

III. Methodik

III.1. Material

Als Material dienten 24 Plazenten von term-eutrophen Schwangerschaften. Davon stammten 8 Plazenten von Frauen mit einem Schwangerschaftsdiabetes und 16 Plazenten von gesunden Schwangeren. Die 24 Plazenten wurden je nach Experiment-Verlaufsrichtung, dem Vorliegen eines Diabetes bzw. der Hinzugabe von Metformin sechs Gruppen zugeordnet, die sich folgendermaßen verteilen:

Untersuchungsgruppe	Experiment-Verlaufsrichtung	
	Mutter zu Fetus	Fetus zu Mutter
Schwangerschaftsdiabetes + Metformin (Gruppe 1)	4	4
Gesunde Schwangere + Metformin (Gruppe 2)	4	4
Kontrolle (Gruppe 3) gesund, ohne Metformin	4	4

Den 8 Plazenten von Schwangerschaftsdiabetikerinnen wurde Metformin zugesetzt. Von den 16 Plazenten gesunder Schwangerer wurden 8 ebenfalls mit Metformin getestet, die restlichen 8 fungierten als Kontrollplazenten, das heißt, sie wurden ohne Zugabe von Metformin untersucht. „Mutter zu Fetus“ bzw. „Fetus zu Mutter“ bezeichnet die entsprechende Perfusionsrichtung im Experiment.

III.2. Versuchsaufbau

Als Modell wurde das „Zirkulierende Einzelkotyledonen-Modell der menschlichen Plazenta“ (im Original: "Recirculating single cotyledon human placental model"³⁴) verwendet, das aus zwei getrennten und geschlossenen Kreisläufen aufgebaut ist und dessen schematischer Aufbau nachfolgend dargestellt ist.

