

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
aus dem Institut für Anatomie  
(Molekularanatomie und Zellbiologie)  
Abteilungsleiter: Professor Dr. med. R. Gossrau

**Nachweis isometrischer Kontraktionen  
im extravasalen myofibroelastischen System  
der menschlichen Plazenta**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
medizinischen Doktorwürde  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von  
**Holger Groth**  
aus Wriezen

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. R. Graf

Korreferent: Prof. Dr. med. G. Schönfelder

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 19.09.2008

*Meinem Vater*

\* 28.09.1945

† 25.01.2005

Teile dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

Isometric contraction of the extravascular contractile system of the human placenta.

(Groth, H.; Pfitzer, G.; Graf, R.)

Placenta 1997, 18: A.25

## Inhaltsverzeichnis

<b><u>I. Einleitung</u></b>	<b>8</b>
<b><u>II. Material und Methoden</u></b>	<b>14</b>
<u>II.1. Material</u>	14
<u>II.1.1. Plazenten</u>	14
<u>II.1.2. Physiologische Lösung</u>	14
<u>II.1.3. Geräte/Präparierbesteck</u>	14
<u>II.2. Methoden</u>	16
<u>Tabelle 1 Zusammensetzung des Plazentenkollektives</u>	16
<u>II.2.1. Allgemeine Materialgewinnung</u>	17
<u>Abb.1: Chorionplatte-Präparation</u>	17
<u>II.2.1.a: Präparation des Chorionmesoderms</u>	18
<u>Abb. 2: Präparation des Chorionmesoderms</u>	18
<u>II.2.1.b: Präparation der perivasalen Stammzottenmanschette</u>	19
<u>Abb. 3: Stammzotte</u>	20
<u>Abb. 4: Präparation der Stammzottenmanschette</u>	20
<u>II.3. Muskelphysiologische Untersuchungen</u>	21
<u>Abb. 5: Gefäßpräparation aus der Chorionplatte</u>	21
<u>II.4. Immunhistochemische Untersuchungen</u>	23
<u>II.4.1. Immunzytochemischer Nachweis von <math>\alpha</math>-Aktin</u>	24
<u>II.4.2. Nachweis des von Willebrand Faktors mittels Immunfluoreszenz</u>	25
<u>II.5. Elektronenmikroskopie</u>	26
<u>II.6. Substanzen</u>	27
<u>Tabelle 2 Substanzen und Konzentrationen</u>	27
<u>II.7. Statistik</u>	29
<u>II.8. Ethik</u>	29
<u>II.9. Methodenkritik</u>	29

<b><u>III. Befunde</u></b>	<b>31</b>
<u>III.1. Allgemeine Ausführungen</u>	31
<u>Diagramm 1: Mittlere Kontraktionskräfte von Blutgefäßen der Plazenta und der untersuchten alpha-Aktin-positiven Zellen des Chorionmesoderms und der PVCS.</u>	32
<u>III.2. Meßergebnisse in Abhängigkeit verschiedener Parameter</u>	32
<u>Tabelle 3 PVCS</u>	33
<u>Diagramm 2: Mittlere Kontraktionskraft aller untersuchten Proben in Abhängigkeit der Nabelschnurinsertion</u>	34
<u>III.3. Muskelphysiologische Untersuchungen</u>	35
<u>III.3.1: Untersuchungen zur Kontraktilität des Chorionmesoderms und der PVCS</u>	35
<u>Abb. 6: Chorionmesoderm, Plazenta 0</u>	36
<u>Abb. 7: Chorionmesoderm, Plazenta 0</u>	36
<u>Abb. 8: PVCS, Plazenta 29</u>	37
<u>Abb. 9: Chorionmesoderm, Plazenta 10</u>	37
<u>Tabelle 4 Substanzen und Kontraktionskräfte</u>	38
<u>III.3.2: Untersuchungen zur Relaxation</u>	39
<u>Abb. 10: Chorionmesoderm, Plazenta 12</u>	39
<u>Abb. 11: Chorionmesoderm, Plazenta 4</u>	40
<u>Abb. 12: PVCS, Plazenta 30</u>	40
<u>Abb. 13: PVCS, Plazenta 30</u>	41
<u>III.3.3: Kraft-/Dehnungskurven</u>	41
<u>III.4. Immunhistochemische Nachweismethoden</u>	42
<u>Abb. 14: PVCS. Immunfluoreszenz</u>	42
<u>Abb. 15: Positivkontrolle</u>	43
<u>Abb. 16: Blutgefäß</u>	43
<u>Abb. 17: Immunreaktivität nach Inkubation mit anti-vWF</u>	44
<u>III.5. Elektronenmikroskopie</u>	44
<u>Abb. 18: Zwei Ausläufer von Myofibroblasten</u>	45
<u>Abb. 19: Zwei Myofibroblastenausläufer im Chorionmesoderm</u>	45
<u>Abb 20: Zwei Zellausläufer von Myofibroblasten im Chorionmesoderm</u>	46
<u>Abb. 21: Myofibroblast im Chorionmesoderm</u>	46

<b><u>IV. Diskussion</u></b>	<b>47</b>
<u>IV. 1. Myofibroblasten</u>	47
<u>IV.2.Muskelphysiologische Untersuchungen</u>	49
<u>IV.3. Physiologie</u>	53
<b><u>V. Zusammenfassung</u></b>	<b>58</b>
<b><u>VI. Literaturverzeichnis</u></b>	<b>59</b>
<b><u>VII. Abbildungs- und Materialverzeichnis</u></b>	<b>68</b>
<u>VII.1. Abbildungen</u>	68
<u>VII.2. Tabellen</u>	70
<u>VII.3. Diagramme</u>	70
<u>VII.4. Materialverzeichnis</u>	71
<b><u>VIII. Anhang</u></b>	<b>76</b>
<u>Tabelle 5 Angabe zu den einzelnen Messungen</u>	76
<b><u>Danksagung</u></b>	<b>80</b>
<b><u>Lebenslauf</u></b>	<b>82</b>
<b><u>Erklärung</u></b>	<b>84</b>

## I. Einleitung

Die Plazenta ist das erste Organ, welches in der Embryogenese der Säugetiere entwickelt wird; ihre Entwicklung und Funktion wird von vielen Aspekten der frühen Schwangerschaft beeinflusst. Eine entscheidende Rolle bei der menschlichen Plazentation spielen Trophoblasteninvasion und deziduale Zellreaktion (Malassine, 2001). Sie sind grundlegende Voraussetzung für die spätere Entwicklung des Fetus. Mit zunehmender Schwangerschaftsdauer hängt das fetale Wachstum entscheidend vom Anstieg der Kapazität der Plazenta sowie vom erleichterten Transfer zwischen mütterlichem und fetalem Kreislauf ab (Charnock-Jones und Burton, 2000). Hierfür ist insbesondere eine koordinierte Entwicklung des Zottenbaumes notwendig, die unter anderem von verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie vascular endothelial growth factor, placental growth factor, Angiopoetin, Angiostatin und dem Sauerstoffpartialdruck abhängig ist (Kingdom et al. 2000). Jüngste Untersuchungen an der Mausplazenta zeigen verschiedenste molekulare Wege zur Differenzierung der einzelnen Trophoblast Subtypen, sowie deren entscheidende Bedeutung für die Zottenbaumentwicklung (Rossant und Cross, 2001). Defekte in der Zottenbaumentwicklung können in kritischen Perioden permanente Veränderungen an Geweben und Organen des Fetus einleiten. Es kann zu mangelhaftem intrauterinem Wachstum und im späteren Leben unter anderem zu Krankheiten wie Diabetes mellitus und Hypertonie führen (Bjercke, 1999). Plazentare Fehlentwicklungen schließen u.a. fehlende Trophoblasteninvasion der mütterlichen Spiralarterien, Transferstörungen von Sauerstoff und Nährstoffen sowie Zottendifferenzierungsstörungen ein (Aplin, 2000).

Die Entwicklung der primären Chorionzotten beginnt am Ende der zweiten Schwangerschaftswoche (SSW, 13. –15. Tag p.c.). Diese beginnen sich schnell zu verzweigen, bereits in der dritten SSW (15. –16. Tag p.c.) wächst Mesenchym in die Zotten ein und bildet einen Kern von lockerem Bindegewebe. In diesem Stadium werden die Zotten als sekundäre Chorionzotten bezeichnet. In der Folge beginnen sich einige der mesenchymalen Zellen im Zentrum der Zotten zu differenzieren und

bilden Blutkapillaren. Diese entwickeln sich schnell zu arterio-kapillär-venösen Netzwerken. Sobald sich in den Zotten Blutgefäße gebildet haben (18. –21. Tag p.c.), werden sie als tertiäre Zotten bezeichnet (Vogel, 1992). Die entstandenen Blutgefäße gewinnen Anschluß an Gefäße, die sich im Chorion und dem Verbindungsstiel gebildet haben und über diesen Anschluß an das embryonale Herz. Bereits am Ende der dritten SSW beginnt das embryonale Blut durch die Kapillaren der Chorionzotten zu zirkulieren. Zu diesem Zeitpunkt hat sich die primitive Plazenta gebildet.

Der Zottenbaum der reifen Plazenta wird in drei Abschnitte untergliedert (Kaufmann et al., 1979; Vogel, 1992):

1. Stammzotten: Trunci, Rami und Ramuli chorii,
2. Intermediärzotten: Zwischenzotten des peripheren (reifen) und zentralen (unreifen) Typs,
3. Terminalzotten: Endzotten.

Aus der Chorionplatte entspringen die wenige Millimeter unverzweigt verlaufenden Trunci chorii. Durch 3-4 äquale, dichotome Teilungen gehen aus ihnen die Rami chorii hervor. Hieraus zweigen kleinere Nebenäste ab, die sogenannten Ramuli chorii. Diese können bis zu 10 Verzweigungen bilden. Größere Ramuli chorii können in direkter Fortsetzung der Rami chorii die Basalplatte erreichen und sind mit dieser über eine Zellsäule aus Zytotrophoblasten verbunden. Sie werden Haftzotten genannt.

Trunci chorii, auch als Stammzotten bezeichnet, sind durch die Ausbildung einer perivasalen Manschette um axial verlaufende Arterien und Venen gekennzeichnet, in der zahlreiche  $\alpha$ -Aktin-positive Zellen liegen (Beham et al. 1988; Graf et al. 1992; Kohlen et al. 1993), und die von Graf et al. (1992) als perivasale kontraktile Manschette bezeichnet wurde. Eine perivasale rein bindegewebige Manschette wurde bereits von Tenzer (1962) und Becker (1963) beschrieben. Sie entspricht dem IV. Reifezeichen nach Becker (1963) für Stammzotten. Die  $\alpha$ -Aktin-positiven Zellen, wurden auf Grund von ultrastrukturellen Kriterien als Myofibroblasten identifiziert (Feller et al. 1985; Demir et al. 1992; Graf et al. 1992, Kohlen et al. 1993;), und sind streng parallel zur Verlaufsrichtung der Blutgefäße angeordnet.

Kohnen et al. (1995) konnten in ihren Untersuchungen feststellen, daß sich die Myofibroblasten aus den subtrophoblastär gelegenen Fibroblasten während der Plazentareifung über zytoskelettale Zwischenstufen differenzieren. Sie sind sowohl untereinander als auch mit dem umgebenden kollagenen und elastischen Bindegewebe verbunden und bilden eine funktionelle myofibroelastische Einheit (Graf et al. 1997). Metz und Weihe (1980) fanden in der Plazenta Zellen die untereinander durch gap junctions verbunden waren, sie interpretierten diese jedoch als glatte Muskelzellen. Schließlich wurde durch Graf et al. (1995) die perivasale kontraktile Manschette (PVCS) isoliert. Graf et al. konnten weiterhin nachweisen, daß sich in den Stammzotten mit dem größten Durchmesser in der Regel auch die stärksten PVCS befinden.

Am Termin hat die reife Plazenta im Durchschnitt einen Durchmesser von ca. 15-20 cm (King, 1989) und besteht aus ca. 10-30 Kotyledonen (Page, 1993). Einem Kotyledon kann eine mütterliche Spiralarterie zugeordnet werden (Beck, 1982a, b). Die Zottenfläche wird auf rund 11-14 m<sup>2</sup> geschätzt, bei einer Perfusion von 30 ml/100g (Drury et al. 1981) Plazentagewicht am Termin, mit einem Perfusionsdruck arteriell von 50-80 mmHg und venös von 10-20 mmHg, (Stieve, 1935; Becker et al. 1981; Vogel, 1992; Reynolds, 1978) sowie einer Durchblutung des IVR von 500-700 ml/min (Becker, 1963; Barker et al. 1994). Der utero-plazentare Blutfluß ist im Normalfall durch hohen vaskulären Transport und niedrigen Widerstand gekennzeichnet (Boura et al. 1994), ähnlich dem der umbilikalen Blutströmung. Wie neuere Untersuchungen mittels Cw-Doppler zeigen, kommt es während der Wehentätigkeit zu einer rund fünfzig prozentigen Flußabschwächung innerhalb des IVR. Der Blutfluß sistiert dabei niemals komplett (Rogmans et al. 1994). Im Vergleich zu den Spiralarterien, sind von Mitte bis Ende der Schwangerschaft signifikant niedrigere resistance und pulsatility indices des Blutflusses im IVR zu sehen. Die enddiastolische Flußgeschwindigkeit ist jedoch signifikant höher als in den Spiralarterien (Kurjak et al. 1997). Dies könnte für eine elastische und auch myogene Komponente der Plazenta sprechen, ähnlich der der Arterienwand großer Gefäße.

Die Plazenta ist als Organ an der Grenzfläche zwischen Mutter und Fetus für den Stoffaustausch konzipiert und ersetzt für den heranwachsenden Fetus die Funktion von Niere, Leber, Haut und Lunge. Durch die eigene Hormonsynthese insbesondere von Progesteron, Östrogen und humanem Choriongonadotropin ist sie unverzichtbarer Bestandteil zum Erhalt der Schwangerschaft. Durch die Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel der Mutter wird eine Optimierung der Versorgung des Fetus erreicht. Mit fortschreitender Schwangerschaft muß sich die Plazenta der gesteigerten mütterlichen und fetalen Durchblutung anpassen können.

Bereits 1936 stellte Spanner hierzu auf Grund der morphologischen Befunde seiner Untersuchungen eine Hypothese über die Existenz eines kontraktiven extravasalen Systems in der Plazenta auf. Trotz zahlreicher muskelphysiologischer, biochemischer und morphologischer Untersuchungen besteht aber seit fast 100 Jahren eine kontroverse Diskussion über die Existenz solcher Strukturen in der Humanplazenta. Ein historischer Abriß zum Verlauf dieser Debatte wird von Graf et al. (1994) geschildert. Zum weiteren Verständnis der vorgelegten Arbeit wird hier eine kurze Zusammenfassung gegeben: Auf Grund ihrer morphologischen Untersuchungen berichteten bereits im Jahr 1932 Dubreuil und Rivière von einem extravaskulären kontraktiven Zellsystem in der menschlichen Plazenta. Sie beschrieben ein komplexes Netzwerk aus fibro-muskulären Schichten in der Chorionplatte und „axes fibro-musculaires“ in den Stamm- und Intermediärzotten. In derselben Arbeit bemerkten die Autoren, daß, obwohl dieses System bereits im Jahr 1906 durch Happe beschrieben wurde, es offensichtlich der Aufmerksamkeit anderer Autoren entgangen war. Von Spanner (1936) existiert eine sehr detaillierte Beschreibung der extravaskulären glatten Muskelzellen. Erst zwanzig Jahre später wurde durch Krantz und Parker (1963) in physiologischen Untersuchungen die Kontraktilität des extravaskulären Systems bestätigt, es fehlte in dieser Arbeit jedoch der Nachweis zum Ausschluß einer Kontamination der Proben durch Gefäßmuskelzellen. Im Gegensatz zu Krantz und Parker konnte Babcock (1969) durch muskelphysiologische Untersuchungen in Proben aus der Chorionplatte der menschlichen Plazenta keine Kontraktionen nachweisen. Da es ihm gelang mit klassischer histochemischer Technik in extravaskulären Zellen Glattmuskel-Aktin nachzuweisen, führte er seine

Ergebnisse auf die mangelnde Empfindlichkeit seiner Meßapparatur zurück. Im selben Jahr demonstrierte Bertolini et al. (1969) in ultrastrukturellen Untersuchungen Zellen in der Chorionplatte, von denen er vermutete, daß es sich um glatte Muskelzellen handeln könnte. Er verweist hier jedoch auf notwendige weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Frage. Becker et al. (1981) führten ebenfalls ultrastrukturelle Untersuchungen durch, ihre Ergebnisse widersprachen aber denen von Bertolini (1969). In den Untersuchungen durch King und Gröschel-Stewart (1965) wurde kontraktiles Protein, durch Michael (1974) Actomyosin und durch Huszar und Bailey (1979 a, b) wurden die Interaktion von Aktin und Myosin in der menschlichen Plazenta beschrieben. In den Jahren 1992-1997 wurde durch Graf und Mitarbeiter das System immunhistochemisch untersucht und die „perivasale kontraktile Manschette“ in der menschlichen Plazenta isoliert und charakterisiert.

Da die Funktion der menschlichen Plazenta sowohl unter normalen als auch pathologischen Bedingungen zahlreiche Fragen offen ließ, beschäftigten sich die meisten Untersuchungen nur mit der Modulation des uteroplazentaren und fetoplazentaren Blutflusses in der Plazenta (Nordenvall et al. 1991; Mayhew und Burton, 1997). Mit Ausnahme weniger Studien, (Ohno et al. 1979; Feller et al. 1985; Beham et al. 1988; Demir et al. 1992; Graf et al. 1992, 1994, 1995; Kohnen et al. 1993; Kohnen, 1994; Voss, 1994) wurde, trotz der zahlreichen positiven Befunde seit Happe (1906), die Existenz eines zweiten *extravasalen* kontraktilen Systems in der menschlichen Plazenta immer wieder angezweifelt bzw. gar nicht erst diskutiert. Die Autoren Dubreuil und Rivière (1932), Spanner (1936) und Krantz und Parker (1963) und zuletzt auch Farley et al. (2004) vermuteten, daß Kontraktionen des extravaskularen kontraktilen Systems eigenständige Bewegungen der Plazenta verursachen, welche einen propulsiven Einfluß auf den utero- und fetoplazentaren Blutfluß haben. Die Untersuchungen von Farley et al. (2004) zur longitudinalen Kontraktilität ganzer Zotten der menschlichen Plazenta zeigen, daß die Zotten in der Lage sind, sich in Längsrichtung zu kontrahieren und zu relaxieren. Grundlegender Schwachpunkt, dieser wie auch aller anderen vorliegenden Untersuchungen, ist jedoch die fehlende Differenzierung, ob die bis dato gemessenen Kontraktionen durch die  $\alpha$ -Aktin-positiven Zellen der perivasalen Manschette der Stammzotten

(PVCS) bzw. des Chorionmesoderms (CM) der Chorionplatte oder durch die Zellen der Media der plazentaren Blutgefäße verursacht wurden. Daraus ergaben sich folgende Zielsetzungen für diese Arbeit:

1. Entwicklung und Etablierung einer geeigneten Präparationstechnik zur Isolierung von Proben aus der perivasalen Stammzottenmanschette (PVCS) und dem extravasalen System des Chorionmesoderms der Chorionplatte, ohne daß es dabei zu einer Gefäßmuskelkontamination kommt.
2. Entwicklung eines geeigneten Versuchsaufbaues für die muskelphysiologischen Untersuchungen an diesen Proben.
3. Isometrische Untersuchungen der isolierten Proben.
4. Immunzytochemische Untersuchungen der untersuchten Proben mit dem Ziel zu prüfen, ob sie Gefäßmuskelzellen enthielten oder nicht.
5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Feststellung der normalen Morphologie der entsprechenden Proben nach Isolierung mit derselben Methode, die für die physiologischen Messungen angewendet wurde.

## II. Material und Methoden

### II.1. Material

#### II.1.1. Plazenten

Die in die Untersuchungen einbezogenen Plazenten stammten aus der Frauenklinik am Campus Benjamin Franklin, Charité-Universitätsmedizin Berlin und der Frauenklinik Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin.

In die Auswertung der Untersuchung wurden ausschließlich Plazenten unkompliziert verlaufender Schwangerschaften zwischen der 37. und 41. Schwangerschaftswoche einbezogen (Tab. 1), die spontan oder durch Sectio caesarea entbunden wurden.

#### II.1.2. Physiologische Lösung

Zur Präparation und Aufbewahrung der Proben wurde eine HEPES-gepufferte physiologische Salzlösung (nachfolgend PSS-Lösung genannt) folgender Zusammensetzung verwandt: NaCl 118,0 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2 mM, KCl 5,0 mM, HEPES 24 mM, Glucose 10 mM, pH 7,4 bei 21°C. Die Lösung wurde vor der Verwendung einer 15 minütigen Begasung mit reinem Sauerstoff unterzogen.

#### II.1.3. Geräte/Präparierbesteck

Der gesamte Versuchsaufbau stammt von der Fa. Scientific Instruments GmbH (Heidelberg, Deutschland), aufbauend auf einem Basisgerät für intakte Muskelstreifen MK 1 L, das mit einem Zweikammerküvettenystem (Volumen ca. 5 ml) für Begasung mit Wärmetauscher ausgerüstet war. Der Kraftnehmer KG 3, Auflösung 3 µN, bei einer natürlichen Resonanzfrequenz von 700Hz, war mit einem

Präparatgreifer ausgerüstet. Die Kraftnehmermessbrücke BAM 4 C war mit einem Analogcomputer versehen, der die Eigenoszillationen nach raschen Kraftänderungen unterdrückt; dadurch kam es zu einer sehr hohen zeitlichen Auflösung der Kraftmessung von 1,5 ms. Die Vordehnung der Probe wurde durch eine Mikrometerschraube eingestellt. Als Nachweisgerät wurde ein 1-Kanal (Y-T-Schreiber) verwandt. Um die Stromschwankungen so gering wie möglich zu halten, wurde ein Spannungskonstanthalter zwischen die Geräte und das Stromnetz geschaltet und der gesamte Versuchsaufbau zur elektrostatischen Abschirmung in einem Brutschrank (Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) untergebracht. Die Leerschwankungen konnten dadurch bei der Aufzeichnung von anfänglich  $\pm 0,03$  mN auf  $\pm 0,01$  mN verringert werden. Durch den Einsatz eines Transducers/Analogcomputer KG 7 mit verbesserter Performance (Fa. Scientific, Heidelberg, Deutschland) anstelle des KG 3 konnten Einflüsse der Stromschwankungen weitgehend ausgeschaltet werden. Zum Entleeren des Zweikammerküvetten-systemes wurde eine Vakuumpumpe eingesetzt. Beim Einspannen der Präparate kamen eine Kaltlichtlampe (Fa. Wild Herrbrugg, Schweiz) sowie eine Lupe (Makromar, Mahr, Deutschland) zum Einsatz. Präpariert wurde mit feinen Scheren und Pinzetten unter einer Stereolupe.

