

**EINFLUSS VON NO-DONOREN AUF DEN PLAZENTAREN
STOFFWECHSEL WÄHREND DER ZWEISEITIGEN EX VIVO
PERFUSION REIFER PLAZENTAKOTYLEDONE AM BEISPIEL VON
PENTAERITHRITYLTETRANITRAT**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität in Jena

von Jana Rößner
geboren am 22.08.1977 in Gera

Gutachter

- 1. Prof. Dr. med. Eckehard Schleußner, Universitätsklinikum Jena**
- 2. Prof. Dr. med. James Beck, Universitätsklinikum Jena**
- 3. Prof. Dr. rer. nat. Torsten Steinmetzer, Philipps-Universität Marburg**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15. Januar 2013

Abkürzungsverzeichnis

β -HCG	Humanes Choriongonadotropin (β -Untereinheit)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
EDRF	endothelialer relaxierender Faktor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPH-Gestose	Edema-Proteinuria-Hypertension-Gestose
GC	Guanylatcyclase
GTN	Glyceroltrinitrat (Nitroglycerin)
HPLC	Hochleistungs- bzw. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>High Performance</i> bzw. <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
IL-1 α	Interleukin-1 α
INF- γ	Interferon- γ
iNOS	induzierbare NO-Synthase
i.v.	intra venös
LC-MS	HPLC/Massenspektrometrie
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molarität
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
PDE	Phosphodiesterase
PEdiN	Pentaerithryldinitrat
PEmonoN	Pentaerithrylmononitrat
PETN	Pentaerithryltetranitrat
PEtriN	Pentaerithryltrinitrat
RI	Resistance Index
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
sGC	lösliche Guanylylcyclase (<i>soluble guanylyl cyclase</i>)
SNP	Natrium-Nitroprussid (<i>sodium nitroprusside</i>)
TNF- α	Tumornekrosefaktor α

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
INHALTSVERZEICHNIS	IV
ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 Physiologisches NO	8
1.2 Pentaerithryltetranitrat	14
1.3 Aufbau und Funktion der Plazenta	18
2 ZIELE DER ARBEIT	22
3 METHODIK	24
3.1 Perfusionsmodell	25
3.2 Gewinnung und Präparation des Kotyledons	25
3.3 Prinzip des Versuchsablaufes	26
3.4 Aufbau und Funktion der Perfusionsanlage	28
3.5 Verwendete Materialien	30
3.5.1 Perfusionsanlage	30
3.5.2 Chemikalien und Lösungsmittel	30
3.6 Analytische Methoden	31
3.6.1 Bestimmung von PETN und seinen Metaboliten	31
3.6.2 Antipyrinbestimmung	32
3.6.3 Kreatininbestimmung	33
3.6.4 Glukosebestimmung	33
3.6.5 Laktatbestimmung	34
3.6.6 Bestimmung des Humanen Choriongonadotropin	34
3.6.7 Blutgasanalyse	35
3.7 Statistische Auswertung	36
4 ERGEBNISSE	37
4.1 Antipyrin	38
4.2 Kreatinin	39
4.3 Glukose	40
4.4 Laktat	42

Inhaltsverzeichnis	V
4.5 Humanes Choriongonadotropin	43
4.6 Perfusionsdruck	43
4.7 Sauerstofftransfer	44
4.8 Sauerstoffverbrauch	45
4.9 Transplazentarer Transfer von PETN und seinen Metaboliten	47
5 DISKUSSION	49
6 SCHLUSSFOLGERUNG	59
LITERATURVERZEICHNIS	61
ANHANG	80
Messwerte	81
Tabelle a: Plazentadaten	82
Tabelle b: Antipyrin – maternal	83
Tabelle c: Antipyrin – fetal	84
Tabelle d: Kreatinin – maternal	85
Tabelle e: Kreatinin – fetal	86
Tabelle f: Glukose – maternal	87
Tabelle g: Glukose – fetal	88
Tabelle h: Laktat – maternal	89
Tabelle i: Laktat – fetal	90
Tabelle j: β HCG – maternal	91
Tabelle k: Perfusionsdruck – fetal	92
Tabelle l: Sauerstofftransfer	93
Tabelle m: Sauerstoffverbrauch gesamt	94
Danksagung	95
Ehrenwörtliche Erklärung	96

Zusammenfassung

Das Anwendungsspektrum der organischen Nitrate, z. B. Glyceroltrinitrat (GTN) und Pentaerithryltetranitrat (PETN) kennt man aufgrund ihrer hervorragenden Vasoreaktivität bisher hauptsächlich aus dem kardiologischen Bereich. Durch ihre vasodilatatorische Wirkung erzielt man eine bessere Perfusion und somit eine günstigere Sauerstoffversorgung. Diese gefäßreaktiven Wirkungen macht man sich auch in der Geburtshilfe zu Nutze. Erste Literaturhinweise findet man schon 1882 zur Uterusrelaxation bei Plazentaretention. Lees et al. haben 1994 erstmals den erfolgreichen therapeutischen Einsatz von Glyceroltrinitrat zur Wehenhemmung beim Menschen beschrieben (Lees et al. 1994, Schleußner 2002).