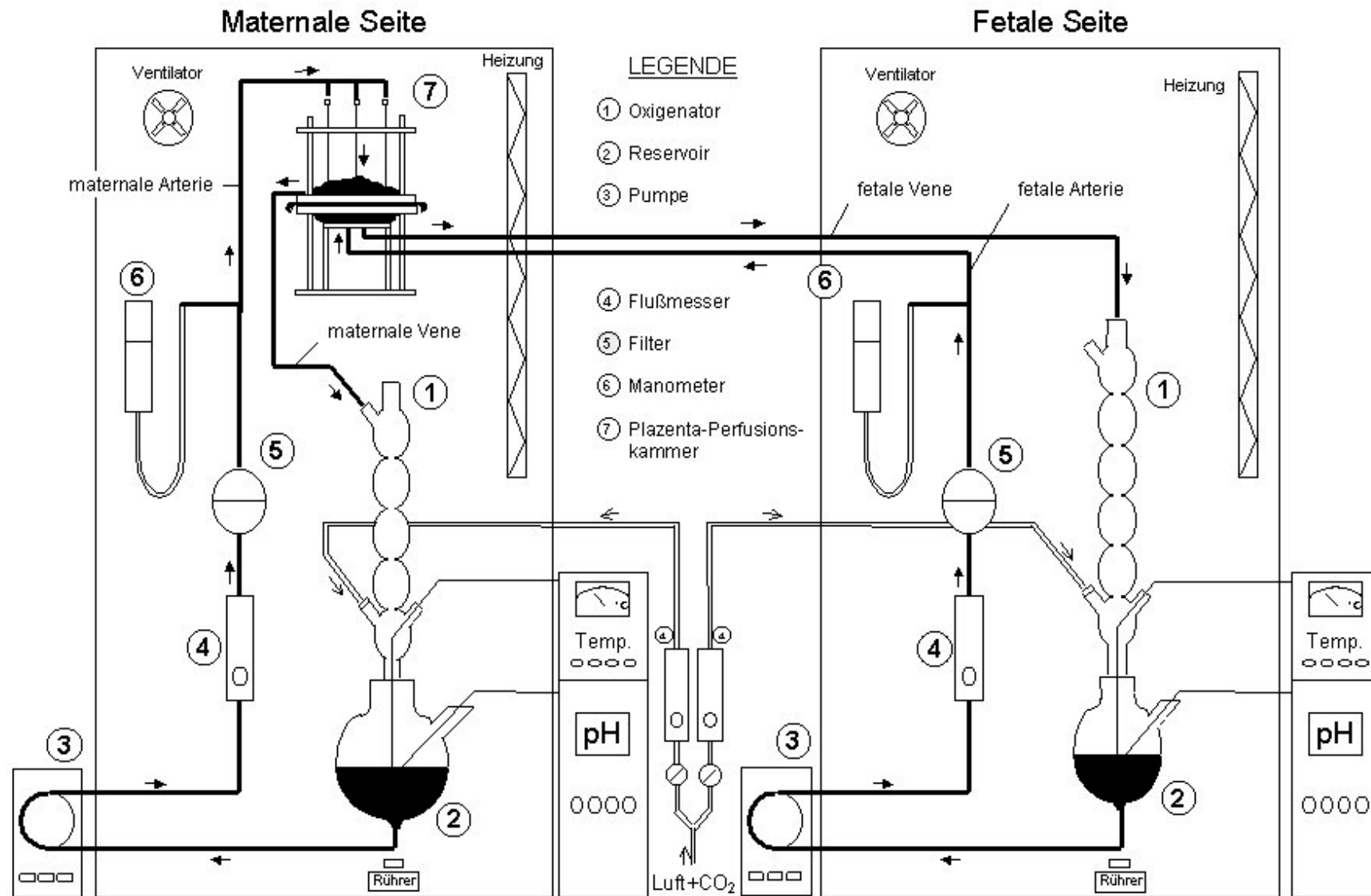


Abbildung 1: Versuchsanordnung (modifiziert nach Brandes¹³)

Die Versuchsapparatur (Abb.1) entspricht dem von *Brandes* beschriebenen Modell¹³ mit geringen Modifikationen. Sie besteht aus zwei Boxen mit einem maternalen und einem fetalen Kreislauf, die mit der jeweils entsprechenden Seite eines einzelnen intakten Plazentakotyledonen verbunden sind und so die mütterliche und die kindliche Seite der plazentaren Blutversorgung darstellen.

Das Ziel des Versuches besteht darin, am ausgewählten Kotyledonen mittels der beschriebenen Versuchsapparatur, die die physiologischen Verhältnisse der Plazentaperfusion simuliert, den Einfluss von Metformin auf den Glukosetransport und die Glukoseaufnahme der Plazenta zu testen.

Dieser Kotyledon befindet sich in der Plazenta-Perfusionskammer, einem aus Plexiglas bestehenden Behälter, der folgenden Aufbau hat:

- Das **untere Kompartiment** (fetal) ist nach unten geschlossen und enthält, im Gegensatz zu früheren Modellen, keine „Amnionflüssigkeit“. Dadurch ist eine bessere Kontrolle über etwaige Lecks auf der fetalen Seite, speziell an den perfundierenden Kathetern, möglich. In diesem Kompartiment befindet sich als Auflagefläche eine abgepolsterte Plattform, auf der der Plazentakotyledon mit der fetalen Seite nach unten liegt. Zwei Katheter, die Anschluss an die Gefäße haben und nach außen führen, perfundieren den Kotyledonen und fungieren als fetale Arterie und Vene. Das den Kotyledonen umgebende Gewebe sowie die Eihäute werden über den Rand des unteren Kompartiments gezogen.
- Darüber wird ein **Zwischenstück** in Form eines Ringes gesetzt und festgeschraubt, so dass das untere Kompartiment abgedichtet wird. Das überhängende Plazentagewebe wird abgeschnitten. Innerhalb des Ringes liegt jetzt der perfundierte Kotyledon mit der mütterlichen Seite nach oben.
- Über den Ring wird das **obere Kompartiment** gestülpt und ebenfalls so verschraubt, dass es dicht ist. Im unteren Teil besitzt es eine seitliche Öffnung mit aufgesetztem Schlauch für den mütterlichen venösen Abfluss. Der Deckel weist eine Vielzahl kleiner Löcher auf, durch die drei 19-er Kanülen eingeführt werden, die die mütterlichen Spiralarterien simulieren.

