronenmikroskopische,

immunhistochemische und Permeabilitätsstudien am fetalen Endothel legen eine Vergleichbarkeit des fetalen Gefäßsystems mit dem von adulten Skelettmuskeln nahe [41]. Gestärkt wird diese These durch Untersuchungen zum Phänotyp des fetalen Endothels. Dabei konnte gezeigt werden, dass das plazentare Endothel ein typisches Muster an endothelialen Markern exprimiert [43] [44] [45] [46]. Daraus ist abzuleiten, dass sich die humane Plazenta für Studien an humanem Endothel in Perfusionsversuchen hervorragend eignet.

1.5 Geschichte der Plazentaperfusion

Perfusionsversuche an der humanen Plazenta bieten die Möglichkeit, transplazentaren Stoffaustausch, verschiedene Transportmechanismen, plazentaren Stoffwechsel, Toxizität oder potentielle Exposition des Fötus gegenüber Umweltfaktoren und vieles mehr zu untersuchen.

Die erste Beschreibung über die extrakorporale Perfusion einer humanen Plazenta stammt von *Krantz* aus dem Jahr 1962 [47]. Die von *Panigel* 1967 vorgestellte zweiseitige in-vitro-Perfusion eines isolierten Kotyledons stellt das meist gebräuchliche Modell dar [48]. Dieses wurde von *Schneider* [49] [50], *Miller* [51] und anderen Arbeitsgruppen weiterentwickelt und verfeinert. Die meisten der Studien mit Verwendung eines zweiseitigen Plazentaperfusionsmodells haben zum Zweck, den materno-fetalen Stoffaustausch zu untersuchen. In den vergangenen drei Jahrzehnten wurden zahlreiche Studien unter Verwendung eines ex-vivo Perfusionsmodells eines humanen Kotyledons zu plazentaren Medikamententransfer veröffentlicht. *Bourget* bietet einen Überblick über getestete Medikamente im Zeitraum von 1972 bis 1994 [52]. In dem Review von *Myren* wird eine Auswahl von Perfusions-Versuchen zu Medikamententransfers von 1995 bis 2006 dargestellt [53]. Die Bandbreite der

untersuchten Substanzen reicht von illegalen Drogen über Antibiotika bis hin zu neueren Medikamenten der HIV- oder Epilepsiebehandlung [54] [55] [56] [57].

Bei der zweiseitigen Perfusion eines Plazentakotyledon wird nach Kanülierung sowohl der fetalen Gefäße wie auch der maternalen Lakunen die Perfusion mit heparinisierendem Krebs-Ringer-Puffer eingeleitet. Für länger dauernde Versuche (>6 Stunden) muss zur Perfusion ein Zellkulturmedium verwendet werden. Auf diese Weise kann die Plazenta bis zu 48 Stunden bei nachweisbarem Zellüberleben perfundiert werden [58]. Die Perfusion kann in einem geschlossenen Kreislauf bei Fragestellungen zum Stoffaustausch oder Metabolismus, oder aber nicht rezirkulierend vorgenommen werden, dann mit dem Ziel, z.B. die Medikamentenclearance zu untersuchen [59].

Allerdings müssen die Daten aus Experimenten mit perfundierten Plazenten kritisch interpretiert werden, da die entbundene Plazenta nicht mehr der Situation *in vivo* entspricht. So könnte man einen Untergang von metabolischen Funktionen oder spezifischen Transportmechanismen postulieren. Ein weiterer Kritikpunkt der Perfusion mit Pufferlösung ist, dass kein Blutfluss oder Plasma-Protein-Bindung untersucht werden kann [52].

Die *ex-vivo* Perfusion der humanen Plazenta ist eine elegante wissenschaftliche Untersuchungstechnik, die ohne große ethische Bedenken durchgeführt werden kann. Obwohl im Regelfall die Plazenta nach der Geburt vernichtet wird, ist vor Experimenten mit placentarem Gewebe das schriftliche Einverständnis der Mutter einzuholen.

Für die dieser Arbeit zugrunde liegender Fragestellung wählten wir ein Modell der unilateralen Perfusion eines fetalen Kotyledons. Die Perfusion erfolgte nicht mit einer Pufferlösung, wie sie bei allen in der Literatur beschriebenen Modellen verwendet wird, sondern mit humanem Vollblut, um zum einen potentiell komplexe Vorgänge

am fetalen Endothel, insbesondere Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen, und zum anderen alle für Entzündungsreaktionen relevante Zelltypen vereinen und untersuchen zu können.

1.6 Entzündung

Um zu evaluieren, inwieweit sich die humane Plazenta für Medikamentenstudien eignet, muss ein valides Modell etabliert sein. Grundlage zahlreicher in-vivo Versuche bestimmter Wirkstoffe oder Wirkmechanismen stellen Entzündungsmodelle im Tierversuch dar [60] [61] [62].

Als Entzündung bezeichnet man einen komplexen Prozess, mit dem ein Organismus und/oder sein Gewebe auf einen endogenen oder exogenen Reiz reagiert. Je nach zugrunde liegender Noxe kann die Entzündung formal-pathogenetisch eingeteilt werden und einer kausalen Therapie zugänglich gemacht werden. Unter den auslösenden ätiologischen Faktoren unterscheidet man physikalische (z.B. mechanischer Reiz, Wärme, Strahlung), chemische (z.B. Säure, Laugen) oder biologische (z.B. Bakterien, Viren, Pilze) Faktoren. Ziel ist es, den schädigenden Reiz unter Beteiligung des Immunsystems zu beseitigen, dessen Ausbreitung zu unterbinden und ggf. eingetretene Schäden zu reparieren.

Bereits der römische Schriftsteller Celsus hatte ca. 30 v. Chr. die bis heute gültigen Kardinalsymptome der Entzündung erkannt und sie als *Tumor* (Schwellung), *Calor* (Wärme), *Rubor* (Rötung) und *Dolor* (Schmerz) beschrieben. Diese vier Kardinalsymptome wurden dann im 19. Jahrhundert durch Rudolf Virchow durch ein weiteres klinisches Symptom ergänzt, nämlich der *Funktio laesa* (Funktionsstörung). Hervorgerufen werden diese Symptome vor allem durch eine Veränderung der Mikrozirkulation, die sich in Form von Vasodilatation der Arteriolen, Kapillaren und Venolen äußert. Dies hat zur Folge, dass sich die Gefäßpermeabilität erhöht und

vermehrt Plasmaproteine durch zunächst Transsudation und später Exsudation ins umliegende Gewebe gelangen. Die Vasodilatation bewirkt eine Verlangsamung des Blutstroms. Dadurch können Leukozyten leichter an den Rand des Blutstroms gelangen (*Margination*), aufgrund der Expression vermehrter Adhäsionsmoleküle am Endothel anhaften (*Adhäsion*) und in das umliegende Gewebe auswandern (*Transmigration*). Schwellung, Wärme und Rötung kann als direkte Folge der vaskulären Veränderungen verstanden werden, wohingegen der Schmerz als indirekte Folge u.a. von erhöhtem Gewebedruck entsteht. Außerdem sind verschiedene Entzündungsmediatoren direkt in der Lage sensible Nervenendigungen zu beeinflussen. Eine Funktionseinschränkung bei Entzündung wird neben der Schwellung und dem Schmerz häufig von einer direkt schädigenden Wirkung durch die Noxe verursacht.

Je nach zeitlichem Verlauf kann man zwischen akuter und chronischer Entzündung unterscheiden. Bei den akuten Entzündungsformen steht die Alteration der Mikrozirkulation im Vordergrund mit der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, die in der ersten Phase vor allem von Endothelzellen und dem sie umgebendem Gewebe gebildet werden. Im weiteren Verlauf werden diese Botenstoffe fast ausschließlich von eingewanderten Leukozyten, vorwiegend Neutrophilen und Makrophagen, produziert, mit dem Zweck die Noxe zu eliminieren und die Entzündung zum Ausheilen zu bringen.

Gelingt es nicht den entzündungsstimulierenden Reiz auszuschalten, so kann es zur Chronifizierung kommen. Dabei stehen vor allem proliferative Umbauvorgänge mit Gefäßeinsprossung und bindegewebiger Demarkierung im Vordergrund. Da bei der Etablierung eines Entzündungsmodells an der isoliert perfundierten humanen Plazenta diese Art der Entzündung wegen der begrenzten Überlebensdauer des Organs keine Rolle spielt, wird im Folgenden darauf nicht näher eingegangen.

2. Ziel und Fragestellung

Für diese Arbeit ergeben sich folgende Ziele und Fragestellungen:

- 1) Etablierung eines Entzündungsmodells an einem ex-vivo Perfusionsmodell an der humanen Plazenta.
- 2) Immunhistochemische Charakterisierung des fetalen Endothels nach Perfusion.
- 3) Lassen sich intravitalmikroskopische Untersuchungen an der ex-vivo perfundierten humanen Plazenta durchführen?

3. Material und Methoden

3.1. Plazenten

Nach Unterzeichnung einer schriftlichen Einverständniserklärung durch die Mütter erhielten wir 18 Plazenten aus der gynäkologischen Abteilung des Klinikums Großhadern. Diese Plazenten stammten von term-eutrophen, unkomplizierten Schwangerschaften nach geplanten Kaiserschnittentbindungen. Dabei sollte die Schwangerschaftsdauer zwischen 36 und 41 Wochen betragen haben, und das Geburtsgewicht des Kindes zwischen 2,5 und 4,5 kg liegen. Für das Ziel möglichst unbeeinflusste Versuchsergebnisse zu erhalten, wurden folgende Ausschlusskriterien formuliert:

- bekannte Vorerkrankungen der Mutter, wie z.B. Hypertonie, Erkrankung des Blutgerinnungssystems, Diabetes mellitus, Vaskulitis, HIV, Hepatitis, andere chronische Infektionskrankheiten
- neu aufgetretene Erkrankungen während der Schwangerschaft, wie z. B. Gestationshypertonie, Diabetes mellitus, Chorioamnitis (mütterliches Fieber > 38 °C, fetale Tachykardie, Uterusverhärtung)
- bekannter Substanzenabusus der Mutter, wie Alkohol, Nikotin oder illegale Drogen
- klinische Zeichen der Plazentainsuffizienz, wie z.B. Polyhydramnion, Oligohydramnion, pathologisches CTG
- makroskopisch erkennbare Defekte der Plazenta in Form von Haemorrhagien, Infarkten, Verlust der Integrität

Direkt nach der Geburt erfolgte dann eine grobe orientierende Inspektion der Plazenten und anschließend der Transport in 4°C kalter Ringer-Lactat-Infusionslösung¹ in das Labor. Dort wurden alle weiteren Präparationen vorgenommen.

3.2. Präparation der Plazenten

Nach einer weiteren eingehenden Inspektion der Plazenten im Labor auf Unversehrtheit, wurde ein passender Kotyledon mit wenigen Gefäßanastomosen ausgewählt, und die versorgende fetale Arterie mit einem 18G-Katheter² und die zugehörige Vene mit einem 16G-Katheter³ kanüliert. Das sich anschließende Freispülen des Kotyledons von fetalem Blut mit 4°C kalter heparinierter Natrium-Chlorid-Lösung erfolgte innerhalb der ersten 20 Minuten nach Abnabelung des Neugeborenen von der Plazenta und war nach weiteren 20 Minuten leicht an der Aufhellung des perfundierten Areals mit guter Abgrenzbarkeit gegenüber dem livide verfärbten restlichen Gewebe erkennbar.

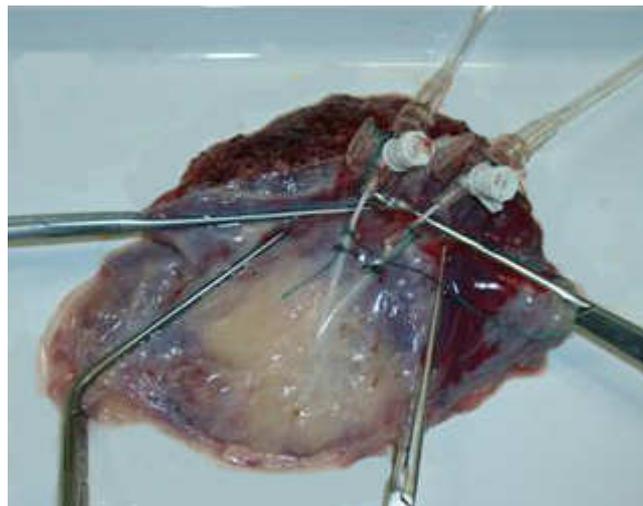


Abbildung 3: Von fetalem Blut freigespülter Kotyledon, erkennbar als helles Areal.

¹ Ringer-Lactat-Infusionslösung, B.Braun Melsungen AG; 34209 Melsungen; Deutschland

² BD Insite-W™, NY, USA

³ BD Insite-W™, NY, USA

3.3. Blutspender

Maximal 30 min vor Reperfusion der Plazenten wurde 200 ml Blut von freiwilligen Spendern abgenommen. Akzeptiert wurden sowohl weibliche als auch männliche Blutspender ohne bekannte chronische oder akute Infektionskrankheiten. Die Blutentnahme erfolgte mit Hilfe eines Butterfly-Katheters⁴. Das so gewonnene Vollblut wurde in zuvor mit Heparin⁵ durchgespülten 50ml Spritzen⁶ bis zur Reperfusion in einem Inkubator bei 37° C gelagert. Als Ausgangswerte wurden in dem nicht diluierten Vollblut die Zellzahlen sowie der Hämatokrit mittels eines CoulterCounter bestimmt.

3.4. Versuchsgruppen

Für die Perfusionsversuche bildeten wir zunächst zwei Gruppen. Die erste Gruppe (n=8) diente als Kontrolle und wurde mit verdünntem Humanblut, wie in 3.5. beschrieben, perfundiert. In der zweiten Gruppe (n=8) gaben wir nach zwei Minuten Perfusion Lipopolysaccharid⁷ (LPS) in einer Dosierung von 3 ng/ml dem Perfusionskreislauf zu. Diese beiden Versuchsgruppen dienten der Etablierung des Inflammationsmodells an der humanen Plazenta.

Zusätzlich wurden 2 weitere Plazenten nach dem Schema der Kontrollgruppe perfundiert, um intravitalmikroskopische Aufnahmen des fetalen Gefäßsystems zu machen.

⁴ ECOFLO®; Perfusionsbesteck, 19G, Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland

⁵ Heparin-Natrium Braun 25000 i.e. B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

⁶ Braun Injekt 50ml B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

⁷ LPS, Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

3.5. Vorbehandlung des Vollblutes

Zur Perfusion der Plazenta wurde der Hämatokrit des Vollblutes auf einen Wert von 30% ($\pm 2\%$) durch Zugabe von Krebs-Henseleit-Puffer⁸ verdünnt [63]. Dies diente der Herabsetzung der Blutviskosität und damit der Erleichterung der Perfusion bei ausreichender Oxygenierung des Gewebes [64].

Als praktische Anwendung des Modells und für weitergehende Darstellung der fetalen Mikrozirkulation führten wir an 2 zusätzlichen Plazenten intravitalmikroskopische Untersuchungen durch. Dazu wurden zur Kontrastierung der Gefäße folgende Farbstoffe 15 Minuten vor Reperfusion dem Blut zugegeben: Als Plasmamarker verwendeten wir Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-markiertes Dextran⁹ in der Konzentration von 9 $\mu\text{g/ml}$. Die Leukozyten wurden mit 0,6 $\mu\text{g/ml}$ des fluoreszierenden Markers Rhodamin-6G¹⁰ angefärbt.

Mittels des im nächsten Kapitel näher beschriebenen Perfusionssystems konnte das oxygenierte humane Blut bei konstanter Temperatur von 37°C durch das fetale Gefäßsystem der Plazenta zirkulieren.

3.6. Perfusionssystem

Zur ex-vivo-Perfusion wurde die Plazenta in einem selbstgefertigten beheizten Gefäß, gefüllt mit physiologischer 0,9%iger Natrium-Chlorid-Lösung, gelagert, um die Temperatur in dem Organ über den gesamten Zeitraum der Perfusion konstant bei 37°C halten zu können und das Gewebe vor Austrocknung zu schützen. Die

⁸ ICF-LMU; München, Deutschland

⁹ Fluoresceinisothiocyanate Isomer I, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

¹⁰ Rhodamin© Merck, Darmstadt, Deutschland

Plazenta war mit der fetalen Seite nach oben positioniert, um eine leichte Zugänglichkeit zum zu perfundierenden fetalen Kompartiment der Plazenta zu gewährleisten.

Das Perfusionssystem (Abbildung 3) [64] bestand aus einem speziell angefertigten abgedichteten Blutreservoir¹¹ aus Edelstahl mit einem Fassungsvermögen von 500ml. Das Perfusionsblut wurde mittels einer Rollerpumpe¹² vom Reservoir durch einen eigens entwickelten Oxygenator¹³ aus Aluminium mit einer Blutflußgeschwindigkeit zwischen 4 und 7 ml/min gepumpt. Sowohl das Reservoir als auch der Oxygenator standen in Verbindung mit einem externen Heizkreislauf bestehend aus einem verzweigten Schlauchsystem mit Anschluss an ein Wärmebad mit Pumpfunktion¹⁴, um die Bluttemperatur im Verlauf der Perfusion konstant auf 37°C zu halten [64]. Über kompensatorische Sauerstoffzufuhr über den Oxygenator konnte der Säure-Base-Haushalt in dem Perfusionsblut reguliert werden. Im Anschluss an den Oxygenator floss das Blut durch eine Blasenfalle¹⁵ und durch ein Dreiwege-Hahnssystem¹⁶. Über einen Hahn wurde mittels eines Druckwandlers¹⁷ kontinuierlich der Perfusionsdruck gemessen und auf einen Bildschirm übertragen. Über die beiden anderen Schleusen der Hahnbank konnten Blutproben aus dem arteriellen Schenkel des Systems entnommen werden. Nach Anschluss des arteriellen Schenkels des Perfusionssystems an die katheterisierte fetale Arterie zirkulierte das Blut durch den Kotyledon, drainierte über den Katheter in der fetalen Vene in den venösen Schenkel des Perfusionssystems und wurde dem Blutreservoir

¹¹ ICF-LMU, München, Deutschland

¹² IPS, Ismatec SA, Zürich, Schweiz

¹³ ICF-LMU, München, Deutschland

¹⁴ Thermostat 2761, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

¹⁵ Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

¹⁶ Discifix®, B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen, Deutschland

¹⁷ COMP DT-XX, Ohmeda, Murray-Hill, NJ, USA

wieder zugeführt. Blutentnahmen aus dem venösen Schenkel des Systems waren über einen eingeschalteten Dreiwegehahn¹⁸ möglich.

3.7. Intravitalmikroskopie

3.7.1. Technisches Setup

Zur Beurteilung der Mikrozirkulation sowie der Leukozyten-Endothel-Interaktion der Plazenta erfolgte direkt nach Beginn der Reperfusion die intravitalmikroskopische Untersuchung. Dazu wurde das unter 3.6. beschriebene Gefäß mit Plazenta auf einem Mikroskopiertisch unter einem Intravitalmikroskop installiert, so dass oberflächliche fetale Gefäße des perfundierten Kotyledons fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zugänglich waren.

Die intravitalmikroskopischen Analysen wurden in Epiilluminationstechnik an einem Mikroskop¹⁹ modifiziert mit einer Ploemo-Pak Lichtquelle²⁰ und einer 100 Watt HBO Quecksilberlampe²¹ unter Zwischenschaltung von I_{2/3} (450-490 nm) und N₂ (530-560 nm) Filterblöcken²² durchgeführt. Über ein 25x Wasserimmersionsobjektiv ließen sich Vergrößerungen um das 450fache erzielen.

Die mit dem Intravitalmikroskop generierten Bilder wurden mittels einer charge-coupled device (CCD)- Videokamera²³ auf einen Bildschirm²⁴ übertragen und für die spätere Auswertung von einem SVHS Videorecorder²⁵ aufgezeichnet. Zur zeitlichen Dokumentation der Videosequenzen, war zwischen Kamera und Videorecorder eine Zeitlaufuhr²⁶ geschaltet.

¹⁸ Discifix®, B.Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen, Deutschland

¹⁹ Orthoplan®, Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland

²⁰ Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland

²¹ OSRAM GmbH, München, Deutschland

²² Fa. Leitz, München, Deutschland

²³ FK 6990 IQ-S, Pieper GmbH, Mellingen, Schweiz

²⁴ Trinitron PVMA 2043, Sony, München, Deutschland

²⁵ AG-7350, Panasonic, München, Deutschland

²⁶ VTG-33, FOR A Company, Japan

Wie unter 3.5. beschrieben färbten wir zur Darstellung der plazentaren Mikrozirkulation das Plasma im Perfusionsblut mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-markiertem Dextran und die darin enthaltenen Leukozyten mit Rhodamin-6G.

Der Aufbau des Perfusionssystems mit der intravitalmikroskopischen Aufnahmeeinheit ist schematisch in der Abbildung 3 dargestellt.

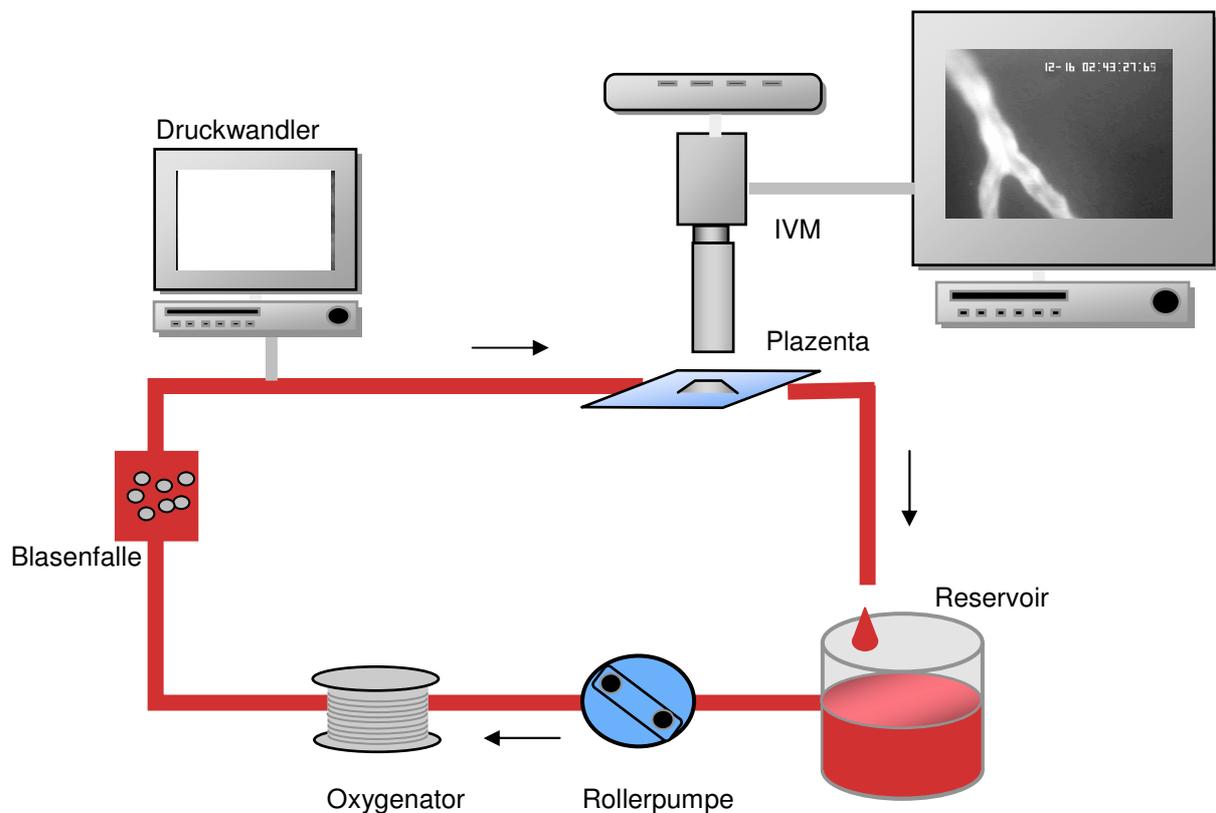


Abbildung 4: Perfusionssystem modifiziert nach Thein et al.

3.8. Messparameter

Während der Perfusion des plazentaren Gewebes konnten sowohl aus dem arteriellen, als auch aus dem venösen Schenkel des Perfusionssystems Blutproben gewonnen werden. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, und 240

Minuten nach Beginn der Reperfusion wurde zur Bestimmung folgender Parameter arterielles Blut dem System entnommen und mit einem elektronischen Zellzählgerät²⁷ gemessen:

- Erythrozyten (RBC): in $\times 10^6 / \mu\text{l}$
- Leukozyten (WBC): in $\times 10^3 / \mu\text{L}$
- Thrombozyten (Plat): in $\times 10^3 / \mu\text{L}$
- Hämatokrit (Hct): in %
- Hämoglobin (Hb): in g/dL

Folgende Parameter wurden sowohl im arteriellen, als auch im venösen Schenkel des Perfusionssystems zu oben genannten Zeitpunkten mittels Blutgasanalysator²⁸ erhoben:

- pH
- $p\text{O}_2$: in mmHg
- $p\text{CO}_2$: in mmHg
- Sauerstoffsättigung: in %

Aus diesen Werten lässt sich die arterio-venöse Sauerstoff-Differenz (AVDO_2) als Parameter für die Vitalität des perfundierten Gewebes mit folgender Formel berechnen:

- $(1,34 \times \text{Hb} \times \text{S}_a\text{O}_2 + 0,0031 \times p_a\text{O}_2) - (1,34 \times \text{Hb} \times \text{S}_v\text{O}_2 + 0,0031 \times p_v\text{O}_2)$

²⁷ Coulter Counter, Fa. Coulter Electronics, Krefeld, Deutschland

²⁸ Gasanalyser 348, Chiron Diagnostics, Fernwald, Deutschland

Hb: Hämoglobin in g/dL

S_aO₂: arterielle Sauerstoffsättigung in %

S_vO₂: venöse Sauerstoffsättigung

p_aO₂: Sauerstoffpartialdruck arteriell in mmHg

p_vO₂: Sauerstoffpartialdruck venös in mmHg

Darüber hinaus wurde während des gesamten Beobachtungszeitraums der Perfusionsdruck über den in den Kreislauf eingeschalteten Druckwandler aufgezeichnet sowie die Flussrate zu Beginn und am Ende der Perfusion bestimmt.

3.9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zu den Zeitpunkten 0, 15, 60, 120 und 240 Minuten entnahmen wir mit Hilfe von Eppendorf-Cups ca. 2 mL Vollblut aus dem venösen Schenkel des Systems und zentrifugierten es für 5 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute in einer Zentrifuge²⁹. Die so erhaltenen humanen Seren wurden bis zur Messung bei -75 °C eingefroren. Nach Auftauen der Seren bei Raumtemperatur bestimmten wir quantitativ die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α mittels kommerzieller ELISA-Kits der Firma Bender MedSystems.

Bei einem ELISA handelt es sich um einen sogenannten heterogenen Enzym-Immunoassay, bei dem die gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten Antikörper an eine Trägersubstanz gebunden vorliegen. An die nach Inkubation mit der Probe gebildeten Immunkomplexe lagern sich in einem nachfolgenden Schritt zugegebene enzymmarkierte Anti-Antikörper an. Dies wird als „Sandwichmethode“ bezeichnet. Durch Zugabe eines chromogenen Substrats zum Reaktionsansatz können die Immunkomplex-gebundenen Enzym-Substrat-Komplexe sichtbar

²⁹ Centrifuge 5415 C, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

gemacht werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, die Antigenkonzentration in der Probe über eine photometrische Bestimmung der Immunkomplexgebundenen Markerenzyme durch Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivität zu ermitteln.