## II.2. Methoden

Um in den Versuchen möglichst gleiche Bedingungen für alle Präparate zu haben, wurden in Vorversuchen 12 Plazenten präpariert und untersucht. Gleichzeitig wurde damit die Versuchsdurchführung festgelegt. Im Versuchsablauf wurden alle Proben mit 100 mM KCl in PSS stimuliert. Die Ergebnisse dieser 12 untersuchten Plazenten sind nicht in die Auswertung dieser Arbeit eingeflossen. Bei der Gewinnung der Plazenten wurde außerdem auf Durchmesser (kleiner, gleich bzw. größer 15 cm), Dicke (kleiner, gleich bzw. größer 2,5 cm), Nabelschnuransatz (zentral/ peripher) und Vaskularisation der Chorionplatte (CP) geachtet.

37. SSW		38. SSW		39. SSW		40. SSW		41. SSW	
2 Plazenten		7 Plazenten		13 Plazenten		6 Plazenten		3 Plazenten	
NS zentr	NS periph	NS zentr	NS periph	NS zentr	NS periph	NS zentr	NS periph	NS zentr	NS periph
1	1	2	5	7	6	3	3	2	1

Tabelle 1 Zusammensetzung des Plazentenkollektivs

SSW: Schwangerschaftswoche, NS: Nabelschnur, zentr: zentrale Insertion der Chorionplatte, periph: periphere Insertion der Chorionplatte

## II.2.1. Allgemeine Materialgewinnung

Unmittelbar nach der Entbindung wurde aus den Plazenten mit einer Schere ein ca. 6-8 cm breiter Streifen vom Randsinus bis zum Nabelschnuransatz herausgeschnitten. Vom gewonnenen Gewebestreifen wurde ca. 1,5-2 cm unter der CP der anhängende Zottenbaum abgetrennt (siehe Abb. 1). Mit PSS-Puffer wurde das Blut weitgehend aus dem Präparat gespült. Beim Spülen war darauf zu achten, daß die Präparate nicht zu stark gezerrt wurden. Wenn sich der Puffer nach mehrmaligem Spülen nicht mehr blutig färbte, wurden die Gewebestreifen ins Labor transportiert. Bis zu diesem Zeitpunkt dauerte die Präparation 8-10 min.

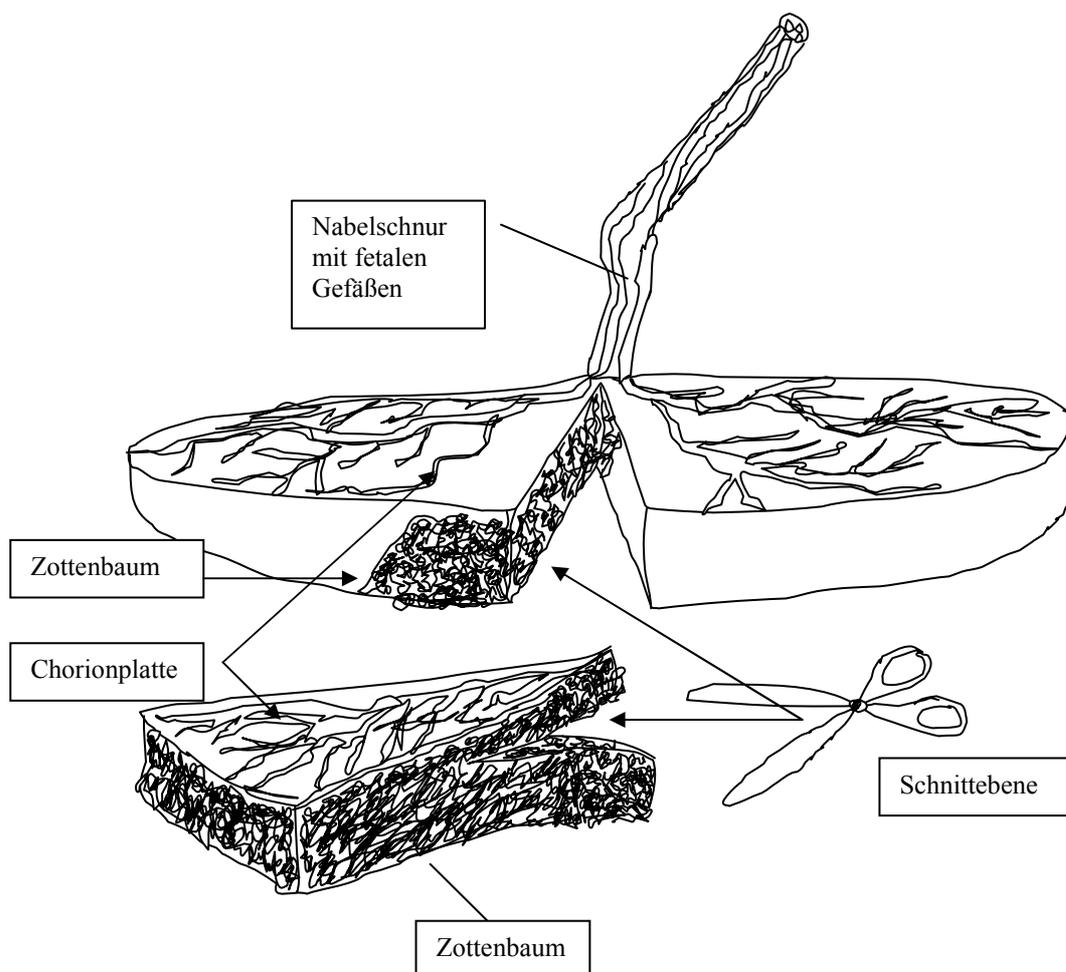


Abb. 1: Präparation der Chorionplatte

## II.2.1.a: Präparation des Chorionmesoderms

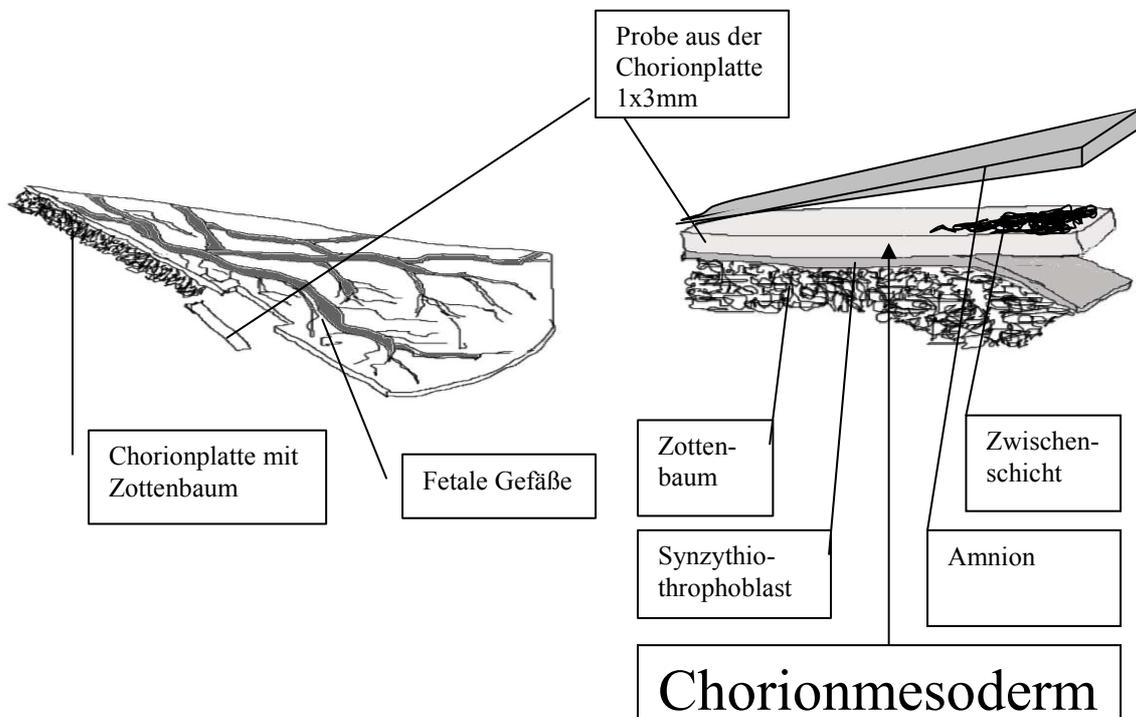


Abb. 2: Präparation des Chorionmesoderms

Für die Präparation des Chorionmesoderms (CM) wurde unter der Stereolupe mit ca. 20-30-facher Vergrößerung nach kleinsten Blutgefäßen in der Chorionplatte gesucht. Diese stellten sich als zarte Verdichtungen im Gewebe dar und hoben sich somit vom umliegenden Gewebe ab. An gefäßfreien Stellen wurde das Amnion vom Chorion getrennt. Dazu wurden Amnion und Chorion jeweils mit einer Pinzette gefaßt und durch sanftes Ziehen voneinander gelöst. Da Amnion und Chorion nur durch eine zarte Bindegewebsschicht (Zwischenschicht) getrennt sind, geht das in den meisten Fällen sehr leicht (Abb. 2). Es wurden sämtliche Zotten vom Chorion möglichst vorsichtig und umfassend entfernt. Diese Arbeit erforderte größte Sorgfalt, da die Terminalzotten teilweise rückläufig in die Chorionplatte einwachsen.

Danach wurde aus dem Chorionmesoderm eine ca. 1x3 mm große Probe herausgeschnitten (Abb. 2). Dabei mußte darauf geachtet werden, daß die Probe nicht gezerrt wurde, da es sonst sofort zu nicht mehr relaxierbaren Spontankontraktionen kam. Von der erhaltenen Probe wurde schließlich der Synzytiotrophoblast abgezogen. Die gewonnene Probe bestand nun nur noch aus dem Chorionmesoderm. Die gesamte Präparation für eine Probe dauerte ungefähr 40-50 min. Die besten Ergebnisse ließen sich dann erzielen, wenn die Proben nach der Feinpräparation 12-16 h in PSS-Puffer bei Raumtemperatur ruhen konnten.

#### II.2.1.b: Präparation der perivasalen Stammzottenmanschette

Aus dem Plazentastreifen wurden zunächst die größten Stammzotten herausgesucht. Diese wurden von den umliegenden Terminalzotten befreit, so daß sie bis zur Chorionplatte frei zugänglich waren. Die Präparation erfolgte dabei in Richtung Chorionplatte, die Stammzotten wurden direkt an der Chorionplatte abgeschnitten. Die so erhaltenen „Zottenzylinder“ haben eine ungefähre Länge von 5-8 mm (Abb. 3). Anschließend wurden die Zotten der Länge nach aufgeschnitten, so daß man zwei halbe Zylinder erhielt (Abb. 4). Die weitere Präparation erfolgte unter der Stereolupe bei 12-50-facher Vergrößerung. Die in den Schnittflächen gelegenen fetalen Gefäße sind deutlich erkennbar, sie werden außen von der Stammzottenmanschette (PVCS) umhüllt. Um zu vermeiden, daß Mediamuskelzellen in die Präparate gelangen, wurde in ca. 0,3 mm Abstand von den fetalen Gefäßen in deren Längsrichtung eine ca. 1x3mm große Probe aus der PVCS mit einer feinen Schere und Pinzette herauspräpariert (Abb. 4). Hierbei hat es sich bewährt, die Probe an einem Ende zu fassen und mit der Schere entlang der Längsrichtung zu schneiden. Dabei muß auf eventuell radial von den zentralen Stammzottengefäßen abgehende kleinste Gefäße geachtet werden (Tenzer, 1962). Die Proben wurden nach der ca. 40 min dauernden Präparation für 12-16 h bei Raumtemperatur in PSS-Puffer gelagert.

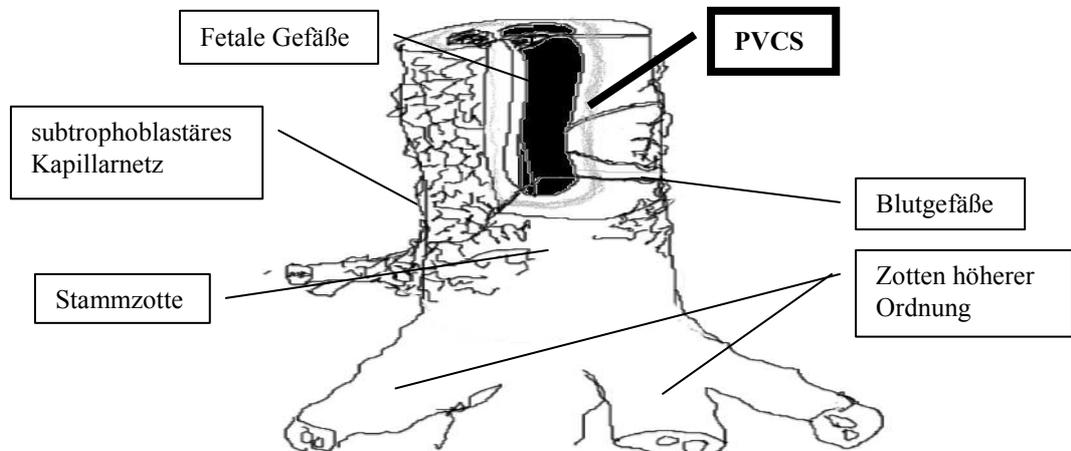


Abb. 3: Stammzotte. PVCS: perivasale kontraktile Manschette

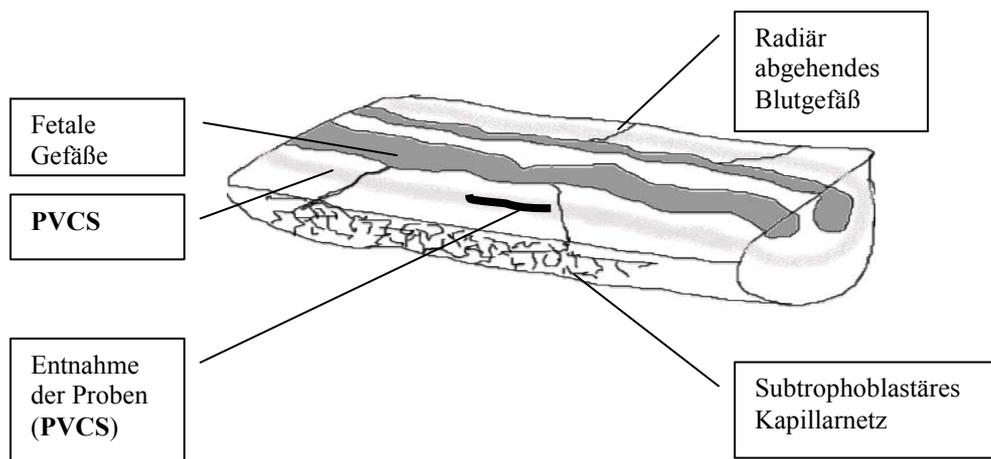


Abb. 4: Präparation der Stammzottenmanschette

PVCS: perivasale kontraktile Manschette

### II.3. Muskelphysiologische Untersuchungen

Durch Vorversuche mit Blutgefäßen der Chorionplatte wurde das Meßsystem auf seine Funktionstüchtigkeit geprüft. Die Blutgefäße wurden aus der Zwischenschicht der Chorionplatte entnommen. Hierzu wurde zuerst das Amnion vom Chorion getrennt, anschließend die umhüllende Zwischenschicht von den Gefäßen abpräpariert und abschließend ein ca. 3 cm langes Gefäßstück entnommen. Dieses wurde auf eine Nadel aufgefädelt, die vertikal in einer Holzplatte fixiert war. Mit einer Schere und einer Pinzette wurde der Gefäßstreifen in spiraligen Gängen zu einem fortlaufenden Präparat aufgeschnitten (Abb. 5).

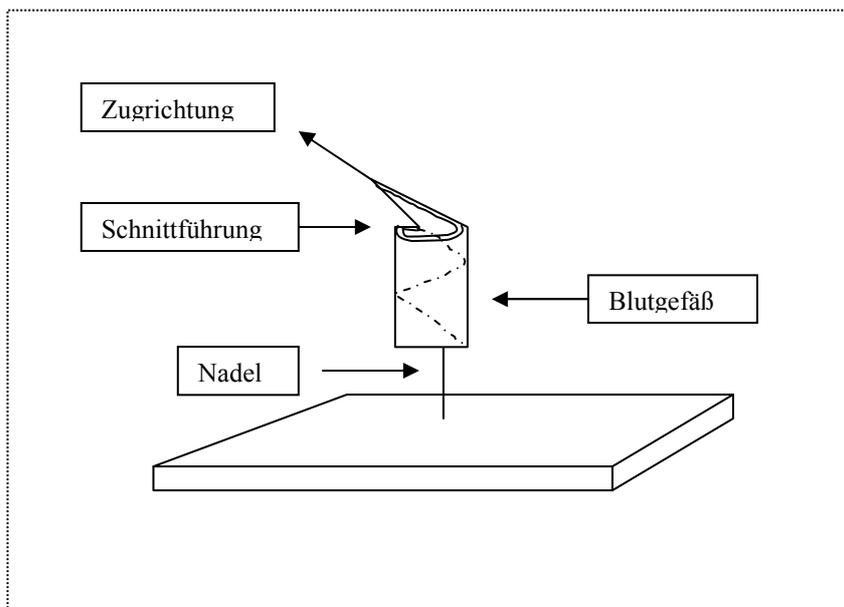


Abb. 5: Gefäßpräparation aus der Chorionplatte

Aus dem so erhaltenen ca. 1 mm breiten Streifen wurde eine ca. 3 mm lange Probe zur Untersuchung entnommen. Diese konnten im Gegensatz zu den Proben der PVCS und des CM ohne Ruhephase sofort in die Meßapparatur eingespannt werden. Die Kraftmessung der Blutgefäße, wie auch der Gewebeproben des Chorionmesoderms und der PVCS erfolgte isometrisch.

Zur Stimulation der Gewebeproben wurde initial grundsätzlich 100 mM KCl in PSS-Lösung (nachfolgend KCl-Lösung genannt) folgender Zusammensetzung verwendet: 23 mM NaCl, 1,2 mM MgCl, 1,6 mM CaCl, 1,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 24 mM HEPES, 10 mM Glucose, pH 7,4 bei 21°C. Vor der Verwendung wurde die Lösung 15 min mit O<sub>2</sub> begast. Zum Auswaschen der Lösung wurde PSS-Puffer benutzt. Die Lösung wurde nach dem Ansetzen nicht länger als 48 h verwendet. Um ein Austrocknen der Gewebeproben zu verhindern, mußten diese innerhalb von 10-15 sec in die Präparategreifer eingespannt werden. Dabei durften die Proben nicht gedehnt werden, da es sonst zu starken Spontankontraktionen von bis zu 5400  $\mu\text{N}/\text{mm}^2$  kam, die nicht mehr relaxiert werden konnten. Nach dem Einspannen wurden die Proben in eine mit 5 ml PSS gefüllte Küvette getaucht. Anschließend wurde die „Null-Linie“ für jedes Präparat aufgezeichnet. Schließlich wurde die Probe aus der Küvette herausgeschwenkt, der PSS-Puffer aus der Küvette mittels Vakuumpumpe abgesaugt und die KCl-Lösung in die Küvette gegeben. Diese Prozedur hatte einen geringeren störenden Einfluß auf die Probe, als das direkte Absaugen der Lösungen. Die KCl-Lösung wurde zwischen 5 und 30 min in der Küvette belassen, danach wurde entweder mit PSS-Puffer ausgewaschen oder eine der angegebenen dilatierenden Substanzen in die Küvette gegeben. Alternativ wurde die KCl-Lösung anschließend durch die in Tabelle 2 (siehe S. 20) genannten Substanzen ersetzt. Die Versuche wurden kontinuierlich durch den Einkanalschreiber erfaßt. Mit der Mikrometerschraube konnte die Vordehnung bis 500  $\mu\text{N}$  (passive Kraft) variiert werden. Zur Abgrenzung gegen Artefakte (z.B. Erschütterungen) und Kontraktionen von Fibroblasten, die Kräfte bis zu 200  $\mu\text{N}/\text{mm}^2$  generieren (Gabbiani, 1992, Schürch et al. 1992, Kolodney und Wysolmerski 1992, Obara et al. 1995), wurden in die Auswertung der Arbeit nur Kräfte einbezogen, die über 200  $\mu\text{N}/\text{mm}^2$  lagen. Eine Begasung mit Sauerstoff während der Versuche erwies sich als ungünstig, da die Proben waagrecht eingespannt waren und durch die aufsteigenden Gasblasen irritiert wurden. Als Alternative wurden alle Lösungen vor den Versuchen 15 min mit reinem O<sub>2</sub> begast. Nach der muskelphysiologischen Untersuchung wurden alle Proben, die eine Kontraktion zeigten, immunhistochemisch auf das Vorkommen von  $\alpha$ -Aktin und des von Willebrand Faktors (vWF) untersucht. Der vWF ist ein von Endothelzellen gebildetes Protein (Bauer, 1994) und gilt als

spezifischer Endothelzellmarker. Damit ist er gleichzeitig ein Indikator für Blutgefäße. Der immunzytochemisch Nachweis des kontraktiven Filamentes  $\alpha$ -Aktin dient dem Nachweis von glatten Muskelzellen und Myofibroblasten (Skalli et al. 1987, Schürch et al. 1992).

#### II.4. Immunhistochemische Untersuchungen

##### Herstellen der Gefrierschnitte

Zur Herstellung der Gefrierschnitte wurde ein ca. 2x2x1 cm großes Stück Schweineschnitzel (beim Fleischer erworben) als Träger für die zu untersuchende Gewebeprobe auf ein rundes Korkplättchen gelegt. Die Probe wurde dann in Längsrichtung auf das Schnitzfleisch gelegt, mitsamt dem Korkplättchen mit Frischhaltefolie umhüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Vermeidung des Leyden-Frostschens Phänomens wurde die Probe solange im Stickstoff bewegt, bis sie vollständig durchgefroren war. Die Probe wurden bis zur Untersuchung bei  $-40^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Beschichtung der Objektträger: Um ein Abschwimmen der Schnitte während der Inkubation zu verhindern, wurden die Objektträger für den Nachweis von  $\alpha$ -Aktin (Klon asm-1, Boehringer, Mannheim, Deutschland) und des vWF (polyklonal, Dakopatts, Hamburg, Deutschland) mit Poly-L-Lysin (Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland) beschichtet. Als erstes mußten die Objektträger dazu mit Alkohol 50-70% gereinigt werden, danach wurden sie an der Luft getrocknet. Nach dem vollständigen Trocknen kamen sie für 3-5 min in eine 1:10 mit Aqua dest. verdünnte Poly-L-Lysin-Lösung. Nach dem Abtropfen wurden die Objektträger bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank für 8-12 h getrocknet.