Die Kanülen perforieren die mütterliche Seite des Kotyledonen und perfundieren so den intervillösen Raum. Das sich aus den venösen Öffnungen der Dezidua

ansammelnde „Blut“ wird über den venösen Abfluss des oberen Kompartiments in den Oxigenator der mütterlichen Seite geführt. Dort wird zur pH-Wert-Regulation ein Gasgemisch aus Raumluft (80 ml/min) und Kohlendioxid (je nach Bedarf zwischen 0 und 40 ml/min) zugeführt. Anschließend gelangt die Flüssigkeit in das Reservoir, in dem sich eine Öffnung zur Probenentnahme befindet. Über eine Elektrode wird kontinuierlich der pH-Wert der Flüssigkeit gemessen und durch manuelle Regulation der Kohlendioxidflussrate bzw. -konzentration im Oxigenator konstant gehalten. Ein Messfühler registriert die Temperatur im Reservoir, die ein automatischer Temperaturregler, verbunden mit einer Heizspirale an der Wand der Box, auf einem gleich bleibenden Niveau hält. Die notwendige Luftzirkulation wird durch einen Ventilator erreicht. Die durch einen Magnetrührer stetig in Bewegung gehaltene Flüssigkeit gelangt danach vom Reservoir über eine Umwälzpumpe (LDC / Milton Roy Constametric III metering pump) zurück in die Plazentaperfusionskammer, wobei sie einen Seidenfilter passiert, der ein Verstopfen der Plazentagefäße mit Blutkoagula verhindert. Zusätzlich werden noch ein in-line-Flussmesser und ein Quecksilber-Manometer dazwischen geschaltet, um Flussgeschwindigkeit und Druck des Kreislaufs messen und gegebenenfalls durch Veränderung der Umdrehungszahl der Pumpe regulieren zu können. Dabei gelten für beide Kreisläufe folgende Normwerte:

- Flussrate: mütterliche Seite 10 ml/min; fetale Seite 2 ml/min
- Perfusionsdruck: mütterliche Seite 2 mmHg; fetale Seite 3 mmHg
- pH-Wert: 7,4 +/- 0,05
- Temperatur: 37°C

Die einzelnen Teile der Versuchsanordnung sind durch PVC-Schläuche mit einem Durchmesser von 5 mm untereinander verbunden.

Der fetale Kreislauf ist prinzipiell gleich aufgebaut. Hier wird der betreffende Kotyledon über einen aus der fetalen Box kommenden arteriellen und venösen Katheter perfundiert.

III.3. Vorbereitung

Unmittelbar nach der Geburt wird die Plazenta ins Labor transportiert und ein passender Kotyledon, möglichst peripher mit wenig Gefäßanastomosen, ausgewählt. Die versorgende fetale Arterie wird mit einem 5-French- und die zugehörige Vene mit einem 8-French-Katheter katheterisiert. Die sich anschließende Perfusion zur Stoffwechselstabilisierung des Kotyledonen mit heparinierter Krebs-Ringer-Lösung muss innerhalb der ersten 15 Minuten nach Ausstoßen der Plazenta erfolgt sein. Die Wiederkehr der metabolischen Aktivität zeigt sich an der Aufhellung des perfundierten Areals und der guten Abgrenzbarkeit gegenüber dem livid verfärbten restlichen Plazentagewebe.

In der Zwischenzeit werden die Boxen vorgewärmt und die Reservoirs beider Kreisläufe mit vorbereiteten Flüssigkeiten aufgefüllt. Das Fassungsvermögen des Reservoirs auf der Ausgangsseite (entspricht bei Experiment-Verlaufsrichtung „Mutter zu Fetus“ der mütterlichen Seite und bei „Fetus zu Mutter“ der fetalen Seite) beträgt 200 ml, das auf der Empfängerseite 100 ml. Hinzu gegeben wird:

- auf beiden Seiten
 - heparinisierte Krebs-Ringer-Lösung
 - Albumin 0,2 g/l
- auf der Ausgangsseite:
 - Glukose 150 mg/dl
 - Antipyrin 200 µg/ml (Sigma Chemical Company, St. Louis)
 - Metformin 1 µg/ml

Die Kreisläufe werden in Gang gesetzt und die im Kapitel „Versuchsaufbau“ genannten Parameter auf ihre Normwerte eingestellt.

Wenn ein ausreichender venöser Rückfluss der Pufferlösung sichergestellt ist und Lecks in der Plazentaschranke ausgeschlossen sind, wird die Plazenta in die Plazenta-Perfusionskammer und diese anschließend in die mütterliche Box platziert. Danach werden die fetalen Katheter mit den entsprechenden Schläuchen der fetalen Box verbunden und auf der mütterlichen Seite der intervillöse Raum durch 3 stumpfe

Kanülen, die mit dem mütterlichen Kreislauf in Reihe geschaltet sind, punktiert und perfundiert. In den folgenden 5 Minuten wird die Stabilisierung des pH-Wertes und des Druckes abgewartet, der Ausschluss von Lecks festgestellt und die Flussrate nachjustiert.