3.9.1. IL-1 β

Zur quantitativen Bestimmung von IL-1 β verwendeten wir einen humanen IL-1 β -ELISA³⁰. Auf eine mit anti-IL-1 β beschichtete Mikrotiterplatte wurden jeweils Standards, Kontrollen und Proben aufgetragen und anschließend der biotinkonjugierte sekundäre Antikörper gegen IL-1 β zugegeben. Während der ersten Inkubation bindet das spezifische Antigen (IL-1 β) sowohl an den immobilisierten Antikörper auf der Platte, als auch an den biotinylierten in der Lösung. Nach Entfernen des überschüssigen sekundären Antikörpers in einem Waschvorgang wurde das Enzym Streptavidin-HRP zur Bindung an den biotinkonjugierten Antikörper zugegeben. Nach der zweiten Inkubation bei Raumtemperatur wurde in einem weiteren Waschschritt überschüssiges Streptavidin-HRP entfernt und die Substratlösung für den enzymgekoppelten Antikörper hinzugegeben. Durch die stattgefundenen Enzymreaktion wechselte die Farbe von blau zu gelb in Abhängigkeit von der in der Probe vorhandenen Menge an IL-1 β . Die Farbintensität ist direkt proportional zu der in der Probe vorhandenen Zytokinkonzentration. Die enzymatische Reaktion wurde mit Zugabe einer Stopp-Lösung beendet und die Absorption konnte innerhalb von zwei Stunden bei 450 nm mit einem ELISA-Reader³¹ gemessen werden. Anschließend konnten die Konzentrationen für IL-1 β in den Proben über eine Standardkurve berechnet werden.

³⁰ Human IL-1 β BMS224/2, Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich

³¹ Easy Reader EAR 400 AT, SLT Tecan, Crailsheim, Deutschland

3.9.2. IL-6

Für die Bestimmung von IL-6 kam ein humaner IL-6-ELISA³² zum Einsatz. Die Durchführung und Auswertung erfolgte analog dem unter 3.7.1 für IL-1 β beschriebenen Vorgehen, allerdings wurden sowohl ein monoklonaler primärer, als auch ein monoklonaler sekundärer Antikörper gegen IL-6 verwendet.

3.9.3. TNF- α

In gleicher Weise (siehe 3.7.1.) bestimmten wir mit einem humanen TNF- α -ELISA³³ die Konzentrationen für TNF- α . Dabei war die Mikrotiterplatte mit einem polyklonalen Antikörper für TNF- α beschichtet. Bei dem eingesetzten biotinylierten sekundären Antikörper handelte es sich um einen monoklonalen Antikörper.

3.10. Durchflusszytometrie

Zu den Zeitpunkten 0, 15, 60, 120 und 240 Minuten wurden aus dem System Blutproben entnommen und mit einem FACSCalibur[®]-Durchflußzytometer³⁴ analysiert. Dieses Gerät ist mit einem Argon-Ionenlaser (488 nm) ausgestattet und ermöglicht die Analyse von bis zu drei Fluoreszenzspektren. Über einen angeschlossenen Computer³⁵ wurden die erhobenen Daten verarbeitet und gespeichert. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit einer speziellen Software³⁶.

3.10.1. Prinzip der Durchflusszytometrie und verwendete Antikörper

Als optisches Meßsystem kann ein Durchflusszytometer Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Partikel analysieren. Die gewonnenen Daten basieren

³² Human IL-6 BMS213/2CE, Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich

³³ Human TNF- α BMS223/3CE, Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich

³⁴ FACSCalibur[®], Becton Dickinson, San Jose, CA, USA

³⁵ Power-Mac, Apple Inc., Cupertino, CA, USA

³⁶ Cell Quest, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA

auf einer gleichzeitigen Messung mehrerer physikalischer und biochemischer Eigenschaften jeweils einer einzelnen Zelle. Voraussetzung für die Messung mit einem Durchflusszytometer ist das Vorliegen der Probe als Einzelzellsuspension. Zur Analyse passieren die Zellen, umgeben von einem Hüllstrom, den Analysepunkt. Durch den Hüllstrom wird der Probenstrom so verengt, dass die Zellen einzeln, hintereinander zum Messpunkt gelangen und eine Beschleunigung erfahren. Dieser Prozess wird auch als „hydrodynamische Fokussierung“ bezeichnet. Nach Auftreffen des Laserstrahls auf eine Zelle kommt es durch bestimmte Zelleigenschaften wie Querschnittsfläche, Membranstruktur, Refraktionsindex und intrazelluläre Bestandteile zur Streuung des Lichtes. Am größten ist die Streuung im Kleinwinkelbereich von 0-10°. Dieses Vorwärtsstreulicht oder FSC (engl. forward scatter) korreliert mit dem Querschnitt der Zelle und lässt Rückschlüsse auf deren Größe zu. Der kleinere Teil wird im rechten Winkel zum einfallenden Strahl gestreut und wird als Seitwärtsstreulicht oder SSC (engl. sideward scatter) bezeichnet. Die Intensität dieses Lichtes entspricht dem Refraktionsindex und gibt Informationen über Granularität, Membranfaltung und äußere Form der Zelle. Über diese Streulichtparameter lassen sich die Leukozytengruppen, wie neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten voneinander unterscheiden und eine Darstellung der Thrombozytenpopulation ist möglich.

Darüber hinaus ist es möglich bestimmte Epitope auf den Zellen durch Antikörper, die mit Fluorochromen konjugiert sind, nachzuweisen. Dabei werden die Fluorochrome durch Laserlicht angeregt, d.h. ihre Elektronen werden auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Rücksprung der Elektronen zum Grundniveau emittieren sie Lichtenergie, die als Fluoreszenz sichtbar wird. Aufgrund des Energieverlustes beim Strahlenübergang ist das emittierte Licht energieärmer und damit langwelliger als das Anregungslicht. Die Fluorochrome müssen so gewählt

werden, dass sie im Exzitationsbereich des Lasers (488 nm) liegen. Bei Verwendung mehrerer Fluorochrome ist zu beachten, dass sich die Emissionsspektren voneinander unterscheiden. Als fluoreszierende Verbindungen verwendeten wir in dieser Studie FITC (Fluorescein-Iso-Thiocyanat) und PI (Propidiumjodid). Im Unterschied zum grün fluoreszierenden FITC emittiert PI eine Rot-Fluoreszenz. Konjugiert waren diese Fluorochrome mit monoklonalen Antikörpern gegen CD11a³⁷, CD11b³⁸ und CD62L³⁹ zum Nachweis dieser Moleküle auf neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten als Marker des Grades der Aktivierung. Zum Nachweis des Aktivierungsgrades der Thrombozyten setzten wir monoklonale Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle CD41⁴⁰ und CD62P⁴¹ auf Thrombozyten ein. Zusätzlich wurden die Thrombozyten mit Phorbolmyristataacetat (PMA) stimuliert, um eine Aussage über die Expressionsrate der besagten Adhäsionsmoleküle unter maximalen Stimulationsbedingungen zu erhalten. Dadurch können gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Voraktivierung der Thrombozyten gezogen werden. PMA greift ohne Beteiligung von Rezeptoren in die Enzymkaskade ein, die an der Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten beteiligt ist und führt dadurch zur Aktivierung der Thrombozyten.

Die optischen Signale werden über spezielle Detektoren (sog. Photomultiplier) in elektrische Impulse umgewandelt und verstärkt. Zur Auswertung werden die Daten an den Computer übertragen und anschließend auf einem Speichermedium abgelegt.

³⁷ Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

³⁸ Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

³⁹ Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

⁴⁰ Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

⁴¹ Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

3.11. Gewebeproben

Am Ende eines jeden Experiments wurden sowohl aus dem perfundierten Kotyledon, als auch aus einem nicht perfundierten Bereich der Plazenta ca. 2x2 cm große Gewebeproben entnommen, in 4% Formalin⁴² für 24 bis 48 Stunden fixiert, danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet.

Für die histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden aus den Gewebelöcken mit einem Mikrotom⁴³ ca. 6 µm dicke Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgezogen, anschließend entparaffiniert und rehydriert. Die Kontrollbiopsien aus nicht perfundiertem Gewebe dienen der Charakterisierung der placentaren Endothels (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.11.1. Konventionelle Färbungen

Zur lichtmikroskopischen Bestimmung der Morphologie des placentaren Gewebes wurden die Gewebeschnitte mit zwei in Histologie und Pathologie weit verbreiteten Techniken angefärbt. Durch diese Färbetechniken werden die Zell- und Gewebestandteile erkennbar und können so voneinander unterschieden werden.

3.11.1.1 Hämatoxilin/Eosin (H/E)

Die HE-Färbung ist die am weitesten verbreitete Routinefärbemethode zur Untersuchung der Morphologie von Gewebe. Sie bietet eine orientierende Übersicht und ermöglicht, einzelne zelluläre Strukturen voneinander zu unterscheiden. Hierbei werden alle basophilen Zell- und Gewebestrukturen (z. B. Chromatin der Zellkerne, manche Zytoplasmabestandteile) durch Hämatoxilin blau angefärbt. Alle azidophilen

⁴² Apotheke Klinikum Großhadern-LMU, München, Deutschland

⁴³ Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Bestandteile (z. B. Zytoplasma, viele Interzellulärsubstanzen) werden durch Eosin rot gefärbt.

Die auf dem Objektträger befindlichen Schnitte wurden für vier Minuten in Hämatoxylin-Lösung⁴⁴ eingelegt. Nach Waschen mit PBS, erfolgte die Überfärbung mit Eosin⁴⁵ (1% in Aqua dest.) für ein bis zwei Minuten. Anschließend wurden überschüssiges Eosin mit 70%igem Ethanol⁴⁶ heruntergespült und die gefärbten Schnitte eingedeckt.

3.11.1.2. Trichrom-Färbung nach Masson

Die Trichrom-Färbung nach Masson ist eine Standardfärbung zur Beurteilung der Extrazellulärmatrix und ermöglicht in erster Linie die Differenzierung von Kollagenfasern und Epithelgewebe. Bei dieser Färbung stellen sich die Zellkerne schwarz und das Zytoplasma rot dar, wobei sich sowohl kollagene als auch retikuläre Fasern blau anfärben.

Nach Entparaffinisieren wurden die Schnitte zunächst für 30 Minuten in Eosin-Lösung getaucht, dann mit Aqua dest.⁴⁷ gespült, anschließend für 30 Minuten in Hämatoxylin-Lösung gebracht und wiederum mit Aqua dest. gespült. Die Differenzierung der Präparate erfolgte für 10 bis 30 Minuten in Alkohol, bevor sie für 5 Minuten mit Fuchsin⁴⁸ gefärbt wurden. Nach erneutem Waschen in Aqua dest. wurden die Schnitte letztendlich mit Deckgläsern eingedeckt.

⁴⁴ Apotheke Klinikum Großhadern-LMU, München, Deutschland

⁴⁵ Apotheke Klinikum Großhadern-LMU, München, Deutschland

⁴⁶ Apotheke Klinikum Großhadern-LMU, München, Deutschland

⁴⁷ Apotheke Klinikum Großhadern-LMU, München, Deutschland

⁴⁸ Apotheke Klinikum Großhadern-LMU, München, Deutschland

3.11.2. Immunhistochemie

3.11.2.1. Theorie der Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbemethoden ermöglichen es, antigene Strukturen (Epitope) von Zellen und Gewebsabschnitten durch spezifische Antikörper nachzuweisen und zu identifizieren.

Durch Überschichten des zu untersuchenden Gewebeabschnittes mit einem in Lösung befindlichen Antikörper, der gegen ein vorhandenes Protein im Schnitt gerichtet ist, kommt es zur Antigen-Antikörper-Reaktion. Der so entstandene Komplex lässt sich durch verschiedene Nachweismethoden sichtbar machen. Heutzutage kommen spezifische Antikörper zum Einsatz, die meist durch Isotope, partikuläres Material (z. B. Erythrozyten), Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme markiert sind und auf diese Weise dargestellt werden können. Als wesentliche Voraussetzung für die Wertigkeit der Färbemethoden gelten die Spezifität der verwendeten Antikörper für das zu markierende Antigen und die Stabilität der nachzuweisenden antigenen Struktur. Letztere ist einerseits von der chemischen Natur des Antigens, andererseits aber auch von der Vorbehandlung (Fixierung, Einbettmedium, Färbeprotokoll) des Schnittpräparates abhängig. Grundsätzlich werden polyklonale Antikörper von monoklonalen Antikörpern unterschieden. Präparationen polyklonaler Antikörper erkennen und binden an verschiedene Epitope auf dem Antigen gegen das sie gerichtet sind. Auf diese Weise wird sowohl die Sensitivität als auch die Reaktivität der Färbemethode erhöht. Als nachteilig beim Einsatz von polyklonalen Antikörpern hat sich erwiesen, dass es durch Kreuzreaktionen mit ähnlichen antigenen Determinanten häufiger zu falsch positiven Ergebnissen kommt. Präparationen monoklonaler Antikörper reagieren dagegen nur mit einem spezifischen Epitop des Antigens, gegen das sie gebildet wurden. Daraus ergibt sich eine sehr hohe Antigen-Spezifität der monoklonalen Antikörper. Die

Sensitivität kann allerdings durch Zerstörung oder strukturelle Veränderung antigener Determinanten, wie es im Rahmen der Präparation des Schnittes vorkommen kann (z. B. pH-Wert, Temperatur, Fixierung), herabgesetzt werden, so dass es häufiger zu falsch negativen Ergebnissen kommt.

3.11.2.2. Immunhistochemische Färbungen

Sämtliche immunhistochemischen Färbungen führten wir eigenständig am Institut für Pathologie der Universitätsklinik von Santiago de Compostela, Spanien unter der Anleitung von Professor Jerónimo Forteza Vila und Professor Tomás García, sowie in Kooperation mit dem Institut für Morphologie und Histologie der Universität von Santiago de Compostela, Spanien unter der Anleitung von Professor Andres Beiras Iglesias in den dortigen Laboratorien während eines mehrwöchigen Aufenthaltes durch.

Alle Serienschnitte für die immunhistochemischen Färbungen wurden zunächst in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe hydriert.

3.11.2.2.1. Automatisierte Färbemethoden

Bei den im folgenden Abschnitt beschriebenen eingesetzten Antikörpern wurden die Färbungen automatisiert mit dem Immunfärbeautomaten Autostainer plus⁴⁹ der Firma Dako durchgeführt. Der Färbeautomat hat eine Gesamt-Objektträgerkapazität von 1-48 Glasobjektträger und Stellplätze für 64 verschiedene Reagenzien. Das System kann mit allen gängigen kommerziellen Reagenzien betrieben werden. Zur Färbung wurden die Reagenzien automatisch auf die horizontal angeordneten Objektträger aufpipettiert und anschließend gewebeschonend wieder abgeblasen.

⁴⁹ DakoCytomatation GmbH, 22083 Hamburg, Deutschland

Da für die meisten verwendeten Antikörper keine Färbeprotokolle für die Anwendung an histologischen Schnitten der humanen Plazenta in der Literatur beschrieben waren, war es notwendig in Vorversuchen sowohl die Vorbehandlung der Schnitte zur Demaskierung der entsprechenden Antigene als auch die genaue Konzentration der Antikörper in verschiedenen Verdünnungsstufen auszutesten. Die folgende Tabelle 1 stellt eine Übersicht über die angewendeten Antikörper in entsprechender Verdünnung, deren Spezifität und Ursprungsspezies sowie die Vorbehandlung der Schnitte dar:

Art	Firma	Spezifität	Ursprung	Verdünnung	Vorbehandlung
VE-Cadherin	Sta.Cruz	monoklonal	Maus	1:50	Wasserbad
E-Selectin	Sta. Cruz	monoklonal	Maus	1:50	Wasserbad
CD3	Sta. Cruz	monoklonal	Maus	1:50	Wasserbad
ICAM-1	Sta. Cruz	monoklonal	Maus	1:50	Wasserbad
PECAM-1/CD31	Dako	monoklonal	Maus	1:25	Mikrowelle
vWF	Dako	monoklonal	Maus	1:50	Mikrowelle
L-Selectin	Dako	monoklonal	Maus	1:10	Schnellkochtopf
P-Selectin	Dako	monoklonal	Maus	1:25	Schnellkochtopf
VCAM-1	Dako	monoklonal	Maus	1:25	Mikrowelle
Thrombomodulin	Dako	monoklonal	Maus	1:40	-
TNF- α	R&D	monoklonal	Maus	1:25	Mikrowelle
IL-1	R&D	monoklonal	Ziege	1:50	Wasserbad
IL-6	R&D	monoklonal	Ziege	1:50	Wasserbad

Tabelle 1: Immunhistochemisch eingesetzte Antikörper

3.11.2.2.2. Manuelle Färbemethoden

Folgende immunhistochemischen Färbungen führten wir entsprechend den Angaben der Hersteller zur Verwendung durch:

Zum Nachweis von IL-1 im perfundierten Gewebe verwendeten wir einen anti-humanen, monoklonalen Antikörper⁵⁰. IL-1 wird als proinflammatorisches Zytokin u. a. von Endothelzellen und Lymphozyten gebildet und verstärkt eine Entzündungsreaktion durch Hochregulation von Expressionsmolekülen und durch Aktivierung von Neutrophilen.

Die Färbung führten wir an 4-7 µm dicken, luftgetrockneten Paraffinschnitten durch, die für 10 Minuten in Azeton⁵¹ fixiert wurden. Nach 10 minütiger Inkubation mit Humanserum in PBS⁵² wurden die Schnitte über Nacht mit 100 µl des Primärantikörpers bei 4 °C überschichtet.

3.12. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des Software Pakets Sigma Stat^{TM53}. Zunächst wurden die Werte auf ihre Verteilung hin überprüft. Aufgrund des Vorhandenseins von nicht-normalverteilten Daten erfolgte die graphische Darstellung der Ergebnisse als Median ± Standardabweichung (SD).

Konnte die Normalverteilung nicht ausgeschlossen werden, so erfolgte der Vergleich zwischen zwei Gruppen mittels Student's t-Test. Bei Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine Varianzanalyse (One Way Analysis of Variance (ANOVA)) durchgeführt. Zeigten sich hierbei signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen,

⁵⁰ R&D Systems, Waldorf, Deutschland

⁵¹ Apotheke Klinikum Großhadern-LMU, München, Deutschland

⁵² Apotheke Klinikum Großhadern-LMU, München, Deutschland

⁵³ Jandel GmbH, Erkrath, Deutschland

wurde der Holm-Sidak-Test als multipler post-hoc Vergleichstest durchgeführt, um festzustellen zwischen welchen Gruppen die Unterschiede bestehen.

Konnte eine Normalverteilung der Werte ausgeschlossen werden, so erfolgte eine Kruskal-Wallis-Analyse mit darauf folgendem Dunn's post-hoc Test zum Vergleich der einzelnen Gruppen. Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Hämatologische Parameter

Von den folgenden Parametern wurde für jeden Messzeitpunkt der vierstündigen Perfusion der Median sowie die Standardabweichung des Medians bestimmt: Hämatokrit, Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Außerdem bestimmten wir dieselben Parameter als Ausgangswerte in dem frisch abgenommenen und unverdünnten Vollblut. Bei der statistischen Analyse fanden diese Werte keine Beachtung. Der Zeitpunkt 0 Minuten nach Verdünnung des Blutes auf einen Hämatokrit von ca. 30% diente als Kontrollzeitpunkt im Vergleich zu den anderen Messzeitpunkten während der Perfusion, um statistische Unterschiede innerhalb der Gruppen zu erfassen.

4.1.1. Hämatokrit

Während des gesamten Zeitraums der Perfusion traten keine signifikanten Unterschiede der gemessenen Hämatokritwerte innerhalb der mit LPS behandelten Gruppe auf, während es in der Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg des Hämatokrits zu den Zeitpunkten 120 Minuten, 180 Minuten und 240 Minuten im Vergleich zum Kontrollmesszeitpunkt 0 Minuten kam (Abbildung 3). Der Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte der LPS-Gruppe mit denen der Kontrollgruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede. Als Ausgangswerte im frisch abgenommenen Vollblut bestimmten wir in der Kontrollgruppe einen Hämatokrit von $44,8\% \pm 1,7$ und in der LPS-Gruppe einen Hämatokrit von $45,3\% \pm 2,1$ (Daten in der Grafik nicht dargestellt). Nach Verdünnung des Vollblutes ergab sich in der Kontrollgruppe ein Median von $28,65\% \pm 2,15$ und in der LPS-Gruppe ein Median von $31,65\% \pm 1,8$.

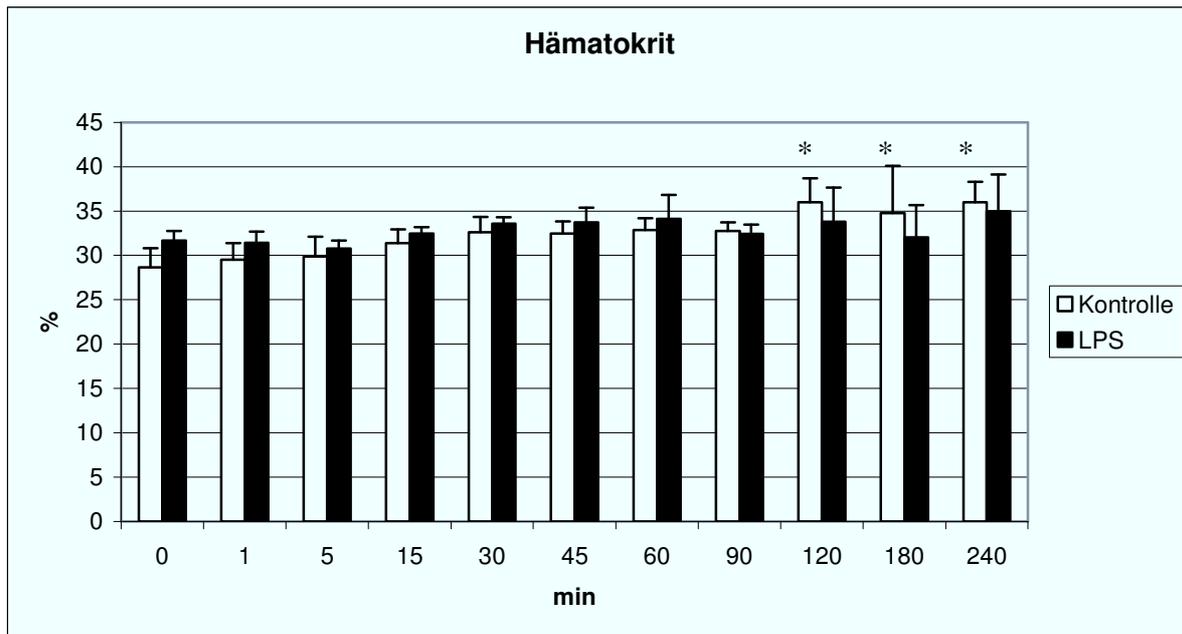


Abbildung 5: Hämatokrit in % im Verlauf der Perfusion dargestellt als Median \pm Standardabweichung
 *: $p < 0,05$ Anstieg innerhalb der Kontrollgruppe vs. Zeitpunkt 0

4.1.2. Thrombozyten

Die Thrombozytenzahl im verdünnten Blut zum Zeitpunkt Null betrug in der Kontrollgruppe $138 \cdot 10^3/\mu\text{l} \pm 19$ und in der LPS-Gruppe $122 \cdot 10^3/\mu\text{l} \pm 12$. Während in der Kontrollgruppe ein Absinken der Thrombozytenzahl nach 30 Minuten auf $98 \cdot 10^3/\mu\text{l} \pm 12$ mit statistischer Signifikanz im Vergleich zum Ausgangswert zu beobachten war, zeigte sich die Thrombozytenzahl der LPS-Gruppe nur tendenziell abnehmend mit einem Wert von $106,5 \cdot 10^3/\mu\text{l} \pm 14,5$ zum selben Messzeitpunkt ohne statistische Signifikanz im Vergleich zum Ausgangswert. Im weiteren Verlauf zeigten sich die Thrombozytenzahlen in der Kontrollgruppe stabil. Nach 240 Minuten Perfusionszeit konnte die Thrombozytenzahl mit $103 \cdot 10^3/\mu\text{l} \pm 21$ ermittelt werden. Ab dem Zeitpunkt 30 Minuten zeigten sich signifikant niedrigere Thrombozytenzahlen innerhalb der Kontrollgruppe im Vergleich zum Ausgangswert zum Zeitpunkt Null.

In der LPS-Gruppe zeigte sich wieder ein nicht signifikanter Anstieg der Thrombozyten bis auf $121,5 \cdot 10^3/\mu\text{l} \pm 30$. Zum Ende der Perfusion bei 240 Minuten lag die Thrombozytenzahl dann bei $98 \cdot 10^3/\mu\text{l} \pm 20$. Verglichen mit dem Wert bei Zeitpunkt Null der LPS-Gruppe ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den anderen Meßzeitpunkten ermitteln.

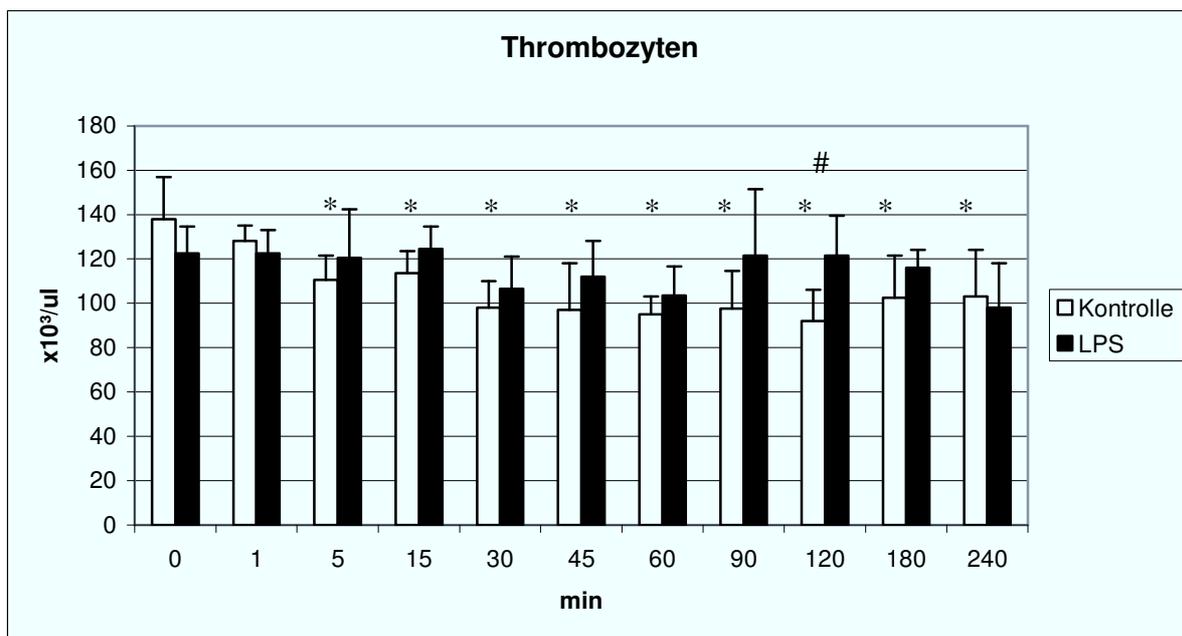


Abbildung 6: Thrombozyten in $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ im Verlauf der Perfusion dargestellt als Median \pm Standardabweichung.