Frühgeburtlichkeit und hypertensive Schwangerschaftserkrankungen (z. B. Präeklampsie) und/oder intrauterine Wachstumsrestriktionen machen den größten Teil der Risikoschwangerschaften aus. Eine adäquate uteroplazentare und fetoplazentare Blutversorgung ist essentiell für eine normale intrauterine Entwicklung. Hier spielt Stickstoffmonoxid (NO) hinsichtlich der Regulation des plazentaren Gefäßwiderstandes eine wichtige Rolle (Lyll et al. 1995, Lyll et al. 1996, Poston 1997).

Während organische Nitrate z. B. bereits in Form von Glyceroltrinitrat-Pflastern in der Geburtshilfe zum Einsatz kommen, könnte auch PETN auf Grund seines Wirkungsspektrums und der besseren Verträglichkeit eine weitere Option bei der Behandlung schwerwiegender Schwangerschaftserkrankungen darstellen. Bisher ist wenig über die Beeinflussung des plazentaren Stoffwechsels während der Applikation von PETN in der Schwangerschaft bekannt. Deshalb war das Ziel der vorliegenden Arbeit, mit Hilfe des *ex vivo* Modells der zweiseitigen rezirkulierenden Plazentaperfusion den Einfluss von PETN auf verschiedene Stoffwechselfparameter der humanen Plazenta zu untersuchen.

Dazu wurde die von Schneider und Huch entwickelte Technik der zweiseitigen rezirkulierenden humanen Plazentaperfusion verwendet (Schneider and Huch 1985). Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 15 einzelne Perfusionsversuche durchgeführt, wobei 6 dieser Versuche als Kontrollperfusionsen ohne PETN als Bezugsbasis dienten und 9 Perfusionsen unter Zusatz von PETN (700 µg/ml) im Modellsystem durchgeführt wurden. Um die Effekte des Pharmakons auf den uteroplazentaren Stoffwechsel beurteilen zu können, wurden im Verlauf der mehrstündigen Perfusionsexperimente Glukoseverbrauch, Laktatbildung, β -HCG-Synthese, Sauerstoffverbrauch/ -transfer, der fetale arterielle Perfusionsdruck sowie exemplarisch für einen Versuch der

transplazentare Transfer von PETN und seinen Metaboliten in das fetale Kompartiment bestimmt.

PETN hatte in den vorliegenden Experimenten keinen signifikanten Einfluss auf den Metabolismus des zweiseitig perfundierten Plazentakotyledons bei vierstündiger Exposition mit dem Pharmakon. Die dabei untersuchten Parameter Glukoseverbrauch, Laktatproduktion, β -HCG-Synthese sowie der Sauerstoffverbrauch/ -transfer erfuhren keine signifikanten Veränderungen im gemessenen Zeitraum. Die unveränderte Stoffwechselleistung unter Zusatz von PETN im Perfusionsversuch im Vergleich zu den durchgeführten Kontrollperfusionsen lieferte keine Hinweise dafür, dass PETN die untersuchten Stoffwechselfparameter der reifen, humanen Plazenta beeinflusst. Es konnte jedoch auch keine Verbesserung der Sauerstoffversorgung auf fetaler Seite der Plazenta nachgewiesen werden.

Während der bis zu sechsstündigen Perfusionsversuche wurde im fetalen Gefäßbett auch nach Zugabe von PETN ein relativ konstanter Perfusionsdruck beobachtet. Die erwartete Drucksenkung im fetalen Gefäßsystem der Plazenta konnte im Vergleich zu den Arbeiten mit Glyceroltrinitrat bzw. beim therapeutischen Einsatz des PETN im kardiologischen Bereich nicht erzielt werden. Eine mögliche Ursache hierfür liegt in der Versuchsführung ohne eine gezielte Kontraktion der Gefäße vor Applikation von PETN. Dies kann nur in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Die durchgeführten ex vivo Perfusionsexperimente an isolierten Plazentakotyledonen lieferten keinen Hinweis darauf, dass PETN den Stoffwechsel der reifen, humanen Plazenta nachteilig beeinflusst. Die zweiseitige rezirkulierende humane Plazentaperfusion kann Anhaltspunkte für metabolische Veränderungen im humanen Modell liefern. Für eine abschließende Gefährdungsbeurteilung insbesondere in der Schwangerschaft und für den sich entwickelnden Fetus sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Damit bleibt PETN eine interessante Alternative zu den bereits in der Geburtshilfe verwendeten organischen Nitraten, die auf Grund ihrer Nebenwirkungen und der Toleranzentwicklung nur eingeschränkt zum Einsatz kommen können.