7  $\mu\text{m}$  dicke Serien-Gefrierschnitte wurden mit einem Kryostat Modell 2800 N (Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland) angefertigt und auf die beschichteten Objektträger aufgezogen und für 24 h bei Raumtemperatur getrocknet. Um eine möglichst große und übersichtliche Schnittfläche der kleinen Proben zu erhalten, wurde das Präparat in einem Winkel von rund  $30^{\circ}$  zur Längsachse geschnitten.

#### II.4.1. Immunzytochemischer Nachweis von $\alpha$ -Aktin

Zum immunzytochemischen Nachweis von Glattmuskelaktin wurden die Schnitte mit anti- $\alpha$ -Aktin (Klon asm-1, Boehringer, Mannheim, Deutschland) inkubiert. Dazu wurden die Kryostatschnitte 5 min bei  $-25^{\circ}\text{C}$  in reinem Aceton vorbehandelt, luftgetrocknet und dann in einem Gemisch aus 400  $\mu\text{l}$  Glutardialdehyd und 32 ml 37%-igem Formaldehyd, das mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,2; 0,1 M PBS (Williams, 1977), auf 200 ml aufgefüllt wurde, fixiert. Nach einer sorgfältigen Spülung in PBS-Puffer wurde mit non-Immuneserum (Maus-Serum, Serva, Heidelberg, Deutschland) für 20 min inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren. Für den immunzytochemischen Nachweis von  $\alpha$ -Aktin wurde anschließend für 30 min mit dem spezifischen Antikörper (1:60 mit PBS-Puffer verdünnt) inkubiert. Zur Visualisierung der Antigenbindung wurden die Schnitte 3x5 min in jeweils frischem PBS gespült. Anschließend wurde für 30 min mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, monoklonalem Maus IgG (Klon 1A4, Verdünnung 1:200, Vector Laboratories, Burlingame, USA) inkubiert. Mit jeweils frischem PBS-Puffer wurde zweimal gespült und für weitere 60 min mit einem Komplex aus Avidin und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase (Vectastain ABC, Vector Laboratories, Burlingame, USA) beschichtet. Nach abschließender zweimaliger Spülung in jeweils frischem PBS-Puffer wurden die Schnitte zum Nachweis der lokalen Immunreaktion für ca. 10 min mit Diaminobenzidin-haltigem Medium (Vectastain Kit III, DAB, Vector Laboratories, Burlingame, USA) inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte in Leitungswasser und Aqua dest. gespült und in Glyzeringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

Alternativ wurde  $\alpha$ -Aktin mittels Immunfluoreszenz visualisiert (inkubiert mit anti  $\alpha$ -Aktin, Klon asm-1, 1:10, Boehringer, Mannheim, Deutschland, sowie TRITC Ziege anti Maus IgG, 1:40, Nordic, Tilburg, Niederlande); hierbei wurden die Proben wie unter Punkt II.4.2. für den vWF beschrieben behandelt.

#### II.4.2. Nachweis des von Willebrand Faktors mittels Immunfluoreszenz

Die 7 µm dicke Serienkryostatschnitte wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträgern montiert, luftgetrocknet und für fünf Minuten in Aceton bei 4°C vorbehandelt, danach 24 h vollständig an der Luft getrocknet, anschließend 3x5 min in PBS-Puffer gespült und für 60 min mit anti-vWF (1:50, polyklonal, Dakopatts, Hamburg, Deutschland) 1:50 mit PBS verdünnt, inkubiert. Zur Visualisierung wurden die Präparate 3x5 min in PBS-Puffer gespült und 45 min in TRITC-IgG (1:40, Kaninchen IgG, Code No. R0156, Dakopatts) inkubiert, sorgfältig in PBS-Puffer gespült und abschließend mit PBS-Glyzerin eingedeckt.

Alternativ wurde vWF mittels Immunzytochemie (DAB) visualisiert, hierbei wurden die Proben entsprechend, wie unter Punkt II.4.1. für  $\alpha$ -Aktin beschrieben, behandelt. Als Sekundärantikörper wurde biotinyliertes Ziegen-anti-Kaninchen IgG, 1:50 (Serva, Deutschland) verwendet.

Da in den untersuchten Gewebeproben keine Blutgefäße erwartet wurden, wurden als Positivkontrolle die Blutgefäße des Trägermaterials (Schweineschnitzel) gewertet. Zur Kontrolle der Spezifität der Antikörper wurden in jeder Versuchserie Schnitte mit PBS anstelle der spezifischen Antikörper inkubiert; die Reaktion war stets negativ. Alle Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte der Bezug der Chemikalien von Merck oder Sigma.

## II.5. Elektronenmikroskopie

Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte wie unter Punkt II.2. beschrieben. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden die Präparate in Araldit eingebettet. Nach der Entnahme wurden die Gewebeproben in Fixans nach Karnowsky (1965) unter Zugabe von 4% PVP und 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2 für 12-24 h fixiert. Anschließend wurde in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2-7,4, gespült und die Gewebe über Nacht im letzten Spülpuffer belassen. Die Nachfixierung erfolgte mit 2% wässriger Osmiumsäure für 2-4 h, anschließend wurde 3x15 min mit 0,1M Phosphatpuffer, pH 7,2-7,4, gespült, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert (Ethanol 30, 50, 70, 90% für 3x15 min und Ethanol abs. 2x60 min). Die Proben kamen schließlich für 2 h in Propylenoxid, für mindestens 3 h in Propylenoxid/ Araldit 1:1 und vor dem Einbetten 24 h in reines Araldit. Die Polymerisation dauerte bei 70°C 24 h. Untersucht wurde mit einem Elektronenmikroskop Typ EM10, Fa. Zeiss, Deutschland.

## II.6. Wirkung verschiedener Substanzen bei den muskelphysiologischen Untersuchungen

Bei der muskelphysiologischen Messung wurden alle Proben mit 100 mM KCl in PSS stimuliert. Um einen Eindruck über Stimulationsmöglichkeiten durch endogene Substanzen zu gewinnen, wurden die in Tabelle 2 genannten Substanzen orientierend untersucht.

Wirkung	Substanz	Konzentrationen
<i>Kontrahierend</i>	Angiotensin II	$10^{-8}$ , $10^{-6}$ M in PSS
	Carbachol	$10^{-10}$ , $10^{-9}$ , $10^{-8}$ , $10^{-7}$ , $10^{-6}$ M in PSS
	Acetylcholin	$10^{-6}$ , $3 \times 10^{-6}$ M in PSS
	PGF <sub>2α</sub>	$10^{-8}$ , $10^{-7}$ , $10^{-6}$ , $10^{-5}$ M in PSS
	Oxytocin	$10^{-2}$ , $10^{-1}$ M in PSS
	Serotonin	$10^{-6}$ , $2 \times 10^{-6}$ , $10^{-4}$ , $10^{-3}$ M in PSS
	Endothelin-1	$10^{-10}$ , $10^{-9}$ , $10^{-8}$ , $10^{-7}$ , $10^{-6}$ M in PSS
	KCl-Lösung	100mM
<i>Relaxierend</i>	Adenosin	$10^{-12}$ , $10^{-11}$ , $10^{-10}$ , $10^{-9}$ , $10^{-8}$ , $10^{-7}$ , $10^{-6}$ , $10^{-5}$ M in PSS
	Substanz P(Acetatsalz)	$10^{-6}$ M in PSS

Tabelle 2 Substanzen und Konzentrationen

Anhaltspunkt zur Auswahl dieser in der vorgelegten Arbeit eingesetzten Substanzen waren Arbeiten verschiedener Autoren, die die genannten Substanzen in glattmuskelphysiologischen Untersuchungen von verschiedenen Organen und Zellkulturen eingesetzt haben: Huszar und Bailey, (1979 b) KCl, NaCl, Ca-ionen, ATP; von Brozovich und Morgan (1989) Phenylephrin, KCl; Maigaard, (1987) KCl, Serotonin, Angiotensin II, Oxytocin, PGF<sub>2α</sub>; Hull et al. (1994) Serotonin,

Acetylcholin, Substanz P, Adenosindiphosphat; McCarthy et al. (1994) Angiotensin II, Endothelin-1, PGF2 $\alpha$ ; Leicht et al. (1994) KCl; Bodelsson und Stjernquist, (1994) Substanz P, Serotonin; Clifton et al. (1994, 1995) KCl, PGF2 $\alpha$ .

Die Substanzen Carbachol und Acetylcholin wurden entsprechend persönlicher Empfehlung durch Frau Prof. Pfitzer (Institut für vegetative Physiologie, Universität Köln) in die Untersuchung einbezogen. Die angegebenen Substanzen wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland) und Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. In der Auflistung sind nur solche Konzentrationen angegeben, bei denen in der vorgelegten Arbeit deutlich meßbare ( $\geq 200 \mu\text{N}/\text{mm}^2$ ) Kontraktionen erreicht wurden. Die einzelnen Substanzen wurden mit Sauerstoff-begastem PSS-Puffer verdünnt.

## II.7. Statistik

Für die statistische Auswertung wurden die Kontraktilitäten in Abhängigkeit von Variablen der Plazenta bestimmt.

Unterschiede in der Kontraktilität in Abhängigkeit von Eigenschaften der Plazenta (Dicke, Breite) und der Nabelschnurinsertion (peripher, zentral) werden mit dem T-Test für unabhängige Stichproben und bei nicht Vorliegen der Testvoraussetzungen mit dem Welch-Test (ungleiche Varianzen) bzw. einem nicht-parametrischen Test (Mann-Whitney-U Test) überprüft. Ein signifikantes Ergebnis kann angenommen werden wenn  $p \leq 0,05$  ist. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS.

## II.8. Ethik

Die vorgelegte Untersuchung wurde mit Zustimmung durch die Ethikkommission des Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin für das Forschungsprojekt (Gr 1041/3-1 und 3-2) der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

## II.9. Methodenkritik

Zur weiteren Optimierung der Bedingungen bei der Untersuchung könnten folgende Veränderungen an der zur Kraftmessung verwandten Apparatur dienen:

1. Um die Auswirkungen der Oberflächenspannung auf die Messungen so gering wie möglich zu halten, sollten die Proben, statt horizontal und oberflächennah wie in der vorgegebenen Apparatur, vertikal in der Tiefe der Meßkammer fixiert werden.
2. Irritationen, die durch das Austauschen der Lösungen hervorgerufen werden, könnten mittels eines Perfusionssystems minimiert werden. Hierzu würden ein herkömmliches Schwerkraftperfusionssystem mit Anschluß im Boden der Meßkammer und ein Überlauf an deren Oberrand genügen.

3. Die störenden Oberflächenbewegungen bei der Begasung könnten durch ein Zweikammersystem, das aus einer Meßkammer und einer Begasungskammer besteht, die unter der Flüssigkeitsoberfläche miteinander verbunden sind, vermieden werden.

Primär nicht zu beeinflussen sind, auf Grund der anatomischen Verhältnisse, der wechselnde Anteil der Aktin-positiven Zellen in den untersuchten Proben der Plazenta sowie die deutlichen Unterschiede im makroskopischen Bau der einzelnen Plazenten, wie unterschiedlicher Nabelschnuransatz oder unterschiedlich große basale Anheftungsfläche der Plazenta und daraus resultierend unterschiedliche Dicke der Plazenta. Es muß jedoch geprüft werden, ob z. B. Nabelschnuransatz oder Dicke der Plazenta einen unmittelbaren Einfluß auf die Meßergebnisse haben und damit auf die Leistung des extravasalen kontraktiven Systems.

### III. Befunde

#### III.1. Allgemeine Ausführungen

Von 31 untersuchten Plazenten konnten 51 Proben von insgesamt 26 Plazenten stimuliert werden. Alle untersuchten Proben ließen sich mehrfach stimulieren. Die Proben konnten durch KCl-Lösung und durch Autakoide stimuliert werden.

Durch Stimulation mittels KCl-Lösung konnte eine mittlere Kraft von  $0,6 \pm 0,32$  mN/mm<sup>2</sup> (mean  $\pm$  SEM) für die Proben des Chorionmesoderms gemessen werden. Für die Proben der PVCS konnte eine mittlere Kraft von  $0,31 \pm 0,09$  mN/mm<sup>2</sup> (mean  $\pm$  SEM) gemessen werden (Diagramm 1).

Es wurden außerdem 27 Kontraktionen registriert, die durch Irritationen beim Einspannen bzw. durch Variation der Vordehnung ausgelöst wurden, die gemessenen Kräfte bewegten sich im Bereich zwischen 200-6900  $\mu$ N/mm<sup>2</sup>.

Als Positivkontrolle für das Meßsystem wurde von drei Plazenten jeweils eine Probe eines Blutgefäßes untersucht. Die drei Proben konnten mehrfach mit 100 mM KCl-Lösung stimuliert werden. Es wurden dabei 10 Kontraktionen mit einer mittleren Kraft von  $1,4 \pm 0,95$  mN/mm<sup>2</sup> (mean  $\pm$  SEM) gemessen (Diagramm 1).

Bei den PVCS- und Chorionmesoderm-Messungen mußte nur in einem Fall eine Probe von der Auswertung ausgeschlossen werden, da mit immunzytochemischer Reaktion ein Blutgefäß nachgewiesen wurde. Von fünf Plazenten bei denen keine Kontraktionen nachweisbar waren, wurden zwei Plazenten manuell mehr als 20 min nach dem Kind entbunden, zwei Plazenten waren auffallend klein, stark vaskularisiert und mit zahlreichen lipösen Infarkten durchsetzt. Schließlich wurde eine Entbindung mittels Saugglocke vorgenommen, dabei wurde die Plazenta ebenfalls manuell entbunden. Damit konnten nach Anwendung der Ausschlußkriterien 96,26% der untersuchten Proben zu Kontraktionen stimuliert werden.

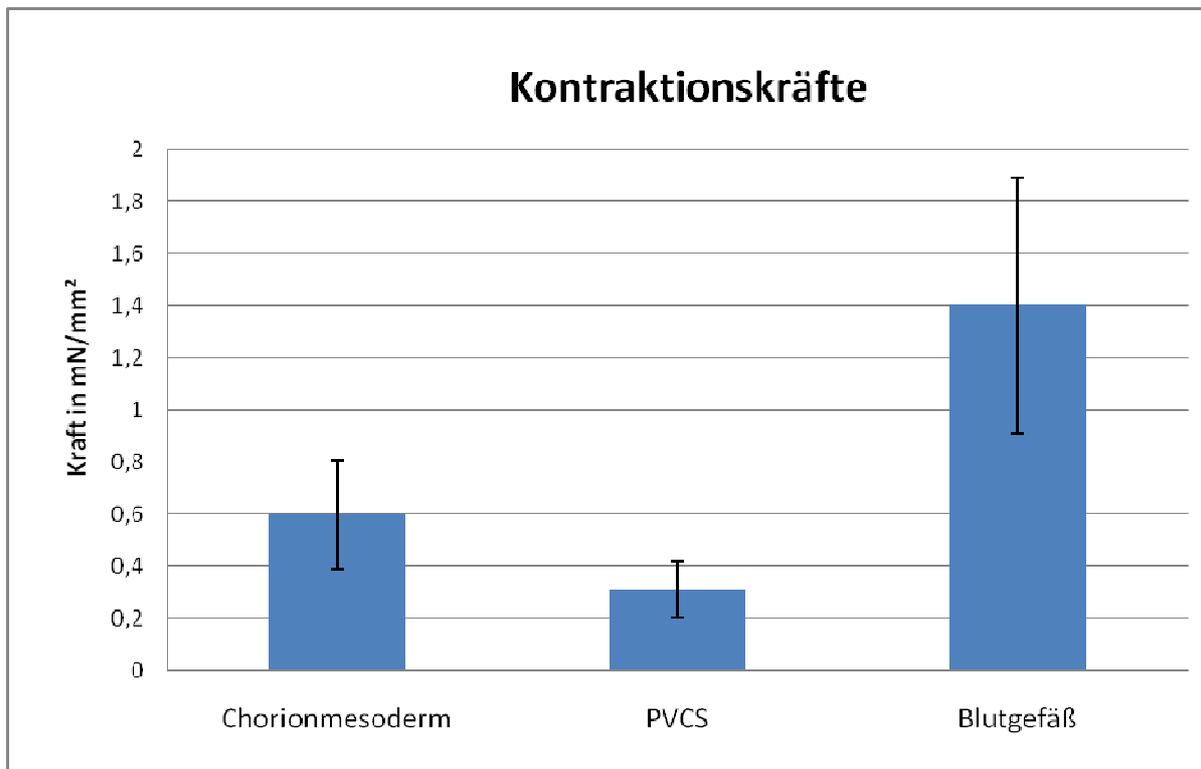


Diagramm 1: Mittlere Kontraktionskräfte von Blutgefäßen der Plazenta und der untersuchten alpha-Aktin-positiven Zellen des Chorionmesoderms und der PVCS.

### III.2. Meßergebnisse in Abhängigkeit verschiedener Parameter

Die Untersuchungen ergaben, daß sich flache Plazenten mit großem Durchmesser sowie einer geringen Vaskularisation besonders gut für die Untersuchung des Chorionmesoderms eigneten. Während sich die Proben der Plazenten Nr. 16 und 27 mit einem Durchmesser unter 15 cm, einer Dicke über 3 cm und starker Vaskularisation der Chorionplatte zu keiner meßbaren Kontraktion stimulieren ließen, konnten im Vergleich dazu die Proben der Plazenten Nr. 10 und 29 mit einem Durchmesser deutlich über 15 cm, einer Dicke unter 3 cm und geringer Vaskularisation wiederholt stimuliert werden. Diese Plazenten erreichten Kontraktionsstärken bis max. 0,95 bzw. 1,23 mN/mm<sup>2</sup> (Tab. 5, siehe Anhang). Schließlich schien auch der Nabelschnuransatz auf der Chorionplatte Einfluß auf die Stimulierbarkeit der Proben zu haben.

In der vorgelegten Arbeit wurden größere Kräfte in den Proben der Plazenten mit peripherem Nabelschnuransatz gemessen (Tab. 3 und Diagramm 2).

Messergebnisse der PVCS bei Stimulation mit 100 mM KCl-Lösung	
Nabelschnur zentral PVCS 30-3 Kraft in mN/mm <sup>2</sup> (mean ± SEM)	Nabelschnur randständig PVCS 29-1 Kraft in mN/mm <sup>2</sup> (mean ± SEM)
0,354±0,148	0,423±0,140

Tabelle 3 PVCS, Mehrfachstimulation jeweils einer Probe mit 100mM KCl-Lösung.

Die mittlere Kontraktilität aller Proben ist bei peripherer Insertion der Nabelschnur (NS) (0,73 mN/mm<sup>2</sup>) im Vergleich zur zentralen Insertion (0,37 mN/mm<sup>2</sup>) größer (Abb. 7). Der Unterschied bezogen auf die Nabelschnurinsertion beträgt 0,362 mN/mm<sup>2</sup>, dieser Unterschied ist nicht statistisch signifikant (p=0,13, Welch Test). Siehe Diagramm 2.

„Kleine dicke Plazenten“ zeigten keine Kontraktion, der Unterschied bezogen auf die Plazentadicke ist in der vorgelegten Arbeit nicht signifikant (p=0,054).

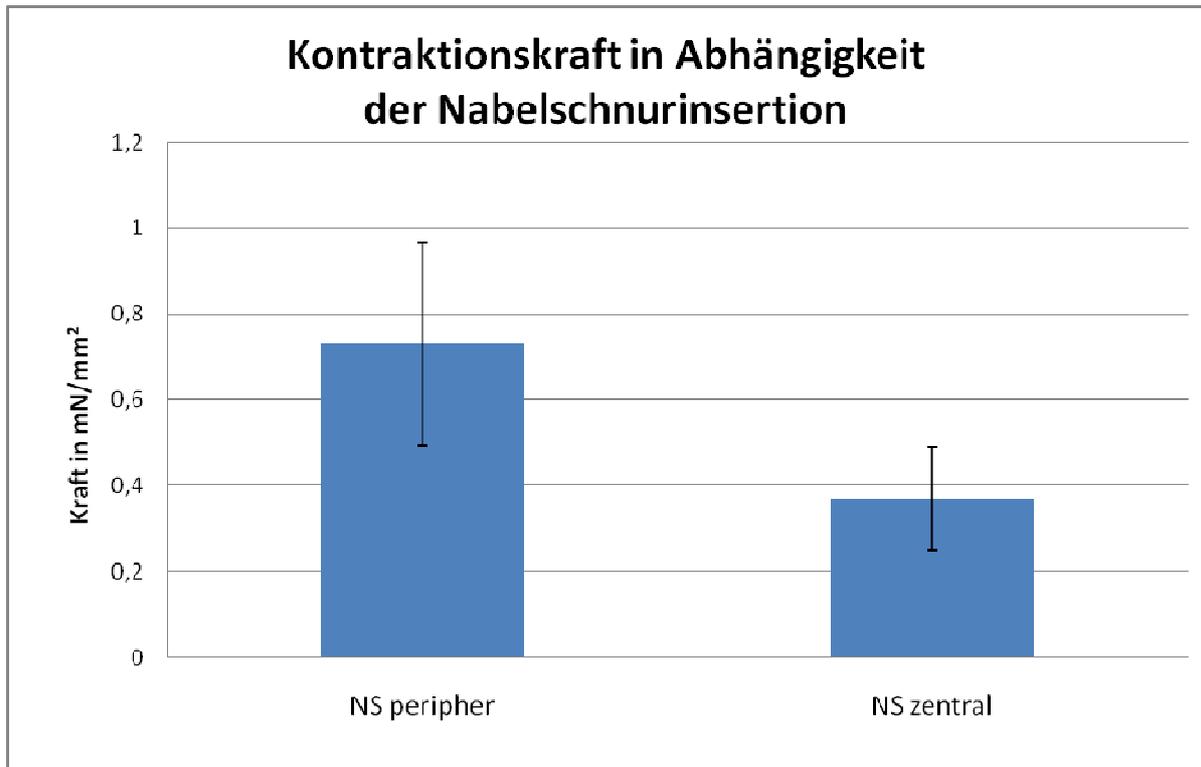


Diagramm 2: Mittlere Kontraktionskraft aller untersuchten Proben in Abhängigkeit der Nabelschnurinsertion.