*: $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe vs. Zeitpunkt 0
[zusätzlich Zeitpunkt 1 vs. 45, 60, 90, 120, 180, 240;
Zeitpunkt 5 & 15 vs. 120, nicht in Grafik dargestellt]

#: $p < 0,05$ Kontrolle vs. LPS

4.1.3. Leukozyten

Die Leukozytenzahl wurde zum Ausgangszeitpunkt Null in der Kontrollgruppe mit $2,91 \cdot 10^3/\mu\text{l} \pm 0,5$ und in der LPS-Gruppe mit $2,95 \cdot 10^3/\mu\text{l} \pm 0,3$ bestimmt. In den ersten 90 Minuten der Perfusion nahmen die Leukozytenzahlen auf $1,8 \cdot 10^3/\mu\text{l} \pm 0,35$ in der Kontrollgruppe und auf $1,8 \cdot 10^3/\mu\text{l} \pm 0,2$ in der LPS-Gruppe signifikant ab. Nach 240 Minuten Perfusion lag die Zahl der Leukozyten in der Kontrollgruppe bei $2 \cdot 10^3/\mu\text{l} \pm$

0,25. In der LPS-Gruppe konnten die Leukozytenzahl am Ende der Perfusion nach 240 Minuten mit $2,2 \cdot 10^3/\mu\text{l} \pm 0,4$ bestimmt werden. Im Vergleich der beiden Gruppen zu den unterschiedlichen Meßzeitpunkten zeigten sich signifikante Unterschiede zu den Zeitpunkten 30 und 45 Minuten.

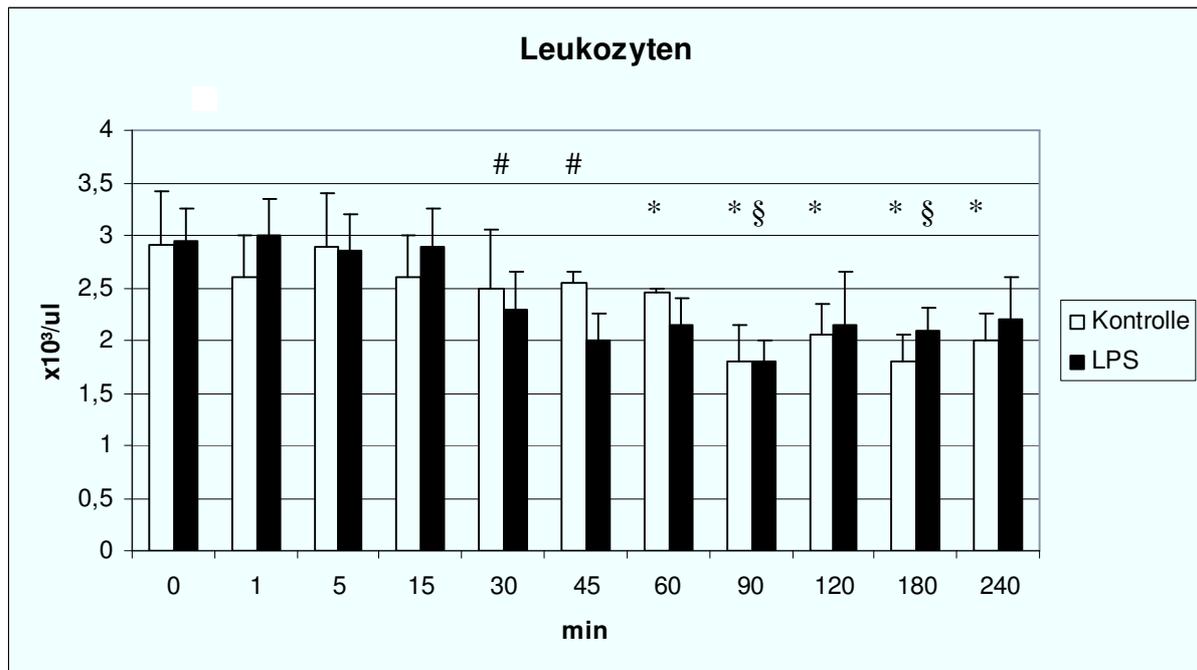


Abbildung 7: Leukozyten in $x10^3/\mu\text{l}$ im Verlauf der Perfusion dargestellt als Median \pm Standardabweichung.

*: $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe vs. Zeitpunkt 0

[zusätzlich Zeitpunkt 1 vs. 60, 90, 120, 180, 240; Zeitpunkt 5 vs. 60, 90, 120, 180, 240; Zeitpunkt 15 & 30 vs. 90, 180, in Grafik nicht dargestellt]

§: $p < 0,05$ innerhalb der LPS-Gruppe vs. Zeitpunkt 0

[zusätzlich Zeitpunkt 1 vs. 180, in Grafik nicht dargestellt]

#: $p < 0,05$ Kontrolle vs. LPS

4.2 Vitalparameter

Neben den oben beschriebenen hämatologischen Parametern bestimmten wir zur Beurteilung der Funktionalität sowohl die arterio-venöse Sauerstoffdifferenz (AVDO₂) als auch den Perfusionsdruck.

4.2.1 AVDO₂

Als Parameter der Vitalität des perfundierten Plazentagewebes berechneten wir zu den entsprechenden Meßzeitpunkten die arterio-venöse Sauerstoffdifferenz (AVDO₂). Diese lag als Ausgangswert zum Zeitpunkt Null bei 0,7 ml/dl ± 0,25 in der Kontrollgruppe und bei 1,05 ml/dl ± 0,8 in der LPS-Gruppe. Zunächst stieg in der Kontrollgruppe die AVDO₂ signifikant an. Zum Meßzeitpunkt nach 45 Minuten Perfusion lag die AVDO₂ bei 1,7 ml/dl ± 0,35 in der Kontrollgruppe und bei 1,7 ml/dl ± 1,4 in der LPS-Gruppe. Anschließend blieb die AVDO₂ in der Kontrollgruppe weitgehend stabil. Am Ende der Perfusion nach 240 Minuten wurde sie mit 1,3 ml/dl ± 0,3 errechnet.

In der LPS-Gruppe zeigte sich die AVDO₂ schwankender und insgesamt etwas niedriger als in der Kontrollgruppe. Nach 240 Minuten erreichte sie mit 0,8 ml/dl ± 0,4 den niedrigsten Wert.

Insgesamt lässt sich allerdings zu jedem Zeitpunkt in beiden Gruppen eine arterio-venöse Sauerstoffdifferenz nachweisen, wodurch die Vitalität des perfundierten Plazentagewebes über den gesamten Zeitraum der Perfusion von 240 Minuten nachgewiesen wird.

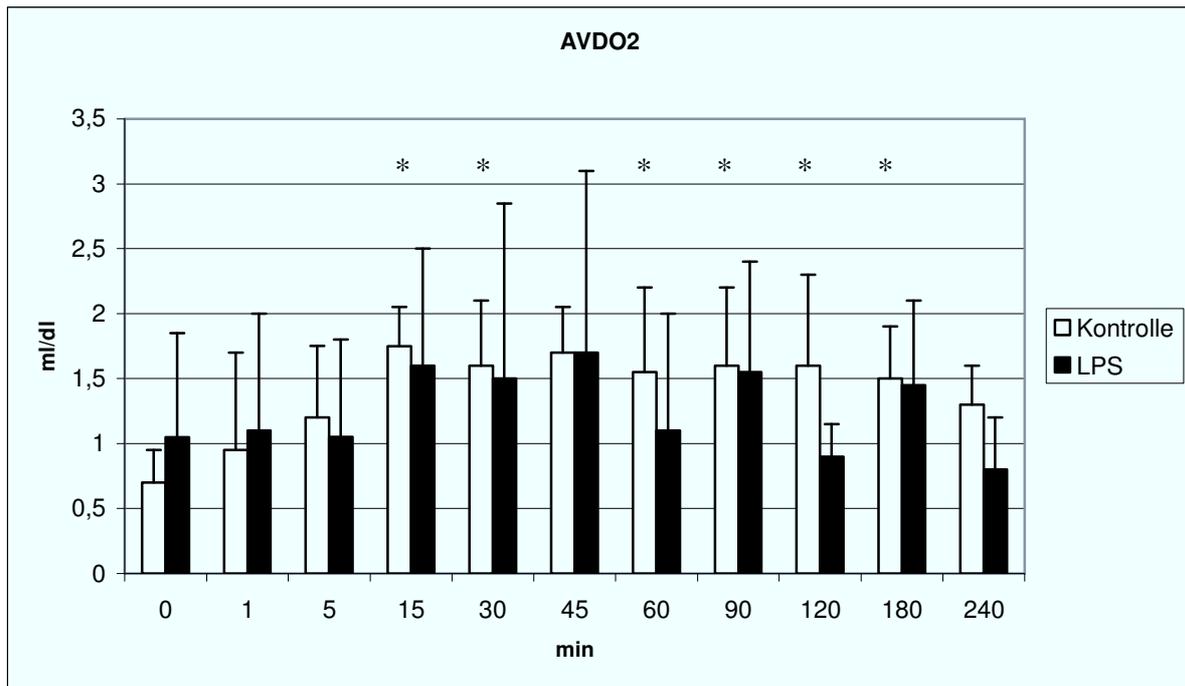


Abbildung 8: AVDO₂ in ml/dl im Verlauf der Perfusion dargestellt als Median \pm Standardabweichung.
 *: $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe vs. Zeitpunkt 0
 [zusätzlich Zeitpunkt 1 vs. 15, 90; Zeitpunkt 5 vs. 30, in Grafik nicht dargestellt]

4.2.2 Perfusionsdruck

Während der Perfusion wurde der Perfusionsdruck kontinuierlich aufgezeichnet und an den festgelegten Meßzeitpunkten abgelesen.

In der Kontrollgruppe blieb der Druck über den gesamten Zeitraum stabil. Die Perfusionsdrücke lagen zwischen 25,5 mmHg \pm 5 zum Zeitpunkt 45 Minuten und 30 mmHg \pm 7 zum Zeitpunkt 180 Minuten. Dies entspricht weitgehend Daten aus der Literatur zu Perfusionsversuchen an der humanen Plazenta [65] [66].

Im Gegensatz dazu war in der LPS-Gruppe ein signifikanter kontinuierlicher Anstieg der Perfusionsdrücke festzustellen. Ausgehend von einem initialen Druck von 44 mmHg \pm 11 zum Zeitpunkt Null steigerten sich die Drücke bis auf einen Wert von 89 mmHg \pm 11 zum Endzeitpunkt nach 240 Minuten Perfusion.

Ab dem Zeitpunkt 30 Minuten zeigte sich bei den höheren Perfusionsdrücken der LPS-Gruppe im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe statistische Signifikanz.

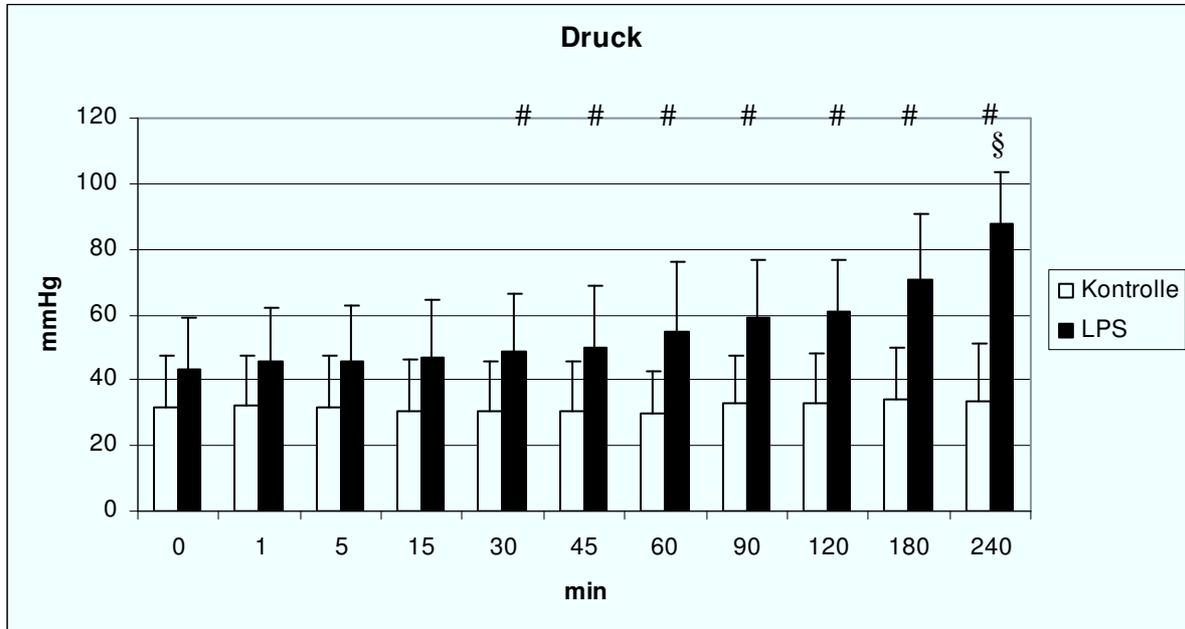


Abbildung 9: Druck in mmHg im Verlauf der Perfusion dargestellt als Median \pm Standardabweichung.

§: $p < 0,05$ innerhalb der LPS-Gruppe vs. Zeitpunkt 0

[zusätzlich Zeitpunkte 1 & 5 vs. 240, in Grafik nicht dargestellt]

#: $p < 0,05$ Kontrolle vs. LPS

4.3 ELISA

Zur weiteren Charakterisierung des Perfusionsmodells an der humanen Plazenta hinsichtlich einer Inflammation bestimmten wir die Serumkonzentration der pro- bzw. antiinflammatorische Zytokine Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrose-Faktor α (TNF- α) im Serum des Perfusionsblutes zu den Zeitpunkten 0 Minuten, 15 Minuten, 60 Minuten, 120 Minuten und 240 Minuten.

4.3.1 IL-1 β

IL-1 β als zentraler Botenstoff in der Immunantwort auf verschiedene Fremdeinflüsse wie z.B. Lipopolysaccharid ließ sich in geringer Konzentration erstmalig zum Zeitpunkt 120 Minuten in beiden Versuchsgruppen nachweisen und war mit $1,98 \text{ pg/ml} \pm 1,98$ in der Kontrollgruppe und $1,56 \text{ pg/ml} \pm 1,56$ in der LPS-Gruppe ähnlich niedrig. Ein signifikanter Anstieg zeigte sich dann in der LPS-Gruppe nach 240 Minuten auf $222,84 \text{ pg/ml} \pm 43,86$, wohingegen der Anstieg in der Kontrollgruppe auf $27,67 \text{ pg/ml} \pm 27,76$ nicht signifikant war.

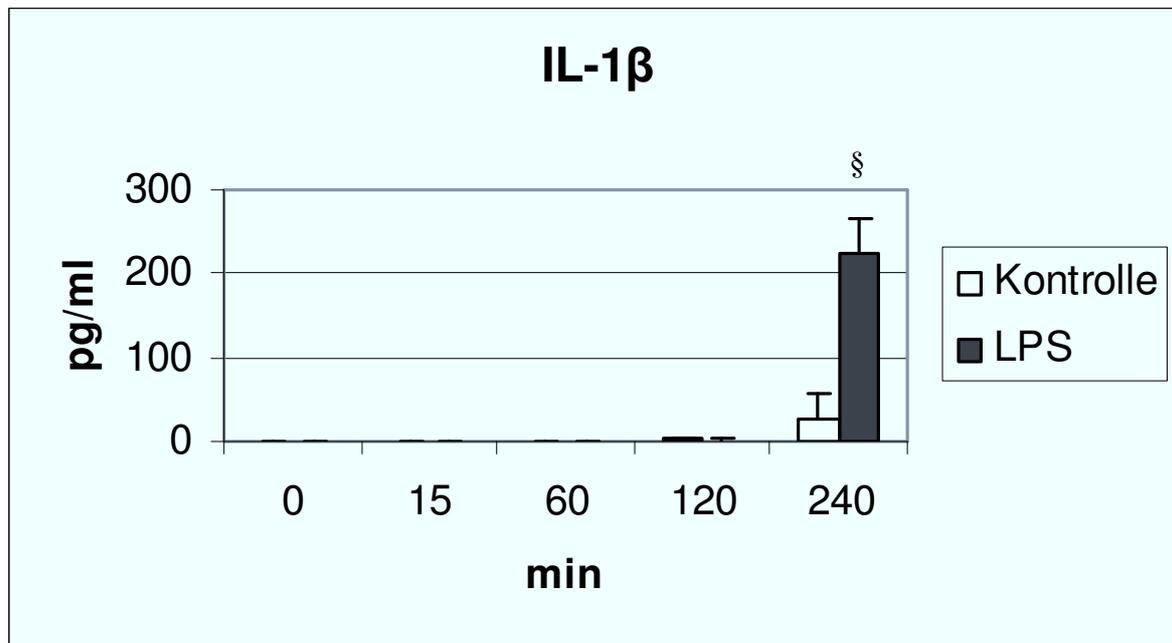


Abbildung 10: *IL-1 β dargestellt als Median \pm Standardabweichung.
§: $p < 0,05$ innerhalb der LPS-Gruppe vs. Zeitpunkt 0*

4.3.2 IL-6

Dem IL-6 kommt bei Entzündungsprozessen eine bedeutende Rolle bei der Regelung von Mechanismen der angeborenen Immunität im Übergang zur Regelung von Mechanismen der erworbenen Immunität zu. Deutliche Unterschiede bei der Bestimmung von IL-6 in unserem Plazentaperfusionsmodell zeigten sich bereits nach

60 Minuten. Die Konzentrationen konnten zu diesem Zeitpunkt mit $3,66 \text{ pg/ml} \pm 3,66$ in der Kontrollgruppe und mit $24,26 \text{ pg/ml} \pm 9,91$ in der LPS-Gruppe bestimmt werden. In der LPS-Gruppe zeigte sich dann im weiteren Verlauf der Perfusion ein signifikanter Anstieg auf über $367,21 \text{ pg/ml} \pm 122,42$ nach 120 Minuten bis auf $1042,22 \text{ pg/ml} \pm 392,1$ nach 240 Minuten. Wesentlich moderater fiel der Anstieg von IL-6 innerhalb der Kontrollgruppe mit Werten von $70,28 \text{ pg/ml} \pm 37,94$ nach 120 Minuten und $343,37 \text{ pg/ml} \pm 215,1$ nach 240 Minuten aus.

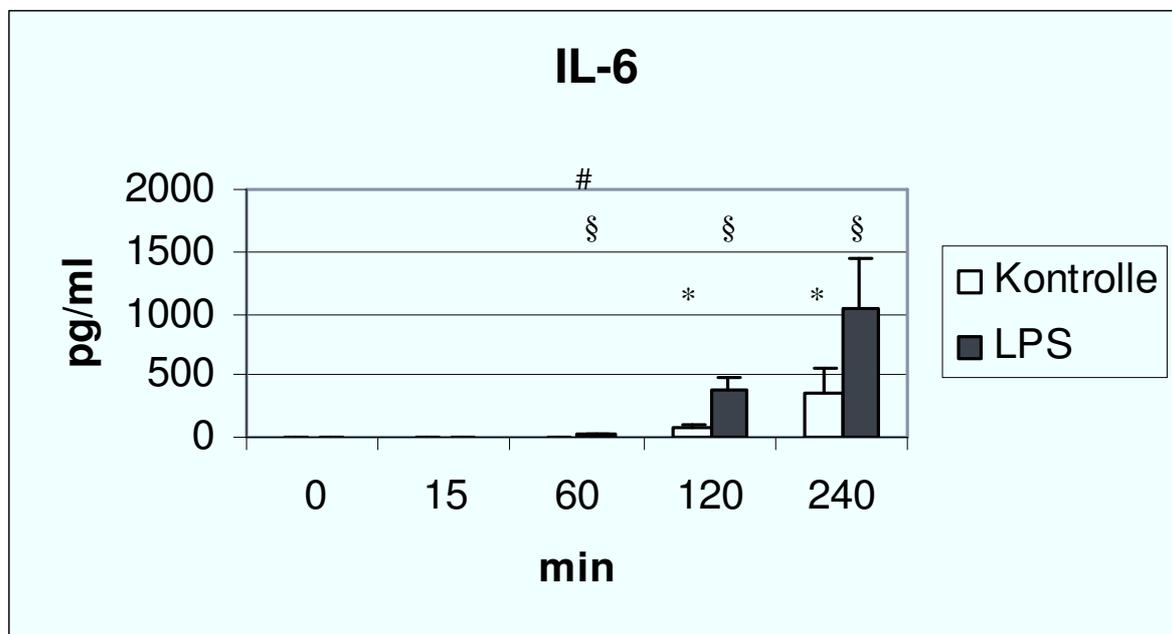


Abbildung 11:

IL-6 dargestellt als Median \pm Standardabweichung.

**: $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe vs. Zeitpunkt 0*

§: $p < 0,05$ innerhalb der LPS-Gruppe vs. Zeitpunkt 0

#: $p < 0,05$ Kontrolle vs. LPS

4.3.3 TNF- α

TNF- α ist an lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen beteiligt und regelt als multifunktionales Zytokin die Aktivität verschiedener Immunzellen, indem es zur Ausschüttung anderer Zytokine anregt. Die Konzentrationen für TNF- α in unserem Perfusionsmodell lagen zu den Zeitpunkten 0 und 15 Minuten unter 30 pg/ml in der

Kontrollgruppe und um 100 pg/ml in der LPS Gruppe. Zu einem ersten deutlicheren Anstieg kam es in der LPS-Gruppe nach 60 Minuten mit einem Wert von 280,52 pg/ml \pm 145,96, während in der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt die Konzentration mit 43,82 pg/ml \pm 43,82 signifikant niedriger war. Nach 120 Minuten verdreifachte sich die Konzentration von TNF- α auf 909,33 pg/ml \pm 267,55 in der LPS-Gruppe und war damit signifikant höher als die Konzentration in der Kontrollgruppe mit 393,2 pg/ml \pm 64,32. Nach 240 Minuten Perfusionszeit lag die Konzentration in der Kontrollgruppe mit 815,05 pg/ml \pm 626,83 um die Hälfte niedriger als in der LPS-Gruppe mit 1588,3 \pm 592 pg/ml.

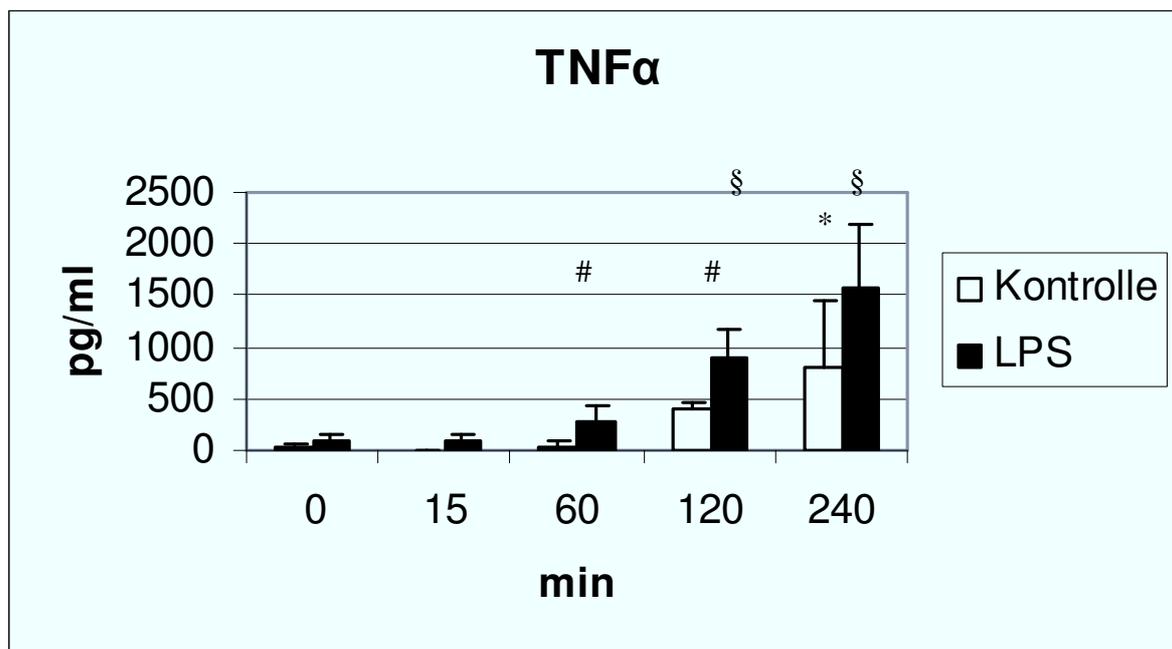


Abbildung 12:

TNF- α dargestellt als Median \pm Standardabweichung.

**: $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe vs. Zeitpunkt 0 [zusätzlich Zeitpunkt 15 vs. 240, in Grafik nicht dargestellt]*

§: $p < 0,05$ innerhalb der LPS-Gruppe

[zusätzlich Zeitpunkt 15 vs. 120 & 240, in Grafik nicht dargestellt]

#: $p < 0,05$ Kontrolle vs. LPS

4.4 FACS

Durchflußzytometrische Untersuchungen stellen ein weit verbreitetes Testverfahren in der Grundlagenforschung und der klinischen Immunologie dar und ermöglichen eine Aussage des Aktivierungsgrades von Zellen durch Analyse der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle. Wir setzten dieses Verfahren zur Analyse der Aktivierung mononuklearer Zellen im Perfusionsblut ein, um das Plazentaperfusionsmodell weiter zu charakterisieren.

4.4.1 Lymphozyten

4.4.1.1 CD11a

CD11a wird als transmembranes Glycoprotein auf allen Leukozyten exprimiert und spielt als Adhäsionsmolekül eine Rolle bei der Leukozyten-Endothelzellinteraktion. Dem Kurvenverlauf bei der Expression von CD11a ist in beiden Gruppen eine Abnahme der Expression über den zeitlichen Verlauf der Perfusion zu entnehmen. Die Werte der medianen Fluoreszenzintensität nahmen in der Kontrollgruppe von $224,12 \pm 42,825$ auf $153,69 \pm 5,67$ ab. In der LPS-Gruppe fiel die Expression von CD11a auf den Lymphozyten nach 4 Stunden Perfusion von $167,8 \pm 17,18$ signifikant auf $130,89 \pm 23,73$ ab.

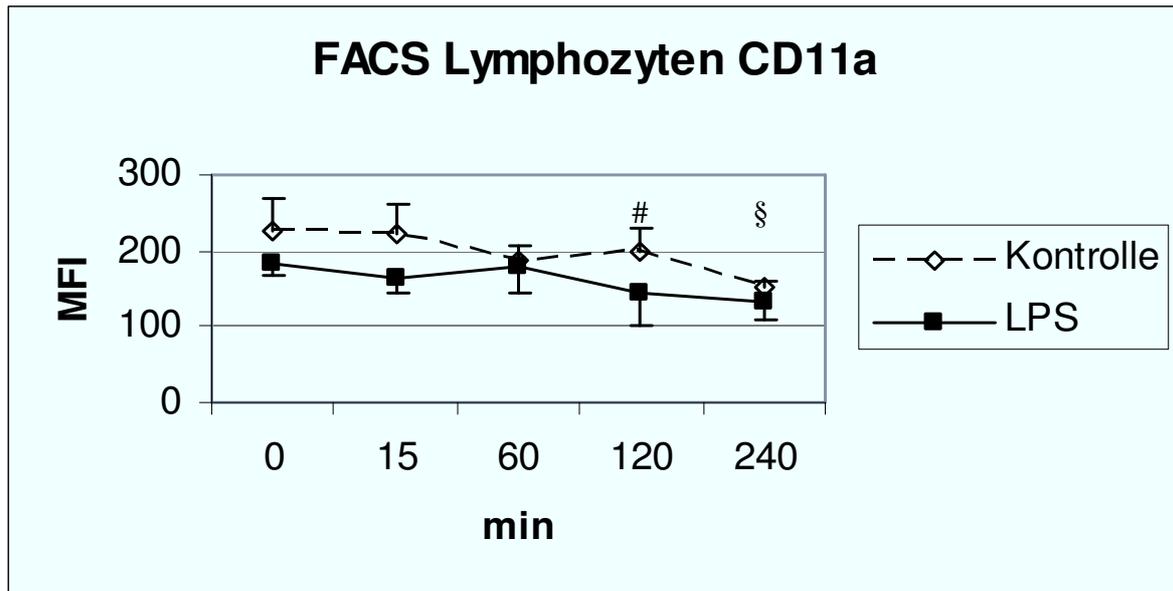


Abbildung 13:

*CD11a Expression dargestellt als Median der Fluoreszenzintensität (MFI) \pm Standardabweichung.
 §: $p < 0,05$ innerhalb der LPS-Gruppe vs. Zeitpunkt 0
 #: $p < 0,05$ Kontrolle vs. LPS*

4.4.1.2 CD11b

Bei der Betrachtung der Expression von CD11b auf Lymphozyten fiel auf, dass grundsätzlich eine höhere Expression zu den einzelnen Meßzeitpunkten (signifikant an den Zeitpunkten 0, 15, 60 Minuten) in der LPS-Gruppe bestand. Ein Maximum der Expression von CD11b zeigte sich in beiden Gruppen zum Zeitpunkt 120 Minuten mit einer medianen Fluoreszenzintensität bei $305,68 \pm 83,95$ in der Kontrollgruppe und bei $442,12 \pm 90,27$ in der LPS-Gruppe. Innerhalb der Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikant höhere Expression von CD11b ab dem Zeitpunkt 120 Minuten.