1 Einleitung

Bisher galt die Aufmerksamkeit der organischen Nitrate in der Geburtshilfe hauptsächlich der Tokolyse. Schon 1882 wurde organisches Nitrat zur Uterusrelaxation bei Plazentaretention eingesetzt. Lees et al. haben 1994 erstmals den erfolgreichen therapeutischen Einsatz von Glyceroltrinitrat zur Wehenhemmung beim Menschen beschrieben (Lees et al. 1994, Schleußner 2002).

Organische Nitrate sind Prodrugs, die durch bestimmte Zellen im Organismus, wie Endothel- und glatte Gefäßmuskelzellen, eine Freisetzung der eigentlichen Wirksubstanz dem radikalischen Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$) bewirken. Freigesetztes $\bullet\text{NO}$ ist ein lipophiles, sehr reaktives Gas, welches leicht Zellwände und Gewebe permeiert und somit rasch am Ort der Wirkung auftritt. Seine Hauptwirkung konzentriert sich auf die Relaxation von Arterien und Venen. Dabei stellt NO den Hauptregulator der Vasomotorik dar, z. B. an den Koronararterien.

NO ist eine extrem kurzlebige Substanz und muss pharmakologisch in Form von NO-Donoren gegeben werden. Die wichtigsten Substanzen hierbei sind Glyceroltrinitrat (GTN, "Nitroglycerin"), Isosorbiddinitrat (ISDN), Isosorbidmononitrat (ISMN) und S-Nitrosoglutathion (GSNO). Natrium-Nitroprussid ist als Notfallmedikament zur akuten Blutdrucksenkung bekannt. Nach den Untersuchungen von Beinder et al. ist die transdermale Verabreichung von NO-Donoren eine Methode, die geringe Auswirkungen auf den Blutdruck der Patientinnen mit Präeklampsie hat und die fetale Versorgung verbessert. Zurzeit werden prospektiv randomisierte Studien zur Therapie der Präeklampsie mit NO-Donoren durchgeführt. Der Einsatz von NO-Donoren außerhalb von Studien ist bisher jedoch nicht empfohlen (Beinder und Mohaupt 1999).

Ein weiteres Beispiel für einen exogenen NO-Donor stellt das Pentaerithryltetranitrat (PETN) dar. Es ist ein Langzeitnitrat und entfaltet sich daher entsprechend den vasodilatatorischen Wirkungen, z. B. zur Behandlung ischämischer Durchblutungsstörungen des Herzens.

Organische Nitrate und PETN als exogene NO-Liberatoren entfalten ihre Aktivität besonders dort, wo sie in höherer Konzentration lokal freigesetzt werden, vorwiegend bei größeren koronaren Leitungs- und Widerstandsgefäßen und Venen. Erhöhte Wirksamkeit beobachtet man auch bei endogenem $\bullet\text{NO}$ -Mangel durch geschädigtes Gefäßendothel, z. B. bei Ischämie und Atherosklerose.

Auch im Bereich der Mikrozirkulation hat sich gezeigt, dass neben den vasodilatatorischen Effekten auch eine Beeinflussung der Blutviskosität herbeigeführt wird (Folkow and Mellander 1964). Diese trägt ebenfalls zu einer verbesserten

Perfusion bei. Im Endstrombereich der Gefäße wird somit der Blutfluss gefördert und die Sauerstoffsituation begünstigt.

Diese Prinzipien nutzt man heute hauptsächlich in der Kardiologie zur Anfallskupierung bei Angina pectoris. NO als Akuttherapeutikum eingesetzt, kann aufgrund seiner starken Permeabilität schnell am Ort des Geschehens wirken, aber auch zur Langzeitbehandlung bei Koronarer Herzkrankheit oder endothelialer Dysfunktion eingesetzt werden.