Die Kontraktibilität der untersuchten Proben war im allgemeinen sehr stark von den Rahmenbedingungen abhängig. Dies umfaßt Faktoren, die auf die Plazenta während und nach der Geburt einwirken. So konnten bei einem Beginn der Präparation von mehr als 20 min post partum die untersuchten Proben zu keiner Kontraktion stimuliert werden. Erheblichen negativen Einfluß hatten auch Zerrungen des Gewebes durch die Präparation selbst. Sie führten zu starken Spontankontraktionen. Proben, die in Eis gekühlt transportiert und anschließend auf 37°C bzw. 21°C erwärmt wurden, konnten bei den durchgeführten Versuchen nur zu sehr schwachen Kontraktionen oder gar nicht stimuliert werden. Proben, die ohne Kühlung transportiert und untersucht wurden, erreichten die besten Ergebnisse in den muskelphysiologischen Untersuchungen.

In der vorgelegten Arbeit bewährte sich eine Probenentnahme aus dem mittleren bis zentralen Drittel der Chorionplatte in radiärer Richtung. Die Proben wurden immer aus dem größten Radius zwischen Nabelschnur und Plazentarand entnommen. Es zeigte sich schließlich, daß die Proben, die sofort nach der Präparation in den Präparategreifer eingespannt und untersucht wurden, durchweg schlecht zu stimulieren waren. Eine Ruhephase von 12-16 h bei Raumtemperatur in O<sub>2</sub> begasten PSS-Puffer führte zu gleichbleibend guten Ergebnissen.

### III.3. Muskelphysiologische Untersuchungen

#### III.3.1: Untersuchungen zur Kontraktilität des Chorionmesoderms und der perivasalen Manschette

Bei Stimulation mit 100 mM KCl-Lösung lagen die gemessenen Kräfte der Proben des Chorionmesoderms im Bereich zwischen 200-2650  $\mu\text{N}/\text{mm}^2$ , die der PVCS-Proben zwischen 200-570  $\mu\text{N}/\text{mm}^2$  (Tab. 4).

Zur besseren Abgrenzung von Artefakten wurde bei den Untersuchungen initial für jedes Präparat eine basale Aktivität in PSS-Puffer für ca. 10-15 min aufgezeichnet (Abb. 6 und Abb. 8). Hier zeigten sich geringe Leerschwankungen, die nach Einsatz des Transducers/ Analogcomputers KG 7 minimiert werden konnten. Anschließend erfolgte die Stimulation der Proben mittels 100 mM KCl-Lösung. Das Vorgehen bei der Untersuchung von Chorionmesoderm und PVCS war dabei grundsätzlich gleich (Abb. 7 und Abb. 8). In der vorgelegten Arbeit wurden bei gleicher Stimulation größere Kräfte bei den Proben des Chorionmesoderms im Vergleich zu den Proben der PVCS gemessen. Wie in Abb. 9 ersichtlich, konnten die Proben wiederholt zu Kontraktionen stimuliert werden. Dies gelang sowohl mit KCl-Lösung als auch mit den anderen orientierend untersuchten Substanzen. Bei der Untersuchung von Chorionmesoderm und PVCS ließen sich die besten Ergebnisse mit KCl-Lösung (100 mM), Endothelin-1 und Serotonin erzielen (Tab. 4).

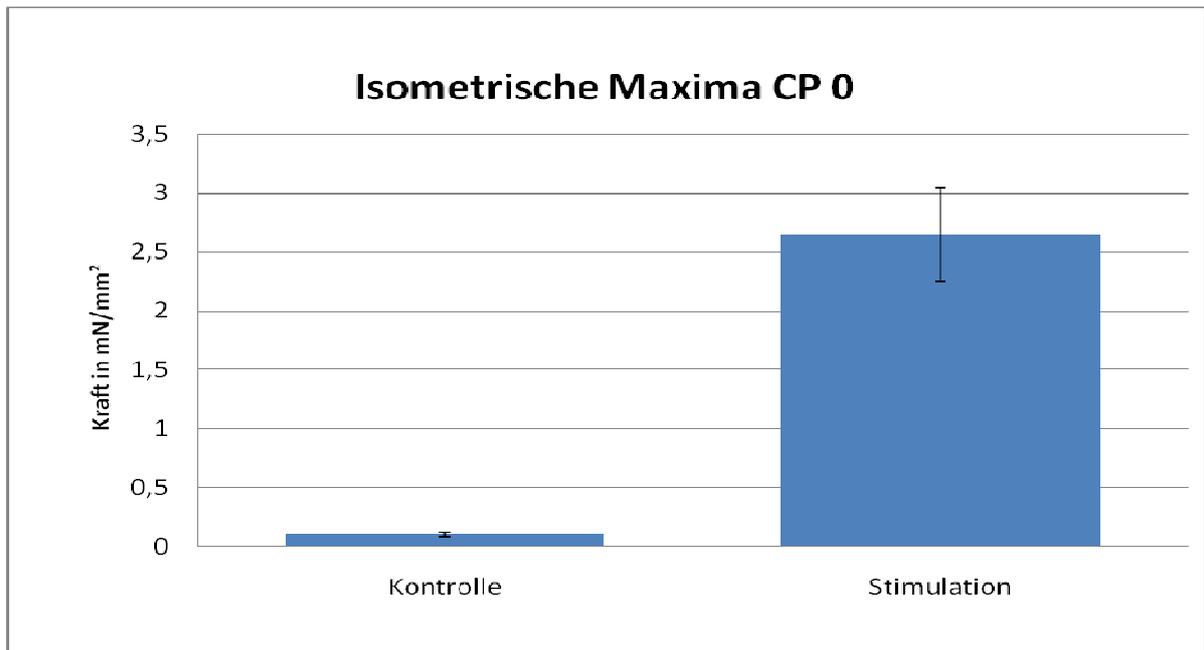


Abb. 6: Chorionmesoderm (CP), Plazenta 0, Stimulation mit 100 mM KCl-Lösung.

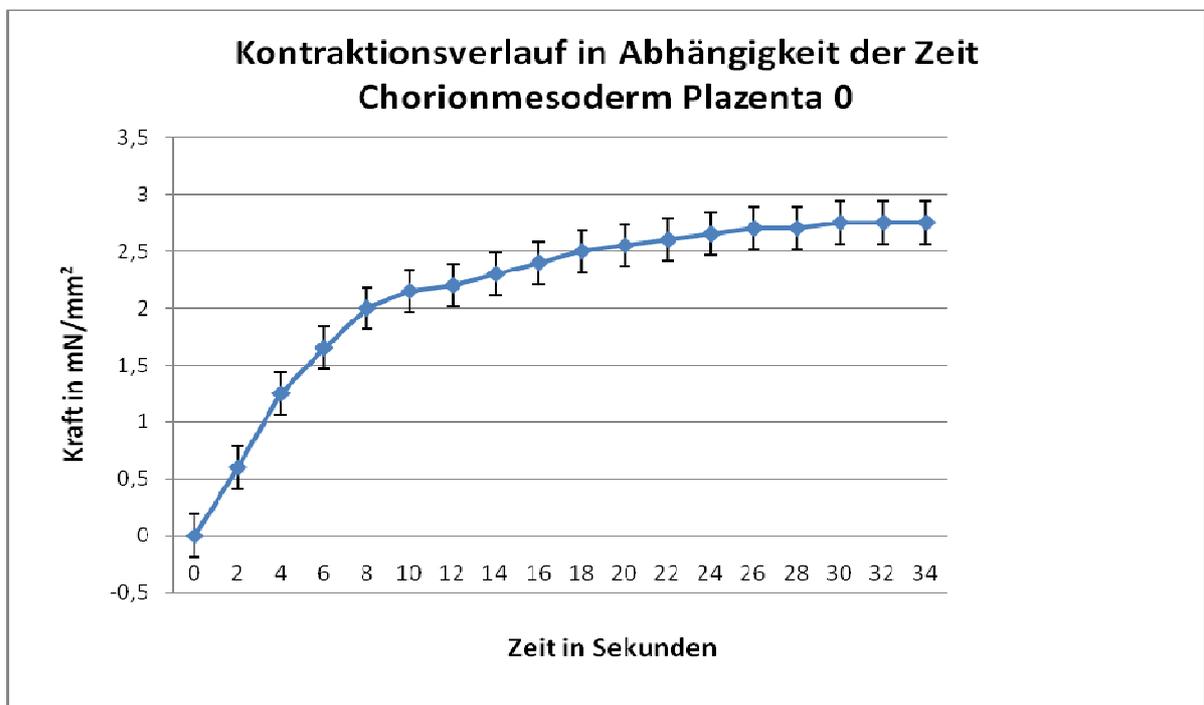


Abb. 7: Chorionmesoderm, Plazenta 0, Stimulation mit 100 mM KCl-Lösung, Transducer KG3.

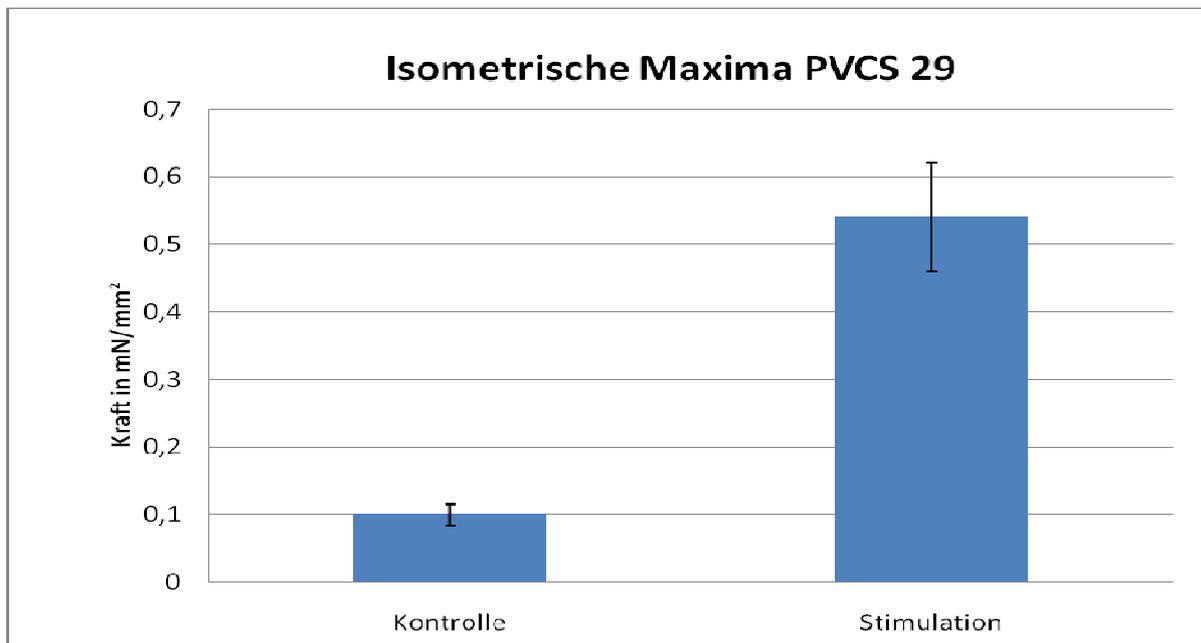


Abb. 8: PVCS, Plazenta 29, passive Kraft und anschließende Stimulation mit 100 mM KCl-Lösung, Transducer KG7a.

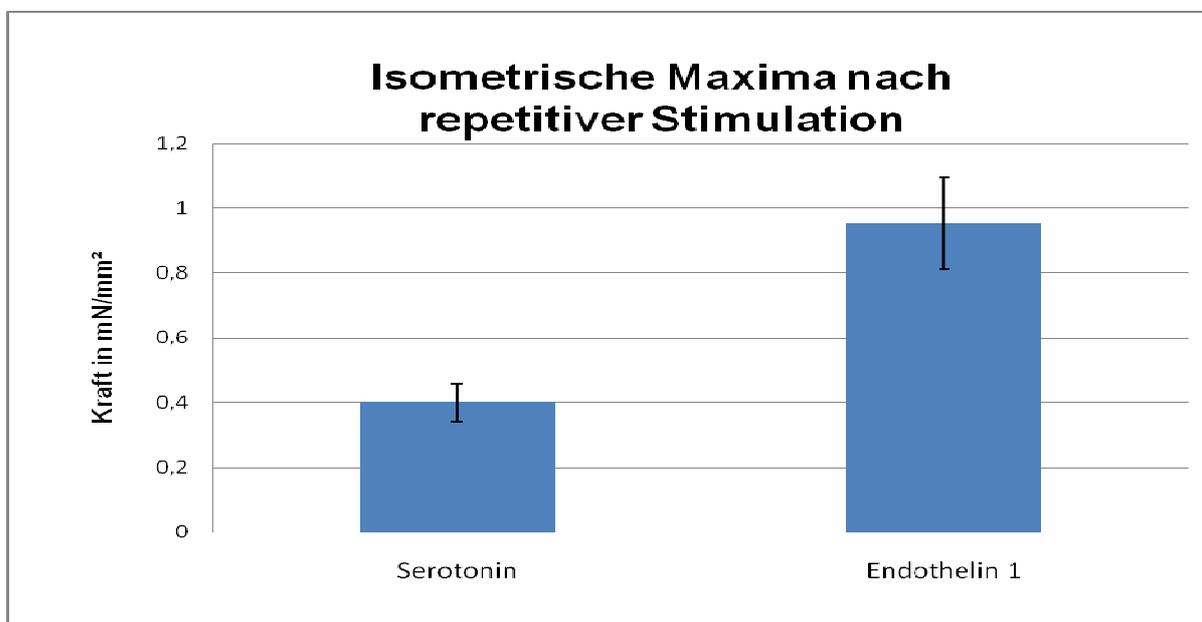


Abb. 9: Chorionmesoderm, Plazenta 10, repetitive Stimulation mit Serotonin und Endothelin-1, Transducer KG 3.

Präparat	Substanz	Kraft (mN/mm <sup>2</sup> )
		mean ± SEM
Chorionmesoderm	Serotonin	0,41±0,14
	Acetylcholin	0,26±0,05
	Angiotensin II	0,25±0,04
	Carbachol	0,25±0,05
	Endothelin-1	0,46±0,24
	Oxytocin	0,45
	PGF <sub>2α</sub>	0,35±0,14
	KCl 100mM	0,6±0,32
PVCS	Acetylcholin	0,3
	Serotonin	0,25
	Endothelin-1	0,36
	KCl 100mM	0,31±0,09
Blutgefäß	KCl 100mM	1,4±0,95
	Acetylcholin	0,85

Tabelle 4 Eingesetzte Substanzen und gemessene Kontraktionskräfte

### III.3.2: Untersuchungen zur Relaxation

Die durch einen Agonisten kontrahierten Proben konnten entweder durch Auswaschen des Agonisten mittels PSS-Puffer oder durch Substanz P bzw. Adenosin relaxiert werden. Dabei konnte jede durch einen Agonisten ausgelöste Kontraktion bis auf das Ausgangsniveau relaxiert werden. Von den anfänglich häufig aufgetretenen Spontankontraktionen mit Kräften bis zu  $6,9 \text{ mN/mm}^2$  konnte nur eine mittels Adenosin ( $10^{-6} \text{ M}$ ) teilweise relaxiert werden (Abb. 10). Die entsprechenden Konzentrationen der zur Untersuchung verwendeten Substanzen sind in Tab. 2 dargestellt.

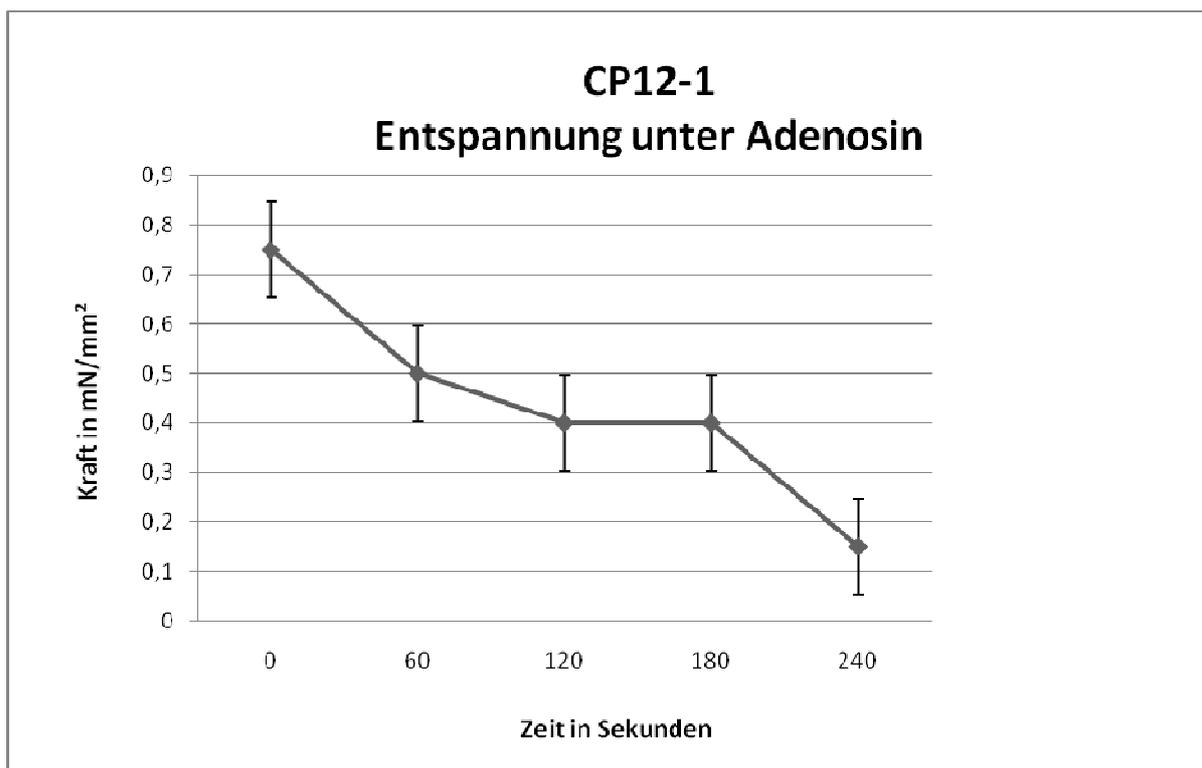


Abb. 10: Chorionmesoderm, Plazenta 12, Relaxieren einer Spontankontraktion mit  $10^{-6} \text{ M}$  Adenosin.

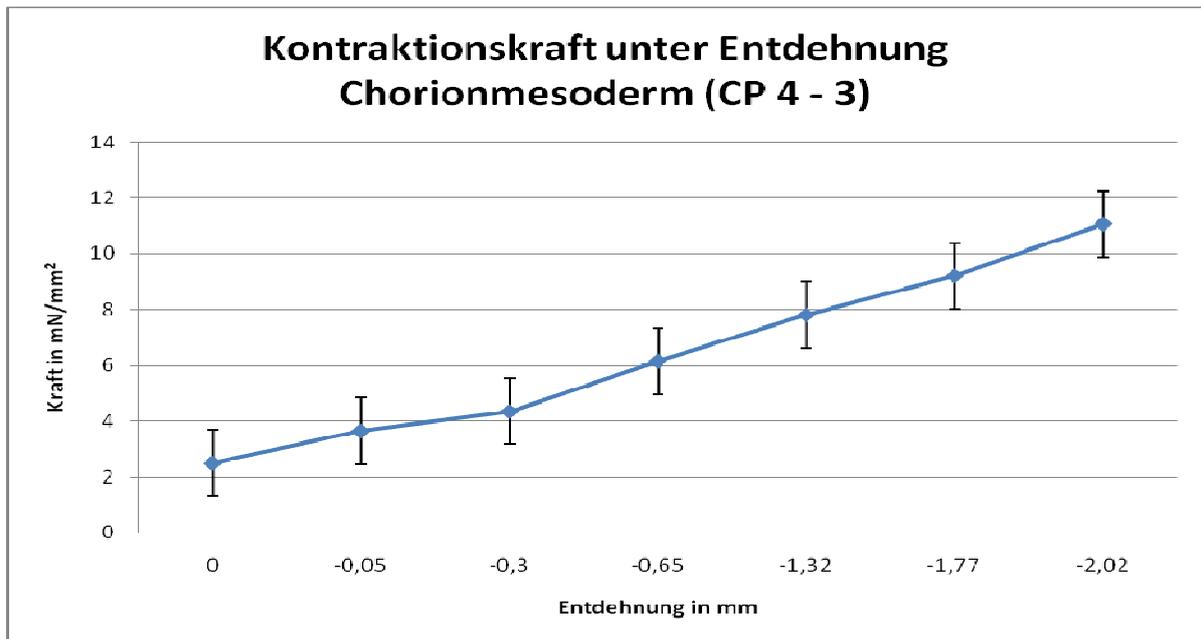


Abb. 11: Chorionmesoderm, Plazenta 4, repetitive Stimulation mit 100mM KCl-Lösung unter Veränderung der Vordehnung Ausgangslänge der Probe 3mm.

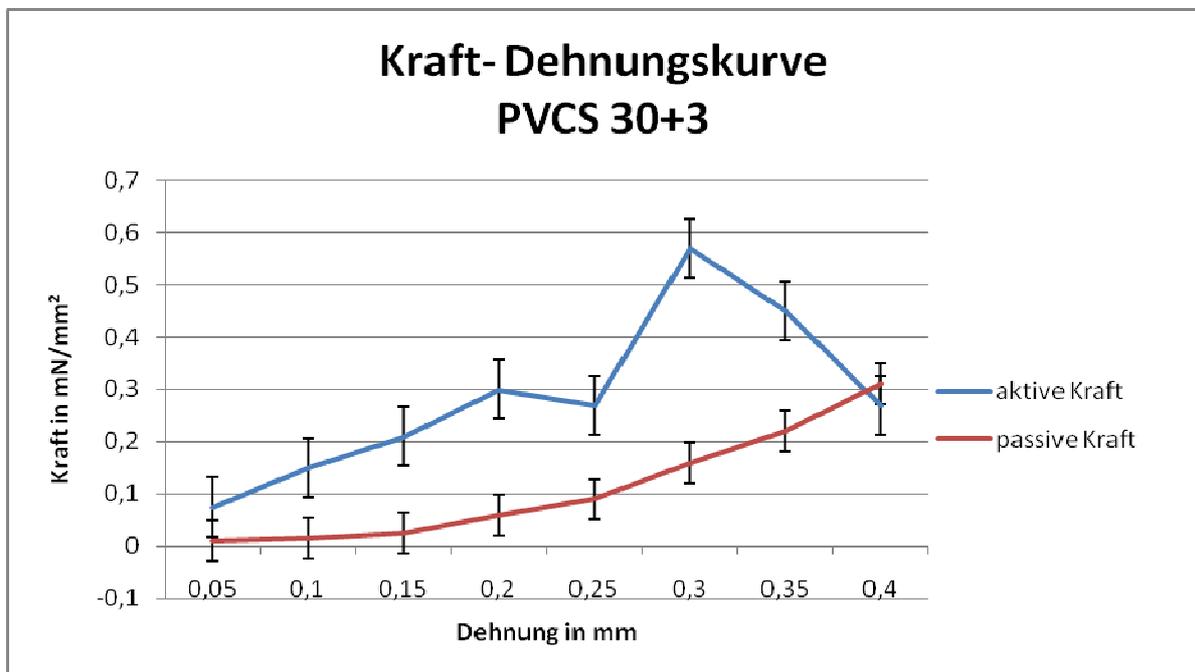


Abb. 12: PVCS, Plazenta 30, repetitive Stimulation mit 100 mM KCl-Lösung unter Veränderung der Vordehnung, Ausgangslänge der Probe 3mm.