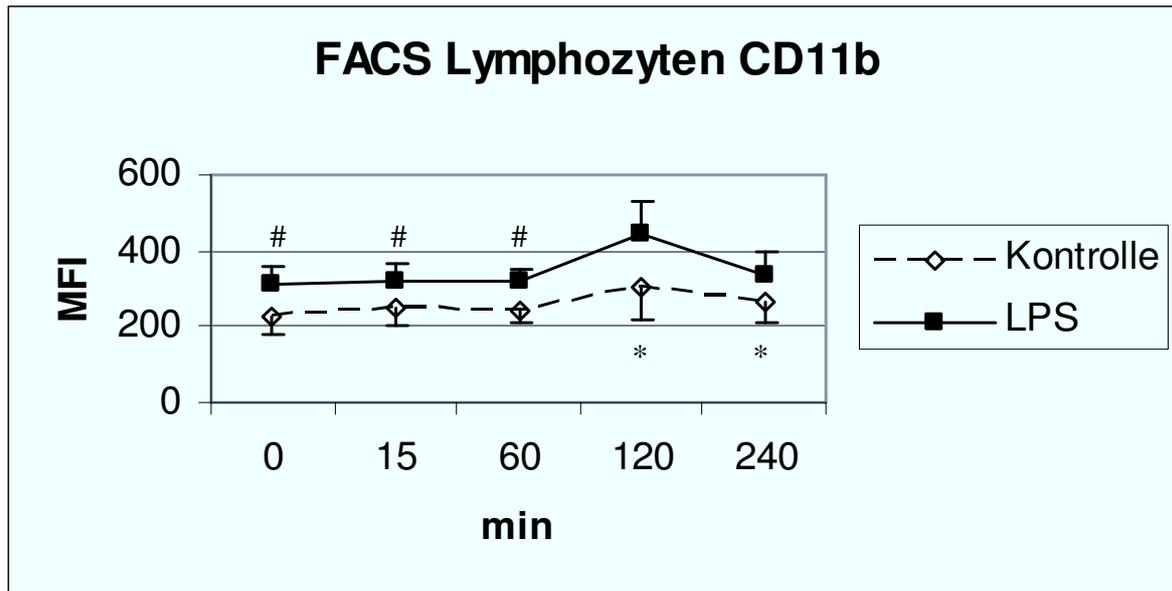


Abbildung 14:

*CD11b Expression dargestellt als Median der Fluoreszenzintensität (MFI) \pm Standardabweichung.
 *: $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe vs. Zeitpunkt 0 [zusätzlich Zeitpunkt 15, 60 vs. 120 & 240, in Grafik nicht dargestellt]
 #: $p < 0,05$ Kontrolle vs. LPS*

4.4.1.3 CD62L

Die Expression von CD62L auf den Lymphozyten zeigte in der Kontrollgruppe innerhalb der ersten 60 Minuten ein stabiles Niveau mit Fluoreszenzintensitäten um 2000, ab Minute 60 kam es zu einem signifikanten Anstieg der Expression mit Verdoppelung der Intensitätswerte auf $4428,44 \pm 2037,785$ nach 120 Minuten und auf $4687,97 \pm 497,58$ nach 240 Minuten. In der LPS-Gruppe zeigte sich die Expression von CD62L während des gesamten Zeitraums der Perfusion auf hohem Niveau stabil mit Intensitätswerten zwischen $4446,19 \pm 812,085$ (Minute 0) und $4691,65 \pm 556,59$ (Minute 120). Nach 120 Minuten und 240 Minuten Perfusion zeigte sich eine gleich hohe Expression von CD62L in beiden Gruppen.

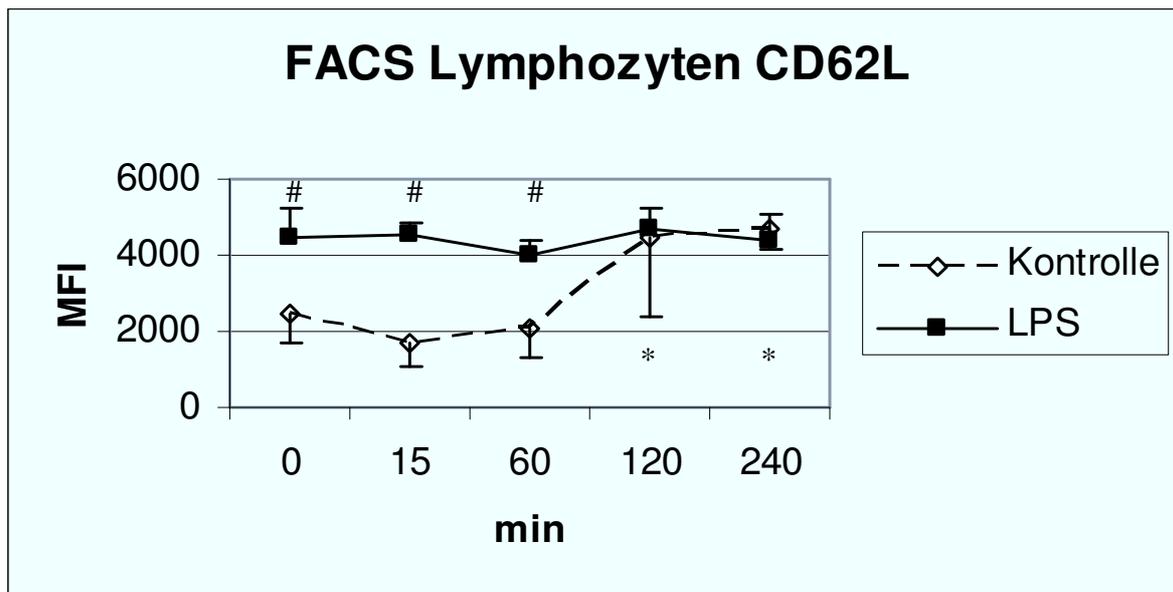


Abbildung 15:

*CD62L Expression dargestellt als Median der Fluoreszenzintensität (MFI) \pm Standardabweichung.
 *: $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe vs. Zeitpunkt 0 [zusätzlich Zeitpunkt 15, 60 vs. 120 & 240, in Grafik nicht dargestellt]
 #: $p < 0,05$ Kontrolle vs. LPS*

4.4.2 Neutrophile Granulozyten

Neben den Lymphozyten untersuchten wir neutrophile Granulozyten im Perfusionsblut auf die Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD11b und CD62L.

4.4.2.1 CD11a

Die Expression von CD11a auf Neutrophilen zeigte ein ähnliches Muster wie die Expression auf Lymphozyten (siehe Abbildung 9). Auch auf den Neutrophilen war die Expression in der Kontrollgruppe im Vergleich zur LPS-Gruppe zu den Messzeitpunkten 15 und 120 Minuten höher. Über den zeitlichen Verlauf war eine nicht signifikante Abnahme der Expression in der Kontrollgruppe von $87,8 \pm 9,76$ bei Minute 0 auf $64,96 \pm 2,93$ am Ende der Perfusion nach 240 Minuten zu beobachten.

Ein ähnlicher Kurvenverlauf mit etwas geringerer Abnahme der Intensität der Expression für CD11a von $62,34 \pm 5,35$ auf $47,69 \pm 2,21$ zeigte sich in der LPS-Gruppe.

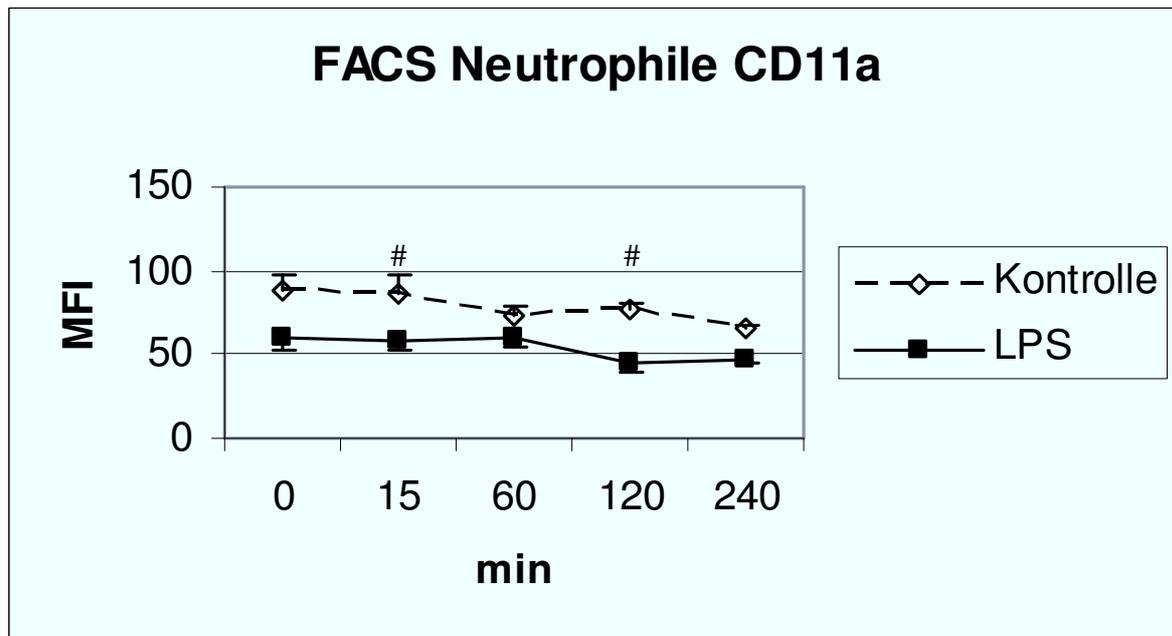


Abbildung 16:

*CD11a Expression dargestellt als Median der Fluoreszenzintensität (MFI) \pm Standardabweichung.
#: $p < 0,05$ Kontrolle vs. LPS*

4.4.2.2 CD11b

CD11b zeigte in der Kontrollgruppe einen signifikanten Anstieg der Expression ausgehend von einem Wert der mittleren Fluoreszenzintensität von $975,42 \pm 363,65$ zum Zeitpunkt 0 auf $5050,42 \pm 693,015$ zum Zeitpunkt 120 Minuten, um dann nach 240 Minuten bei einer Intensität von $4804,08 \pm 556$ stabil zu bleiben. Ein nicht signifikanter Anstieg der Expression ließ sich in der LPS-Gruppe von $1774,15 \pm 658,135$ ausgehend innerhalb der ersten 60 Minuten auf $4383,96 \pm 571,65$ nachvollziehen. Dann kam es allerdings zur Einstellung eines Plateaus mit einem Wert von $4386,68 \pm 578,64$ nach 240 Minuten.

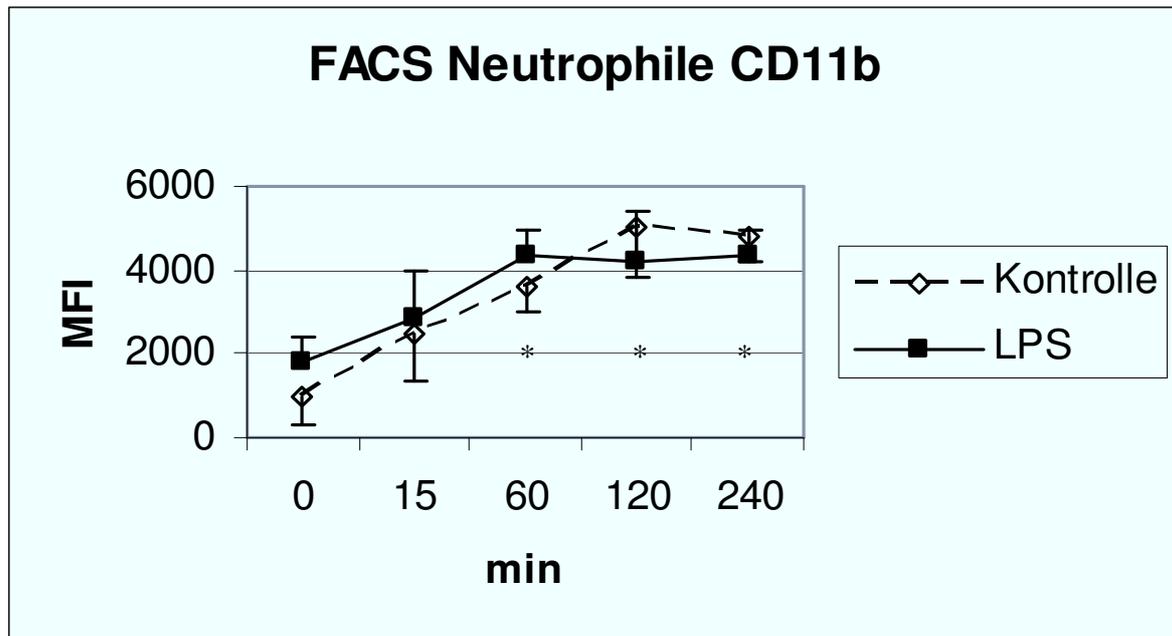


Abbildung 17:

CD11b Expression dargestellt als Median der Fluoreszenzintensität (MFI) \pm Standardabweichung.

**: $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe vs. Zeitpunkt 0 [zusätzlich Zeitpunkt 15 vs. 60, 120 & 240, in Grafik nicht dargestellt]*

4.4.2.3 CD62L

Anders als auf den Lymphozyten kam es bei der Expression von CD62L auf den Neutrophilen in der Kontrollgruppe zu einem Abfall der Expression im Verlauf der Perfusion. Die Expression fiel signifikant von einer mittleren Intensität von $2256,51 \pm 1010,125$ zum Zeitpunkt Null auf $318,72 \pm 111,65$ nach 240 Minuten. Damit ergab sich eine Reduktion für die Expression von CD62L um das Siebenfache nach 4 Stunden Perfusion in der Kontrolle. Unter LPS-Einfluß hingegen zeigte sich ein geringerer Expressionsverlust von CD62L im Verlauf, ohne statistische Signifikanz. Von einem niedrigeren Ausgangswert mit $1200,69 \pm 1848,215$ als in der Kontrollgruppe kommend fiel die Expression nach 240 Minuten auf $193,4 \pm 38,39$. Dies entsprach einer Reduktion um den Faktor 6.

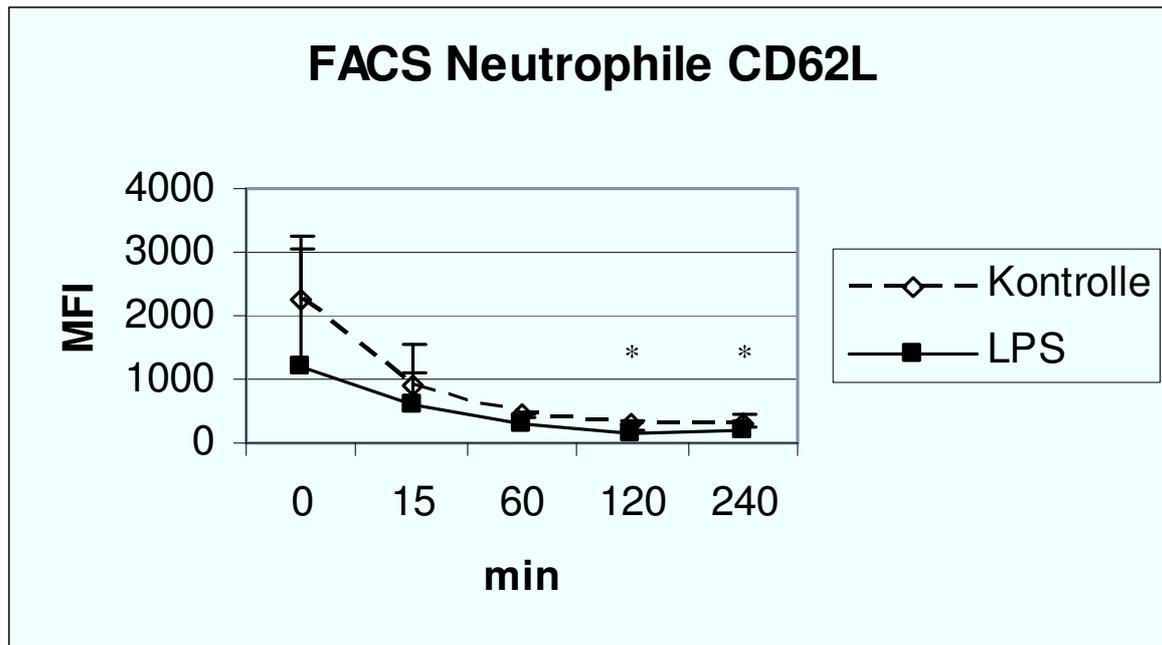


Abbildung 18: *CD62L Expression dargestellt als Median der Fluoreszenzintensität (MFI) \pm Standardabweichung.*
 *: $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe vs. Zeitpunkt 0

4.4.3 Thrombozyten

Zur Beurteilung der Aktivierung der Thrombozyten in unserem Perfusionsmodell untersuchten wir CD62P und CD41.

4.4.3.1 CD62P

In der Kontrollgruppe zeigte die Expression ab 15 Minuten einen Abfall der mittleren Fluoreszenzintensität von 54 bis auf einen Wert von $28,84 \pm 4,75$ nach 120 Minuten. Nach 240 Minuten kam es dann wieder zu einem Anstieg der MFI auf $47,13 \pm 6,02$ ohne jeweils statistische Signifikanz zu erreichen. In der mit LPS behandelten Gruppe ließ sich ein steter Abfall der MFI ausgehend von $50,55 \pm 7,295$ auf $29,24 \pm 4,15$ bis zum Zeitpunkt 120 Minuten beobachten. Nach 240 Minuten stieg dann die Expression für CD62P wieder bis auf eine MFI von $36,74 \pm 8,7$, auch hier kein Nachweis statistischer Signifikanzen.

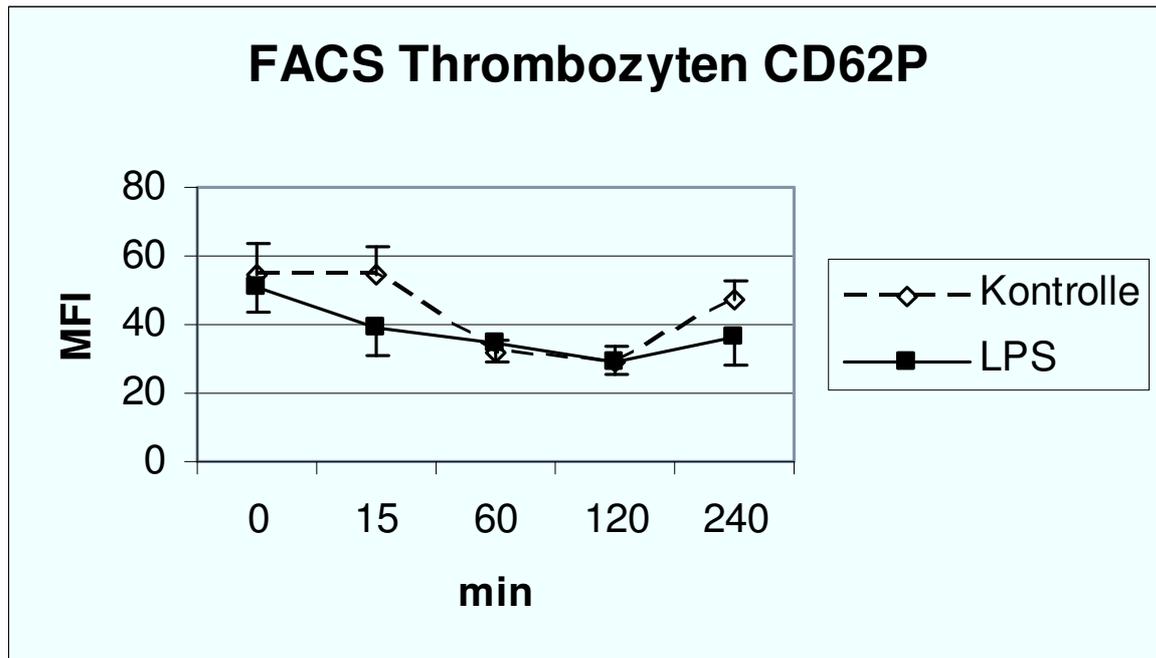


Abbildung 19: *CD62P Expression dargestellt als Median der Fluoreszenzintensität (MFI) \pm Standardabweichung.*

4.4.3.2 CD62P (PMA)

Ausgehend von einem mittleren Fluoreszenzintensitätswert von $430,48 \pm 77,335$ begann die Expression in der Kontrollgruppe nach 15 Minuten signifikant abzunehmen und erreichte nach 240 Minuten eine MFI von $83,63 \pm 48,67$. Unter LPS-Einfluß zeigte sich zunächst ein geringer Anstieg der Expression von einer MFI von $238,51 \pm 132,245$ (Minute 0) auf $314,87 \pm 122,965$ (Minute 15). Ab dann fiel die MFI kontinuierlich auf $37,9 \pm 9,55$ bis zur Minute 240 signifikant ab.

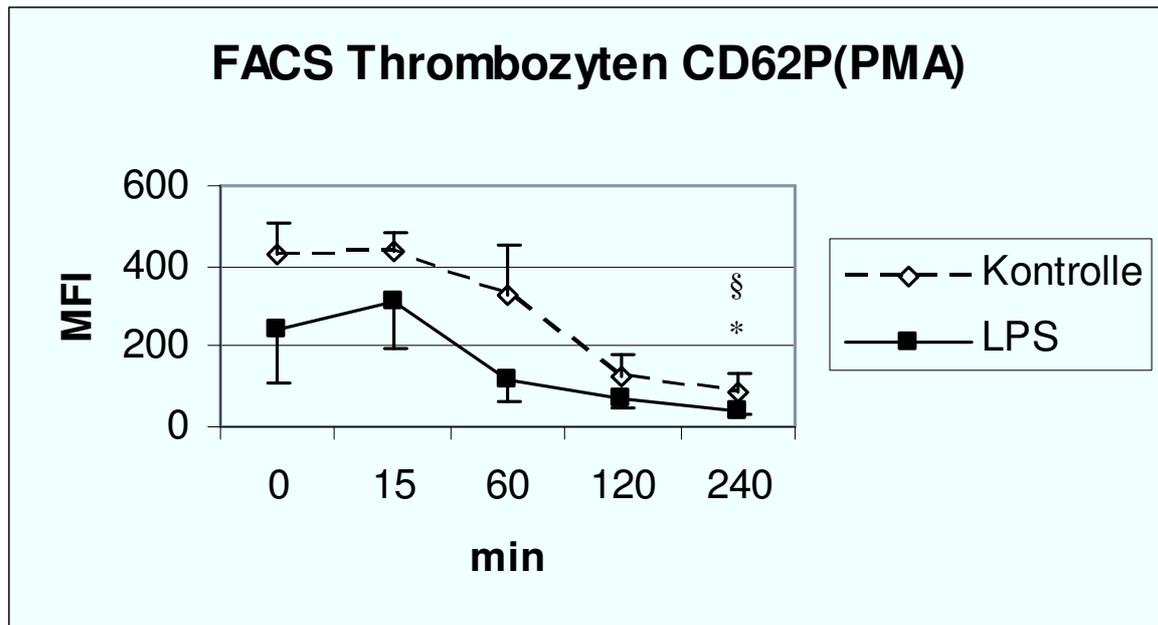


Abbildung 20: CD62P Expression unter PMA-Stimulation dargestellt als Median der Fluoreszenzintensität (MFI) \pm Standardabweichung.

*: $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe vs. Zeitpunkt 0

[zusätzlich Zeitpunkt 240 vs. 15, 60, 120, in Grafik nicht dargestellt]

§: $p < 0,05$ innerhalb der LPS-Gruppe

[zusätzlich Zeitpunkt 240 vs. 15, 60, 120, in Grafik nicht dargestellt]

4.4.3.4 CD41

Die Expression von CD41 zeigte keine Unterschiede zwischen Kontroll- und LPS-Gruppe bei identischem Kurvenverlauf. In beiden Gruppen zeigte sich ein geringer Intensitätsabfall von $653,14 \pm 48,355$ in der Kontrolle bzw. $588,59 \pm 59,995$ in der LPS-Gruppe (Zeitpunkt 0 Minuten) auf $474,88 \pm 31,81$ in der Kontrolle bzw. $464,31 \pm 116,39$ in der LPS-Gruppe (Zeitpunkt 240 Minuten).

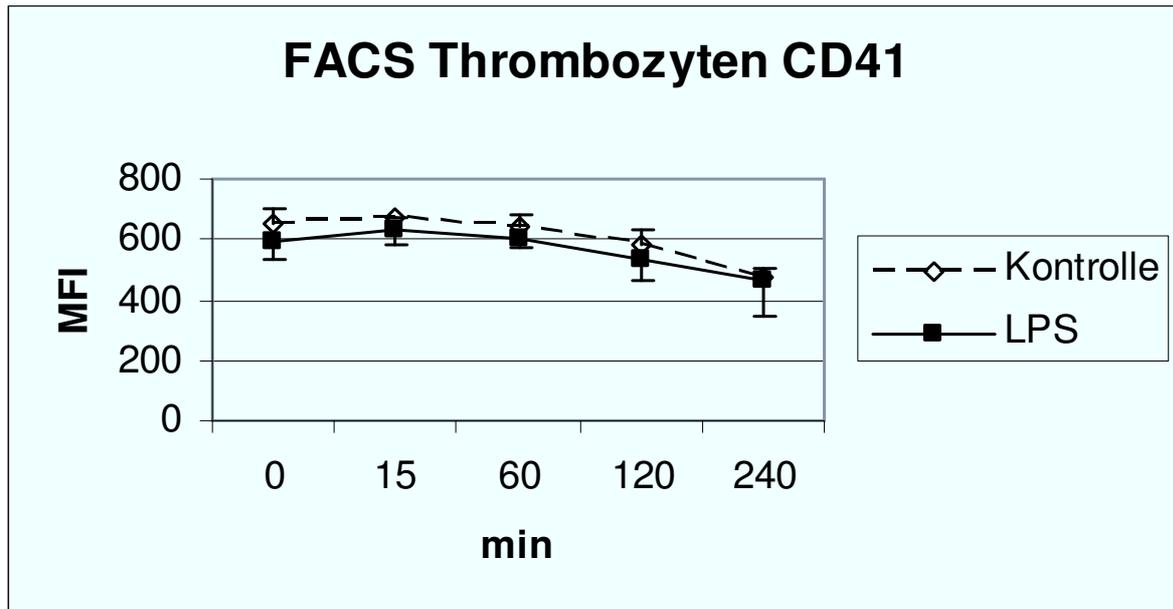


Abbildung 21: *CD41 Expression dargestellt als Median der Fluoreszenzintensität (MFI) \pm Standardabweichung.*

4.4.3.5 CD41 (PMA)

Ein ähnliches Bild zeigte sich unter der Stimulation der Thrombozyten mit PMA bei leicht höherer MFI für die Expression von CD41. In beiden Gruppen ließ sich ein nicht signifikanter Abfall der MFI über die vierstündige Perfusion von $1292,95 \pm 96,865$ auf $744,73 \pm 108,95$ (Kontrollgruppe) bzw. von $1075,48 \pm 128,76$ auf $500,25 \pm 227,95$ (LPS-Gruppe) verzeichnen.