Hohe Drücke sind als Anzeichen eines Gefäßverschlusses durch Thromben oder Kinking zu werten¹³. Konnte durch Manipulation an den Kathetern kein Druckabfall erreicht werden, wurde die Plazenta von der Studie ausgeschlossen.

Durch die Verwendung von Antipyrin, das durch einfache Diffusion von der mütterlichen zur fetalen Seite der Plazenta und umgekehrt transportiert wird, kann jedes Experiment hinsichtlich der Integrität der Plazentaschranke individuell validiert werden.³⁴ Dazu ermittelt man das Verhältnis des prozentualen kumulativen Transports von Glukose zu Antipyrin. Ein Quotient von ≥ 1 , was bedeuten würde, dass prozentual genauso viel beziehungsweise mehr Glukose als Antipyrin durch die Plazenta transportiert werden würde, wäre ein klarer Indikator für einen Fehler im Experiment.

Außerdem würde es bei Vorliegen eines Lecks in der Plazentaschranke zu einem raschen Konzentrationsausgleich zwischen der mütterlichen und fetalen Seite kommen.

Am Ende der Vorbereitungsphase befindet sich die Plazenta, angeschlossen an den maternalen und fetalen Kreislauf, in der Plazenta-Perfusionskammer innerhalb der mütterlichen Box. Auf der maternalen und fetalen Seite zirkuliert Krebs-Ringer-Lösung unter physiologischen Bedingungen, zusätzlich wurden auf der Ausgangsseite Metformin, Antipyrin und Glukose hinzu gegeben.

Der nächste Schritt, der den eigentlichen Beginn des Experiments darstellt, besteht in der Hinzugabe radioaktiv markierter Glukose sowie radioaktiv markierten Antipyrins (mit einer spezifischen Aktivität von 37 kBq/ml), um Glukose- und Antipyrinkonzentrationen bestimmen zu können und damit quantitative Aussagen zum Einfluss von Metformin auf den Glukosetransport und die Glukoseaufnahme der Plazenta treffen zu können.

III.4. Durchführung

Zum Zeitpunkt T=0 (Beginn des Experiments) werden auf der Ausgangsseite die radioaktiv markierten Testsubstanzen hinzu gegeben. Dabei handelt es sich um:

- 100 µl ³H-markierte Glukose (The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan) und
- 100 µl ¹⁴C-markiertes Antipyrin (Sigma Chemical Company, St. Louis).

Direkt nach dem Start (0 Minuten) sowie nach 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten wird aus jedem Reservoir eine 1-ml-Probe entnommen und unmittelbar im Anschluss bei 5000 Umdrehungen/min mindestens 5 Minuten zentrifugiert, um die restlichen Erythrozyten aus der Perfusionsflüssigkeit zu entfernen. Aus dem Überstand jeder einzelnen Probe werden 400 µl zur weiteren Verwendung entnommen. Davon werden 200 µl abpipettiert und mit 10 ml „Beckmann Ready Value scintillation fluid“ aufgefüllt. Mit Hilfe des „Beckmann LS6800 liquid scintillation spectrometer“ wird für diese Proben eine Szintillations-Spektrometrie durchgeführt, indem über 10 Minuten die Zerfallsrate des Tritiums sowie des ¹⁴C-Isotops des Kohlenstoffs gemessen wird. Anhand der ermittelten Werte lassen sich so die Glukose- und Antipyrinkonzentrationen und -transportraten für alle Proben berechnen (siehe unten). Die Reste werden für zukünftige Analysen bei -30°C eingefroren.

Nach Entnahme der letzten Probe erfolgt zur Beurteilung möglicher Lecks und als Grundlage weiterer Berechnungen die Messung der Endvolumina beider Reservoirs. Weiterhin wird über den fetalen arteriellen Katheter eine Malachit-Lösung in den Kotyledonen injiziert, um das perfundierte Areal anzufärben und dadurch sichtbar zu machen. Der gefärbte Anteil wird ausgeschnitten, gewogen und in 50 ml destilliertem Wasser homogenisiert. Nach der Bestimmung des Volumens wird das Homogenisat zur Reinigung 1 Stunde in einer 1:1 Lösung aus:

- 30%igem Wasserstoffperoxid und
- 70%iger Perchloroessigsäure inkubiert.