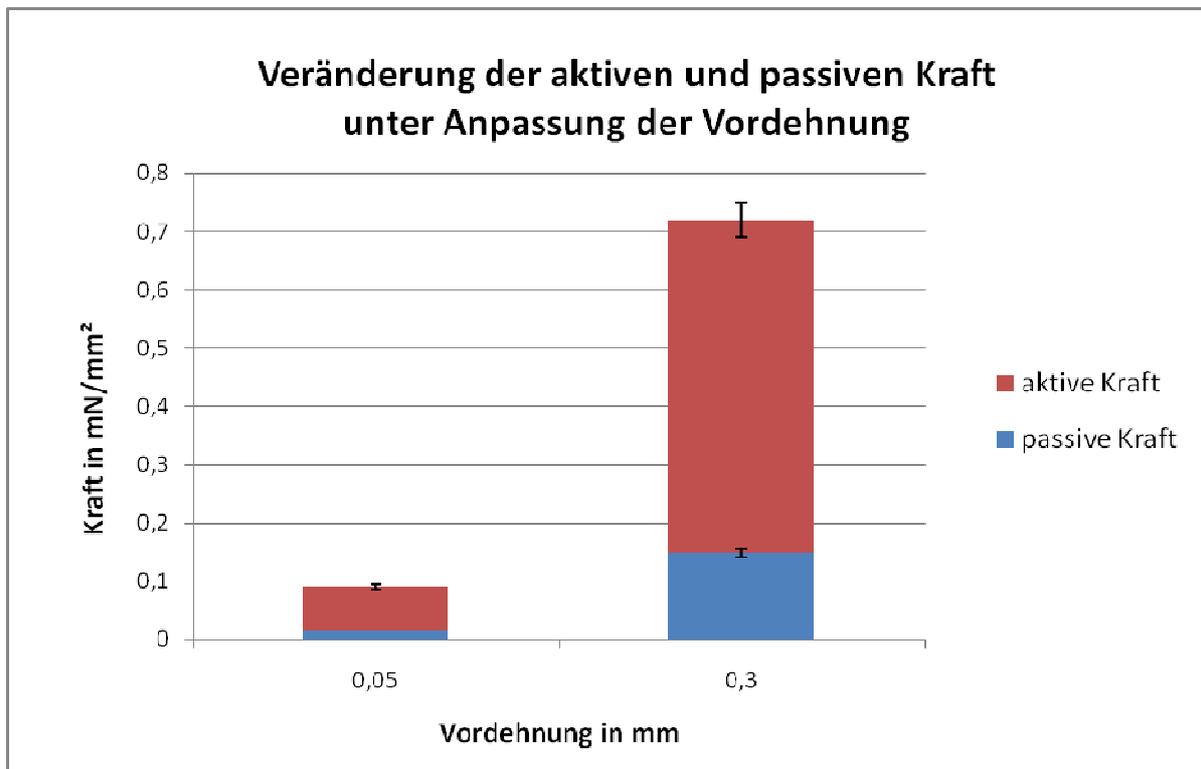


Abb. 13: PVCS, Plazenta 30, repetitive Stimulation einer Probe mit 100 mM KCl Lösung, mit jeweils nachfolgender Auswaschung durch PSS, unter Veränderung der Vordehnung (siehe auch Abb. 12).

### III.3.3: Kraft-/Dehnungskurven

Ausgehend von Untersuchungen an glatten Muskelzellen (Brozovich und Morgan, 1989), wurden gezielt Kraft-/Dehnungskurven erstellt. Wie in den Abb. 12 und 13 zu sehen ist, zeigte sich bei Dehnung dieser Probe (Ausgangslänge 3mm) schon bei 0,3 mm ein erstes Maximum von  $560 \mu\text{N}/\text{mm}^2$ , welches nach einem Abfallen der maximalen Kraft, noch einmal bei 0,45 mm erreicht werden kann. Dieser abrupte Abfall nach einem Maximum zeigte sich wiederholt bei Dehnung und anschließender Stimulation. Ganz im Gegensatz dazu, ist bei Entdehnung (Abb. 11) ein fast linearer Anstieg der maximalen Kraft bei zunehmender Entdehnung meßbar. Bei Versuchen mit fortlaufender Entdehnung wurden Kräfte bis  $6900 \mu\text{N}/\text{mm}^2$  generiert. Es wurden keine Unterschiede zwischen Proben der PVCS und des Chorionmesoderms gesehen.

### III.4. Immunhistochemische Nachweismethoden

Nach der muskelphysiologischen Untersuchung wurden alle Proben, die eine Kontraktion zeigten, immunhistochemisch auf das Vorkommen von  $\alpha$ -Aktin und des von Willebrand Faktors (vWF) untersucht. Sowohl in Proben des Chorionmesoderms als auch in der PVCS (Abb. 14) konnten immunhistochemisch  $\alpha$ -Aktin positive Zellen nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob die untersuchten Präparate frei von Blutgefäßen waren, wurden alle Präparate mit anti-vWF inkubiert. Die Blutgefäße des Trägermaterials (hier Schweineschnitzel) dienten bei jeder Untersuchung als Positivkontrolle. Reaktivität wurde in den Endothelzellen von Blutgefäßen des Schweineschnitzels (Abb. 15 und Abb. 17) gefunden. Von den 51 untersuchten Proben enthielt lediglich eine Probe (Plazenta 17, Probe 2) ein kleines Blutgefäß (Abb. 16). Diese Probe wurde von der Auswertung ausgeschlossen. In Abb. 17 ist deutliche Reaktivität im Trägermaterial zu erkennen, während die untersuchte Probe (hier PVCS) frei von Reaktivität bleibt.

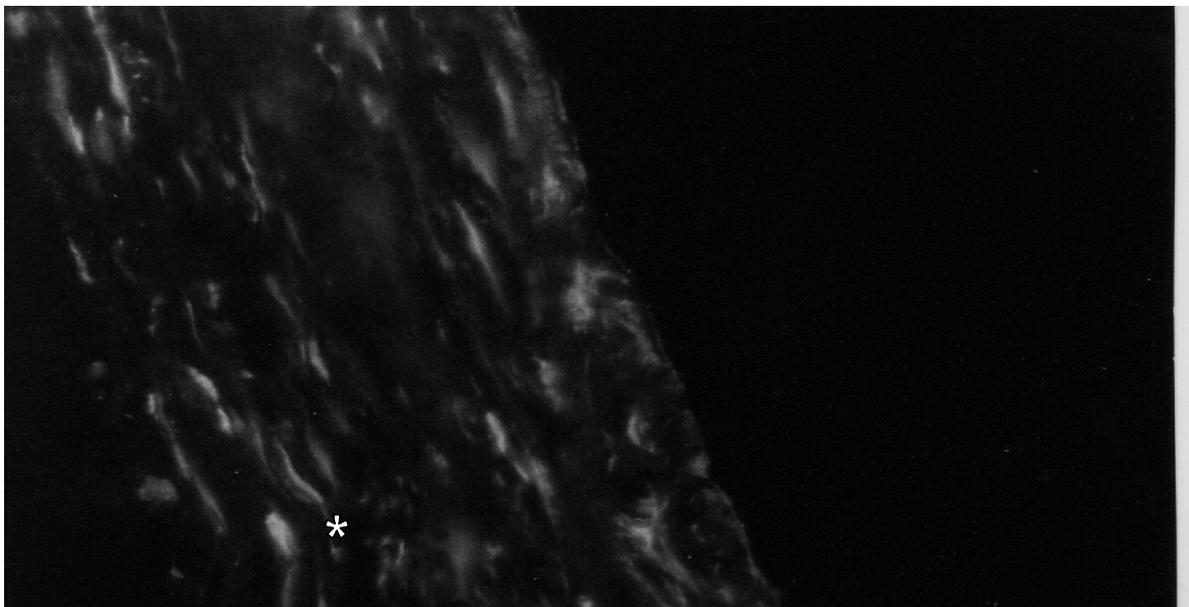


Abb. 14: PVCS. Immunfluoreszenz (\*) nach Inkubation mit anti- $\alpha$ -Aktin. Zahlreiche  $\alpha$ -Aktin positive Zellen in paralleler Verlaufsrichtung. Vergrößerung 800fach.

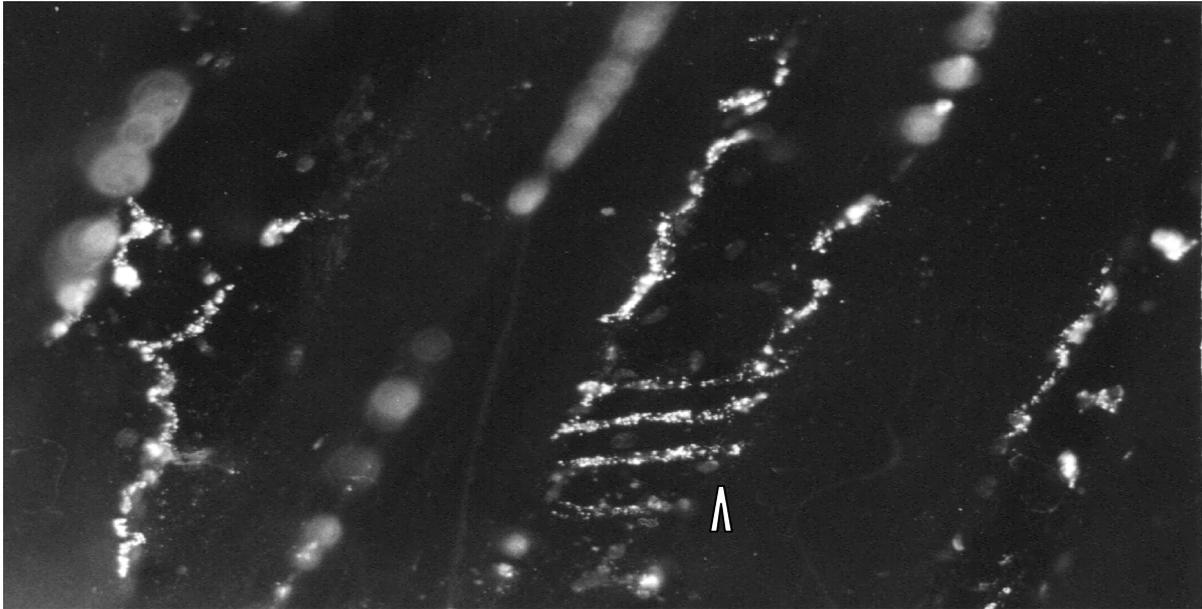


Abb. 15: Positivkontrolle. Immunfluoreszenz nach Inkubation mit anti-vWF. Blutgefäße (^) im Trägermaterial (hier Schweineschnitzel). Vergrößerung 500fach.

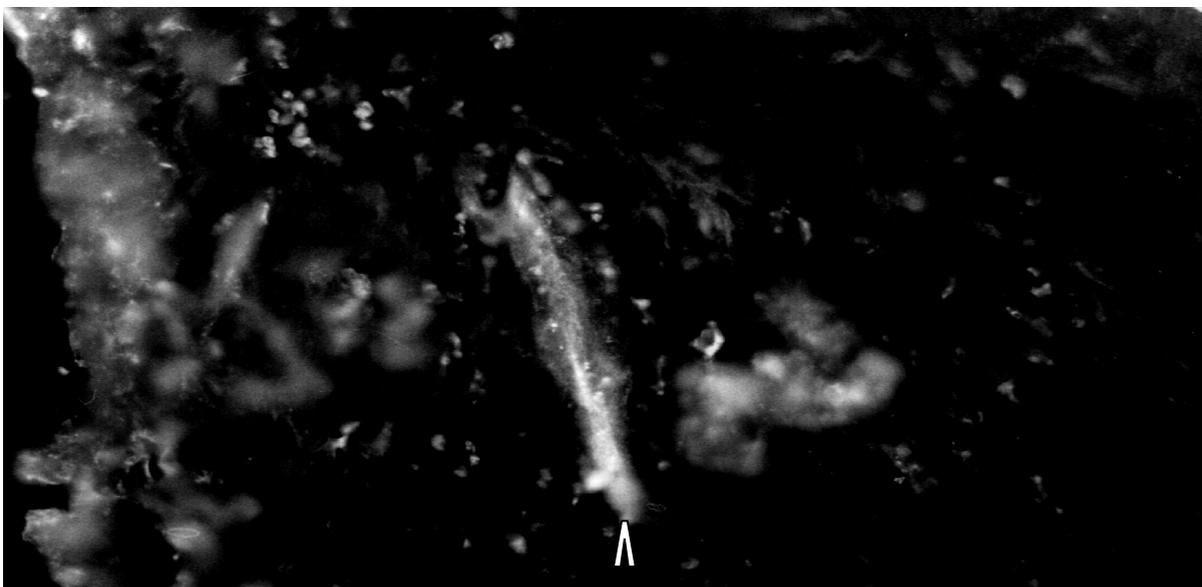


Abb. 16: Blutgefäß (^) im Chorionmesoderm, Immunfluoreszenz nach Inkubation mit anti-vWF. Vergrößerung 500fach.



Abb. 17: Immunreaktivität nach Inkubation mit anti-vWF, Visualisierung mit DAB. PVCS (X) auf Trägermaterial (hier Schweineschnitzel, oberes rechtes Drittel der Abbildung). PVCS ohne spezifische Immunreaktion (linke zwei Drittel der Abbildung). Deutliche Reaktivität (^) der Blutgefäße im Schweineschnitzel. Vergrößerung 500fach.

### III.5. Elektronenmikroskopie

Aus den gleichen Arealen der Chorionplatte, aus denen die Proben für die muskelphysiologischen Untersuchungen stammten, wurden mit derselben Technik Proben für die ultrastrukturelle Untersuchung entnommen. In den Schnitten fielen verschiedene Arten von Zellen auf: Fibrozyten und Fibroblasten sowie Zellen die über teilweise extrem lange und sehr filigrane Zellausläufer verfügten (Abb. 18- 21). Sie enthielten in Längsrichtung der Zellen zahlreiche zum Teil in Bündeln angeordnete Filamente, dense plaques, zellorganellreiche Areale und auffallend viele Caveolae (Abb.18-21). Sie entsprachen damit Myofibroblasten. Die Zellen lagen teilweise sehr weit auseinander, ihre Ausläufer waren über gap junctions miteinander verbunden. Desweiteren gab es ähnliche Zellen in den Gewebeproben, die neben weniger Filamenten, große Granula und zahlreiche primäre und sekundäre Lysosomen

(Abb. 18) enthielten. Glatte Muskelzellen mit den klassischen morphologischen differentialdiagnostischen Kriterien waren nicht erkennbar.

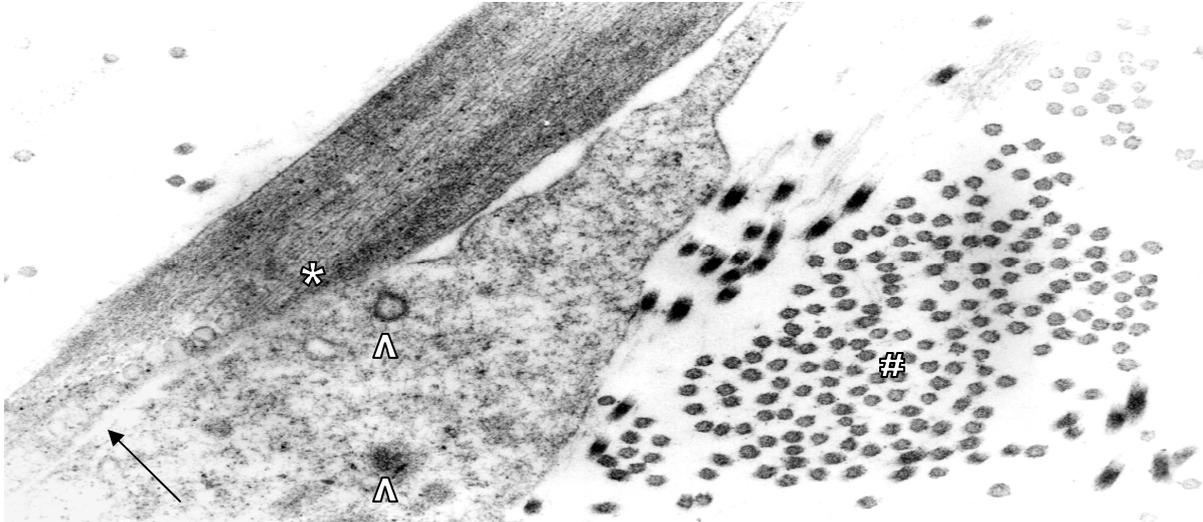


Abb. 18: Zwei Ausläufer von Myofibroblasten des Chorionmesoderms umgeben von Kollagenfasern (#). Filamente (\*), Caveolae (Pfeil), Lysosomen (^). Vergrößerung 20000fach.

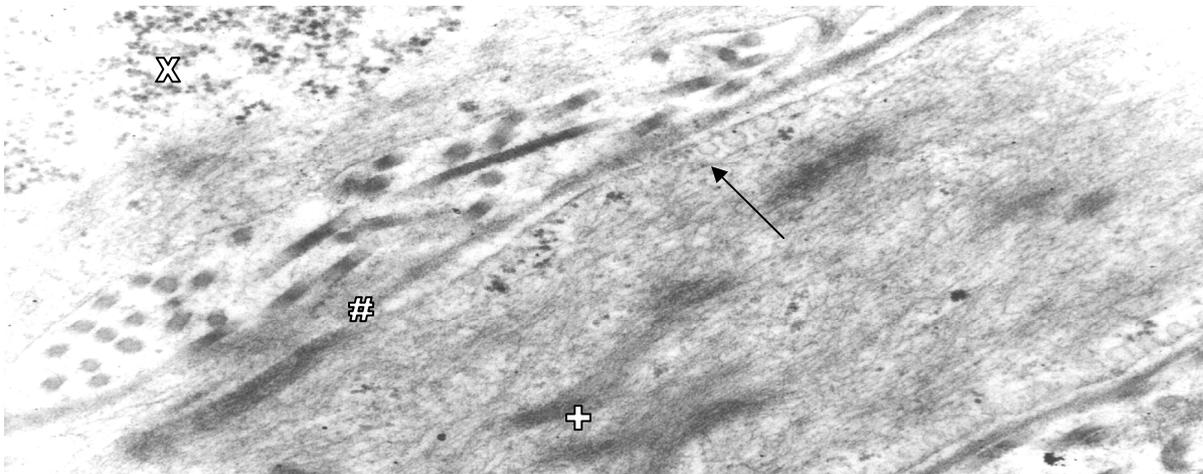


Abb. 19: Zwei Myofibroblastenausläufer im Chorionmesoderm. Der obere Zellausläufer enthält Glykogen (X), im unteren Zellausläufer zahlreiche Caveolae (Pfeil), sowie filamentreiche Zone mit dense plaques (+). Kollagenfasern (#). Vergrößerung 20000fach.

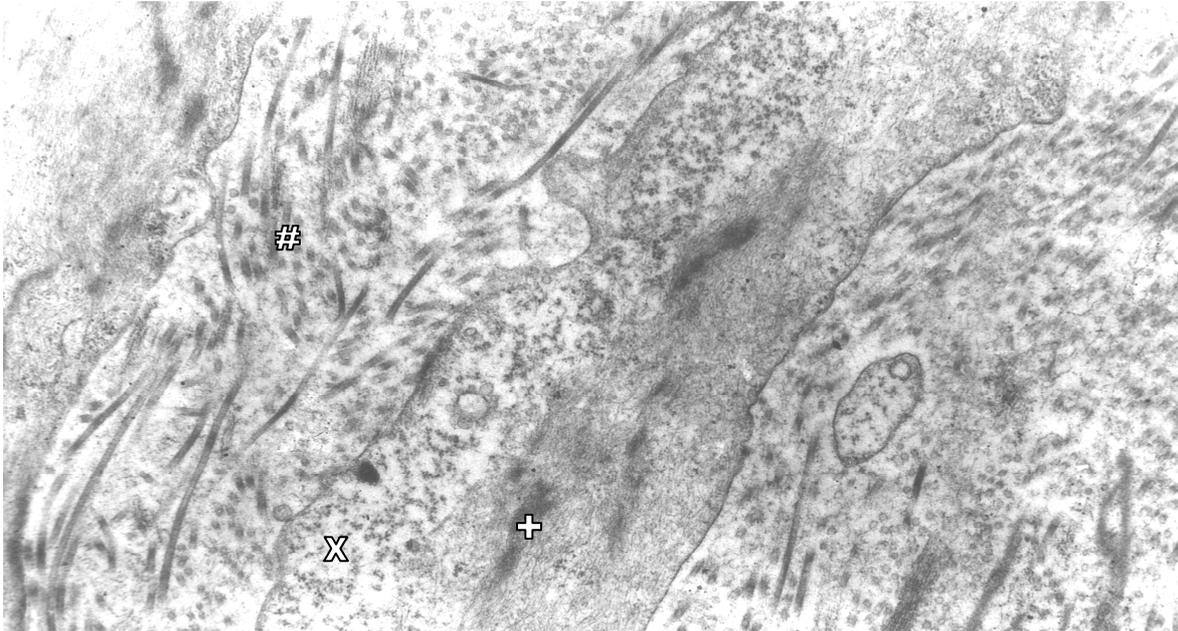


Abb. 20: Zwei Zellausläufer von Myofibroblasten im Chorionmesoderm. Filamentreiche Zone mit dense plaques (+), glykogenreiche Zone (X), Kollagenfasern (#). Vergrößerung 25200fach.