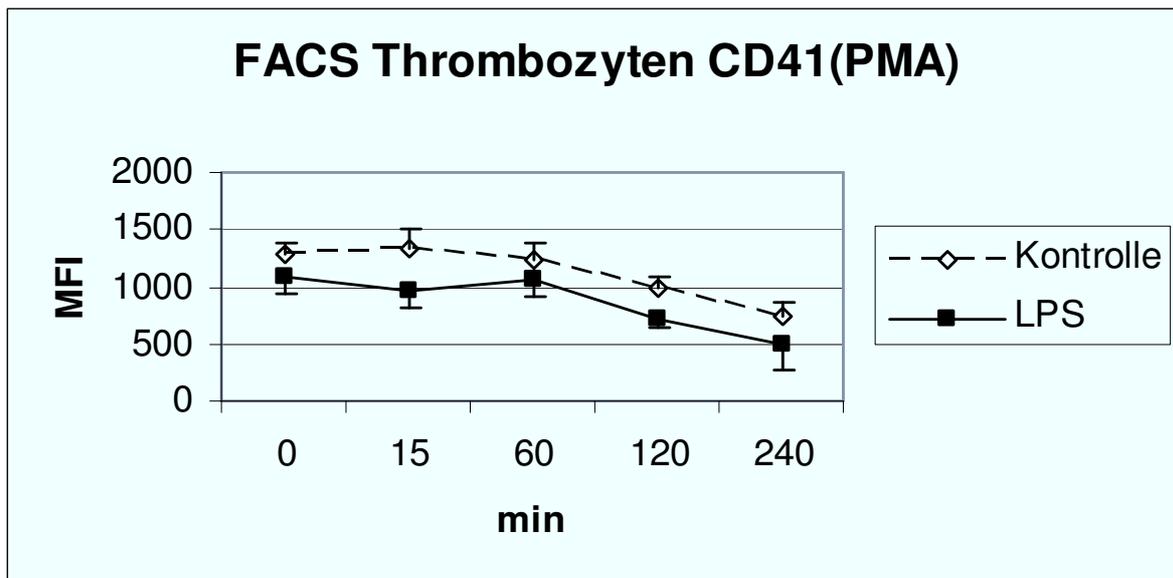


Abbildung 22: *CD41 Expression unter PMA-Stimulation dargestellt als Median der Fluoreszenzintensität (MFI) \pm Standardabweichung.*

4.5 Histologie und Immunhistochemie

Das histologische Bild von Schnitten durch die reife Plazenta ist durch das überwiegende Vorhandensein von Endzotten geprägt mit ihrem charakteristischen morphologischen Aufbau, wie unter 1.4 der Einleitung beschrieben. Die HE-Färbung ermöglicht eine Beurteilung des plazentaren Gewebes nach Integrität oder dem Vorhandensein von Pathologien bei guter Abgrenzbarkeit der zellulären Bestandteile, wie z.B. Endothelzellen zu Stromazellen. Sie stellt ferner die Grundlage in der Beurteilung der plazentaren Histomorphologie vor immunhistochemischen Zusatzuntersuchungen dar. Die im Folgenden dargestellten histologischen Bilder zeigen jeweils Schnitte durch die humane Plazenta nach vierstündiger Perfusion mit humanem Vollblut (Kontrollgruppe) und humanem Vollblut mit LPS (LPS-Gruppe) in Gegenüberstellung nach entsprechender histologischer oder immunhistochemischer Färbung.

4.5.1 HE-Färbung

Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung zeigt in der Kontrollgruppe eine gut erhaltene Mikrostruktur. Der Synzytiotrophoblast ist schlank und in seiner Kontinuität erhalten. Das Stroma der Zotten ist relativ zellarm, was auf eine nur geringe zelluläre Infiltration hindeutet. Die Endothelzellen, die die fetalen Kapillaren und Sinusoide auskleiden sind gut abgrenzbar, homogen und zeigen kein ödematöses Zytoplasma. Thrombotische Gefäßverschlüsse sind nur vereinzelt zu beobachten.

Im Gegensatz dazu ist die Zottenstruktur in der LPS-perfundierten Gruppe deutlich inhomogener. Die Zelllage des Synzytiotrophoblasten ist erhalten. Das villöse Stroma ist etwas zellreicher, was auf eine vermehrte zelluläre Infiltration hinweist. Die fetalen Endothelzellen sind nicht ödematös vergrößert bei verstärkter interstitieller Ödembildung. Es findet sich mehr thrombotisches Material in dem fetalen Gefäßsystem.

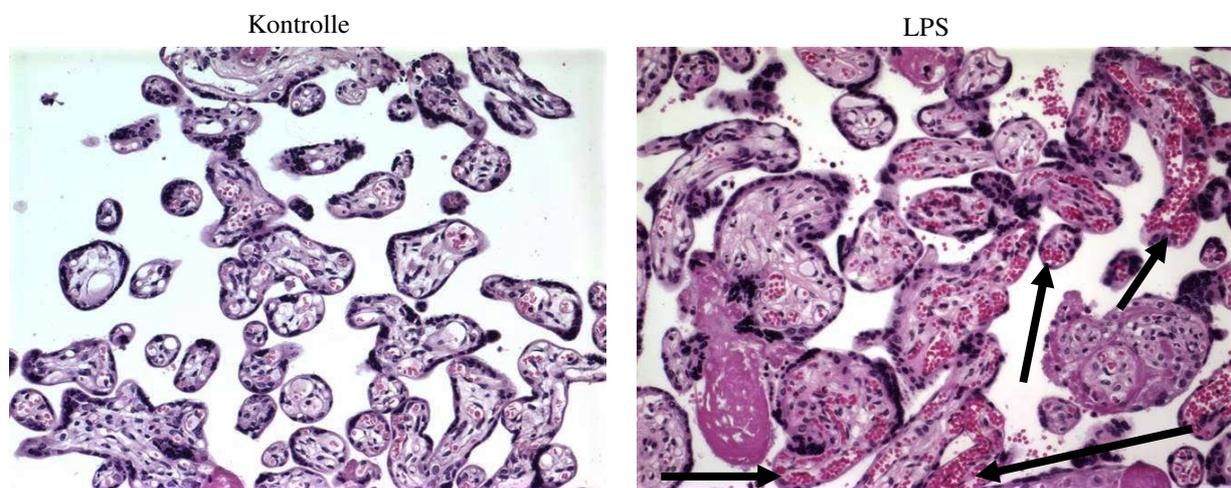


Abbildung 23: *HE-Färbung, Vergrößerung x20. Schnitt durch Endzotten der perfundierten humanen Plazenta mit gut erhaltener Mikrostruktur in der Kontrolle. Vermehrte Thrombenbildung (Pfeile) und interstitielles Ödem in der LPS-Gruppe.*

4.5.2 Masson-Trichrom-Färbung

Ein ähnliches Bild zeigt sich in der Masson-Trichrom-Färbung. Die Grundstruktur der Zotten ist in beiden Gruppen erhalten, bei etwas aufgelockerterem villösem Stroma und dichter gelagerten Zellkernen des Synzytiotrophoblasten in der LPS-Gruppe als Hinweis auf ein Ödem.

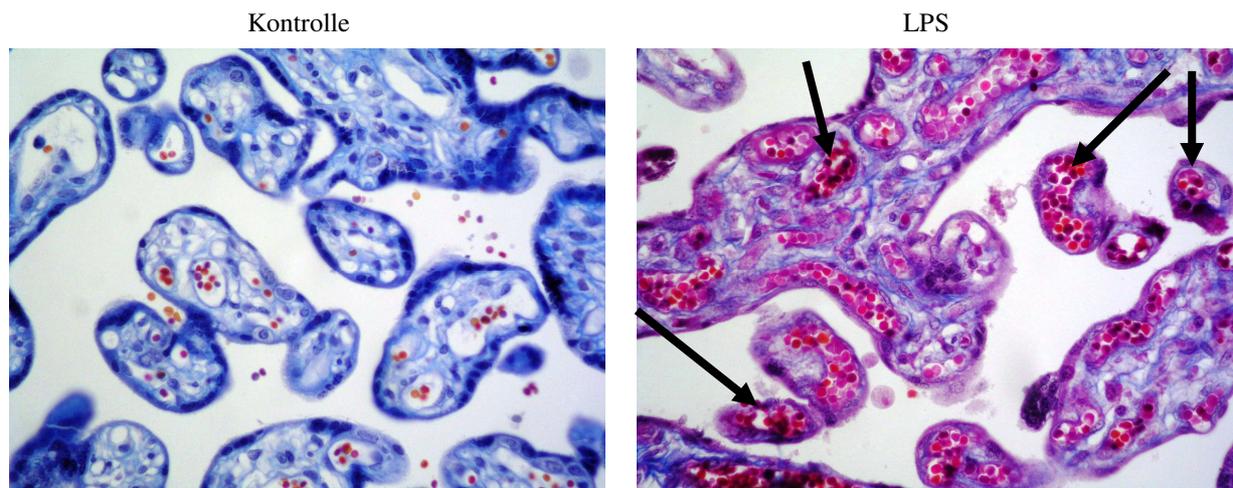


Abbildung 24: *Masson-Trichrom-Färbung, Vergrößerung x40. Schnitt durch Endzotten der perfundierten humanen Plazent. Schlanke Endothelien, offene fetale Gefäße in der Kontrollgruppe. Thrombosen (Pfeile) und stromales Ödem in der LPS-Gruppe.*

4.5.3 vWF

Der von Willebrand Faktor (vWF) als Bestandteil der Blutgerinnung wird sowohl in der Kontroll- als auch in der LPS-Gruppe endothelial exprimiert und lässt sich in ähnlicher Intensität in beiden Gruppen nachweisen [44]. Wie in der Literatur beschrieben ist auch in unseren Schnitten eine gewisse Heterogenität für die Verteilung von vWF im Bereich der fetalen Mikrozirkulation festzustellen [67].

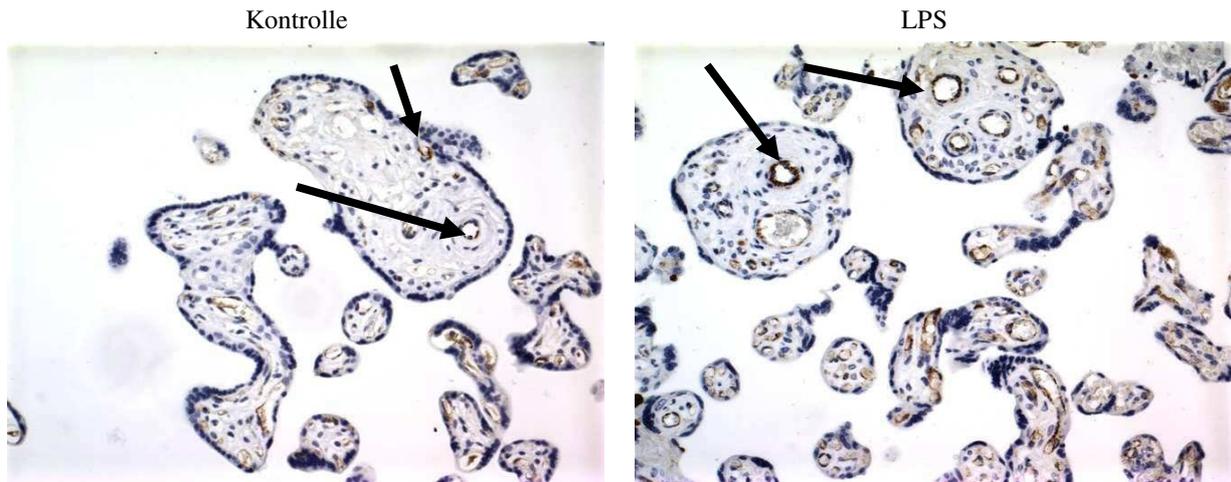


Abbildung 25: *vWF, Vergrößerung x40.
Streng endotheliale Expression von vWF in beiden Gruppen (Pfeile).
Heterogene Verteilung von vWF im Bereich der fetalen
Mikrozirkulation ohne Unterschiede zwischen Kontroll- und LPS-
Gruppe.*

4.5.4 ICAM-1

ICAM-1 oder CD54 ist sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der LPS-Gruppe streng endothelial nachweisbar, wobei sich tendenziell eine stärkere Expression in der LPS-Gruppe nachweisen lässt.

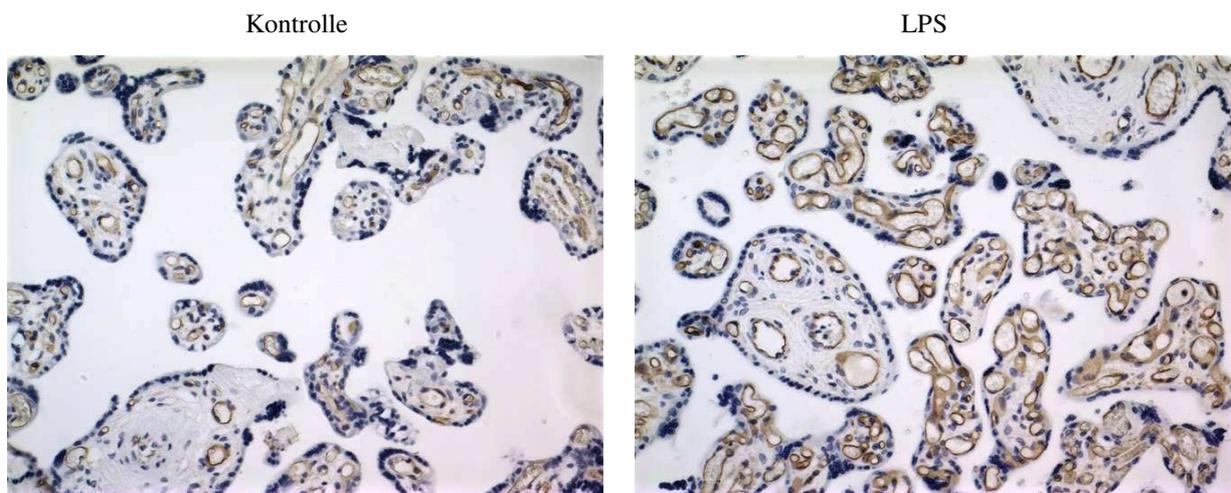


Abbildung 26: *ICAM-1, Vergrößerung x40.
Streng endotheliale Expression von ICAM-1 in beiden Gruppen.
Stärkere Expression in der LPS-Gruppe.*

4.5.5 VE-Cadherin

VE-Cadherin wird in beiden Gruppen streng endothelial exprimiert. Zwischen den Gruppen bestehen keine Unterschiede, allerdings zeigt sich eine gewisse Heterogenität in der Expression innerhalb der Gesichtsfelder einer Biopsie.

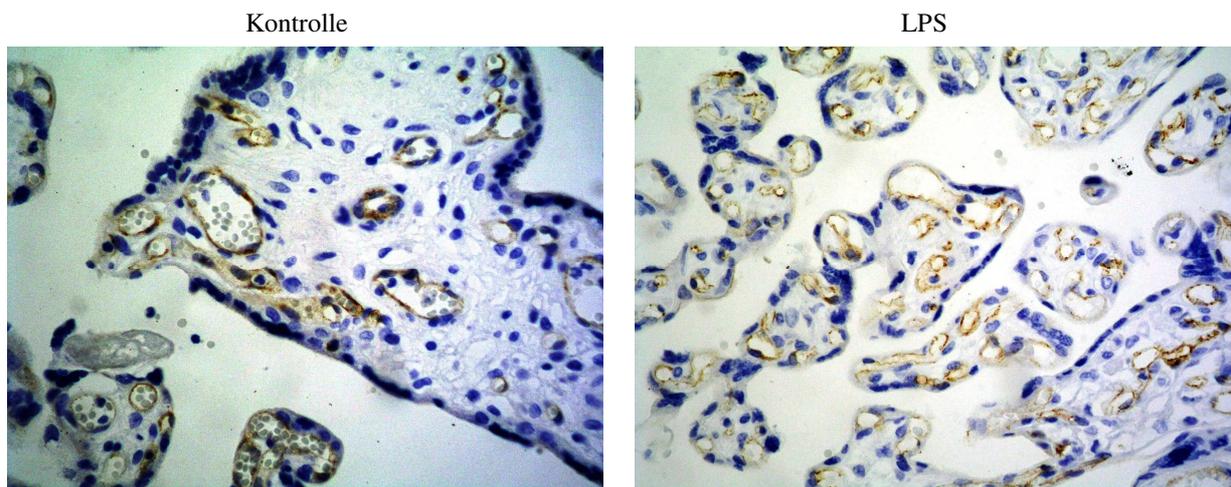


Abbildung 27: *VE-Cadherin, Vergrößerung x40.
Sowohl in Kontroll- als auch in LPS-Gruppe streng endotheliale
Expression von VE-Cadherin ohne Unterschiede zwischen beiden
Gruppen.*

4.5.6 CD31 (PECAM-1)

PECAM-1 oder CD31 lässt sich sowohl auf den Endothelzellen der Kontrollgruppe, als auch auf den Endothelzellen der LPS-Gruppe nachweisen mit etwas stärkerer Expression in der LPS-Gruppe. Vereinzelt kann man in beiden Gruppen eine Positivität für CD31 auch auf mononukleären Zellen feststellen.

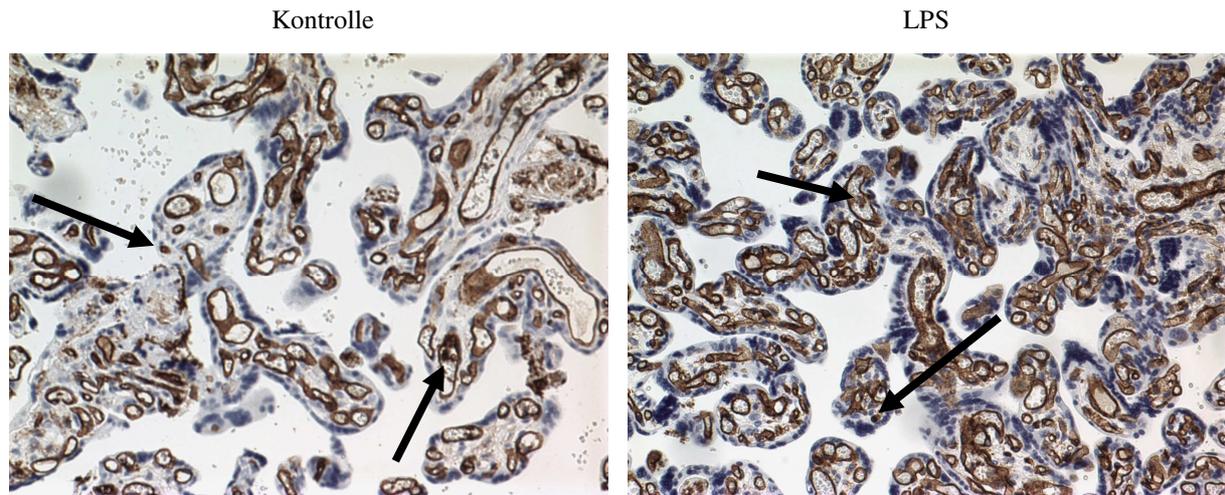


Abbildung 28: *PECAM-1, Vergrößerung x40.
endotheliales Expressionsmuster für PECAM-1 in beiden Gruppen.
Vereinzelt Expression auf mononukleären Zellen (Pfeile).*

4.5.7 IL-1

IL-1 lässt sich in beiden Gruppen disseminiert im Bereich der plazentaren Zotten nachweisen, wenngleich eine stärkere Positivität in der LPS-Gruppe augenfällig ist. Nachweisbar ist IL-1 im fetalen Endothel, etwas schwächer im villösen Stroma und am stärksten im Bereich des Synzytiotrophoblasten. Zudem zeigt sich eine Anfärbbarkeit für IL-1 intravasal im Bereich der Leukozyten und Erythrozyten.

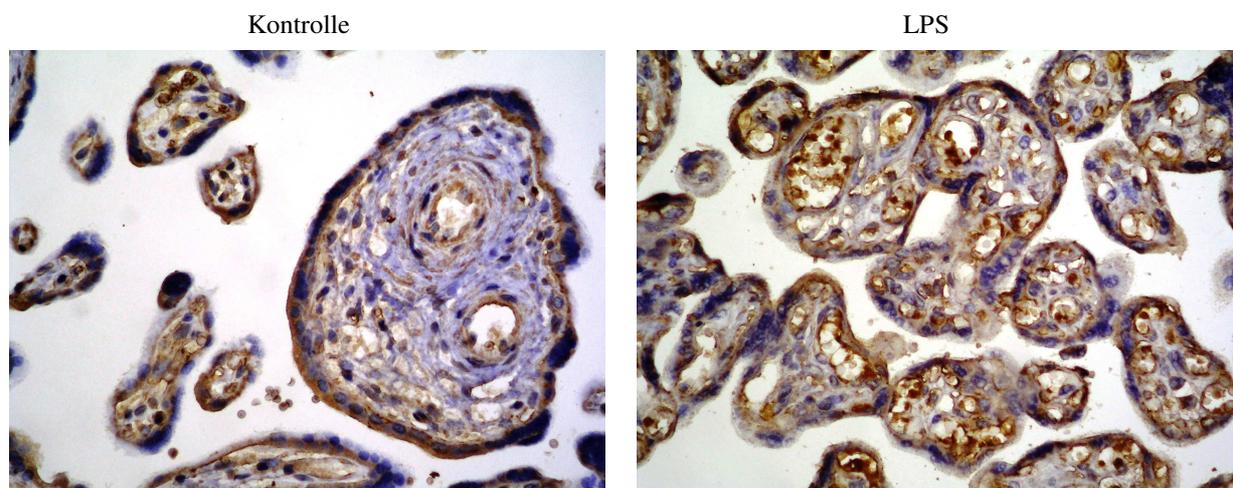


Abbildung 29: *IL-1, Vergrößerung x40.
Disseminierte Expression von IL-1 in beiden Gruppen v.a. im Bereich
des Endothels und des Synzytiotrophoblasten. Stärkere Expression in der
LPS-Gruppe.*

4.5.8 IL-6

Ein ähnliches Expressionsmuster wie IL-1 lässt sich für IL-6 nachvollziehen. In beiden Gruppen zeigt sich Positivität vor allem im Bereich des Synzytiotrophoblasten. Außerdem zeigt sich das fetale Endothel sowohl in der Kontroll- als auch in der LPS-Gruppe mit IL-6 markiert, bei allerdings deutlich stärkerer Expression in der LPS-Gruppe. Zudem färben sich mononukleäre Zellen intravasal und im villösen Stroma positiv für IL-6, auch hier verstärkt in der LPS-Gruppe.

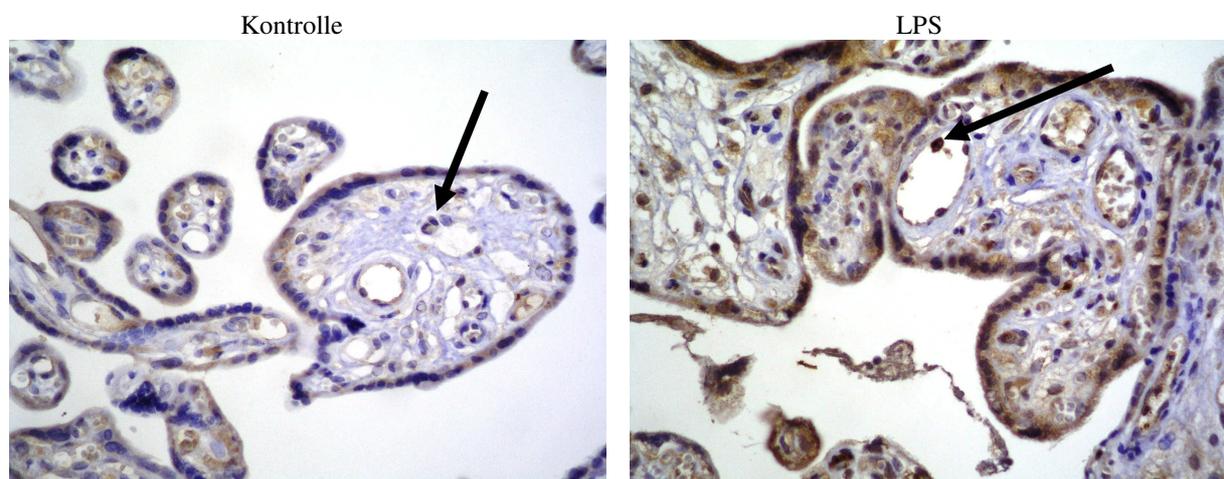


Abbildung 30: *IL-6, Vergrößerung x40.
Diffuse Expressionsverteilung für IL-6 in beiden Gruppen mit Betonung von Synzytiotrophoblasten, Endothel und mononukleären Zellen (Pfeile). Stärkere Expression in der LPS-Gruppe.*

4.5.9 TNF- α

Eine Expression für TNF- α ist besonders in Leukozyten und Erythrozyten innerhalb der fetalen Mikrovaskularisation nachweisbar, wohingegen sich weder fetales Endothel noch die synzytiotrophoblastäre Zellschicht für TNF- α positiv färbt. Zwischen Kontroll- und LPS-Gruppe sind allenfalls geringe Unterschiede in der Stärke der Expression zugunsten der LPS-Gruppe festzustellen.

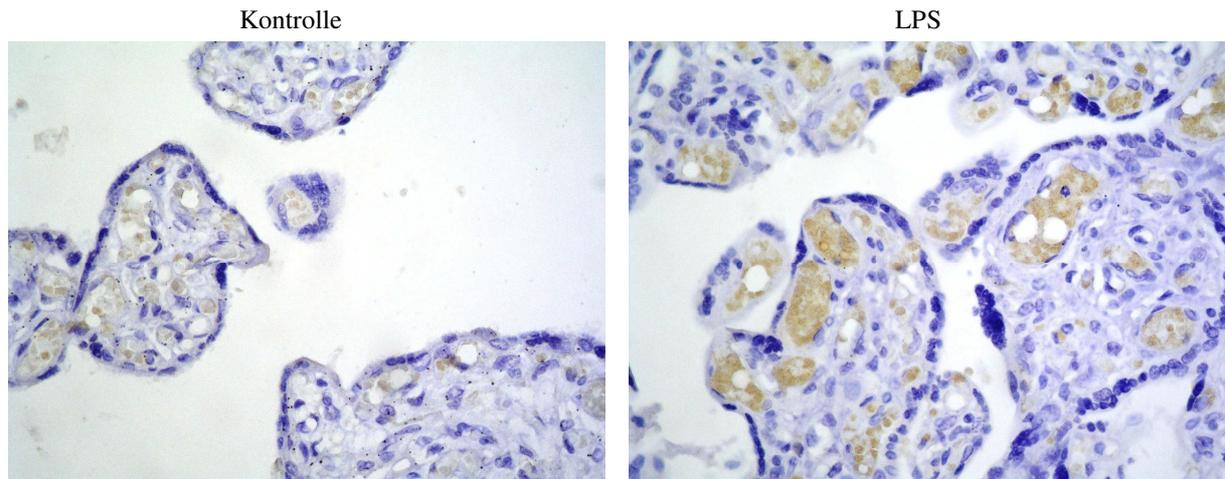


Abbildung 31: *TNF- α , Vergrößerung x40.*
Positivität für TNF- α in Leukozyten und Erythrozyten verstärkt in der LPS-Gruppe.