Anschließend werden mehrere 1-ml-Proben entnommen und mittels Szintillations-Spektrometrie untersucht, um die plazentare Glukoseaufnahme berechnen zu können (siehe unten).

Alle Experimente wurden einer strengen Qualitätskontrolle unterworfen. Es wurden nur Plazenten von term-Geburten verwendet. Die Validität jedes Experiments wurde anhand dreier Kriterien beurteilt, deren Auftreten zum Ausschluss der Plazenta von der Studie führten:

1. Übertritt von mehr als 10% der maternalen oder fetalen Lösung in den jeweilig anderen Kreislauf (Feststellung durch Messung der Endvolumina)
2. Nichterreichen einer adäquaten Perfusion innerhalb der Grenzwerte für den Perfusionsdruck (als Grenzwert galt das 1,5fache der o.g. Normwerte)
3. Fehlende oder zu rasche Einstellung eines Gleichgewichts für Antipyrin zwischen beiden Kreisläufen.

III.5. Mathematische Auswertung

Berechnung von C_X :

C_X = Konzentration der zu testenden Substanz zum Zeitpunkt $t=x$ [mg/dl] bzw. [µg/ml]

$$C_X = \frac{D_X \cdot C_{A0}}{D_{A0}}$$

D_X = Zerfallsrate der radioaktiv markierten zu testenden Substanz in der entnommenen Probe zum Zeitpunkt $t=x$ [1/min]

C_{A0} = Konzentration der zu testenden Substanz auf der Ausgangsseite zum Zeitpunkt $t=0$ [mg/dl] bzw. [µg/ml]

D_{A0} = Zerfallsrate der radioaktiv markierten zu testenden Substanz in der entnommenen Probe auf der Ausgangsseite zum Zeitpunkt $t=0$ [1/min]

Berechnung von V_X :

V_X = Volumen im Reservoir einer Seite zum Zeitpunkt $t=x$ [ml]

Das Endvolumen V_F [ml] im Reservoir einer Seite setzt sich aus folgenden Teilvolumina zusammen:

$$V_F = V_0 - (V_D + V_P)$$

V_0 = Anfangsvolumen im Reservoir einer Seite [ml]

V_D = gesamtes durch Diffusion verlorenes oder hinzugekommenes Volumen einer Seite [ml]

(Anmerkung: hinzugekommenes Volumen erhält negatives Vorzeichen)

V_P = Gesamtvolumen aller entnommenen Proben einer Seite [ml] (= 9ml)

Daraus würde sich für V_X folgende Formel ergeben:

$$V_X = V_0 - \sum_{i=0}^x (V_{Di} + V_{Pi})$$

V_{Di} = durch Diffusion verlorenes oder hinzugekommenes Volumen einer Seite zum Zeitpunkt $t=i$ [ml]

V_{Pi} = Volumen der entnommenen Probe einer Seite zum Zeitpunkt $t=i$ [ml] (= 1ml)

Da sich V_{Di} wegen des Fehlens einer Volumenskala auf dem Reservoir nicht experimentell ermitteln ließ, wird der Wert mit Hilfe von ΔV näherungsweise berechnet:

ΔV = Änderung des Volumens im Reservoir einer Seite zwischen zwei Probenentnahmen [ml]

Anmerkung: ΔV setzt sich aus dem Volumen der entnommenen Probe (= 1ml) und dem in diesem Zeitraum diffundierten Volumen zusammen

$$\Delta V = \frac{(V_0 - V_F)}{(n - 1)}$$

n = Anzahl der entnommenen Proben (= 9)

Somit ergibt sich für V_X :

$$V_X = V_0 - \sum_{i=0}^x \Delta V_i$$

ΔV_i = Änderung des Volumens im Reservoir einer Seite zum Zeitpunkt $t=i$ [ml]

Berechnung des kumulativen Transports einer Substanz:

$$\text{Transport [\%]} = \frac{C_{Ex} \cdot V_{Ex} + \sum_{i=0}^x (C_{EPi} \cdot V_{EPi})}{C_{A0} \cdot V_{A0}} \cdot 100$$