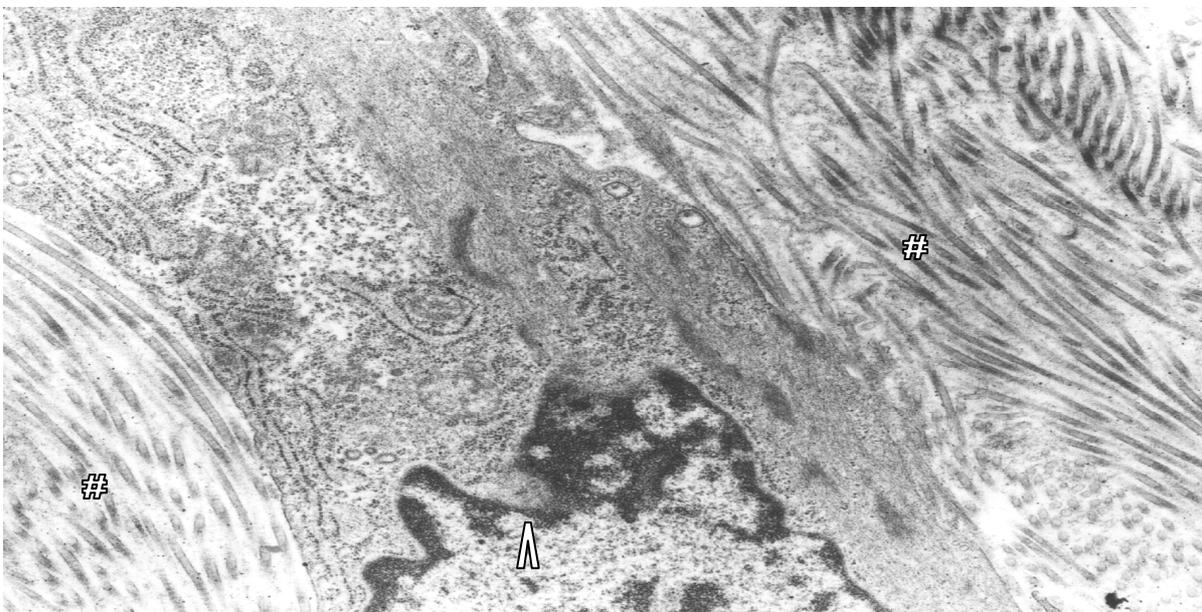


Abb. 21: Myofibroblast im Chorionmesoderm, filamentreiche Zone mit dense plaques in der rechte Seite der Zelle. Umgeben von Kollagenfasern (#), Zellkern (^). Vergrößerung 25200fach.

## IV. Diskussion

In der vorgelegten Arbeit konnte erstmals zweifelsfrei gezeigt werden, daß die in muskelphysiologischen Untersuchungen nachgewiesenen kontraktile Eigenschaften des extravasalen Systems der Chorionplatte und der PVCS der Stammzotten nicht auf einer Kontamination des Gewebes mit den Mediamuskelzellen der fetalen Gefäße beruhen, sondern eine eigenständige Leistung der  $\alpha$ -Aktin-positiven Zellen darstellen. Damit leistet die vorgelegte Arbeit einen entscheidenden Beitrag zur Beilegung eines fast einhundert Jahre währenden Disputes in der Plazentaforschung, in dem immer wieder angezweifelt wurde, daß es in der Humanplazenta außerhalb von Blutgefäßen kontraktile Zellen gibt.

### IV. 1. Myofibroblasten

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, wurde seit Happe (1906) von der Existenz glatter Muskelzellen in der humanen Plazenta ausgegangen. In seiner ultrastrukturellen Untersuchung der Chorionplatte beschreibt und dokumentiert Bertolini 1969 erstmals Zellen mit deutlichen zytologischen Kriterien von Myofibroblasten, ohne die Zellen jedoch so zu bezeichnen. Schiebler und Kaufmann (1981) bezeichneten diese Befunde als falsch. Im Gegensatz dazu, wurde in späteren ultrastrukturellen Untersuchungen anderer Autoren der Nachweis von Myofibroblasten bzw. Glattmuskelzell-ähnlichen Zellen in der Chorionplatte und in den Stammzotten bestätigt (Feller et al. 1985; Demir et al. 1992; Kohnen, 1993; Graf et al. 1994). Die Befunde der vorgelegten Untersuchung, in der die extravasalen Zellen mit kontraktile Ultrastruktur jeweils Myofibroblasten darstellen und sowohl in den Proben des Chorionmesoderms als auch in den Stammzottenmanschetten gefunden wurden, stehen mit den Arbeiten von Feller et al. (1985), Demir et al. (1992), Kohnen (1993) und Graf et al. (1994) im Einklang.

Myofibroblasten können sich auf einen funktionellen Reiz hin aus Fibroblasten differenzieren und besitzen die morphologischen Kriterien sowohl von Fibroblasten als auch von glatten Muskelzellen (Skalli et al., 1987; Schürch et al. 1992; Lüllmann-Rauch, 2003). Zu diesen Kriterien zählt ihr spindelförmiges bis polygonales Aussehen mit langen zytoplasmatischen Zellausläufern, die u.a. über gap junctions miteinander verbunden sind. Sie besitzen zahlreiche Caveolae resp. subplasmalemmale Vesikel. Im Zytoplasma befinden sich viele mit dense bodies durchsetzte Mikrofilamente, die parallel zur Längsachse der Zellen angeordnet sind. Charakteristisch ist auch die im Vergleich zu den glatten Muskelzellen reiche Ausstattung mit Golgi Apparat und rauhem endoplasmatischem Retikulum, so wie es für die Fibroblasten typisch ist. Als Zeichen ihrer Kontraktion finden sich in vielen Myofibroblasten Einkerbungen des Zellkerns (Lane, 1965; Bloom und Cancilla 1969; Franke und Schinko 1969; Majno et al. 1969; Rudolph et al., 1977). Die Basallamina der Myofibroblasten ist lückenhaft und die Zellen sind über so genannte fibronexus mit dem Stroma verbunden (Singer, 1979, Singer et al. 1984). Sämtliche dieser Kriterien konnten in der vorgelegten Arbeit in den Zellen der Gewebeproben der Chorionplatte und der Stammzotten ultrastrukturell nachgewiesen werden. Da die entsprechenden Proben für die ultrastrukturellen Untersuchungen nach denselben Kriterien, die für die Entnahme für die muskelphysiologischen Untersuchungen galten, entnommen wurden, kann bei den Zellen der vorgelegten Untersuchung von Myofibroblasten ausgegangen werden. Untermauert wird dieser Befund durch den immunzytochemischen Nachweis von  $\alpha$ -Aktin in Zellen der Gewebeproben des Chorionmesoderms und der Stammzotten, die im Anschluß an die muskelphysiologischen Untersuchungen untersucht wurden.  $\alpha$ -Aktin ist ein essentielles kontraktiles Protein der Myofibroblasten (Skalli et al. 1987). Damit decken sich die eigenen Ergebnisse mit denen von Graf et al. (1992).

## IV.2. Muskelphysiologische Untersuchungen

Für die Messung der Kräfte kontraktiler Zellen werden im wesentlichen zwei Methoden der Kraftmessung angewandt. Dies sind zum einen isometrische und zum anderen isotonische Kraftmessungen. Bei den isometrischen Untersuchungen werden die Kräfte gemessen, die gegen einen Widerstand geleistet werden, ohne daß sich der Muskel dabei verkürzt. Das Produkt aus Kraft mal Weg ist Null. Der Muskel verrichtet somit eine statische Arbeit. Man mißt hierbei die für den jeweiligen Stimulus maximal auftretende Kraft.

Isotonische Messungen erfassen die Kräfte, die nötig sind, eine vorgegebene Kraft zu überwinden. Hier wird dynamische Arbeit verrichtet. Positiv dynamische Arbeit, wenn der Muskel die vorgegebene Kraft überwindet und sich verkürzt. Übersteigt die vorgegebene Kraft die des Muskels, wird der Muskel bei der Kontraktion gedehnt, es wird negativ dynamische Arbeit verrichtet. Isotonische Kraftmessungen erfassen nur die von außen vorgegebene Kraft. Um solche Messungen durchführen zu können, sollte im Vorfeld schon klar sein, in welcher Größenordnung die Kräfte liegen. Da für die vorgelegte Untersuchung keine Größenordnungen bekannt waren, waren isometrische Messungen zur Erfassung der für den jeweiligen Stimulus maximalen Kraft besser geeignet. Zur Stimulation wurde 100mM KCl-Lösung verwandt. Der Mechanismus, dem eine Kontraktion durch die Gabe einer 100mM KCl-Lösung zugrunde liegt, besteht in einer Depolarisation der Zellmembran. Es kann somit im Verlauf der Versuche nicht zu einer Adaptation der jeweiligen substanzspezifischen Rezeptoren kommen, die dann ein falsch positives oder negatives Ergebnis ergeben könnten. Weiterhin entstehen auch keine falsch negativen Ergebnisse durch das eventuelle Fehlen einiger substanzspezifischer Rezeptoren. KCl ist eine der am stärksten kontraktile wirkenden Substanzen, sie war somit für diese erste Untersuchung besonders geeignet.

Mit der vorgelegten Untersuchung konnte gezeigt werden, daß nach Anwendung der unter Punkt II.1.1. genannten Ausschlußkriterien 96,26 % der untersuchten Proben in der Lage sind, sich adäquat auf einen von außen zugeführten Reiz zu kontrahieren. Die  $\alpha$ -Aktin positiven Zellen in den untersuchten Proben erfüllten somit das wichtigste Kriterium einer kontraktilen Zelle, nämlich die Kontraktion auf einen adäquaten Reiz. Diese Kontraktionen konnten sowohl in den Gewebeproben der PVCS als auch in denen des Chorionmesoderms nachgewiesen werden. Die gemessenen Kräfte (200-2600 $\mu$ N) bewegten sich dabei im Bereich der Kräfte, die von Myofibroblasten generiert werden können (Gabbiani, 1992; Schürch et al. 1992; Kolodney und Wysolmerski 1992). Schließlich konnte auch das Ansprechen auf relaxierende Substanzen gezeigt werden.

Auffällig sind die unterschiedlichen Kontraktionskräfte der Proben der einzelnen Plazenten. Erklärungen könnten sich einerseits aus den unterschiedlichen „Belastungen“ während der Schwangerschaft wie z.B.: Dauer der Wehentätigkeit, Pressperiode, applizierte Pharmaka oder auch die intrauterine Verweildauer nach dem Blasensprung und andererseits aus morphologischen Besonderheiten wie z. B. Dicke der Plazenta, Nabelschnuransatz oder unterschiedliche Zahl der Myofibroblasten pro untersuchter Gewebeprobe ergeben.

Der Sitz der Plazenta befindet sich in der Regel im Bereich des zentralen Fundus uteri bzw. im Bereich der lateralen Uteruswand (Gonser et al. 1996, Beck, 1992). Folglich befindet sich die Basalplatte unter Bedingungen wie Stehen, Sitzen und Gehen eher kranial. Das mütterliche Blut wird also nicht gegen die Schwerkraft in den intervillösen Raum hineingespritzt und läuft dann nicht mit der Schwerkraft wieder heraus. So wird es meistens in den Abbildungen zum mütterlichen Blutfluß durch die Plazenta in den gängigen Lehrbüchern und in der Fachliteratur (Stieve, 1940, Corner, 1963, Benirschke und Kaufmann, 1990) zwar einleuchtend, jedoch ohne Beachtung der richtigen Position der Plazenta im Uterus falsch dargestellt. Liegt die Plazenta im zentralen Bereich des Fundus uteri, fällt das mütterliche Blut förmlich in den intervillösen Raum und muß gegen die Schwerkraft wieder herausgeleitet werden. Klar wird diese Betrachtung an hand der wenigen

Abbildungen mit richtiger Position der Plazenta im Uterus (siehe hierzu Boyd und Hamilton, 1970). Spanner (1936) postulierte bereits, daß innerhalb der Plazenta zwei Systeme zur Verspannung existieren. Das eine System beschreibt er als passive Verspannung, bei der die Chorionplatte mittels Haftzotten mit der Dezidua verbunden ist, das andere stellt das aktive Muskelzellsystem dar, welches von der Chorionplatte in die Stamm- und Haftzotten reicht. Bei Kontraktion dieses aktiven Systems, so Spanner 1936, würde sich nicht nur die Chorionplatte kontrahieren sondern auch die Stammzotten und somit bei jeder Kontraktionswelle die Chorionplatte gegen die Dezidua lenken. Die dabei entstehende Kraft würde das mütterliche Blut gegen die Schwerkraft aus dem intervillösen Raum in den venösen Randsinus und damit in die Uterusvenen treiben. Durch diesen beschriebenen Mechanismus für den Abfluß des mütterlichen Blutes aus der Plazenta kommt es zu einer hohen Beanspruchung der Plazentaarchitektur. Durch die einwirkenden Kräfte könnte es während der Plazentaentwicklung zu einer gerichteten und damit funktionell wirkungsvollen Anordnung der  $\alpha$ -Aktin-positiven Zellen bzw. ihrer Filamente kommen. Nach Untersuchungen von Kolodney und Wysolmerski (1992) können Nichtskelettmuskelzellen, anders als Skelettmuskelzellen, bei denen die Anordnung des Zytoskeletts definiert ist, ihr Zytoskelett als Antwort auf physiologische Stimuli neu arrangieren. Gestützt wird diese Vermutung durch morphometrische Untersuchungen von Plazenten von Patientinnen mit Präeklampsie, bei denen die PVCS deutlich schwächer ausgebildet ist als bei Plazenten von unkomplizierten Schwangerschaften (persönliche Mitteilung von Prof. Graf). Außerdem sind die Präeklampsie-Plazenten deutlich weicher und 'schwammiger' von der morphologischen Konsistenz her, als Plazenten unkomplizierter Geburten (ebenfalls persönliche Mitteilung Prof. Graf). Bei Präeklampsie entfällt die Trophoblasteninvasion der Spiralarterienwand. Damit könnte auch der physiologische Stimulus zum Neuarrangement des Zytoskeletts von Nichtskelettmuskelzellen, hier der Myofibroblasten, fehlen.

Nach den Untersuchungen von Bacon et al. (1986) sind die zentralen und parazentralen Bereiche der Plazenta die Regionen mit den besten Stoffaustauschraten, was für eine hohe Durchblutung und damit auch eine hohe Belastung spricht. Nach Ansicht Bacons (1986) scheinen diese Bereiche für

repräsentative Untersuchungen besonders geeignet zu sein. In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, daß die besten Resultate in der Untersuchung des CM bei den Proben des mittleren bis zentralen Drittels der Plazenta gefunden wurden. Wie unter Punkt III. 2. aufgeführt, zeigten morphologische Kriterien wie z. B. zunehmende Plazentafläche und abnehmende Dicke des Organs eine bessere Stimulierbarkeit mit stärkeren Kontraktionen, während zunehmende Plazentadiecke bei abnehmender Plazentafläche zu schlechteren Messergebnissen führte. Diese Ergebnisse könnten die These über eine der Belastung angepaßten Neuordnung des Zytoskeletts (Kolodney und Wysolmerski (1992) und der damit verbesserten Funktion der untersuchten Zellen, hier der Myofibroblasten, unterstützen. Statistisch zeigt sich in der vorgelegten Arbeit eine Tendenz zur Signifikanz, da nur 2 „kleine dicke Plazenten“ in der Untersuchungsstichprobe enthalten waren.

Schließlich konnte, wie auch in der Arbeit von Krantz und Parker (1963), gezeigt werden, daß Proben aus Plazenten, die 20 min und mehr nach dem Kind geboren wurden, zu keiner Kontraktion stimulierbar waren. Damit könnte die Dauer des Kontaktes mit der stehenden Blutsäule eine entscheidende Rolle für die Stimulierbarkeit der untersuchten Zellen haben. Da durch die einsetzende Hämolyse u.a. große Mengen von Kaliumionen frei werden, kommt es zwangsläufig zu Depolarisationen an der Zellmembran der zu untersuchenden Zellen. Eine erneute Stimulation mittels 100mM KCl-Lösung innerhalb kürzester Zeit ist schwer zu erreichen. Die besseren Ergebnisse bei den muskelphysiologischen Untersuchungen nach 12-16-stündiger Ruhephase in PSS-Lösung sprechen hierfür.

Wie in der Chorionplatte sind die Myofibroblasten und die sie umgebenden kollagenen und elastischen Fasern auch in der PVCS morphologisch streng geordnet. Die vorgelegten Meßergebnisse zeigen jedoch, daß die Gewebeproben des Chorionmesoderms höhere Kräfte generieren als die der Stammzotten. Die angewandten Methoden der vorgelegten Arbeit lassen eine Erklärung für diesen Befund derzeit nicht zu. Hier könnten morphometrische Untersuchungen der Gewebeproben geeignet sein, mit denen die tatsächliche Dichte der Zellen pro untersuchtes Probenvolumen erfaßt werden kann. Abgesehen von der zahlenmäßigen Verteilung der kontraktile Zellen pro Fläche kommt es, wie Kohnen

et al. (1995, 1996) in ihrer Arbeit feststellten, in der PVCS zu einer Umdifferenzierung der subtrophoblastären Fibroblasten zu Myofibroblasten mit der Differenzierungsrichtung zum zentralen Gefäß hin. Diese Umdifferenzierung betrifft auch das Zytoskelett der jeweiligen Zellen. Der höchste Anteil an ausdifferenzierten Myofibroblasten befindet sich somit unmittelbar neben dem Gefäß.

### IV.3. Physiologie

Im Rahmen der Plazentaforschung wurde schon früh die Frage diskutiert, wie das mütterliche Blut aus dem intervillösen Raum zurück in den mütterlichen Kreislauf gelangt, da es sich außerhalb der mütterlichen Strombahn befindet und somit nicht durch diese beeinflusst werden kann. In der Literatur (Hörmann, 1953, Kaufmann, 1985, Polin und Fox 1992) wurden verschiedene Modelle der Zirkulation durch die Plazenta auf mütterlicher und fetaler Seite diskutiert. Hierbei wurde insbesondere auf mögliche Einflußnahmen sowohl von fetaler als auch mütterlicher Seite hingewiesen. Grosser (1927) sah nicht die Triebkraft des Herzens, sondern die Wehen des Uterus als Hauptmechanismus der Durchblutung und Entleerung des intervillösen Raumes an. Andere Autoren (Dyroff, 1929 und Pankow, 1929) gehen davon aus, daß nicht meßbare Partialkontraktionen des Uterus den intervillösen Raum entleeren. Hingegen hält Spanner (1936) die Wehen für die Aufrechterhaltung des Kreislaufes im intervillösen Raumes nicht für nötig, vielmehr geht er davon aus, daß die Tonusschwankungen des Myometrium die Entleerung des intervillösen Raumes begünstigen können. Schroeder (1930) führt hierzu an, daß die Tonusschwankungen den zwischen Uteruswand und inkompressibler Fruchtblase gelegenen intervillösen Raum in guter Spannung halten, wie die Gefäßwand ihr Gefäß. Schließlich könnten laut Spanner (1936) Tonusschwankungen der Plazenta selbst Einfluß auf die Durchblutung haben. Neben Spanner (1936) sahen auch Dubreuil und Rivière (1932) in den Wehen während der Schwangerschaft keinen geeigneten Mechanismus zur Entleerung des intervillösen Raumes oder zur Steuerung der Durchblutung desselben. Daß die Wehen keinen geeigneten Mechanismus zur Steuerung der Durchblutung darstellen, entspricht auch der eigenen Ansicht. Zum einen nimmt die Wehentätigkeit

erst im Verlauf der Schwangerschaft zu und zum anderen gibt es nachweislich große Phasen ohne jegliche Wehentätigkeit in der Schwangerschaft. Schließlich werden unter einer Kontraktion des Myometrium sowohl Arterien als auch Venen komprimiert; es ist somit nicht nachvollziehbar, daß die Venen als Niederdrucksystem weniger komprimiert werden als die Arterien mit ihrem Hochdrucksystem. In Anbetracht dieser Tatsache müßte es unter einer Wehe zu einem Blutstau in der Plazenta kommen, da die Venen komprimiert sind und somit das Blut aus dem intervillösen Raum schlechter ableiten können, die Arterien jedoch, wenn auch eingeschränkt, in der Lage sind, weiter Blut in den intervillösen Raum zu pumpen. Somit ist dieser Mechanismus zur Steuerung der Durchblutung des intervillösen Raumes ungeeignet. Rankin und McLaughlin (1979) waren in diesem Zusammenhang in ihren Untersuchungen zu der Meinung gekommen, daß die mütterliche Plazentadurchblutung nicht, bzw. zum Teil nicht unter mütterlicher Kontrolle liegt. Da die mütterlichen Spiralarterien, welche die Plazenta versorgen, nach der zweiten Trophoblastinvasion keine Möglichkeit zur Autoregulation haben, müßte jede kleinste Änderung des fetalen Bedarfes im Tagesverlauf zur Minder- oder Überversorgung führen. Eine dem fetalen Bedarf angepaßte Durchblutung ist so nicht zu erreichen. Wie neuere Untersuchungen mittels „Star volume estimator“ zeigen, kommt es bei Steigerung des arteriellen Nabelschnurdruckes, z. B. während einer Hypoxie, zu einer Vergrößerung des intervillösen Raumes und somit zur Steigerung des Blutvolumens im intervillösen Raum. Auf der anderen Seite können die fetalen Gefäße durch steigenden Druck im intervillösen Raum komprimiert werden. Dies soll zu einem Ansteigen des Resistance Index in den umbilikalen Gefäßen führen. Hierdurch könnte der Blutfluß des intervillösen Raumes ebenfalls angepaßt werden (Karimu und Burton, 1993, 1994). Es entsteht ein zweiseitiges rückgekoppeltes System. Grundlegende Voraussetzung für die Regelung der Durchblutung des intervillösen Raumes durch den Feten, scheint dabei die Trophoblastinvasion in die Media der Spiralarterien zu sein. Sie zeigt den größten signifikanten Effekt auf die Qualität der Plazentadurchblutung und die spätere fetale Entwicklung (Jaffe, 2001).