4.5.10 Thrombomodulin

Thrombomodulin als endotheliales Antigen wird in beiden Gruppen in erster Linie vom Synzytiotrophoblasten exprimiert, wobei sich eine gewisse Stimulierbarkeit durch die Perfusion mit LPS erkennen lässt. Außerdem zeigt sich ein konstantes Expressionsmuster entlang des plazentaren Endothels in beiden Gruppen, aber auch hier eine höhere Intensität nach LPS-Stimulation.

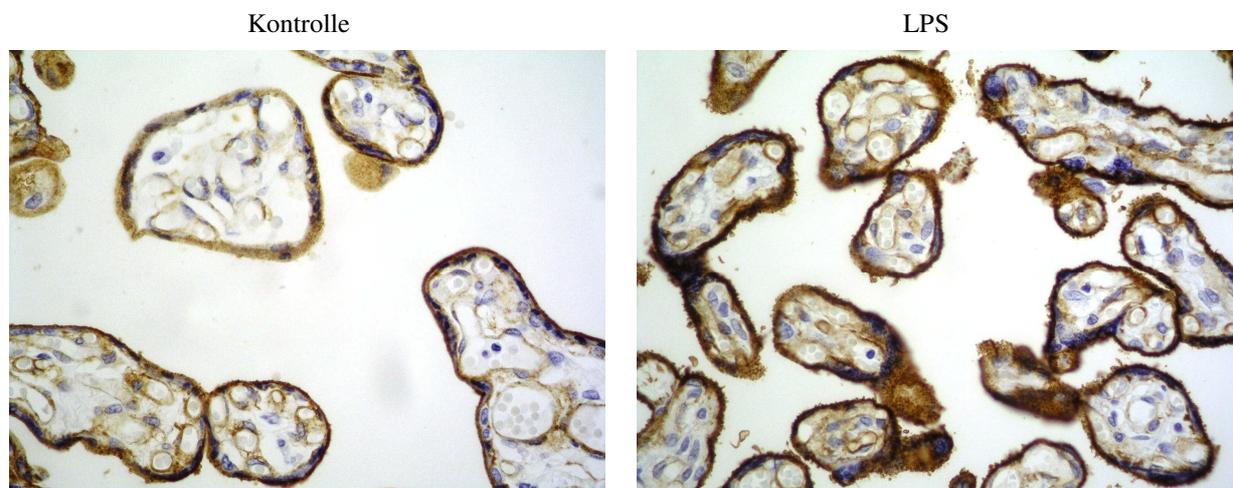


Abbildung 32: *Thrombomodulin, Vergrößerung x40.*
Expression von Thrombomodulin vom Synzytiotrophoblasten und fetalem Endothel verstärkt in der LPS-Gruppe.

4.5.11 PAN-T

Die Färbung mit dem Antikörper PAN-T ermöglicht eine selektive Darstellung von T-Lymphozyten. In unseren Schnitten lassen sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der LPS-Gruppe Lymphozyten in dem fetalen Gefäßbett wie auch im villösen Stroma nach Extravasation nachweisen. Nach LPS-Stimulation zeigen sich deutlich mehr Lymphozyten besonders stromal.

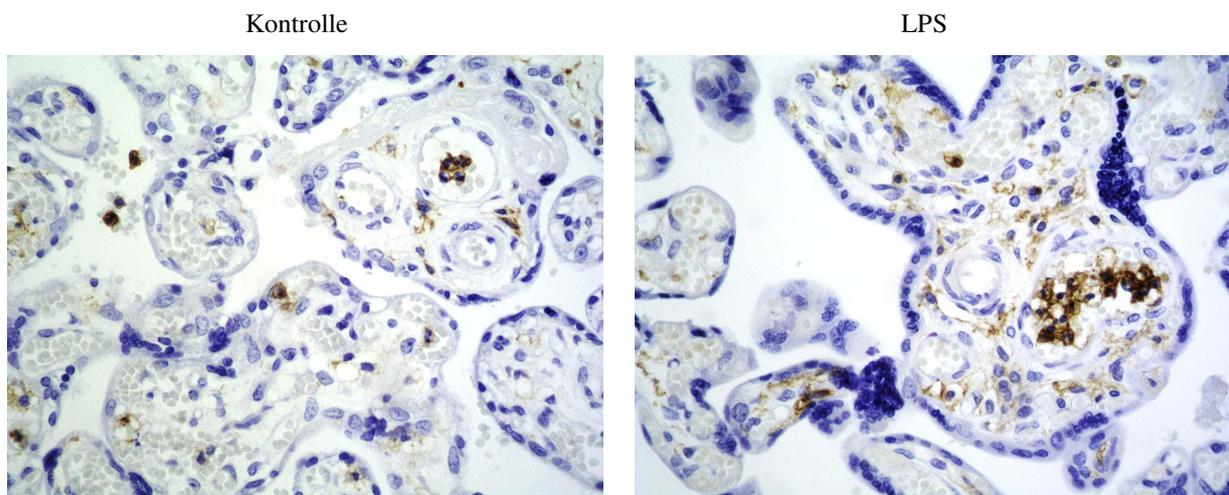


Abbildung 33: *PAN-T, Vergrößerung x40.
Deutlich mehr Lymphozyteninfiltration in der LPS-Gruppe mit der Färbung nach PAN-T nachweisbar.*

4.5.12 L-Selectin, E-Selectin, P-Selectin, VCAM, CD3

Für diese Antikörper zeigte sich keine Positivität.

4.6 Intravitalmikroskopie

An zusätzlichen zwei Plazenten wurden unter den gleichen Perfusionsbedingungen wie in der Kontrollgruppe intravitalmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass über den gesamten Zeitraum der vierstündigen Perfusion in-vivo Fluoreszenzdiagnostik nach Gabe der Farbstoffe FITC-Dextran und Rhodamin-

6G an oberflächlichen Gefäßen der fetalen Chorionplatte mit guter Kontrastierung sowohl des fetalen Gefäßes als auch der zirkulierenden Leukozyten möglich war (siehe Abbildung 30). Eine gute Differenzierung zwischen frei fließenden, rollenden und adhärennten Leukozyten war möglich. Ziel in der vorliegenden Arbeit war es die prinzipielle Möglichkeit der Anwendung der Intravitalmikroskopie an dem beschriebenen Modell der Plazentaperfusion als Erstbeschreibung aufzuzeigen, so dass auf eine Darstellung der Auswertung bei einer Versuchszahl von $n = 2$ verzichtet wurde. Die Präsentation der genauen Ergebnisse wird Gegenstand einer weiterführenden Arbeit sein.

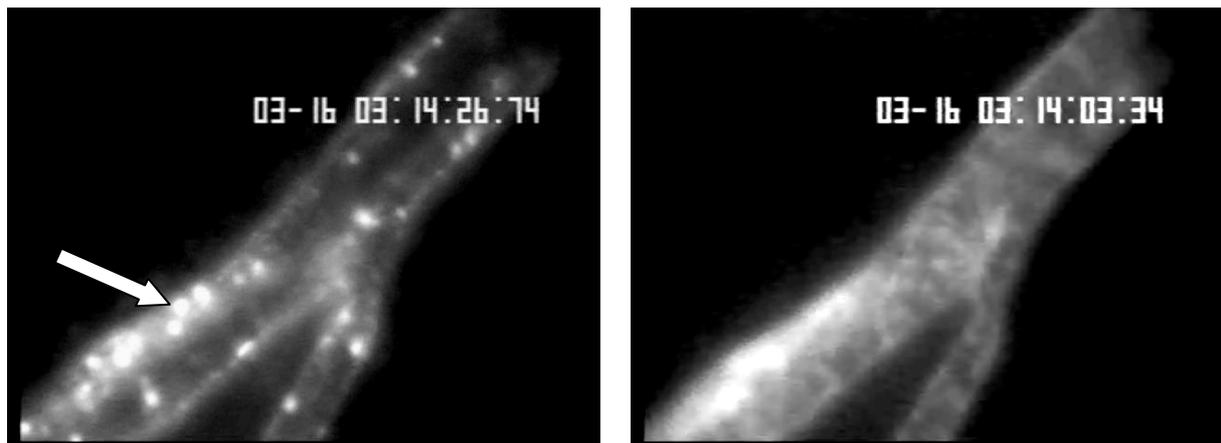


Abbildung 34: *Intravitalmikroskopische Aufnahmen im Verlauf der Perfusion nach ca. 3 Stunden (Standbilder von Videoaufzeichnungen).*
Links: Markierung der Leukozyten durch Rhodamin-6G. Adhärennte Leukozyten erkennbar (Pfeil).
Rechts: Kontrastanhebung des Plasmas durch FITC-Dextran. Korpuskuläre Bestandteile intravasal als Kontrastaussparung zu erkennen.

5. Diskussion

5.1. Grundlegende Überlegungen zur Modellentwicklung

Das Ziel ein Entzündungsmodell an der humanen Plazenta zu etablieren, mit der Möglichkeit der Testung von Wirkstoffen ist aus zwei grundsätzlichen Überlegungen entstanden. Zum Einen erscheint die Übertragbarkeit von Erkenntnissen auf den Menschen aus In-vitro-Modellen oder Tierversuchen im Test von z.B. antihumanen Antikörpern nur eingeschränkt möglich, wie der Fall TGN 1412 gezeigt hat. Auf der anderen Seite soll gezeigt werden, dass es neue alternative Untersuchungsmethoden von Wirkstoffen mit dem Ziel der Einsparung von Tierversuchen geben kann.

Über die Durchführung von Tierversuchen wird seit Jahren kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite wird der Versuch am Tier vor allem auf Grundlage von moralischen und ethischen Überlegungen in Frage gestellt. Als Grund für die Ablehnung von Tierversuchen wird angesehen, dass Tiere in ähnlicher Weise wie Menschen Emotionen wie Freude, Leid, Schmerz und Angst empfinden können und daher ein grundlegendes Recht auf Schutz vor menschlicher Gewalt und Willkür haben [68].

Auf der anderen Seite lassen sich Tierversuche mit der Begründung rechtfertigen, dass daraus wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, ohne die eine grundlegende Erforschung von Krankheiten und/oder die Anwendung von Wirkstoffen am Menschen nicht möglich ist. Unter Befürwortern von Tierversuchen gilt es als ethisch vertretbar, das Leiden von Tieren in Kauf zu nehmen, um das Leiden von Menschen zu verhindern [69].

Die rechtliche Grundlage für die Durchführung von Tierversuchen stellt das Tierschutzgesetz dar. Nach Paragraph 1 des Tierschutzgesetzes gilt das Tier als „Mitgeschöpf dessen Leben und Wohlbefinden zu schützen“ ist. Es ist verboten

Ihnen „ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden“ zuzufügen. Aus dem Paragraph 7 des Tierschutzgesetzes geht hervor, dass Tierversuche dann durchgeführt werden dürfen, wenn „sie zu einem der folgenden Zwecke unerlässlich sind: 1. Vorbeugen, Erkennen oder Behandeln von Krankheiten,... 2. Erkennen von Umweltgefährdungen,... 3. Prüfung von Stoffen oder Produkten auf ihre Unbedenklichkeit... 4. Grundlagenforschung.“

In den letzten Jahren lässt sich wieder eine Zunahme der Anzahl an Tierversuchen verzeichnen. Nach Angaben des Bundeslandwirtschaftsministeriums befanden sich im Jahr 2006 in Deutschland 2.518.267 Tiere in Versuchen. Damit wurde im Jahr 2006 an 105.589 mehr Tieren Versuche durchgeführt als im Jahr 2005, was einem Anstieg von 4,4 % gleichkommt. Die meisten Tierversuche werden in der Arzneimittelforschung, Kosmetikentwicklung und in der Grundlagenforschung durchgeführt.

Einigkeit besteht zweifelsohne darüber, dass die Anzahl von Tierversuchen auf ein absolut notwendiges Mindestmaß zu reduzieren ist. Unser Modell soll einen Beitrag dazu liefern, dass in der präklinischen Forschung valide, reproduzierbare Daten gewonnen werden können, ohne auf aufwendige Tierversuche zurückgreifen zu müssen.

Ausgehend von der dieser Arbeit zugrunde liegenden Überlegung konnte gezeigt werden, dass sich ein Entzündungsmodell an der humanen Plazenta etablieren ließ. Gerade vor dem Hintergrund der stetig steigenden Zahl an biologischen Medikamenten in präklinischer oder klinischer Forschung scheint die Anwendung des humanen Plazentaperfusionsmodells geeignet, um humanspezifische Wirkstoffe in einem streng allogenen System zu testen.

5.2. Material und Methoden

5.2.1 Humanes Plazentamodell

Unsere Arbeitsgruppe hat sich in den letzten Jahren u. a. mit der Erforschung des Einflusses von polyklonalen Antithymozyten Globulinen auf den Ischämie-Reperfusionsschaden bei Organtransplantation beschäftigt. Dabei wurde neben Untersuchungen am isoliert perfundierten Organ des Schweins [70] auch ein Modell der isoliert perfundierten Extremität des Primaten aus Gründen der nahen Verwandtschaft zum Menschen eingesetzt [71] [72]. Über alle ethisch-moralischen Überlegungen hinweg muss als Limitation des Primatenmodells konstatiert werden, dass es sich bei Perfusion mit Humanblut letztendlich um ein xenogenes Modell handelt, so dass die aus diesen Versuchen generierten Erkenntnisse bei der Übertragung auf den menschlichen Organismus nur als Hypothesen formuliert werden können.

Als Weiterentwicklung sollte nun die humane Plazenta als isoliert perfundiertes Organ eingesetzt werden. Diese bietet den Vorteil der leichten Zugänglichkeit zu einem humanen Gefäßsystem im nativen Zellverbund, so dass komplexe physiologische bzw. pathophysiologische Vorgänge untersucht werden können. Außerdem sind humane Plazenten leicht verfügbar und experimentelle Untersuchungen an diesem menschlichen Organ ethisch gut zu rechtfertigen. Darüber hinaus bietet das fetale Gefäßsystem durch die exponierte Lage auf der Plazentaoberfläche die Möglichkeit zu intravitalmikroskopischen Untersuchungen.

Voraussetzung für den Einsatz der humanen Plazenta ist die Entwicklung eines validen Modells zur Erforschung bestimmter Wirkstoffe. Wir wählten ein Modell der Entzündung unter Einsatz von LPS.

Es gibt zahlreiche gut etablierte Entzündungsmodelle an unterschiedlichen Spezies [60] [73] [74], die bei der Untersuchung von Entzündungsmechanismen oder bei der

Evaluierung therapeutischer Strategien zum Einsatz kommen. Unseres Wissens nach wird in dieser Arbeit zum ersten Mal ein Entzündungsmodell an der humanen Plazenta beschrieben. Dieses Modell vereint den Vorteil eines isoliert perfundierten Organs mit einem Experiment an menschlichem Gewebe in einem streng allogenen menschlichen System.

Limitationen des Modells:

Als einschränkend für das Modell kann gelten, dass es sich bei der Plazenta um ein primär ischämisches Gewebe handelt. Somit ist auch bei isolierter Perfusion die Überlebenszeit der Plazenta begrenzt, so dass die Durchführung von Langzeitversuchen nicht möglich ist. Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass die Perfusion der Plazenta unter dem Einsatz von Pufferlösungen für bis zu 12 Stunden bei gleich bleibendem arteriellem Druck und ohne Volumenverlust aus dem Perfusionskreislauf aufrechterhalten werden kann [51], auch wenn dies aus eigener Erfahrung unter dem Einsatz von Humanblut als Perfusat nicht möglich erscheint. Ferner ist unklar inwieweit die fetale Plazenta auf exogene Reize, wie z.B. LPS, gleichsinnig anderen menschlichen Organen reagiert. Gerade bei immunologischen Prozessen, wie sie bei Entzündungen stattfinden, ist zu mutmaßen, dass die Plazenta physiologischerweise zum Erhalt der Frucht inerte als andere Organe reagiert.

5.2.2 Perfusionssystem

Die humanen Plazenten wurden mithilfe eines ex-vivo Hämoperfusionssystem perfundiert. Dieses Perfusionssystem wurde bereits in zahlreichen früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe eingesetzt und lässt somit als etabliertes System reproduzierbare Ergebnisse zu. So konnte *Thein et al.* zeigen, dass das Perfusionssystem keinen negativen Einfluss auf Vollblut als Perfusat hat [64].

Allerdings kann eine gewisse Aktivierung peripherer Blutzellen durch Kontakt zu artifiziellen Oberflächen nicht ausgeschlossen werden. So zeigte sich in anderen Studien mit Verwendung eines ähnlichen Perfusionssystems eine geringe Leukozytendepletion [75]. Deshalb wurde bei Aufbau unserer Perfusionsvorrichtung streng darauf geachtet die Länge des verwendeten Schlauchsystems auf ein absolutes Minimum zu reduzieren, um die Kontaktfläche mit dem Perfusionsblut so gering wie möglich zu halten. Neben Zellaktivierung kommt es bei Kontakt von künstlichen Materialien und Vollblut zur Aktivierung des Gerinnungssystems [76] [77]. *Pascher et al.* konnten jedoch zeigen, dass die Komplementaktivierung durch das Perfusionssystem selbst zu vernachlässigen ist [63]. Außerdem wurde in unserem Setup eine Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems durch Heparinisierung des Perfusionsblutes erreicht.

Durch luftdichtes Abdichten des Blutreservoirs konnte ein geschlossener Kreislauf etabliert werden, aus dem zu jedem Zeitpunkt über die liegenden Dreiwegehähne Blutproben zur Messung von Laborparametern und für Blutgasanalysen entnommen werden konnte. Dies ermöglichte etwaige Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt innerhalb kürzester Zeit zu erkennen und über die Oxygenierung ausgleichen zu können.

In das Perfusionssystem war ein Intravitalmikroskop mit Epiilluminationseinheit integriert, womit erstmals gezeigt werden konnte, dass intravitalmikroskopische Aufnahmen der humanen Mikrozirkulation unter experimentellen Bedingungen möglich sind.

5.2.3 Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie ist ein optisches nicht-invasives Meßverfahren zur Darstellung der Mikrozirkulation. Sie geht zurück auf Beschreibungen von Julius

Friedrich Conheim Mitte des 19. Jahrhunderts. Sie ermöglicht als dynamische Untersuchungsmethode Aussage über die Gefäßperfusion und Zellinteraktion durch die selektive Anfärbung von Blutbestandteilen mit Fluoreszenzfarbstoffen [78]. Dadurch ist es möglich, in vivo Wechselwirkungen von Zellen in der Mikrozirkulation zu visualisieren und genauer zu studieren. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie gilt als Routineverfahren in der Erforschung von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen in unterschiedlichen Organen wie Leber [79], Myokard [80], Darm [81], Lunge [82], Gehirn [83]. Dabei kommen verschiedene Tiermodelle am Kanninchenohr [84], an der Hamsterbackentasche [85], sowie an der Rückenhautkammer, am Mesenterium und am Kremastermuskel von Ratte und Maus zum Einsatz [86] [87] [88].

In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal die Übertragung dieser experimentellen Methode auf ein humanes Organ beschrieben. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit des Studiums der komplexen Vorgänge im humanen vaskulären System unter standardisierten Untersuchungsbedingungen. Als limitierend für die Intravitalmikroskopie muss angesehen werden, dass nur oberflächliche Gefäße der Mikrozirkulation studiert werden können, nicht jedoch tiefer liegende oder größere Gefäße, wobei diese Limitation auch für andere Modelle gilt [89].

5.2.4 Versuchsdurchführung

Die menschliche Plazenta eignet sich hervorragend für ex-vivo Perfusionsversuche an humanem Gewebe. Da dabei eine Funktionseinheit eines gesamten humanen Organs untersucht wird, bietet dies entscheidende Vorteile gegenüber Untersuchungen an z. B. humanen Zellkulturen. So kommt es bei Kultivierung von HUVEC-Zellen zu einer Aktivierung der Zellen mit einem Anstieg der Replikationsrate von 0,1% pro Tag im „ruhenden“ in-vivo Zustand auf 1 bis 10% in der Zellkultur [90].

Dadurch kann sich der endotheliale Phänotyp mit Verlust spezifischer organbezogener Funktionen ändern [91].

Vor der Perfusion mit Humanblut wurden die Plazenten zunächst mit 4°C kalter heparinierter Natrium-Chlorid-Lösung von Blutresten freigespült, um toxische Metabolite auszuschwemmen und eine Thrombosierung der Gefäße zu verhindern. Im klinischen Alltag werden bestimmte Konservierungslösungen zum Spülen explantierter Organe in Vorbereitung einer Organtransplantation eingesetzt. Diese Lösungen sind mit wichtigen Substanzen zur Ernährung und Protektion von Zellen angereichert. Es wäre sicherlich von Vorteil gewesen auch bei unseren Experimenten eine Konservierungslösung, wie z.B. Euro-Collins, einzusetzen, um den Ischämie-Reperfusionsschaden so gering wie möglich zu halten. Allerdings ist aufgrund der Kürze der Ischämiephase von Entbindung bis zum Perfusionsbeginn mit ca. 40 Minuten von keiner größeren Schädigung im Sinne einer unspezifischen und nicht kontrollierbaren Entzündung der Plazenta auszugehen.

Um eine kontrollierte Entzündungsreaktion auszulösen, wurde dem Perfusat LPS zugesetzt. LPS ist auf äußeren Membranen gramnegativer Bakterien enthalten und wirkt bei Zerfall von Bakterien als Endotoxin [92]. Gelangt LPS ins Blut, bindet es an LBP (Lipopolysachharid-bindendes-Protein) und führt nach Komplexierung mit CD14 auf z.B. Monozyten zur Freisetzung von TNF und IL-1 [93] [94]. Insgesamt wurden 8 Versuche mit LPS durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten 8 Experimente ohne Zusatz von LPS.

Zu definierten Zeitpunkten wurden Blutproben aus dem Perfusionssystem entnommen, um die Anzahl peripherer Blutzellen zu Monitoren und um daraus ELISA- und FACS-Untersuchungen durchzuführen. Ferner wurde zu den festgelegten Zeitpunkten der kontinuierlich aufgezeichnete Perfusionsdruck festgehalten. Am Ende der Versuche wurden Gewebeproben zum Zweck der

histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung aus den perfundierten Plazentabereichen entnommen.

5.3. Ergebnisse

5.2.3 Hämatologische Parameter

Um herauszufinden, welchen Einfluss die Zugabe von LPS auf periphere Zellen im Perfusionsblut hatte, bestimmten wir die Konzentration der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten, sowie den Hämatokrit im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Festlegung der Meßzeitpunkte mit zunächst engmaschigen Intervallen innerhalb der ersten 60 Minuten geschah aufgrund der Tatsache, dass innerhalb der ersten Minuten nach Reperfusion eines Organs endotheliale Dysfunktion entsteht [95].

5.2.3.1 Hämatokrit

Das von den Spendern gewonnene Blut wurde zunächst auf einen Ausgangshämatokrit von 30 % verdünnt, bevor es der Perfusion zugeführt wurde. Dies diente der Herabsetzung der Viskosität zur Erleichterung der Perfusion bei ausreichender Sauerstofftransportfähigkeit zur adäquaten Oxygenierung des zu perfundierenden Gewebes [96]. Nach Verdünnung auf einen einheitlichen Ausgangswert ist ferner eine bessere Vergleichbarkeit der Gruppen gegeben.

Der beobachtete leichte Anstieg des Hämatokrits im Verlauf der Perfusion in beiden Gruppen lässt sich durch Elektrolytverschiebungen mit konsekutivem intravasalen Volumenverlust im Sinne einer Ödembildung in der perfundierten Plazenta erklären. Aus Untersuchungen zum Ischämie-Reperfusionsschaden geht hervor, dass es bei Reperfusion zu Mikrozirkulationsstörungen durch Leukozytenaktivierung, Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Zytokinen, sowie durch Akkumulation von toxischen Metaboliten kommt mit der Folge von Membrandesintegration und Ödembildung [97].

Außerdem ist eine gewisse Verdunstung von Flüssigkeit über das Schlauchsystem der Perfusionseinheit nicht ganz auszuschließen.

Insgesamt ist der Volumenverlust in unseren Versuchen als eher gering einzuschätzen, so dass von keinem negativen Einfluss auch nach mehrstündiger Perfusion ausgegangen wird.

5.2.3.2 Thrombozyten

Die Thrombozytenzahl zeigte sich in beiden Gruppen tendenziell abfallend über den Verlauf der Perfusion. Am ehesten ist der Verlust von Thrombozyten als Folge einer Vaskulopathie nach Ischämie-Reperfusion zu sehen. Wegen des kontinuierlichen Anstiegs des Perfusionsdrucks in der LPS-Gruppe gehen wir von einer Thrombozytenaggregation nach Interaktion mit dem Endothel mit anschließender Kapillarobstruktion aus [98]. Bestätigt wird die These durch die histologische Aufarbeitung der Proben nach Perfusion, da in der Übersichtsfärbung mit HE v. a. in der LPS-Gruppe einige thrombosierte Gefäße zu sehen waren.

Thrombozyten sind nicht nur maßgeblich an der Hämostase beteiligt, es gibt zunehmend auch Hinweise darauf, dass sie eine Rolle bei Entzündung und bei Abwehrmechanismen von bakteriellen Infekten spielen [99] [100], da eine rasche Akkumulation an Stellen einer Verletzung oder bakterieller Invasion gesehen wird [101]. Ferner gibt es Hinweise darauf, dass Thrombozyten gebunden an ausgewanderte Neutrophile extravaskulär zu finden sind [102]. Dies ist möglich durch die Fähigkeit über Expression von Adhäsionsmolekülen in direkten Zell-Zell-Kontakt mit anderen Zellen zu treten [103].

Es ist ersichtlich, dass zunehmend mehr Erkenntnisse über die Funktion von Thrombozyten bei Inflammation gewonnen werden, so dass ein weitergehendes Studium der Rolle von Thrombozyten bei Entzündungsprozessen lohnend erscheint.

Das in dieser Arbeit beschriebene Modell bietet die Möglichkeit z. B. Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in einem streng humanen System, auch unter Einsatz der Intravitalmikroskopie, weiter zu erforschen.

5.2.3.3 Leukozyten

Leukozytendepletion bei Reperfusion solider Organe ist ein bekanntes Phänomen. Die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten gilt als erster Schritt der zellvermittelten Mikrozirkulationsstörung mit anschließendem Gewebsuntergang im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens [104] [105]. Dies spiegelt sich auch in unserem Modell durch eine Reduktion der Leukozytenkonzentration in beiden Gruppen wider.

Außerdem spielt die Leukozyten-Endothel-Interaktion eine entscheidende Rolle bei der effektiven Abwehr bakterieller Infekte [106]. Leukozytäre Aktivierung führt zu einer gesteigerten Immunantwort [107] durch vermehrte Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α , Interleukin-1 β , und Interleukin-8 mit der Folge einer generalisierten Aktivierung von neutrophilen Granulozyten [108]. Sowohl die Ausschüttung von Mediatoren, als auch die Sequestration von Neutrophilen führen durch direkten Endothelschaden zur Störung der Mikrozirkulation [109]. Die Leukozytenrekrutierung in entzündetes Gewebe wird über eine erhöhte Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf der Leukozytenoberfläche vermittelt [110].