C_{Ex} = Konzentration der zu testenden Substanz auf der Empfängerseite zum Zeitpunkt $t=x$ [mg/dl] bzw. [$\mu\text{g/ml}$]

V_{Ex} = Volumen im Reservoir der Empfängerseite zum Zeitpunkt $t=x$ [ml]

C_{EPi} = Konzentration der zu testenden Substanz in der entnommenen Probe auf der Empfängerseite zum Zeitpunkt $t=i$ [mg/dl] bzw. [$\mu\text{g/ml}$]

V_{EPi} = Volumen der entnommenen Probe auf der Empfängerseite zum Zeitpunkt $t=i$ [ml] (= 1ml)

C_{A0} = Konzentration der zu testenden Substanz auf der Ausgangsseite zum Zeitpunkt $t=0$ [mg/dl] bzw. [$\mu\text{g/ml}$]

V_{A0} = Volumen im Reservoir der Ausgangsseite zum Zeitpunkt $t=0$ [ml]

Berechnung des Verhältnisses des kumulativen Transports zweier Substanzen:

$$\text{Quotient A/B} = \frac{\text{Transport Substanz A [\%]}}{\text{Transport Substanz B [\%]}}$$

Berechnung der plazentaren Glukoseaufnahme:

$$\text{Glukoseaufnahme} [\mu\text{g Glukose} / \text{g Plazenta}] = \frac{D_{gK} \cdot C_{gA0} \cdot V_K}{D_{gA0} \cdot m_K \cdot 100}$$

D_{gK} = Zerfallsrate der radioaktiv markierten Glukose in der vom (homogenisierten) Kotyledonen entnommenen Probe [1/min]

C_{gA0} = Glukosekonzentration auf der Ausgangsseite zum Zeitpunkt $t=0$ [mg/dl]
(= 150 mg/dl)

V_K = Volumen des perfundierten Kotyledonen [ml]

D_{gA0} = Zerfallsrate der radioaktiv markierten Glukose in der entnommenen Probe auf der Ausgangsseite zum Zeitpunkt $t=0$ [1/min]

m_K = Masse des perfundierten Kotyledonen [g]

III.6. Statistische Methode

Hinsichtlich der statistischen Analyse sind bei dieser Arbeit folgende Tatsachen als gegeben voranzusetzen:

1. Die Anzahl der Plazenten (n) ist mit 24 gering.
2. Die bei dieser Arbeit ermittelten Werte sind unabhängige Größen, da es sich um 24 verschiedene Plazenten handelt, die in keinem Zusammenhang zueinander stehen.
3. Es sind drei Untergruppen vorhanden, die gleichzeitig gegeneinander getestet werden sollen.

Aus diesen Gründen ist der Test nach *Kruskal und Wallis* (oder H-Test) verwendet worden, da er sich für die statistische Analyse dieser Studie am besten eignet. Es

handelt sich hierbei um eine Varianzanalyse, bei der die Streuung unabhängiger Werte auch für kleine n-Zahlen untersucht werden kann. Dieser Test ist eine Ausweitung des U-Tests auf mehr als zwei unabhängige Stichproben und wie dieser parameterfrei. Das bedeutet, dass hier nicht wie beim t-Test die Mittelwerte von Merkmalen, die normalverteilt sind, untersucht werden, sondern die Nullhypothese (dass zwischen den verschiedenen Gruppen kein Unterschied besteht) statt dessen auf der Basis von Rängen getestet wird. Jedem Wert wird ein Rang zugeordnet, und für jede der zu testenden Gruppen wird der Mittelwert der Ränge gebildet. Die verschiedenen Gruppen werden dann gleichzeitig gegeneinander getestet und der erhaltene Wert auf statistische Signifikanz untersucht. Für diese Arbeit wurde das Signifikanzniveau α auf dem 5%-Niveau festgelegt ($p=0,05$).

Da eine Vielzahl von Tests (insgesamt 64) auf denselben Datenkörper angewandt wurden, ist die *Bonferroni-Korrektur* eingeführt worden, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, das heißt, um nicht die Nullhypothese fälschlicherweise abzulehnen. Das so erhaltene korrigierte Signifikanzniveau p_i errechnet sich $p_i=p/n$ (p ist das nominelle Signifikanzniveau für die Folge von n Tests) und beträgt demnach für diese Arbeit: $p_i = 0,05/64 = 0,0008$.

Die entsprechenden Prüfgrößen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS ermittelt.