Mit zunehmender Schwangerschaftsdauer kommt es zu einem Abfall des Spiralarteriendruckes (Carbillon et al. 2000). Ist die vollständige Invasion und

Zerstörung der Media nicht möglich, kommt es, wie verschiedene Untersuchungen zeigen, zu IUGR, Präeklampsie und Frühgeburtlichkeit (Xu et al. 1998, Kam et al. 1999, Ito et al. 1998, Carbillon et al. 2001). Auch auf fetaler Seite scheint die Entwicklung und Reaktivität der fetoplazentaren Durchblutung ein wohl geordnetes Phänomen zu sein. Sie folgt einer präzisen Chronologie und wird durch eine Vielzahl vasoaktiver und angiogener Faktoren gesteuert. Das Endothel der Zottengefäße entläßt vasodilatierende Substanzen zur Verbesserung der eigenen Kapazität, welche eine entscheidende Rolle im allmählichen Abfall des ‚vascular resistance index‘ der Plazenta spielen (Ferre, 2001). Die Gefäßneubildung soll durch den Hypoxie empfindlichen vascular endothelial growth factor gesteuert sein (Kingdom und Kaufmann, 1999). Daß die Plazenta eine Reihe von vasoaktiven Autakoiden selbst synthetisiert oder Vorstufen aus dem Kreislauf zu aktiven Substanzen umwandelt kann ist seit längerem bekannt (Boura und Walters 1991, Myatt 1992). Weitere Voraussetzung für das Wirken solcher Substanzen ist deren Abbau. Die Plazenta ist z. B. reich an Angiotensinase A deren Angiotensin-II-abbauende Funktion biochemisch bestätigt wurde (Kurauchi et al. 1990) und Dipetidylpeptidase IV (DPP IV), deren Substanz-P-spaltende Wirkung ebenfalls biochemisch bestätigt wurde (Feller et al. 1985, Püschel et al. 1982).

Aus den angeführten verschiedenartigsten Möglichkeiten der Einflußnahme auf die Durchblutung des intervillösen Raumes ergibt sich die Notwendigkeit, die ausgesandten Signale in „Regulationsbewegungen“ umzusetzen. Die von Dubreuil und Rivière 1932 erstmals aus Chorionplatte und Stammzotten isolierten Zellen, mit den von ihnen beschriebenen Charakteristika von glatten Muskelzellen, könnten das morphologische Korrelat zur Steuerung der Durchblutung des intervillösen Raumes darstellen. Graf et al. (1996, 1997) erkannten, daß die von Dubreuil und Rivière und Spanner beschriebenen Zellen mit den in eigenen Arbeiten als Myofibroblasten identifizierten Zellen identisch sind und mit dem umgebenen kollagenen und elastischen Bindegewebe sowohl in der Chorionplatte als auch in den Stammzotten ein funktionelles myofibroelastisches System bilden. Begünstigend für eine Stimulation wirkt sich die anatomische Lage des myofibroelastischen Systems zwischen intervillösem Raum und fetalen Blutgefäßen aus. Wie die Ergebnisse der

vorgelegten Arbeit zeigen, konnten die untersuchten Proben sowohl des Chorionmesoderms als auch der PVCS zu Kontraktionen auf unterschiedlichste Reize stimuliert werden. Auf Grund der morphologischen Untersuchungen dieser Proben in denen die ultrastrukturellen und immunhistochemischen Eigenschaften von Myofibroblasten nachgewiesen werden konnten, kann in diesen Zellen des myofibroelastischen Systems das morphologische Korrelat zum Auffangen von Durchblutungsveränderungen des intervillösen Raumes gesehen werden.

Bis heute gingen die Überlegungen immer der Frage nach, wie das Blut aus dem intervillösen Raum herausgelangt. Daß aber nicht nur zu viel Blut im intervillösen Raum sein kann, sondern daß es auf Grund eines eingeschränkten Kreislaufes auf Seiten der Mutter auch zu einer Blutleere kommen kann wurde kaum in die Erwägungen mit einbezogen.

Hier müßte der intervillösen Raum dem weniger werdenden Blutvolumen angepaßt werden. Wie unsere Versuche zeigen, kommt es zu sehr starken Kontraktionen (bis  $6900 \mu\text{N}/\text{mm}^2$ ) der untersuchten Proben, wenn die Vorlast reduziert wird. Es war hierbei nicht entscheidend, ob die Vorlast  $100 \mu\text{N}$  oder  $500 \mu\text{N}$  betrug. Die Auslösung der Kontraktion erfolgt prompt nach Entlastung. Es ist anzunehmen, daß dieser Mechanismus dazu dient, immer einen konstanten Druck auf der Blutsäule des mütterlichen Kreislaufes zu halten, um einem Sistieren des Blutflusses entgegenzuwirken.

Im Augenblick der Geburt kommt es mit dem Blasensprung zum Verlust der stabilisierenden Wirkung des Fruchtwassers. Die Plazenta war bis zu diesem Augenblick zwischen Uterus und prall gefüllter Fruchtblase eingebettet, ein Ausweichen war nicht möglich. Ohne eine Gegenregulation könnte sich die Plazenta nun der Schwerkraft folgend, zunehmend mit mütterlichem Blut füllen. Hierdurch würde ihre Anatomie verändert, mithin die Durchblutung, letztlich wäre die adäquate Versorgung des Fetus nicht mehr gewährleistet. Bis zur Geburt sind es jedoch noch durchaus mehrere Stunden hin. Genau an dieser Stelle ist es von entscheidender Bedeutung eine Gegenregulation auslösen zu können, die nicht erst bei zunehmender Dehnung der  $\alpha$ -Aktin-positiven Zellen erfolgen darf, sondern direkt

in dem Augenblick, indem die stabilisierende Wirkung des Fruchtwassers entfällt. Durch maximale Kontraktionen sowohl der Zellen im Chorionmesoderm als auch in der PVCS könnte die Anatomie der Plazenta stabilisiert werden, eine weitere Versorgung des Fetus in den Stunden bis zur Geburt könnte gesichert werden.

## V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine standardisierte Methode zur Isolierung und umfassenden Untersuchung der  $\alpha$ -Aktin-positiven extravasalen Zellen der Plazenta entwickelt. Die technischen, anatomischen und physiologischen Probleme bei der Behandlung und Untersuchung der Proben erforderten viele Lösungsansätze zur Etablierung der Methode. Bei der Entwicklung der Präparationstechnik der PVCS waren drei Besonderheiten der Stammzottenmorphologie hilfreich: Erstens ist das in den Zotten subtrophoblastär gelegene Kapillarnetz (Boyd und Hamilton, 1970) deutlich abgrenzbar, zweitens sind radiär abgehende Gefäße in den Stammzotten gut zu erkennen und drittens kann genau perivasal präpariert werden. Somit ist die PVCS reproduzierbar zu gewinnen. Bei der Präparation des Chorionmesoderms wurde unter der Stereolupe sorgfältig auf Anzeichen kleinster Blutgefäße geachtet, um anschließend schichtweise das Chorionmesoderm zu präparieren. Wie die nach den physiologischen Untersuchungen durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen ergaben, sind die gewonnenen Proben reproduzierbar frei von Mediamuskelzellen. Die in der vorgelegten Arbeit entwickelten Präparationstechniken bilden somit die geeignete Grundlage zur Untersuchung der Funktion der PVCS und des Choriomesoderms.

Die in den Stammzotten der menschlichen Plazenta gelegene PVCS und die  $\alpha$ -Aktin-positiven Zellen der Chorionplatte sind unter experimentell-physiologischen Bedingungen aktiv zur Kontraktion und Relaxation fähig. Es gelang zweifelsfrei nachzuweisen, daß die untersuchten Proben frei von Mediamuskelzellen waren. Damit beweist die vorgelegte Arbeit, daß die von Graf et al. (1994) vorgeschlagene Bezeichnung *perivasale kontraktile Manschette* richtig ist und trägt entscheidend zur Lösung des seit fast einhundert Jahren währenden Streites über eine mögliche Kontraktilität der extravasalen Aktin-positiven Zellen der Plazenta bei.

## VI. Literaturverzeichnis

- Aplin J (2000)** Maternal influences on placental development. *Semin Cell Dev Biol* 11: 115-125
- Bacon BJ, Gilbert RD, Longo LD (1986)** Regional anatomy of the term human placenta. *Placenta* 7: 233-241
- Babcock RJ (1969)** Smooth muscle in the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 105: 612-615
- Barker G, Boyd RDH, D'Souza SW, Donnai P, Fox H, Sibley CP (1994)** Placental water content and distribution. *Placenta* 15: 47-56
- Bauer C (1994)** Blut ein flüssiges Organsystem. In: Klinke R, Silbernagl S (eds.) *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme, Stuttgart New York, pp. 202-203
- Beck T (1982a)** Der maternale Blutfluß durch die menschliche Plazenta. *Z Geburtsh Perinat* 186: 65-71
- Beck T (1982b)** Der venöse Abfluß der intervillösen Mikrozirkulation in der menschlichen Plazenta. *Z Geburtsh Perinat* 186: 114-118
- Beck T (1992)** Morphologische und hämodynamische Veränderungen der Plazenta bei Präeklampsie. *Gynäkol* 25: 391-397
- Becker V (1963)** Funktionelle Morphologie der Plazenta. *Arch Gynäk* 198: 3-28
- Becker V, Schiebler TH, Kubli F (1981)** Die Plazenta des Menschen. Thieme, Stuttgart New York pp. 55-56
- Beham A, Denk H, Desoye G (1988)** The distribution of intermediate filament proteins, actin and desmoplakins in human placental tissue as revealed by polyclonal and monoclonal antibodies. *Placenta* 9: 479-492
- Benirschke K, Kaufmann P (1990)** Basic structure of the villous trees. In: Benirschke K, Kaufmann P (eds.) *Pathology of the human Placenta*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 22-70
- Bertolini R, Reißig D, Schippel K (1969)** Elektronenmikroskopische Befunde an den Zellen in der Chorionplatte der reifen menschlichen Plazenta. *Z mikroskop-anat Forsch* 80: 358-368

- Bjercke S (1999)** Normal implantation is important in order to avoid pregnancy complications and diseases later in life. *Tidsskr Nor Laegeforen* 119: 3903-3908
- Bloom S, Cancilla PA (1969)** Conformational changes in myocardial nuclei of rats. *Circ Res* 24: 189-196
- Bodelsson G, Stjernquist M (1994)** Endothelium-dependent relaxation to substance P in human umbilical artery is mediated via prostanoid synthesis. *Human Reprod* 9: 733-737
- Boura ALA, Walters WAW (1991)** Autacoids and the control of the vascular tone in the human umbilical-placental circulation. *Placenta* 12: 453-477
- Boura ALA, Walters WAW, Read MA, Leitch IM (1994)** Autacoids and control of human placenta blood flow. *Clin Exp Pharm Physiol* 21: 737-748
- Boyd JD, Hamilton WJ (1970)** *The Human Placenta*, Heffer and Sons LTD. Cambridge, pp. 228-239
- von Brozovich F, Morgan KG (1989)** Stimulus specific changes in mechanical properties of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 257: H1573-H1580
- Carbillon L, Uzan M, Uzan S (2000)** Pregnancy, vascular tone and maternal hemodynamics: a crucial adaption. *Obstet Gynecol Surv* 55: 574-581
- Carbillon L, Challier JC, Aalousini S, Uzan M, Uzan S (2001)** Uteroplacental circulation development: Doppler assessment and clinical importance. *Placenta* 22: 795-799
- Charnock-Jones DS, Burton GJ. (2000)** Placental vascular morphogenesis. *Baill Best Pract Res Clin Obstet Gynecol* 14: 953-968
- Clifton VL, Read MA, Leicht IM, Boura ALA, Robinson PJ, Smith R (1994)** Corticotropin releasing hormon induced vasodilatation in the human fetal placental circulation. *J Clin Endocrin Metab* 79: 666-669
- Clifton VL, Read MA, Leicht IM, Giles WB, Boura AL, Robinson PJ, Smith R (1995)** CRH-induced vasodilatation in the human fetal-placental circulation: involvement of the nitric oxide-cyclic guanosine 3',5'-monophosphate-mediated pathway. *J Clin Endocrin Metab* 80: 2888-2893
- Corner B, (1963)** The fetal and maternal circulation of the Placenta. *J Obstet Gynec* 6: 18-20

- Demir R, Demir N, Kohnen G, Kosanke G, Mironow AV, Üstünel I, Kocamaz E (1992)** Ultrastructure and distribution of myofibroblast-like cell in human placenta stem villi. *Electron Micro* 3: 509-510
- Drury L, Wootton R, Hytten FE (1981)** Studies of a single placenta cotyledon in Vitro: II. The intravascular volume. *Placenta* 2: 155-160
- Dubreuil G, Rivière M (1932)** Formations fibro-musculaires du chorion et des villosités du placenta humain. *CR Séances Soc Biol Fil* 111: 170-172
- Dyroff (1929)** Kongressbericht 762 *Arch Gynäk* 137
- Farley AE, Graham CH, Smith GN (2004)** Contractile properties of human anchoring villi. *Am J Physiol Regul Comp Physiol* 13: S0363-6119
- Feller AC, Schneider H, Schmidt D, Pawaresch MR (1985)** Myofibroblasts as a major cellular constituent of villous stroma in human placenta. *Placenta* 6: 405-415
- Ferre F (2001)** Regulation of fetal placental circulation. *Gynecol Obstet Fertil* 29: 512-517
- Franke WW, Schinko W (1969)** Nuclear shape in muscle cells. *J Cell Biol* 42: 326-331.
- Gabbiani G (1992)** The biology of the myofibroblast. *Kidney Intern* 41: 530-532
- Gonser M, Tillack KH, Pfeiffer G, Mielke G (1996)** Plazentalokalisation und Inzidenz der Präeklampsie. *Ultraschall in Med* 17: 236-238
- Graf R, Frank HG, Öney T (1992)** Histochemical and immunohistochemical investigations of the fetal extravascular and vascular contractile system in the normal placenta and during pre- eclampsia. In: Neubert D, Kavlock RJ, Merker HJ, Klein J (eds) *Risk assessment of prenatally induced adverse health effects*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 537-550
- Graf R, Langer JU, Schönfelder G, Öney T, Hartel-Schenk S, Reutter W, Schmidt HHHW (1994)** The extravascular contractile system in the human placenta. *Anat Embryol* 190: 541-548

**Graf R, Schönfelder G, Mühlberger M, Gutschmann M (1995)** The perivascular contractile sheath of human placental stem villi: Its isolation and characterization. *Placenta* 16: 57-66

**Graf R, Neudeck H, Gossrau R, Vetter K (1996)** Elastic fibers are an essential component of human placental stem villous stroma and an integrated part of the perivascular contractile sheath. *Cell Tissue Res* 283: 133-141

**Graf R, Matejevic D, Schuppan D, Neudeck H, Shakibaei M, Vetter K (1997)** Molecular anatomy of the perivascular sheath in the human placenta stem villi: the contractil apparatus and its association to the extravascular matrix. *Cell Tissue Res* 290: 601-607

**Grosser O (1927)** Frühentwicklung, Eihautbildung und Plazentation des Menschen und der Säugetiere. Bergmann, München pp. 88-89, 340-345, 380-400

**Happe H (1906)** Beobachtungen an Eihäuten junger menschlicher Eier. *Anat Hefte* 32: 173-212

**Hörman G (1953)** Ein Beitrag zur funktionellen Morphologie der menschlichen Plazenta. *Arch Gynäk* 184: 109-123

**Hull AD, White CR, Pearce WJ (1994)** EDRF and Cyclic GMP-dependent vasorelaxation in Human Chorionic Plate Arteries. *Placenta* 15: 365-375

**Huszar G, Bailey P (1979 a)** Isolation and characterization of myosin in the human term placenta. *Am J Obstet Gynecol* 135: 707-712

**Huszar G, Bailey P (1979 b)** Relationship between actin-myosin interaction and myosin light chain phosphorylation in human placental smooth muscle. *Am J Obstet Gynecol* 135: 718-726

**Ito Y, Shono H, Shono M, Muro M, Uchiyama A, Sugimori H (1998)** Resistance index of uterine artery and placental location in IUGR. *Acta Obstet Gynecol Scand* 77: 385-390

**Jaffe R (2001)** Development of early uteroplacental circulation. *Early Pregn* 5: 34-35

**Jizuka S (1915)** Über Vorkommen von Muskelfasern in der menschlichen Plazenta. *Beitr Geburtsh Gynaek* 19: 101-102

- Kam EP, Gardner L, Loke YW, King A (1999)** The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries. *Hum Reprod* 14: 2131-2138
- Karimu AL, Burton GJ (1993)** Star volume estimate of the intervillous clefts in the human placenta. *J Develop Physiol* 19: 137-142
- Karimu AL, Burton, GJ (1994)** The effects of the maternal vascular pressure on the dimension of the placental capillaries. *Brit J Obstet Gynaec* 101: 57-63
- Karnowsky MJ (1965)** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137 A
- Kaufmann P, Sen DK, Schweikart G (1979)** Classification of the human placental villi. I. Histology. *Cell Tiss Res* 200: 409-423
- Kaufmann P (1985)** Basis morphology of the fetal and maternal circuits in the human placenta. *Contrib Gynec Obstet* 13: 5-17
- King BF (1989)** The functional anatomy of the placental vasculature. In: Rosenfeld, Charles R (ed.) *The Uterine Circulation*. Perinatology Press, New York, pp. 17-19
- King TM, Gröschel-Stewart U (1965)** Placental contractile protein. *Am J Obstet Gynecol* 93: 253-258
- Kingdom JC, Kaufmann P (1999)** Oxygen and placental vascular development. *Adv Exp Med Biol* 474: 259-275
- Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P (2000)** Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynec Reprod Biol* 92: 35-43
- Kohnen G, Mironov V, Demir R, Castellucci M, Kaufmann P (1993)** Immunhistochemie und Ultrastruktur kontraktiler Zellen im Zottenstroma der menschlichen Plazenta. *Ann Anat* 175: 37
- Kohnen G (1994)** Immunhistochemische Charakterisierung extravasculärer kontraktiler Zellen in menschlichen Plazentazotten. Thesis, TU Aachen
- Kohnen G, Castellucci M, Hsi BL, Yeh CJG, Kaufmann P (1995)** The monoclonal antibody GB 42 – a useful marker for the differentiation of myofibroblasts. *Cell Tiss Res* 281: 231-242

- Kohnen G, Kertschanska S, Demir R, Kaufmann P (1996)** Placental villous stroma as a model system for myofibroblast differentiation. *Histochem Cell Biol* 105: 415-429
- Kolodney MS, Wysolmerski RB (1992)** Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: A quantitative study. *J Cell Biol* 117: 73-82
- Krantz KE, Parker JC (1963)** Contractile properties of the smooth muscle of the human placenta. *Clin Obstet Gynecol* 6: 26-38
- Kurauchi O, Mizutani S, Nomura S, Kasugai M, Narita O, Tomoda Y (1990)** A comparison of the binding of Angiotensin II to human placenta between normal and severe pre-eclamptic pregnancy. *J Med* 21: 209-216
- Kurjak A, Dudenhausen JW, Hafner T, Kupesic S, Latin V, Kos M (1997)** Intervillous circulation in all three trimester of normal pregnancy assessed by color doppler. *J Perinat Med* 25: 373-380
- Lane BP (1965)** Alteration in the cytologic details of intestinal smooth muscle in various stages of contraction. *J Cell Biol* 27: 199-213
- Leitch IM, Read MA, Boura AL, Walters WA (1994)** Effects of inhibition of nitric oxide synthase and guanylate cyclase on hydralazine-induced vasodilatation of the human fetal placental circulation. *Clin Exp Pharm Physiol* 21: 615-622
- Lüllmann-Rauch R (2003)** *Histologie*. Thieme, Stuttgart New York, p 96, p 203
- Maigaard S (1987)** Contraction and relaxation of human uterine and placental smooth muscle. *Acta Obst Gynec Scand Suppl* 143: 1-39
- Majno G, Shea SM, Leventhal M (1969)** Endothelial contraction induced by histamine-like mediators. An electron microscopic study. *J Cell Biol* 42: 647-672
- Malassine A (2001)** Morphological variability and placental function. *Gynecol Obstet Fertil* 29: 489-496
- Mayhew T, Burton GJ (1997)** Stereology and its impact on our understanding of human placental functional morphology. *Micros Res Tech* 38: 195-205
- McCarthy AL, Woolfson RG, Evans BJ, Davies DR, Raju SK, Poston L (1994)** Functional characteristics of small placental arteries. *Am J Obstet Gynec* 170: 945-951

- Metz J, Weihe E (1980)** Intercellular junctions in the full term human placenta. *Anat Embryol* 158: 167-178
- Michael C (1974)** Actomyosin content of the human placenta. *J Obstet Gynaec* 81: 307-310
- Myatt L (1992)** Control of vascular resistance in the human placenta. *Placenta* 13: 329-341
- Nordenvall M, Ullberg U, Laurin J, Lingman G, Sandstedt B, Ulmsten U (1991)** Placenta morphology in relation to umbilical artery blood velocity waveforms. *Europ J Obst Gynec Reprod Bio* 40: 179-190
- Obara K, Nikcevic G, Pestic L, Nowak G, Lorimer DD, Guerriero Jr. V, Elson EL, Paul RJ, de Lanerolle P (1995)** Fibroblast Contractility without an increase in basal myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* 270: 18734-18737
- Ohno M, Nagle RB, Meezan E, Brendel K (1979)** Isolation and characterization of human placental chorionic villar extracellular matrix. *J Supramol Struct* 12: 457-466
- Page KR (1993)** *The Physiology of the Human Placenta*. UCL Press, London, pp. 16-18
- Pankow (1929)** *Kongressbericht* 766 *Arch Gynäk* 137
- Pfitzer G, Peterson JW, Rüegg JC (1982)** Length Dependence of calcium activated isometric force and immediate stiffness in living and glycerol extracted vascular smooth muscle. *Pflügers Arch* 394: 174-181
- Pfitzer G, Rüegg JC (1992)** Smooth muscle activation. In : *Advances in comparative and enviromental physiology*. Sugi H (ed.) Springer, Berlin Heidelberg New York pp. 63-86
- Pfitzer G, (1993)** Phosphorylation-contraction coupling in smooth muscle: role of caldesmon. In: *Mechanism of myofilament sliding in muscle contraction*. Sugi H (ed.) Plenum Publishing Corporation. pp. 195-202
- Polin RA, Fox WW (eds.) (1992)** *Neonatal and fetal Medecine -physiology and Pathophysiology*. Saunders, Orlando, Florida. pp. 47-55
- Püschel G, Mentlein R, Heymann E (1982)** Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Eur J Biochem* 126: 359-365

**Rankin JH, McLaughlin MK (1979)** The regulation of the placental blood flows. *J Develop Physiol* 1: 3-30

**Reynolds SRM (1978)** Mechanisms of placentofetal blood flow. *Obst Gynec* 51: 245-249

**Rogmans R, Carmans B, Bonten U (1994)**

Dopplerbefunde – Plazentamorphologie: Befundkorrelation und -divergenzen. *Geburtsh u Frauenheilk* 54: 273-275

**Rossant J, Cross JC (2001)** Placental development: lesson from mouse mutants. *Nat Rev Genet* 2: 538-548

**Rudolph R, Guber S, Suzuki M, Woodward M (1977)** The life cycle of the myofibroblast. *Surg Gynecol Obstet* 145: 389-394

**Schiebler TH, Kaufmann P (1981)** Reife Plazenta In: Becker V, Schiebler TH, Kubli F (Hrsg.) *Die Plazenta des Menschen*. Thieme, Stuttgart New York, pp. 51-100

**Schmidt W (1956)** Der Feinbau der reifen menschlichen Eihäute. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* 119: 203-222

**Schroeder R (1930)** Weibliche Genitalorgane. Im Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Springer, Berlin, p. 7, I.