Die komplexe Rolle der Leukozyten bei Entzündung und die Leukozyten-Endothel-Interaktion können in dem hier vorgestellten humanen Modell erstmals unter in-vivo Bedingungen genauer erforscht werden. Es ist zu erwarten, dass die hieraus gewonnen Erkenntnisse besser auf die Klinik des Menschen übertragbar sind, da viele Tiermodelle nicht die Verhältnisse des menschlichen Systems widerspiegeln [111].

5.2.4 Vitalparameter

Als Parameter für die Vitalität des perfundierten Plazentagewebes wurde die $AVDO_2$ ermittelt. Der Verbrauch von Sauerstoff der humanen Plazenta in vivo ist groß. Zusammen mit anderen Organen wie Gehirn, Leber und Niere hat die Plazenta den höchsten Sauerstoffumsatz [112]. Nach Entbindung ist die Plazenta zunächst hypoxisch und wird erst nach Reperfusion wieder reoxygeniert. Aus anderen Versuchen an der humanen Plazenta geht hervor, dass der Sauerstoffverbrauch bei ex vivo Perfusion nur ein Bruchteil der Sauerstoffutilisation in vivo beträgt [113]. Dennoch sind Struktur und Funktionalität des perfundierten humanen Plazentagewebes erstaunlich gut [114]. Eine mögliche Erklärung dafür könnte ein gewisser metabolischer Arrest mit eingeschränkter Proteinsynthese in der humanen Plazenta sein [113]. In unseren Versuchen war zu jedem Zeitpunkt der Perfusion in beiden Gruppen ein Sauerstoffverbrauch im Vergleich des arteriellen Schenkels mit dem venösen Schenkel zu sehen. Setzt man voraus, dass es sich um ein geschlossenes System ohne Verlust von Sauerstoff über den Perfusionsschlauch handelt, so ist davon auszugehen, dass das perfundierte plazentare Gewebe bis zum Versuchsende vital war.

Neben dem Sauerstoffverbrauch wurde in unserem Versuchsaufbau kontinuierlich der Perfusionsdruck aufgezeichnet. Auch hierbei ist bei den konstant stabilen Perfusionsdrücken über den gesamten Zeitraum der Perfusion in der Kontrollgruppe unter physiologischer Perfusionsrate von Vitalität des perfundierten Gewebes auszugehen.

Die gezeigten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der LPS-Gruppe mit einem kontinuierlichen Anstieg des Perfusionsdrucks in der LPS-Gruppe könnte durch embolische oder thrombotische Gefäßverschlüsse verursacht sein. Hinweis

dafür liefert die histologische Aufarbeitung der perfundierten Plazenten durch Nachweis von mehr okkludierten Gefäßen in der LPS-Gruppe.

Auf der anderen Seite könnte der Anstieg des Perfusionsdruckes in der LPS-Gruppe mit einem direkten schädigenden Einfluß von LPS auf das Endothel mit konsekutiver Mikrozirkulationsstörung erklärt werden. Ziel ist es, diese Hypothese in weiteren Versuchsreihen mittels der in dieser Arbeit erstmalig beschriebenen Applikation der Intravitalmikroskopie am humanen Organ zu bestätigen. In der Literatur ist wenig über den Effekt von LPS oder Endotoxin auf den vaskulären Tonus der fetalen Zirkulation in der Plazenta zu finden. *Wagner et al.* konnten keinen Einfluss von LPS auf den Perfusionsdruck feststellen [115], wobei anzumerken ist, dass entgegen unseren Versuchen kein Vollblut zur Perfusion eingesetzt wurde.

5.2.5 ELISA

Da LPS als ein starker Stimulator für Entzündung gilt, erschien uns interessant, die Freisetzung ausgewählter Zytokine in unserem Modell zu bestimmen. Die Wahl fiel auf IL-1 β , IL-6 und TNF- α .

IL-1 β als hochpotentes Zytokin wird vor allem von Monozyten gebildet, aber auch von Makrophagen, Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten und anderen dendritischen Zellen, und gilt als zentraler Botenstoff in der Frühphase von Entzündungsreaktionen. Es wirkt als multifunktionelles Zytokin auf nahezu alle Zellarten [116]. Die biologische Wirkung ist mannigfaltig, u.a. kommt es unter dem Einfluss von IL-1 β zu einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und somit zur Zellaktivierung. Es wirkt als Pyrogen, verstärkt die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, fördert die Hämatopoese und führt zur Ausschüttung von Prostaglandinen [117]. Die Menge an zirkulierendem IL-1 β scheint mit dem Schweregrad bestimmter Erkrankungen zu korrelieren [118].

In unseren Versuchen zeigten sich erste messbare Werte nach 2 Stunden Perfusion mit einem deutlichen Unterschied der Werte nach 4 Stunden Perfusion zwischen den beiden Versuchsgruppen.

IL-6 als proinflammatorisches Zytokin wirkt ebenso auf vielfältige Weise und wird bei verschiedensten entzündlichen Stimuli von unterschiedlichen Zellarten wie Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen in vivo freigesetzt [119] [120]. Es stimuliert die Aktivierung und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten, induziert Fieber und reguliert die Synthese von Akute-Phase-Proteinen [121] [122] [123]. Somit spielt IL-6 bei der Regulation der Immunantwort im Rahmen der Abwehrmechanismen des menschlichen Organismus eine zentrale Rolle. In unseren Experimenten zeigten sich in beiden Gruppen erste nennenswert messbare IL-6-Konzentrationen nach 2 Stunden Perfusion mit einem deutlichen Unterschied nach LPS-Stimulation. Im weiteren Verlauf zeigte sich IL-6 nach 4 Stunden in beiden Gruppen weiter ansteigend.

TNF- α , auch als Cachectin bezeichnet, ist ein Interleukin, das bevorzugt von Monozyten/Makrophagen, aber auch von Lymphozyten gebildet wird [124]. Ferner wird eine Ausschüttung auch von Endothelzellen oder glatten Muskelzellen beobachtet. TNF- α hat als multifunktionales Zytokin sowohl wachstumsstimulierende, als auch wachstumshemmende Funktion und scheint einem autoregulativen Regelkreis zu unterliegen. Unter TNF- α -Einfluß kommt es bei Inflammation zur Proliferation von Neutrophilen, gleichzeitig führt aber auch die Bindung von TNF- α an den TNF-R55-Rezeptor zur Apoptose von Neutrophilen [125]. Entscheidende funktionelle Bedeutung hat TNF- α im Rahmen der Immunantwort auf bakterielle Infektionen. Es spielt eine Schlüsselrolle bei lokalen Entzündungsprozessen, indem es als Akute-Phase-Protein die Zytokinkaskade anstößt und durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität eine Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen in

entzündetem Gewebe ermöglicht. LPS als Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien ist ein sehr potenter Stimulus für die Ausschüttung von TNF- α [126]. In unseren Versuchen zeigte sich in beiden Gruppen ein Anstieg der TNF- α -Konzentration ab 60 Minuten Perfusion, bei allerdings deutlich höheren Werten in der mit LPS perfundierten Gruppe.

Der auch in der Kontrollgruppe zu beobachtende zunehmende Anstieg der Zytokinausschüttung ist auf die Ischämie der Plazenta nach Geburt zurückzuführen. Sowohl aus Untersuchungen an kultiviertem Plazentagewebe, wie auch aus Untersuchungen an isoliert perfundierten Plazentakotyledonen geht hervor, dass nach Reoxigenierung des Gewebes nach totaler Ischämie Zeichen eines Reperfusionsschadens zu sehen sind [127], der mit einer Ausschüttung von Zytokinen einhergeht.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass das gesamte System unseres Perfusionsmodells nach LPS-Stimulation mit einer Zytokinausschüttung, also im Sinne einer Immunantwort, auf den entzündlichen Stimulus reagiert, wobei nicht geklärt ist, zu welchem Anteil der Zytokin-Release von Zellen des Perfusionsblutes oder den Endothelzellen der Plazenta verursacht wurde.

5.2.6 FACS

Durchflußzytometrische Untersuchungen stellen ein weit verbreitetes Testverfahren in der Grundlagenforschung und der klinischen Immunologie dar und ermöglichen eine Aussage über den Aktivierungsgrad von Zellen durch Analyse der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle. Bereits in früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe fand die Durchflußzytometrie Anwendung. *Beiras-Fernandez et al.* konnten damit den Einfluss von verschiedenen polyklonalen Atithymozytenglobulinen (ATG) auf Adhäsionsmoleküle von Lymphozyten, Granulozyten und Thrombozyten in

humanem Vollblut gesunder Probanden nachweisen [128] [129]. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Aktivierung mononukleärer Zellen und Thrombozyten im Perfusionsblut mittels flowzytometrischer Analysen. Dabei zeigte die Expression von CD11a, CD11b und CD62L auf der Oberfläche von Lymphozyten signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der LPS-Gruppe entweder direkt nach LPS-Zugabe (CD62L und CD11b) oder im Verlauf der Perfusion (CD11a). Die initial hohe Expression von CD62L in den Lymphozyten der LPS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe kann als Folge der Aktivierung der Lymphozyten mit LPS im Sinne einer Inflammation interpretiert werden. Die Zunahme der CD62L-Expression ab dem Zeitpunkt 120 Minuten sehen wir möglicherweise als Reaktion auf einen Ischämie-Reperfusionsschaden.

Die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Neutrophilen zeigte signifikante Unterschiede zwischen beiden Studiengruppen. Bei insgesamt niedriger Fluoreszenzintensität zeigte sich eine höhere Expression für CD11a in der Kontrollgruppe im Vergleich zur LPS-Gruppe zu den Zeitpunkten 15 und 120 Minuten. Dabei ist anzumerken, dass die Expression von CD11a für die Adhäsion von Neutrophilen im Vergleich zu dem Integrin CD11b nur eine untergeordnete Rolle spielt. CD11b hingegen zeigte in beiden Gruppen einen signifikanten Anstieg der Expression im Verlauf der Perfusion, ohne Unterschiede zwischen beiden Gruppen aufzuweisen. Dies spricht für eine erhöhte Aktivierung in beiden Gruppen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass bereits die Reperfusion der Plazenta zu einem gewissen Aktivierungsgrad von Neutrophilen im Sinne eines Ischämie-Reperfusionsschadens führt, so dass auch der entzündliche Stimulus LPS keine zusätzlichen Expression von CD11b auf den Neutrophilen auszulösen vermag. Die Expression von CD62L auf Neutrophilen, notwendig für die endotheliale Adhäsion, reduzierte sich im Verlauf der Perfusion, allerdings ohne signifikante Unterschiede zwischen

den beiden Gruppen aufzuweisen. Eine mögliche Erklärung dafür ist das sog. Shedding von CD62L, also der Verlust des Adhäsionsmoleküls auf der Zelloberfläche, das bei zunehmender Schwere der Entzündungsreaktion beobachtet wird [130].

Über CD62P (P-Selectin) auf Thrombozyten wird die Thrombozyten-Endothel-Zellinteraktion vermittelt. Im Verlauf der Perfusion zeigte sich ohne Voraktivierung der Thrombozyten mit PMA eine nur geringe Expression von CD62P, ohne signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die anschließende Aktivierung mit PMA war notwendig, um herauszufinden inwieweit eine Stimulierbarkeit der Expression ausgelöst werden kann. Dabei zeigte sich, dass tendenziell eine allerdings nicht signifikante höhere Expression von CD62P in der Kontrollgruppe erreicht wurde, was für eine geringere Voraktivierung im Vergleich zur LPS-Gruppe sprechen könnte. Im Verlauf der Perfusion kam es dann in beiden Gruppen zu einer Reduktion der Expression von CD62P auf den Thrombozyten. Dies könnte für eine Zunahme thrombozytärer Clotts oder zunehmende Thrombozyten-Endothel-Zellinteraktion mit Verbrauch des Adhäsionsmoleküls CD62P sprechen. Keine Unterschiede zeigten sich für die Expression von CD41 auf Thrombozyten in beiden Gruppen. Auch nach PMA-Stimulation konnten bei insgesamt höherer Fluoreszenzintensität keine Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen ausgemacht werden.

5.2.7 Histologie und Immunhistochemie

Die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden an den Plazenten der Kontrollgruppe und der LPS-Gruppe nach vierstündiger Perfusion durchgeführt. Die histologische Aufarbeitung der Biopsate konnte zeigen, dass auch nach dem Zeitraum der Perfusion eine lichtmikroskopisch gute Ultrastruktur des

perfundierten plazentaren Gewebes ohne größere Läsionen vorlag. Dies ist deshalb bemerkenswert, weil in diesen Experimenten auf eine Perfusion der maternalen Seite verzichtet wurde. Offensichtlich ist die Bereitstellung von Nährstoffen und Sauerstoff aus dem fetalen Kreislauf ausreichend, um auch die „äußere“ Zelllage des Synzytiotrophoblasten vor lichtmikroskopisch nachweisbarem Zelluntergang zu bewahren. Dies steht im Gegensatz zu der in-vivo-Situation der Plazenta. Dort liefert die fetale Perfusion der Plazenta nur einen untergeordneten Beitrag zur Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des plazentaren Gewebes. Es konnte gezeigt werden, dass bereits innerhalb von 1-2 Minuten nach totaler Ischämie im maternalen Kreislauf deutliche ultrastrukturelle Veränderungen, vornehmlich die Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum betreffend, stattfinden [131]. Allerdings scheinen all diese Veränderungen innerhalb von wenigen Minuten nach normoxischer Perfusion vollständig reversibel zu sein, vorausgesetzt die totale Ischämiezeit überschreitet nicht 20 Minuten [131]. Demzufolge wurde auch bei unserem Versuchsaufbau darauf geachtet, innerhalb von 20 Minuten die Reperfusion zur Bereitstellung von Nährstoffen und Sauerstoff einzuleiten. Bei histologischen Untersuchungen nach sechsstündiger Plazentaperfusion unter normoxischen Bedingungen konnten nur moderate Veränderungen am villösen Gewebe im Vergleich zu histologischen Aufarbeitung von Biopsien vor Perfusion festgestellt werden [132]. Die elektronenmikroskopische Integrität bei der mehrstündigen unilateralen normoxischen Perfusion mit Humanblut muss in weitergehenden Versuchen untersucht werden.

In unseren immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich eine deutliche Positivität in beiden Gruppen für von Willebrand Faktor (vWF) im Bereich des fetalen Endothels. Antikörper gegen vWF gelten als verlässliche Marker für Endothelzellen und werden gemeinhin zur Identifizierung und Charakterisierung derselbigen

verwendet [133] [134] [135] [136] [137] [138]. VWF wird in Endothelzellen gebildet [139] und in Weibel-Palade-Körper und im endoplasmatischen Retikulum gespeichert [140] [141] [142]. Durch vWF wird die Aggregation von Thrombozyten und deren Adhäsion besonders am Subendothelium gefördert [143] [144]. Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass im Bereich der fetalen Mikrozirkulation ein heterogenes Expressionsmuster für bestimmte Endothelmarker besteht [67], was sich in unseren histologischen Untersuchungen auch nach vierstündiger Perfusion mit Humanblut nachvollziehen lässt, unabhängig davon ob eine Stimulation mit LPS erfolgte. vWF scheint also nur in geringem Maße in Mikrogefäßen der humanen Plazenta durch LPS stimulierbar zu sein. Es ist bekannt, dass grundsätzlich eine größere Heterogenität des endothelialen Expressionsmuster im Bereich von Mikrogefäßen im Vergleich zu dem Endothel von größeren Gefäßen besteht [145].

Die Heterogenität des fetalen Endothels der Mikrovaskularisation lässt sich auch bei der Interpretation der Befunde für die untersuchten Adhäsionsmoleküle nachvollziehen. Die starke Expression für ICAM-1 spricht für eine endotheliale Aktivierung, obgleich weder VCAM noch E-Selectin in beiden Gruppen nachgewiesen werden konnte. Dies entspricht Daten von Untersuchungen an Plazenten nach vaginaler Entbindung. Auch hier konnte ICAM aber nicht VCAM oder E-Selectin nachgewiesen werden [146] [147]. *Krailing et al.* berichteten über den Nachweis der Expression von E-Selectin in proliferierenden Endothelzellen der Mikrovaskularisation der Plazenta, was mit unseren Daten nicht nachvollzogen werden kann [148].

Eine der wichtigsten Aufgaben der Plazenta ist der selektive Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind. Gewährleistet wird dieser durch einen engen Zell-Zell-Kontakt zwischen den Endothelien. Verantwortlich hierfür sind zelluläre Adhäsionsmoleküle, die diese Kontakte vermitteln [149]. Eine bedeutende Rolle

kommt dabei dem VE-Cadherin zu [41]. Es wird in den lateralen Junctions des Endothels exprimiert und hält eine Barrierefunktion zum selektiven Stoffaustausch für Makromoleküle aufrecht. Antikörper gegen VE-Cadherin führen zu einer gesteigerten Permeabilität, sowohl in vivo als auch in vitro [149] [150] [151]. In unseren Versuchen zeigte sich eine annähernd gleiche Expression für VE-Cadherin sowohl in der Kontroll- als auch in der LPS-Gruppe. Dies deutet auf eine konstante Expression von VE-Cadherin in den Mikrogefäßen der humanen Plazenta unabhängig von einem entzündlichen Stimulus wie LPS hin. Dies erscheint in der pathophysiologischen Situation einer Entzündung wichtig, um auch in dieser Situation einen selektiven Stoffaustausch ohne gesteigerte endotheliale Permeabilität zu gewährleisten.

Es gibt Hinweise darauf, dass auch das Adhäsionsmolekül PECAM-1 an den endothelialen Zellkontakten in der Plazenta beteiligt ist [45]. PECAM-1 wird auf der Oberfläche von Thrombozyten und den meisten Leukozyten exprimiert [152] [153]. Zudem lässt sich PECAM-1 auf Endothelzellen nachweisen, wo es zwar in den interzellulären Junctions konzentriert ist, nicht jedoch mit Adherens Junctions oder Tight Junctions assoziiert ist [154]. Neben der Beteiligung an endotheliale Zell-Zell-Kontakt wird PECAM-1 eine Rolle bei der Vermittlung der transendothelialen Migration von Leukozyten zugeschrieben [155]. Nach Stimulation mit Entzündungsmediatoren zeigte sich bei fetalen Endothelien eine Umverteilung von PECAM-1 auf Kosten der parazellulären Zellverbindungen, was mit einer erhöhten Zellpermeabilität einher ging [156]. In unseren immunhistochemischen Untersuchungen zeigte PECAM-1 eine Positivität über die gesamte endotheliale Zellschicht, so dass von einer Verteilung von PECAM-1 über die gesamten Zelloberfläche ausgegangen werden kann, was im Einklang mit Berichten aus der Literatur ist [157].

Thrombomodulin als endothelialer Membranrezeptor aktiviert Protein C und spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Blutgerinnung durch die thrombinvermittelte Aktivierung von Protein C [158]. Darüber hinaus wirkt Thrombomodulin durch Reduktion der Leukozytenrekrutierung und Abschwächung der Komplement-Aktivierung antiinflammatorisch [159] [160]. Initial isoliert und charakterisiert wurde Thrombomodulin aus der humanen Plazenta [161]. Immunhistochemische Studien belegen, dass Thrombomodulin sowohl auf dem Endothel von placentaren Gefäßen, als auch an der Oberfläche des Synzytiotrophoblasten zu finden ist [162]. Dies zeigte sich auch in unseren Versuchen nach vierstündiger Perfusion, sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der LPS-Gruppe. Eine Verminderung der Expression von Thrombomodulin durch proinflammatorische Stimuli wie TNF konnte in unseren Versuchen nach Stimulation mit LPS nicht nachvollzogen werden [163].

Mit den ELISA-Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass es nach LPS-Stimulation zu einer signifikant höheren Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 und IL-6 kommt. Dass auch nach vierstündiger Perfusion eine Deposition der beschriebenen Zytokine im Plazentagewebe nachweisbar ist, zeigten unsere entsprechenden immunhistochemischen Färbungen. Der schwächere histochemische Nachweis der Zytokine auch in der Kontrollgruppe lässt sich abermals durch einen gewissen Reperfusionsschaden nach Reperfusion der fetalen Vaskularisation mit konsekutiver Reoxygenierung des placentaren Gewebes erklären. Im Gegensatz dazu muss die höhere Positivität dieser Zytokine im Gewebe der LPS-Gruppe als Antwort der Plazentazellen auf den inflammatorischen Stimulus gewertet werden.

Zusammenfassend konnte nach histologischer und immunhistochemischer Aufbereitung des perfundierten Plazentagewebes gezeigt werden, dass einerseits das fetale Endothel der humanen Plazenta typische endotheliale Marker, wie vWF,

VE-Cadherin, ICAM, PECAM oder Thrombomodulin exprimiert und sich somit die Plazenta hervorragend für Studien an humanem Endothel eignet. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass die Plazenta nach Stimulation mit LPS im Sinne einer inflammatorischen Antwort reagiert. Bestätigt wird dies durch die Beobachtung, dass es nach LPS-Perfusion zu einer erhöhten Lymphozyteninfiltration in das villöse Stroma der Plazenta kommt, wie in der immunhistochemische Färbung mit PAN-T dargestellt werden konnte.

6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Vor dem Hintergrund der zunehmenden Zahl von spezies-spezifischen biologischen Medikamente, wie z.B. anti-humanen Antikörpern, in präklinischer Forschung oder in klinischer Anwendung, sowie der stetig zunehmenden Anzahl von Tierversuchen, sollte in der vorliegenden Arbeit ein human-spezifisches Modell der Perfusion an der menschlichen Plazenta entwickelt werden. Ziel war es, zunächst ein Inflammationsmodell an der fetalen Zirkulation zu etablieren, dessen praktische Anwendung sowohl die Einsparung von Tierversuchen, als auch eine bessere Vorhersagbarkeit bei der Testung von spezies-spezifischen Medikamenten ermöglichen könnte. Nach vierstündiger Perfusion sollte das fetale Endothel immunhistochemisch charakterisiert und zudem die praktische Anwendung des Modells mit Intravitalmikroskopie demonstriert werden.

Hierzu erhielten wir 18 Plazenten nach elektiver Sektio und mit definierten Einschlusskriterien aus der gynäkologischen Abteilung des Klinikums Großhadern. Daraus bildeten wir zwei Gruppen mit je 8 Plazenten. Die eine Gruppe diente als Kontrollgruppe und wurde mit heparinisiertem humanem Vollblut über einen Zeitraum von vier Stunden perfundiert. Die andere Gruppe wurde unter den gleichen Bedingungen, allerdings mit dem Zusatz von LPS perfundiert und stellte somit die Verum-Gruppe dar. 2 Plazenten wurden für intravitalmikroskopische Untersuchungen verwandt. Über den Verlauf der Perfusion wurden hämodynamische Parameter zur Validierung des Modells erhoben. Zudem erfolgte zu definierten Zeitpunkten die Entnahme von Blutproben aus dem Perfusionssystem, um den Verlauf der Inflammation im Serum mittels ELISA, sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Lymphozyten, Neutrophilen und Thrombozyten mittels Flowzytometrie zu untersuchen. Am Ende der Perfusion wurden Biopsien zur

histologischen und immunhistochemischen Charakterisierung des Modells entnommen. Zudem wurden intravitalmikroskopische Aufnahmen bei der Perfusion des placentaren Gefäßsystems durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die über den Zeitraum der Perfusion bestimmten hämatologischen Parameter wie Hämatokrit, Thrombozyten und Leukozyten weitgehend stabil blieben. Zudem war zu jedem Zeitpunkt der Perfusion eine positive $AVDO_2$ als Zeichen für die Vitalität des perfundierten Gewebes errechnet worden. Bei Beobachtung des Perfusionsdrucks zeigte sich ein kontinuierlicher signifikanter Anstieg in der LPS-Gruppe, was als Reaktion auf den entzündlichen Stimulus gewertet wurde. Außerdem zeigten sich signifikante Unterschiede zugunsten der LPS-Gruppe bei der Bestimmung der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α im Serum des Perfusionsblutes als Ausdruck der Inflamationsreaktion. Weiterhin konnten wir signifikante Unterschiede in der Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD11b und CD62L auf Lymphozyten und Neutrophile zwischen Kontroll- und LPS-Gruppe zeigen. Nur geringe Unterschiede zeigten CD41 und CD62P auf den Thrombozyten, vor allem nach Aktivierung mit PMA. Die immunhistochemische Aufarbeitung der Biopsate am Ende der Perfusion zeigte eine typische Ausstattung mit endothelialen Markern mit dem Nachweis der Expression von vWF, ICAM-1, VE-Cadherin, PECAM-1 und Thrombomodulin am fetalen Endothel der placentaren Mikrovaskularisation bei erhöhter inflammatorischer Reaktion in der LPS-Gruppe mit vermehrter Deposition/Expression von proinflammatorischen Zytokinen.

Zum ersten Mal konnte an dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell die Anwendung der Intravitalmikroskopie an der isoliert perfundierten fetalen Plazenta des Menschen gezeigt werden.

Dies ermöglicht in weiteren Versuchsreihen das Studium der Mikrozirkulation in menschlichem Gewebe. Unter der Voraussetzung weiterer Evaluierungsstudien

könnte der Einsatz des von uns beschriebenen Modells in der Grundlagen- bzw. vorklinischen Forschung einen Beitrag dazu liefern, dass Tierversuche in Zukunft eingespart werden können und Versuchsergebnisse leichter in die Klinik übertragen werden können.

7. Literaturverzeichnis

1. Suntharalingam, G., Perry, M. R., Ward, S. et al.: Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med*, 355: 1018, 2006
2. Luhder, F., Huang, Y., Dennehy, K. M. et al.: Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J Exp Med*, 197: 955, 2003
3. Beyersdorf, N., Gaupp, S., Balbach, K. et al.: Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 202: 445, 2005
4. Kenter, M. J., Cohen, A. F.: Establishing risk of human experimentation with drugs: lessons from TGN1412. *Lancet*, 368: 1387, 2006
5. Hopkins, M.: Can super-antibody drugs be tamed? *Nature*, 440: 855, 2006
6. St Clair, E. W.: The calm after the cytokine storm: lessons from the TGN1412 trial. *J Clin Invest*, 118: 1344, 2008
7. vfa (Die forschenden Pharmaunternehmen): vfa-Positionspapier "Biosimilars". 2009
8. Frank, R. G.: Regulation of follow-on biologics. *N Engl J Med*, 357: 841, 2007
9. Shankar, G., Pendley, C., Stein, K. E.: A risk-based bioanalytical strategy for the assessment of antibody immune responses against biological drugs. *Nat Biotechnol*, 25: 555, 2007
10. Baumann, A.: Early development of therapeutic biologics--pharmacokinetics. *Curr Drug Metab*, 7: 15, 2006
11. Giezen, T. J., Mantel-Teeuwisse, A. K., Straus, S. M., Schellekens, H., Leufkens, H. G., Egberts, A. C.: Safety-related regulatory actions for biologics approved in the United States and the European Union. *Jama*, 300: 1887, 2008
12. Schellekens, H.: Follow-on biologics: challenges of the "next generation". *Nephrol Dial Transplant*, 20 Suppl 4: iv31, 2005
13. Molowa, D. T., Mazanet, R.: The state of biopharmaceutical manufacturing. *Biotechnol Annu Rev*, 9: 285, 2003
14. Chirino, A. J., Ary, M. L., Marshall, S. A.: Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics. *Drug Discov Today*, 9: 82, 2004
15. Ponce, R., Abad, L., Amaravadi, L. et al.: Immunogenicity of biologically-derived therapeutics: Assessment and interpretation of nonclinical safety studies. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2009

16. Brennan, F. R., Shaw, L., Wing, M. G., Robinson, C.: Preclinical safety testing of biotechnology-derived pharmaceuticals: understanding the issues and addressing the challenges. *Mol Biotechnol*, 27: 59, 2004
17. European Medicines Agency (EMA): Guideline on Requirements for First-in-Man Clinical Trials for Potential High-Risk Medicinal Products. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/2836707en.pdf>, 2007
18. Schneider, C. K., Kalinke, U., Lower, J.: TGN1412--a regulator's perspective. *Nat Biotechnol*, 24: 493, 2006
19. European Medicines Agency (EMA): ICH Topic S6. Note for Guidance on Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-derived Pharmaceuticals. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/030295en.pdf>, 1998
20. Hanke, T.: Lessons from TGN1412. *Lancet*, 368: 1569, 2006
21. Chapman, K., Pullen, N., Graham, M., Ragan, I.: Preclinical safety testing of monoclonal antibodies: the significance of species relevance. *Nat Rev Drug Discov*, 6: 120, 2007
22. Sims, J.: Assessment of biotechnology products for therapeutic use. *Toxicol Lett*, 120: 59, 2001
23. Neubert, R. T., Webb, J. R., Neubert, D.: Feasibility of human trials to assess developmental immunotoxicity, and some comparison with data on New World monkeys. *Hum Exp Toxicol*, 21: 543, 2002
24. Muller, P. Y., Brennan, F. R.: Safety assessment and dose selection for first-in-human clinical trials with immunomodulatory monoclonal antibodies. *Clin Pharmacol Ther*, 85: 247, 2009
25. Dempster, A. M.: Nonclinical safety evaluation of biotechnologically derived pharmaceuticals. *Biotechnol Annu Rev*, 5: 221, 2000
26. Vollmers, H. P., Brandlein, S.: Natural antibodies and cancer. *N Biotechnol*, 2009
27. Daniel, D., Yang, B., Lawrence, D. A. et al.: Cooperation of the proapoptotic receptor agonist rhApo2L/TRAIL with the CD20 antibody rituximab against non-Hodgkin lymphoma xenografts. *Blood*, 110: 4037, 2007
28. Shultz, L. D., Ishikawa, F., Greiner, D. L.: Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol*, 7: 118, 2007
29. Bursleson, G. R., Bursleson, F. G.: Testing human biologicals in animal host resistance models. *J Immunotoxicol*, 5: 23, 2008
30. Muller, N., van den Brandt, J., Odoardi, F. et al.: A CD28 superagonistic antibody elicits 2 functionally distinct waves of T cell activation in rats. *J Clin Invest*, 118: 1405, 2008

31. Kaufmann, P.: Basic morphology of the fetal and maternal circuits in the human placenta. *Contrib Gynecol Obstet*, 13: 5, 1985
32. Schuhmann, R. A.: Placentone structure of the human placenta. *Bibl Anat*: 46, 1982
33. Leiser, R., Kaufmann, P.: Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol*, 102: 122, 1994
34. Simone, C., Derewlany, L. O., Koren, G.: Drug transfer across the placenta. Considerations in treatment and research. *Clin Perinatol*, 21: 463, 1994
35. Kaufmann, P., Sen, D. K., Schweikhart, G.: Classification of human placental villi. I. Histology. *Cell Tissue Res*, 200: 409, 1979
36. Sen, D. K., Kaufmann, P., Schweikhart, G.: Classification of human placental villi. II. Morphometry. *Cell Tissue Res*, 200: 425, 1979
37. Kaufmann, P.: Development and differentiation of the human placental villous tree. *Bibl Anat*: 29, 1982
38. Kohnen, G., Kertschanska, S., Demir, R., Kaufmann, P.: Placental villous stroma as a model system for myofibroblast differentiation. *Histochem Cell Biol*, 105: 415, 1996
39. Demir, R., Kosanke, G., Kohnen, G., Kertschanska, S., Kaufmann, P.: Classification of human placental stem villi: review of structural and functional aspects. *Microsc Res Tech*, 38: 29, 1997
40. Graf, R., Matejevic, D., Schuppan, D., Neudeck, H., Shakibaei, M., Vetter, K.: Molecular anatomy of the perivascular sheath in human placental stem villi: the contractile apparatus and its association to the extracellular matrix. *Cell Tissue Res*, 290: 601, 1997
41. Leach, L., Firth, J. A.: Structure and permeability of human placental microvasculature. *Microsc Res Tech*, 38: 137, 1997
42. Leach, L., Eaton, B. M., Firth, J. A., Contractor, S. F.: Immunogold localisation of endogenous immunoglobulin-G in ultrathin frozen sections of the human placenta. *Cell Tissue Res*, 257: 603, 1989
43. Dye, J. F., Jablenska, R., Donnelly, J. L. et al.: Phenotype of the endothelium in the human term placenta. *Placenta*, 22: 32, 2001
44. Lang, I., Hartmann, M., Blaschitz, A., Dohr, G., Skofitsch, G., Desoye, G.: Immunohistochemical evidence for the heterogeneity of maternal and fetal vascular endothelial cells in human full-term placenta. *Cell Tissue Res*, 274: 211, 1993
45. Leach, L., Clark, P., Lampugnani, M. G., Arroyo, A. G., Dejana, E., Firth, J. A.: Immunoelectron characterisation of the inter-endothelial junctions of human term placenta. *J Cell Sci*, 104 (Pt 4): 1073, 1993

46. Leach, L., Bhasin, Y., Clark, P., Firth, J. A.: Isolation of endothelial cells from human term placental villi using immunomagnetic beads. *Placenta*, 15: 355, 1994
47. Krantz, K. E., Panos, T. C., Evans, J.: Physiology of maternal-fetal relationship through the extracorporeal circulation of the human placenta. *Am J Obstet Gynecol*, 83: 1214, 1962
48. Panigel, M., Pascaud, M., Brun, J. L.: [Radioangiographic study of circulation in the villi and intervillous space of isolated human placental cotyledon kept viable by perfusion]. *J Physiol (Paris)*, 59: 277, 1967
49. Schneider, H., Huch, A.: Dual in vitro perfusion of an isolated lobe of human placenta: method and instrumentation. *Contrib Gynecol Obstet*, 13: 40, 1985
50. Schneider, H., Panigel, M., Dancis, J.: Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium and leucine. *Am J Obstet Gynecol*, 114: 822, 1972
51. Miller, R. K., Wier, P. J., Maulik, D., di Sant'Agnese, P. A.: Human placenta in vitro: characterization during 12 h of dual perfusion. *Contrib Gynecol Obstet*, 13: 77, 1985
52. Bourget, P., Roulot, C., Fernandez, H.: Models for placental transfer studies of drugs. *Clin Pharmacokinet*, 28: 161, 1995
53. Myren, M., Mose, T., Mathiesen, L., Knudsen, L. E.: The human placenta--an alternative for studying foetal exposure. *Toxicol In Vitro*, 21: 1332, 2007
54. Malek, A., Ivy, D., Blann, E., Mattison, D. R.: Impact of cocaine on human placental function using an in vitro perfusion system. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 33: 213, 1995
55. Polachek, H., Holcberg, G., Sapir, G. et al.: Transfer of ciprofloxacin, ofloxacin and levofloxacin across the perfused human placenta in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 122: 61, 2005
56. Forestier, F., de Renty, P., Peytavin, G., Dohin, E., Farinotti, R., Mandelbrot, L.: Maternal-fetal transfer of saquinavir studied in the ex vivo placental perfusion model. *Am J Obstet Gynecol*, 185: 178, 2001
57. Myllynen, P. K., Pienimäki, P. K., Vahakangas, K. H.: Transplacental passage of lamotrigine in a human placental perfusion system in vitro and in maternal and cord blood in vivo. *Eur J Clin Pharmacol*, 58: 677, 2003
58. Polliotti, B. M., Holmes, R., Cornish, J. D. et al.: Long-term dual perfusion of isolated human placental lobules with improved oxygenation for infectious diseases research. *Placenta*, 17: 57, 1996
59. Sastry, B. V., Chance, M. B., Hemontolor, M. E., Goddijn-Wessel, T. A.: Formation and retention of cotinine during placental transfer of nicotine in human placental cotyledon. *Pharmacology*, 57: 104, 1998
60. Poli-de-Figueiredo, L. F., Garrido, A. G., Nakagawa, N., Sannomiya, P.: Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*, 30 Suppl 1: 53, 2008

61. Barnard, D. L.: Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Res*, 82: A110, 2009
62. Dyson, A., Singer, M.: Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med*, 37: S30, 2009
63. Pascher, A., Poehlein, C., Stangl, M. et al.: Application of immunoapheresis for delaying hyperacute rejection during isolated xenogeneic pig liver perfusion. *Transplantation*, 63: 867, 1997
64. Thein, E., Sevilimis, G., Muenzing, S., Hammer, C., Messmer, K.: Evaluation of a system for the perfusion of isolated, rodent organs. *Xenotransplantation*, 8: 94, 2001
65. Kovac, C. M., Howard, B. C., Pierce, B. T., Hoeldtke, N. J., Calhoun, B. C., Napolitano, P. G.: Fetoplacental vascular tone is modified by magnesium sulfate in the preeclamptic ex vivo human placental cotyledon. *Am J Obstet Gynecol*, 189: 839, 2003
66. Hoeldtke, N. J., Napolitano, P. G., Moore, K. H., Calhoun, B. C., Hume, R. F., Jr.: Fetoplacental vascular tone during fetal circuit acidosis and acidosis with hypoxia in the ex vivo perfused human placental cotyledon. *Am J Obstet Gynecol*, 177: 1088, 1997
67. Lang, I., Pabst, M. A., Hiden, U. et al.: Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Eur J Cell Biol*, 82: 163, 2003
68. Gericke, S.: Tierversuche-Einführung in die Problematik. <http://tierrechte.de/p200060001001x1113x4.html>, 2009
69. Deutsche Forschungsgemeinschaft: Tierversuche in der Forschung. VHC Verlagsgesellschaft, 1993
70. Storck, M., Abendroth, D., Prestel, R. et al.: Morphology of hDAF (CD55) transgenic pig kidneys following ex-vivo hemoperfusion with human blood. *Transplantation*, 63: 304, 1997
71. Beiras-Fernandez, A., Thein, E., Chappell, D., Hammer, C.: Morphological assessment of reperfusion injury in a concordant xenogeneic primate model. *Ann Transplant*, 8: 50, 2003
72. Chappell, D., Beiras-Fernandez, A., Hammer, C., Thein, E.: In vivo visualization of the effect of polyclonal antithymocyte globulins on the microcirculation after ischemia/reperfusion in a primate model. *Transplantation*, 81: 552, 2006
73. Goldfarb, R. D., Dellinger, R. P., Parrillo, J. E.: Porcine models of severe sepsis: emphasis on porcine peritonitis. *Shock*, 24 Suppl 1: 75, 2005
74. Redl, H., Bahrami, S., Schlag, G., Traber, D. L.: Clinical detection of LPS and animal models of endotoxemia. *Immunobiology*, 187: 330, 1993

75. Storck, M., Abendroth, D., White, D. J., Pino-Chavez, G., Fakler, J. A., Hammer, C.: [Transgenic swine as potential organ donors? Results of the ex-vivo hemoperfusion hDAF transgenic kidney with human blood]. *Zentralbl Chir*, 123: 785, 1998
76. Du, Y. J., Klement, P., Berry, L. R., Tressel, P., Chan, A. K.: In vivo rabbit acute model tests of polyurethane catheters coated with a novel antithrombin-heparin covalent complex. *Thromb Haemost*, 94: 366, 2005
77. Gorbet, M. B., Sefton, M. V.: Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*, 25: 5681, 2004
78. Menger, M. D., Lehr, H. A.: Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today*, 14: 519, 1993
79. Khandoga, A., Kessler, J. S., Meissner, H. et al.: Junctional adhesion molecule-A deficiency increases hepatic ischemia-reperfusion injury despite reduction of neutrophil transendothelial migration. *Blood*, 106: 725, 2005
80. Kupatt, C., Wichels, R., Horstkotte, J., Krombach, F., Habazettl, H., Boekstegers, P.: Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *J Leukoc Biol*, 72: 455, 2002
81. Massberg, S., Enders, G., Matos, F. C. et al.: Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood*, 94: 3829, 1999
82. Kuebler, W. M., Parthasarathi, K., Lindert, J., Bhattacharya, J.: Real-time lung microscopy. *J Appl Physiol*, 102: 1255, 2007
83. Beck, J., Stummer, W., Lehmborg, J., Baethmann, A., Uhl, E.: Leukocyte-endothelium interactions in global cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl*, 70: 53, 1997
84. Komori, M., Takada, K., Tomizawa, Y., Uezono, S., Nishiyama, K., Ozaki, M.: Effects of colloid resuscitation on peripheral microcirculation, hemodynamics, and colloidal osmotic pressure during acute severe hemorrhage in rabbits. *Shock*, 23: 377, 2005
85. Carvalho, H., Pittman, R. N.: Longitudinal and radial gradients of PO₂ in the hamster cheek pouch microcirculation. *Microcirculation*, 15: 215, 2008
86. Fiedler, U., Reiss, Y., Scharpfenecker, M. et al.: Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med*, 12: 235, 2006
87. Hickey, M. J., Forster, M., Mitchell, D., Kaur, J., De Caigny, C., Kubes, P.: L-selectin facilitates emigration and extravascular locomotion of leukocytes during acute inflammatory responses in vivo. *J Immunol*, 165: 7164, 2000
88. McLean, P. G., Perretti, M., Ahluwalia, A.: Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc Res*, 48: 194, 2000

89. Menger, M. D., Marzi, I., Messmer, K.: In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res*, 23: 158, 1991
90. Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A. et al.: Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91: 3527, 1998
91. Grant, D. S., Tashiro, K., Segui-Real, B., Yamada, Y., Martin, G. R., Kleinman, H. K.: Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell*, 58: 933, 1989
92. Gioannini, T. L., Weiss, J. P.: Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunol Res*, 39: 249, 2007
93. Pugin, J., Ulevitch, R. J., Tobias, P. S.: A critical role for monocytes and CD14 in endotoxin-induced endothelial cell activation. *J Exp Med*, 178: 2193, 1993
94. Bosshart, H., Heinzelmann, M.: Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin. *Ann N Y Acad Sci*, 1096: 1, 2007
95. Tsao, P. S., Lefer, A. M.: Time course and mechanism of endothelial dysfunction in isolated ischemic- and hypoxic-perfused rat hearts. *Am J Physiol*, 259: H1660, 1990
96. Messmer, K., Sunder-Plassmann, L., Jesch, F., Gornandt, L., Sinagowitz, E., Kessler, M.: Oxygen supply to the tissues during limited normovolemic hemodilution. *Res Exp Med (Berl)*, 159: 152, 1973
97. Massberg, S., Messmer, K.: The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*, 30: 4217, 1998
98. Gavins, F., Yilmaz, G., Granger, D. N.: The evolving paradigm for blood cell-endothelial cell interactions in the cerebral microcirculation. *Microcirculation*, 14: 667, 2007
99. von Hundelshausen, P., Weber, C.: Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res*, 100: 27, 2007
100. Klinger, M. H., Jelkmann, W.: Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res*, 22: 913, 2002
101. Weyrich, A. S., Zimmerman, G. A.: Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol*, 25: 489, 2004
102. Issekutz, A. C., Ripley, M., Jackson, J. R.: Role of neutrophils in the deposition of platelets during acute inflammation. *Lab Invest*, 49: 716, 1983
103. Zarbock, A., Polanowska-Grabowska, R. K., Ley, K.: Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev*, 21: 99, 2007
104. Kieran, N. E., Rabb, H.: Immune responses in kidney preservation and reperfusion injury. *J Investig Med*, 52: 310, 2004

105. Boros, P., Bromberg, J. S.: New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant*, 6: 652, 2006
106. Butcher, E. C.: Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 67: 1033, 1991
107. Hotchkiss, R. S., Karl, I. E.: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348: 138, 2003
108. De Backer, D., Creteur, J., Preiser, J. C., Dubois, M. J., Vincent, J. L.: Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 166: 98, 2002
109. Lam, C., Tyml, K., Martin, C., Sibbald, W.: Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. *J Clin Invest*, 94: 2077, 1994
110. Rothlein, R., Wegner, C.: Role of intercellular adhesion molecule-1 in the inflammatory response. *Kidney Int*, 41: 617, 1992
111. Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J., Kolb, M.: The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol*, 40: 362, 2008
112. Carter, A. M.: Placental oxygen consumption. Part I: in vivo studies--a review. *Placenta*, 21 Suppl A: S31, 2000
113. Schneider, H.: Placental oxygen consumption. Part II: in vitro studies--a review. *Placenta*, 21 Suppl A: S38, 2000
114. Illsley, N. P., Fox, H., Van der Veen, F., Chawner, L., Penfold, P.: Human placental ultrastructure after in vitro dual perfusion. *Placenta*, 6: 23, 1985
115. Wagner, R. K., Hinson, R. M., Apodaca, C. C. et al.: Effects of lipopolysaccharide on interleukin-6 production in perfused human placental cotyledons. *J Matern Fetal Med*, 9: 351, 2000
116. Dinarello, C. A.: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87: 2095, 1996
117. Dinarello, C. A., Wolff, S. M.: The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med*, 328: 106, 1993
118. Casey, L. C., Balk, R. A., Bone, R. C.: Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*, 119: 771, 1993
119. Van Snick, J.: Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol*, 8: 253, 1990
120. Akira, S., Hirano, T., Taga, T., Kishimoto, T.: Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *Faseb J*, 4: 2860, 1990
121. Kishimoto, T., Hirano, T.: Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annu Rev Immunol*, 6: 485, 1988

122. Hirano, T.: Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. *Clin Immunol Immunopathol*, 62: S60, 1992
123. Fridman, W. H., Michon, J.: Pathophysiology of cytokines. *Leuk Res*, 14: 675, 1990
124. Beutler, B., Cerami, A.: The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*, 7: 625, 1989
125. Murray, J., Barbara, J. A., Dunkley, S. A. et al.: Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood*, 90: 2772, 1997
126. Tracey, K. J., Cerami, A.: Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med*, 45: 491, 1994
127. Di Santo, S., Malek, A., Sager, R., Andres, A. C., Schneider, H.: Trophoblast viability in perfused term placental tissue and explant cultures limited to 7-24 hours. *Placenta*, 24: 882, 2003
128. Beiras-Fernandez, A., Walther, S., Kaczmarek, I. et al.: In vitro influence of polyclonal anti-thymocyte globulins on leukocyte expression of adhesion molecules. *Exp Clin Transplant*, 3: 370, 2005
129. Beiras-Fernandez, A., Walther, S., Thein, E., Muenzing, S., Hammer, C.: Influence of polyclonal ATGs on expression of adhesion molecules: an experimental study. *Transplant Proc*, 37: 1944, 2005
130. Ferri, L. E., Chia, S., Benay, C., Giannias, B., Christou, N. V.: L-selectin shedding in sepsis limits leukocyte mediated microvascular injury at remote sites. *Surgery*, 145: 384, 2009
131. Kaufmann, P.: Influence of ischemia and artificial perfusion on placental ultrastructure and morphometry. *Contrib Gynecol Obstet*, 13: 18, 1985
132. Bachmaier, N., Linnemann, K., May, K. et al.: Ultrastructure of human placental tissue after 6 h of normoxic and hypoxic dual in vitro placental perfusion. *Placenta*, 28: 861, 2007
133. Hewett, P. W., Murray, J. C.: Human microvessel endothelial cells: isolation, culture and characterization. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 29A: 823, 1993
134. Neumuller, J., Neumuller-Guber, S. E., Lipovac, M. et al.: Immunological and ultrastructural characterization of endothelial cell cultures differentiated from human cord blood derived endothelial progenitor cells. *Histochem Cell Biol*, 126: 649, 2006
135. Kriehuber, E., Breiteneder-Geleff, S., Groeger, M. et al.: Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med*, 194: 797, 2001

136. Grooby, W. L., Krishnan, R., Russ, G. R.: Characterization of ovine umbilical vein endothelial cells and their expression of cell adhesion molecules: comparative study with human endothelial cells. *Immunol Cell Biol*, 75: 21, 1997
137. Spatz, M., Kawai, N., Merkel, N., Bembry, J., McCarron, R. M.: Functional properties of cultured endothelial cells derived from large microvessels of human brain. *Am J Physiol*, 272: C231, 1997
138. Nachman, R. L., Jaffe, E. A.: Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. *J Clin Invest*, 114: 1037, 2004
139. Jaffe, E. A., Hoyer, L. W., Nachman, R. L.: Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*, 52: 2757, 1973
140. Wagner, D. D., Olmsted, J. B., Marder, V. J.: Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol*, 95: 355, 1982
141. Warhol, M. J., Sweet, J. M.: The ultrastructural localization of von Willebrand factor in endothelial cells. *Am J Pathol*, 117: 310, 1984
142. Dorovini-Zis, K., Prameya, R., Bowman, P. D.: Culture and characterization of microvascular endothelial cells derived from human brain. *Lab Invest*, 64: 425, 1991
143. Bona, R. D.: Von Willebrand factor and von Willebrand's disease: a complex protein and a complex disease. *Ann Clin Lab Sci*, 19: 184, 1989
144. Kahaleh, M. B.: The role of vascular endothelium in the pathogenesis of connective tissue disease: endothelial injury, activation, participation and response. *Clin Exp Rheumatol*, 8: 595, 1990
145. Kumar, S., West, D. C., Ager, A.: Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation*, 36: 57, 1987
146. Steinborn, A., Sohn, C., Heger, S., Niederhut, A., Hildenbrand, R., Kaufmann, M.: Labour-associated expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in placental endothelial cells indicates participation of immunological processes in parturition. *Placenta*, 20: 567, 1999
147. Lyall, F., Greer, I. A., Boswell, F., Young, A., Macara, L. M., Jeffers, M. D.: Expression of cell adhesion molecules in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth retardation. *Placenta*, 16: 579, 1995
148. Kraling, B. M., Razon, M. J., Boon, L. M. et al.: E-selectin is present in proliferating endothelial cells in human hemangiomas. *Am J Pathol*, 148: 1181, 1996
149. Lampugnani, M. G., Resnati, M., Raiteri, M. et al.: A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol*, 118: 1511, 1992
150. Gotsch, U., Borges, E., Bosse, R. et al.: VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci*, 110 (Pt 5): 583, 1997

151. Hordijk, P. L., Anthony, E., Mul, F. P., Rientsma, R., Oomen, L. C., Roos, D.: Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability. *J Cell Sci*, 112 (Pt 12): 1915, 1999
152. DeLisser, H. M., Newman, P. J., Albelda, S. M.: Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today*, 15: 490, 1994
153. Watt, S. M., Gschmeissner, S. E., Bates, P. A.: PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma*, 17: 229, 1995
154. Ayalon, O., Sabanai, H., Lampugnani, M. G., Dejana, E., Geiger, B.: Spatial and temporal relationships between cadherins and PECAM-1 in cell-cell junctions of human endothelial cells. *J Cell Biol*, 126: 247, 1994
155. Muller, W. A., Weigl, S. A., Deng, X., Phillips, D. M.: PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*, 178: 449, 1993
156. Leach, L., Eaton, B. M., Westcott, E. D., Firth, J. A.: Effect of histamine on endothelial permeability and structure and adhesion molecules of the paracellular junctions of perfused human placental microvessels. *Microvasc Res*, 50: 323, 1995
157. Romer, L. H., McLean, N. V., Yan, H. C., Daise, M., Sun, J., DeLisser, H. M.: IFN-gamma and TNF-alpha induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. *J Immunol*, 154: 6582, 1995
158. Esmon, C.: Do-all receptor takes on coagulation, inflammation. *Nat Med*, 11: 475, 2005
159. Conway, E. M., Van de Wouwer, M., Pollefeyt, S. et al.: The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med*, 196: 565, 2002
160. Van de Wouwer, M., Plaisance, S., De Vriese, A. et al.: The lectin-like domain of thrombomodulin interferes with complement activation and protects against arthritis. *J Thromb Haemost*, 4: 1813, 2006
161. Salem, H. H., Maruyama, I., Ishii, H., Majerus, P. W.: Isolation and characterization of thrombomodulin from human placenta. *J Biol Chem*, 259: 12246, 1984
162. Maruyama, I., Bell, C. E., Majerus, P. W.: Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J Cell Biol*, 101: 363, 1985
163. Conway, E. M., Rosenberg, R. D.: Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. *Mol Cell Biol*, 8: 5588, 1988

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. med. G. Enders verpflichtet, der mich ohne Vorbehalte als Doktorand übernahm und dadurch die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichte.

Mein größter Dank gilt Herrn Dr. med. vet. E. Thein. Unter seiner Anleitung lernte ich wissenschaftliches Arbeiten von der Versuchsplanung bis zur kritischen Interpretation der Daten. Für seinen stets kompetenten Rat und seine freundschaftliche Verbundenheit bin ich ihm außerordentlich dankbar.

Besonderen Dank möchte ich auch Priv. Doz. Dr. med A. Beiras Fernandez aussprechen. Sein unermüdlicher und motivierender Einsatz sowohl bei der Auswertung als auch bei der Ausarbeitung hat maßgeblich zur Realisierung dieser Arbeit beigetragen.

Für die Möglichkeit der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen an dem Institut für Pathologie der Universität Santiago de Compostela und die hervorragende wissenschaftlich Anleitung bin ich Prof. Dr. A. Beiras Iglesias, Prof. Dr. J. Forteza Vila und Prof. Dr. T. Garcia außerordentlich dankbar.

Ich danke weiterhin Frau A. Allmeling, Frau S. Münzing und Frau A. Schropp für die technische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Meinen lieben Eltern danke ich für die allumfassende und grenzenlose Unterstützung in meinem Leben. Ohne sie wäre dieser berufliche Werdegang nicht möglich gewesen. Deshalb möchte ich ihnen diese Arbeit widmen.

Mein ganz besonderer Dank gilt allerdings meiner lieben Ehefrau Marina und meinem Sohn Maximilian, die mir durch ihren immerwährenden Beistand in Worten und Gesten und durch den Verzicht auf viele gemeinsame Stunden die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit ermöglichten.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

<i>Name</i>	Sebastian Walther
<i>Geburtsdatum</i>	4. Januar 1978
<i>Geburtsort</i>	München
<i>Familienstand</i>	verheiratet mit Marina Walther, geb. Maier (Dipl. Soz. Päd./FH), ein gemeinsamer Sohn
<i>Staatsangehörigkeit</i>	deutsch
<i>Eltern</i>	Dr. med. Volker Walther (Urologe) Ulrike Walther (Diätassistentin)
<i>Geschwister</i>	Alexandra Kurvin (Ärztin) Florian Walther (Dipl.-Ing./FH)

SCHULISCHE AUSBILDUNG

<i>1984 - 1990</i>	Grundschule Neustift, Passau
<i>1988 - 1997</i>	Maristengymnasium, Fürstenzell
<i>1997</i>	Abschluss Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

ZIVILDIENTST

<i>09/1997 – 07/1998</i>	Zivildienst in der Allgemein chirurgischen Abteilung des Klinikums Passau
--------------------------	--

STUDIUM

<i>09/ 1999 – 09/2001</i>	Medizinstudium an der Universität Regensburg
<i>08/2001</i>	Ärztliche Vorprüfung
<i>09/2001– 04/2006</i>	Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
<i>08/2002</i>	erstes Staatsexamen
<i>09/2004</i>	zweites Staatsexamen
<i>04/2006</i>	drittes Staatsexamen

BERUFLICHE AUSBILDUNG

<i>05/2006</i>	Approbation als Arzt
<i>Seit 07/2006</i>	Wissenschaftlicher Angestellter an der Klinik für Urologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. C. Stief)

München, August 2009