**Schürch W, Seemayer TA, Gabbiani G (1992)** Myofibroblast In: Sternberg S (ed.), *Histology for Pathologists*, Raven Press, New York pp. 109-144

**Singer II (1979)** The fibronexus: a transmembrane association of fibronectin-containing fibers and bundles of 5 nm microfilaments in hamster and human fibroblast. *Cell* 16: 675-685

**Singer II, Kawka DW, Kazazis DM, Clark RA (1984)** In vivo co-distribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue: immunofluorescence and electron microscope studies of the fibronexus at the myofibroblast surface. *J Cell Biol* 98: 2091-2106

**Skalli O, Vandekerckhove J, Gabbiani G (1987)** Actin isoform pattern as a marker of normal or pathological smooth-muscle and fibroblastic tissues. *Differentiation* 33: 232-238

**Spanner R (1936)** Mütterlicher und kindlicher Kreislauf der menschlichen Plazenta und seine Strombahnen. *Z Anat Entwicklungsgesch* 105: 163-242

**Stieve H (1935)** Neue Beobachtungen über den Bau der menschlichen Plazenta.

Zentralbl für Gynäkol 8: 434-446

**Stieve H (1940)** Über den Abfluß des Blutes aus dem intervillösen Raum der menschlichen Plazenta. Zbl Gynäkol 64: 1570-1582

**Tenzer W (1962)** Graphische Rekonstruktion des bindegewebigen Stützskeletts der menschlichen Plazenta. Thesis, Christian-Albrechts-Universität, Kiel pp. 9-16, 24-30

**Vogel M (1992)** Atlas der Plazentadiagnostik. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 1-7, 50-70, 204-205

**Voss B, Rauterberg J, Müller KM (1994)** The perivascular connective matrix. Path Res Pract 190: 969-983

**Wiese KH (1975)** Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Chorionplatte der reifen menschlichen Plazenta. Arch. Gynäkol. 218: 243-259

**Williams MF (1977)** Autoradiography and immunocytochemistry, in Glauert, A. M. (ed.): Practical Methods in Electron Microscopy.

Amsterdam New York Oxford, p. 175

**Xu J, Wen L, Ma T (1998)** Color doppler monitoring the utero-placenta-fetal circulation variety of normal pregnancy and IUGR.

Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 33: 209-212

## VII. Abbildungs- und Materialverzeichnis

### VII.1. Abbildungen

Abbildung Nr.	Titel	Seite
1	Präparation der Chorionplatte	10
2	Präparation des Chorionmesoderms	11
3	Stammzotte. PVCS: perivasale kontraktile Manschette	13
4	Präparation der Stammzottenmanschette	13
5	Gefäßpräparation aus der Chorionplatte	14
6	Chorionmesoderm, Plazenta 0, passive Kraft unter PSS, Transducer KG3	28
7	Chorionmesoderm, Plazenta 0, Stimulation mit 100 mM KCl-Lösung, Transducer KG3.	28
8	PVCS, Plazenta 29, passive Kraft und anschließende Stimulation mit 100 mM KCl-Lösung, Transducer KG7a	29
9	Chorionmesoderm, Plazenta 10, repetitive Stimulation mit Serotonin und Endothelin-1, Transducer KG 3	29
10	Chorionmesoderm, Plazenta 12, Transducer KG 3. Relaxieren einer Spontankontraktion mit $10^{-6}$ M Adenosin.	31
11	Chorionmesoderm, Plazenta 4, repetitive Stimulation mit 100mM KCl-Lösung unter Veränderung der Vordehnung Ausgangslänge der Probe 3mm	32
12	Chorionmesoderm, Plazenta 4, repetitive Stimulation mit 100mM KCl-Lösung unter Veränderung der Vordehnung Ausgangslänge der Probe 3mm	32
13	PVCS, Plazenta 30, repetitive Stimulation einer Probe mit 100 mM KCl Lösung, mit jeweils nachfolgender Auswaschung durch PSS, unter Veränderung der Vordehnung	33
14	PVCS. Immunfluoreszenz (*) nach Inkubation mit anti- $\alpha$ -Aktin. Zahlreiche $\alpha$ -Aktin positive Zellen in paralleler Verlaufsrichtung. Vergrößerung 800fach.	34

15	Positivkontrolle. Immunfluoreszenz nach Inkubation mit anti-vWF. Blutgefäße (^) im Trägermaterial (hier Schweineschnitzel). Vergrößerung 500fach.	35
16	Positivkontrolle. Immunfluoreszenz nach Inkubation mit anti-vWF. Blutgefäße (^) im Trägermaterial (hier Schweineschnitzel). Vergrößerung 500fach.	35
17	Immunreaktivität nach Inkubation mit anti-vWF, Visualisierung mit DAB. PVCS (X) auf Trägermaterial (hier Schweineschnitzel), mit deutlicher Reaktivität (^) der Blutgefäße im Schweineschnitzel. Vergrößerung 500fach.	36
18	Zwei Ausläufer von Myofibroblasten des Chorionmesoderms umgeben von Kollagenfasern (#). Filamente (*), Caveolae (Pfeil), Lysosomen (^). Vergrößerung 20000fach.	37
19	Zwei Myofibroblastenausläufer im Chorionmesoderm. Der obere Zellausläufer enthält Glykogen (X), im unteren Zellausläufer zahlreiche Caveolae (Pfeil), sowie filamentreiche Zone mit dense plaques (+). Kollagenfasern (#). Vergrößerung 20000fach.	37
20	Zwei Zellausläufer von Myofibroblasten im Chorionmesoderm. Filamentreiche Zone mit dense plaques (+), glykogenreiche Zone (X), Kollagenfasern (#). Vergrößerung 25200fach.	38
21	Myofibroblast im Chorionmesoderm, filamentreiche Zone mit dense plaques in der rechte Seite der Zelle. Umgeben von Kollagenfasern (#), Zellkern (^). Vergrößerung 25200fach.	38

## VII.2. Tabellen

<b>Tabelle Nr.</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
1	Zusammensetzung des Plazentenkollektivs	9
2	Substanzen und Konzentrationen	20
3	PVCS, Mehrfachstimulation jeweils einer Probe mit 100mM KCl-Lösung	25
4	Eingesetzte Substanzen und gemessene Kontraktionskräfte	30
5	Angaben zu den einzelnen Messungen	65

## VII.3. Diagramme

<b>Diagramm Nr.</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
1	Kontraktionskräfte von Blutgefäßen der Plazenta und der untersuchten Zellen	25
2	Kontraktionskraft in Abhängigkeit der Nabelschnurinsertion	27

## VII.4. Materialverzeichnis

Material	Bezugsquelle
Plazenten	Kreissaal der Frauenklinik am Campus Benjamin Franklin, Charité- Universitätsmedizin Berlin, Professor Dr. med. H. Hopp Kreissaal der Frauenklinik Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin, Professor Dr. med. K. Vetter, Dr. med. M. Nierhaus
<b>Geräte:</b>	
Meßplatz bestehend aus:	Fa. Scientific Instruments GmbH
Basisgerät für intakte Muskelstreifen MK 1 L	Heidelberg, Deutschland
Zweikammerküvettenystem (Volumen ca. 5 ml)	
Begasung mit Wärmetauscher	
Kraftnehmer KG 3, mit Präparategreifer	
Kraftnehmermessbrücke BAM 4 C mit Analogcomputer	
Vakuumpumpe	
1-Kanal Schreiber	
Brutschrank	Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland
Kaltlichtlampe	Fa. Wild Herrbrugg, Schweiz
Stereolupe	Makromar, Mahr, Deutschland

Material	Bezugsquelle
Scheren und Pinzetten	Fa. Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Kryostat Modell 2800N	Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland
Elektronenmikroskop (EM 10)	Fa. Zeiss, Jena, Deutschland
<b>Antikörper:</b>	
anti- $\alpha$ -Aktin (Klon asm-1)	Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland
von Willebrand Faktor (polyklonal)	Fa. Dakopatts, Hamburg, Deutschland
non-Immuneserum (Maus)	Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland
biotinylierten Sekundärantikörper (monoklonal Maus IgG, Klon 1A4)	Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA
TRITC Ziege anti Maus IgG	Fa. Nordic, Tilburg, Niederlande
Sekundärantikörper (biotinyliertes Ziegen-anti-Kaninchen IgG)	Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland
TRITC-IgG, Kaninchen	Fa. Dakopatts, Hamburg, Deutschland

Material	Bezugsquelle
<b>Chemikalien:</b>	
Aceton	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Acetylcholin, Chlorid	Fa. Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland
Adenosin	Fa. Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland
Angiotensin II, Acetate human	Fa. Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland
Avidin und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase (Vectastain ABC)	Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA
Araldit	Fa. Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland
Carbachol	Fa. Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland
Vectastain Kit III, DAB	Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA)
Endothelin I Porcine	Fa. Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Material	Bezugsquelle
Formaldehyd	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Glucose	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutardialdehyd	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Glyceringelatine	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Fa. Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland
5-Hydroxytryptamin, Hydrochloride	Fa. Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland
Osmiumsäure	Fa. Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland
Oxytocin, Acetat Salz	Fa. Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland
Poly-L-Lysin	Fa. Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland
Propylenoxid	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Prostaglandin, F2 $\alpha$ -Methylester	Fa. Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland

Material	Bezugsquelle
PVP(Polyvinylpyrrolidon)	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Sustance P, Acetat Salz	Fa. Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland
Sauerstoff	Fa. Linde, Stadl-Paura, Östereich
NaCl, MgCl, KCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fa. Sigma BioSciences, Deisenhofen, Deutschland
Schweineschnitzel	Örtlicher Fleischer, Berlin-Dahlem

## VIII. Anhang

Tabelle 5

Probe aus CM/PVCS PINr.- PrNr.	SSW	Durch- messer in cm	Dicke in cm	Nabelschnur- Ansatz auf der CP / Vask	Kontraktions- kraft in mN/ mm <sup>2</sup>	Substanzen/ Konzentration	Gefäß- nachweis positiv
CM 0-1	40+6	>15	<3	nicht untersucht	2,65	100 mM KCl	Nein
CM 1-2	39+0	>15	<3	Rand/ mittel	0,9	100 mM KCl	Nein
CM 2-1	32+4	>15	<3	Rand/ mittel	0	100 mM KCl	Nein
CM 3-2	37+2	>15	<3	Zentr/ mittel	0,65	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,6	100 mM KCl	Nein
CM 4-2	39+0	>15	<3	Zentr/ mittel	0,4	PGF2 $\alpha$ -6M	Nein
		>15	<3		0,65	Entdehnung	Nein
		>15	<3		0,65	Entdehnung	Nein
CM 4-3		>15	<3		2,5	spontane Kontraktion	Nein
		>15	<3		1,15	Entdehnung	Nein
		>15	<3		0,7	Entdehnung	Nein
		>15	<3		1,8	Entdehnung	Nein
		>15	<3		1,65	Entdehnung	Nein
		>15	<3		1,4	Entdehnung	Nein
		>15	<3		1,85	Entdehnung	Nein
CM 4-4		>15	<3		2,9	spontane Kontraktion	Nein
		>15	<3		1,95	Entdehnung	Nein
CM 4-5		>15	<3		2,6	spontane Kontraktion	Nein
		>15	<3		2,05	Entdehnung	Nein
		>15	<3		1,85	Entdehnung	Nein
		>15	<3		1,85	Entdehnung	Nein
CM 4-6		>15	<3		1,85	spontane Kontraktion	Nein
CM 4-7		>15	<3		6,9	spontane Kontraktion	Nein
		>15	<3		5,4	Entdehnung	Nein
CM 5-1	38+6	>15	<3	Zentr/ mittel	0,6	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		2,05	spontane Kontraktion	Nein
CM 5-2/		>15	<3		2,2	spontane Kontraktion	Nein
		>15	<3		0,4	100 mM KCl	Nein
CM 6-2	39+2	>15	<3	Rand/ mittel	0,5	spontane Kontraktion	Nein
CM6-3		>15	<3		1,25	100 mM KCl	Nein
PVCS 6-1		>15	<3		1,05	spontane Kontraktion	Nein
CM 7-1	38+4	>15	<3	Rand/ mittel		Hypotone Lösung	Nein
CM 8-1	38+4	>15	<3	Zentr/ mittel		Hypotone Lösung	Nein
CM 9-1	38+2	>15	<3	Rand/ mittel		Hypotone Lösung	Nein

Tabelle 5

Probe aus CM/PVCS PINr.- PrNr.	SSW	Durch- messer in cm	Dicke in cm	Nabelschnur- Ansatz auf der CP / Vask	Kontraktions- kraft in mN/ mm <sup>2</sup>	Substanzen/ Konzentration	Gefäß- nachweis Positiv
CM 10-4	40+5	>>15	<<3	Zentr/ gering	0,45	Serotonin -6M	Nein
		>>15	<<3		0,45	Serotonin -3M	Nein
		>>15	<<3		0,5	Serotonin -4M	Nein
		>>15	<<3		0,7	Serotonin -6M	Nein
		>>15	<<3		0,55	Endothelin-1 -7M	Nein
		>>15	<<3		0,65	Endothelin-1 -7M	Nein
		>>15	<<3		0,95	Endothelin-1 -7M	Nein
CM 11-2		>15	<3	Zentr/ mittel	3,15	spontane Kontraktion	Nein
CM 12-1	39+1	>15	<3	Zentr/ mittel	0,75	spontane Kontraktion	Nein
CM 13-1	39+2	>15	<3	Rand/ mittel	0		Nein
CM 14-1	41+0	>15	<3	Zentr/ mittel	0,25	PGF2 $\alpha$ -6M	Nein
CM 15-1	40+2	>15	<3	Rand/ mittel	0,3	Serotonin -6M	Nein
CM 15-2		>15	<3		0,2	Carbachol -6M	Nein
		>15	<3		0,25	Carbachol -8M	Nein
		>15	<3		0,3	Carbachol -10M	Nein
		>15	<3		0,3	ACh -6M	Nein
		>15	<3		0,2	ACh -8M	Nein
CM 16-1		<<15	>>3	Zentr/ stark	0	Serotonin -6M	Nein
						PGF2 $\alpha$ -6M	
						Angiotensin II -6M	
		<<15	>>3			ACh -6M	Nein
						KCl 100 mM	
						Endothelin-1 -7M	
CM 17-1	38+5	<<15	>>3	Rand/ mittel	0,3		Nein
		>15	<3			Endothelin-1 -7M	Nein
CM 17-2		>15	<3			2,05	spontane Kontraktion
CM 17-3		>15	<3		0,3	Endothelin-1 -7M	Nein
PVCS17-2		>15	<3		0,3	ACh-6M	Nein
CM 18-2	39+6	>15	<3	Zentr/ mittel	0,3	ACh -6M	Nein
CM 18-5		>15	<3		0,35	Serotonin -6M	Nein
		>15	<3		0,4	Endothelin-1 -6M	Nein
CM 19-3	39+1	>15	<3	Rand/ mittel	0,3	Serotonin -6M	Nein
		>15	<3		0,25	Serotonin -7M	Nein
		>15	<3		0,3	Angiotensin II -6M	Nein
		>15	<3		0,25	Angiotensin II -8M	Nein
CM 20-1	40+1	>15	<3	Zentr/ mittel	0		Nein

Tabelle 5

Probe aus CM/PVCS PINr.- PrNr.	SSW	Durch- messer in cm	Dicke in cm	Nabelschnur- Ansatz auf der CP / Vask	Kontraktions- kraft in mN/ mm <sup>2</sup>	Substanzen/ Konzentration	Gefäß- nachweis Positiv
CM 21-1	39+4	>15	<3	Rand/ mittel	0,25	Angiotensin II -6M	Nein
PVCS21-3		>15	<3		0,25	PGF2 $\alpha$ -6M	Nein
		>15	<3		0,25	Serotonin -6M	Nein
	CM 22-1	40+3	>15	<3	Rand/ mittel	0	
CM 23-1	39+2	>15	<3	Zentr/ sark	0,35	PGF2 $\alpha$ -7M	Nein
CM 24-2	40+4	>15	<3	Zentr/ stark	0,2	Angiotensin II -6M	Nein
CM 24-4		>15	<3		0,45	Oxytocin -6 M	Nein
CM 25-1	31+0	PE	Plaz.	Rand/ stark	0		Nein
CM 26-4	38+1	>15	<3	Rand/mittel	1,05	spontane Kontraktion	Nein
CM 27-1	39+1	<<15	>>3	Zentr/ stark	0	100 mM KCl	Nein
CM 28+1	33+0	>15	<3	Zentr/gering	0,36	Endothelin-1 -10M	Nein
		>15	<3		0,2	Endothelin-1 -7M	Nein
CM 28-2		>15	<3		0,6	Dehnung 0,05mm	Nein
CM 29-1	41+1	>>15	<<3	Rand/ gering	1,23	100 mM KCl	Nein
		>>15	<<3		0,73	100 mM KCl	Nein
		>>15	<<3		0,195	100 mM KCl	Nein
		>>15	<<3		0,6	100 mM KCl	Nein
		>>15	<<3		0,62	PGF2 $\alpha$ -6M	Nein
		>>15	<<3		0,24	PGF2 $\alpha$ -8M	Nein
CM 29-2		>>15	<<3		0,225	100 mM KCl	Nein
29-1PVCS		>>15	<<3		0,36	100 mM KCl	Nein
		>>15	<<3		0,255	100 mM KCl	Nein
		>>15	<<3		0,54	100 mM KCl	Nein
		>>15	<<3		0,54	100 mM KCl	Nein
		>>15	<<3		0,36	Endothelin-1 -7M	
30-2PVCS	39+0	>15	<3	Zentr/ stark	0,18	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,225	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,285	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,285	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,465	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,33	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,36	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,225	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,34	100 mM KCl	Nein
30-3PVCS		>15	<3		0,21	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,075	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,15	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,21	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,3	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,27	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,57	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,45	100 mM KCl	Nein

Tabelle 5

Probe aus CM/PVCS PINr.- PrNr.	SSW	Durch- messer in cm	Dicke in cm	Nabelschnur- Ansatz auf der CP / Vask	Kontraktions- kraft in mN/ mm <sup>2</sup>	Substanzen/ Konzentration	Gefäßnach- weis Positiv
		>15	<3		0,27	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,555	100 mM KCl	Nein
		>15	<3		0,18	100 mM KCl	Nein
31-1PVCS	41+1	>15	<3	Zentr/ mittel	0,165	100 mM KCl	Nein
32-2PVCS	37+2	>15	<3	Rand/ Zentr/ mittel	0,21	100 mM KCl	Nein
CM 33-1	38+0	>15	<3	Rand/ gering	0,39	spontane Kontraktion	Nein
33-1PVCS		>15	<3		0,525	100 mM KCl	Nein
		>15	<3				
		>15	<3				
		>15	<3				
		>15	<3				
		>15	<3				
		>15	<3				
Gefäß I	Plaz 0				1,5	100 mM KCl	Ja
					3	100 mM KCl	Ja
					3,2	100 mM KCl	Ja
Gefäß II	Plaz 1				0,85	100 mM KCl	Ja
					0,85	100 mM KCl	Ja
					1,6	100 mM KCl	Ja
Gefäß III	Plaz 11				0,55	100 mM KCl	Ja
					0,9	100 mM KCl	Ja
					0,75	100 mM KCl	Ja
					0,8	100 mM KCl	Ja

Tabelle 5 Angaben zu den einzelnen Messungen

ACh: Acetylcholin, KCl: Kaliumchloridlösung, PGF2a: Prostaglandin F2 $\alpha$ ,

Sub P: Substanz P

Vask: Vaskularisation der Chorionplatte: gering, mittel, stark

PINr. : Plazenta Nr.

PrNr. : Proben Nr.

Vask. : Vaskularisation

CM : Chorionmesoderm

PVCS : perivasale kontraktile Manschette

SSW : Schwangerschaftswoche

Substanzkonzentration in 10<sup>-x</sup> Molar

Zentr: Zentral

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. R. Graf für die Überlassung des Themas, ihrer fast unendlichen Geduld und die großzügige weit über diese Arbeit hinausgehende Unterstützung. Insbesondere möchte ich mich für die konstruktiven Diskussionen im Verlaufe dieser Arbeit bedanken, die die Entwicklung wissenschaftlichen Denkens und Arbeitens vorangetrieben haben.

Herrn Professor Dr. R. Gossrau danke ich für die Möglichkeit, Labor und Instrumentarium der Abteilung Anatomie II nutzen zu dürfen.

Bei Frau Professor Dr. G. Pfitzer (Institut für Physiologie, Universität Köln) möchte ich mich für die umfassende Einführung in die glattemuskelpfysiologischen Untersuchungstechniken, die Nutzung ihres Laboratoriums für erste Studien an der Darmmuskulatur und die hilfreiche Unterstützung durch ihr Laborpersonal bedanken. Weiterhin möchte ich mich für die anregenden Diskussionen und Hinweise im Verlauf der gesamten Arbeit und ihre große Hilfsbereitschaft bei aktuellen Fragen bedanken. Durch ihre Hilfe trug sie maßgebend zur erfolgreichen Umsetzung der isometrischen Kraftmessung bei.

Herrn Professor Dr. K. Vetter und Frau Dr. M. Nierhaus, Frauenklinik, Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin, Herrn Professor Dr. H. Hopp, Frauenklinik am Campus Benjamin Franklin, Charité-Universitätsmedizin Berlin sowie allen Schwestern, Hebammen und dem ärztlichem Personal der Kreissäle beider Kliniken danke ich für die großzügige Unterstützung beim Sammeln der Plazenten.

Frau M. Gutschmann und Frau M. Joncic haben mich in die Methodik der Histologie und Immunhistologie eingewiesen. Frau U. Sauerbier half bei der Erstellung des Bildmaterials. Ihnen und allen anderen Mitarbeitern danke ich für die Unterstützung während der Laborarbeit. Herrn Dr. D. Matejevic und Herrn Dr. H. Neudeck danke ich für praktische Hinweise bei der Erstellung dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre großzügige Unterstützung während des Studiums und der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Diese Arbeit wurde mit freundlicher Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Gr 1041/3-1 und 3-2) durchgeführt.

## **Lebenslauf**

**Aus datenschutzrechtlichen Gründen erfolgt hier keine Darstellung des Lebenslaufes.**

## **Erklärung**

„Ich Holger Groth, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

**Nachweis isometrischer Kontraktionen  
im extravasalen myofibroelastischen System  
der menschlichen Plazenta**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Falkenberg, den 15.03.2008