In der Geburtshilfe findet die spasmolytische Wirkung der Nitrate Anwendung. So werden sie zum Beispiel zur Wehenhemmung bei vorzeitigen Wehen im Verlauf der Schwangerschaft oder zur Notfalltokolyse eingesetzt. Neben der Frühgeburt machen hypertensive Schwangerschaftserkrankungen und/oder intrauterine Wachstumsrestriktionen den größten Teil der Risikoschwangerschaften aus. Je nach Definition, geografischen und ethnischen Bedingungen beträgt ihr Anteil 5-20% aller Schwangerschaften. Drei Millionen Schwangere erkranken jährlich, 80.000 sterben an den Folgen einer hypertensiven Schwangerschaftserkrankung (Zygmunt et al. 2002).

Adäquate uteroplazentare und fetoplazentare Blutversorgung sind essentiell für eine normale intrauterine Entwicklung. Die NO-Produktion spielt hinsichtlich der Regulation des placentaren Gefäßwiderstandes eine wichtige Rolle für die fetoplazentare Einheit. Diese Mechanismen können bei Komplikationen in der Schwangerschaft, wie intrauterine Wachstumsretardierung und Präeklampsie, gestört sein (Lyll et al. 1996, Lyll et al. 1995, Poston 1997).

Während der Schwangerschaft kommt es mit steigendem Gestationsalter physiologisch zu einer Abnahme des Widerstandes im uterinen Gefäßbett. Die tieferen Radialarterien und die oberflächlichen Spiralarterien werden dilatiert, um den vergrößerten Blutbedarf des Fetus zu decken. Eine verminderte oder fehlende Adaptation der Gefäße wird bei verschiedenen Schwangerschaftskomplikationen beobachtet.

Als pathogenetisches Grundprinzip der Präeklampsie gilt die inadäquate Umwandlung der Spiralarterien durch eine unzureichende endovaskuläre Trophoblasteninvasion (Brosens et al. 1972). Im weiteren Verlauf werden die Spiralarterien durch Aggregation von Thrombozyten mit Fibrin und fettgefüllten Makrophagen obstruiert. Es entsteht eine nekrotisierende Läsion mit Schaumzellinfiltraten (Beck 1992).

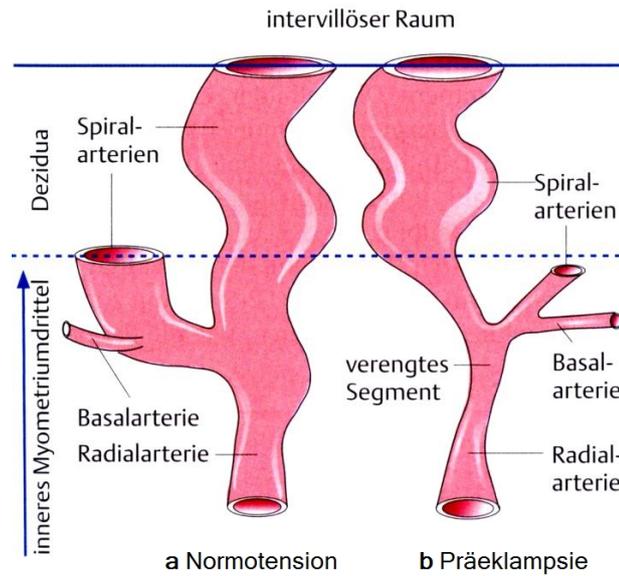


Abbildung 1.1: PlazentagefaÙe in der normalen Schwangerschaft und bei Präeklampsie (Diedrich 1999)

Wahrscheinlich kommt es infolge dessen zu einer gesteigerten Lipidperoxidation mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen ohne adäquate Gegenregulation durch das Antioxidantiensystem. Der oxidative Stress führt einerseits zur Inaktivierung von NO als Vasodilatator, andererseits führt die erhohnte plazentare Produktion von Lipidperoxiden und/oder TNF- α zu einer Leukozytenaktivierung, oxidativem Stress in der maternalen Zirkulation und schlieÙlich zur Endotheldysfunktion (Walker 1998).

Der inadäquaten Trophoblasteninvasion folgt eine generalisierte Endotheldysfunktion, welche die Grundlage für die klinischen Symptome der Präeklampsie (Hypertonus, Ödeme, Proteinurie) darstellt. Die Endotheldysfunktion führt lokal zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen vasodilatatorischen, antiaggregatorischen Substanzen einerseits und vasokonstriktorischen, aggregatorischen Substanzen andererseits. Dadurch werden der Vasotonus und das Gleichgewicht zwischen Gerinnung und Fibrinolyse beeinflusst. Dies betrifft die verminderte Produktion von Prostacyclin bei gleichzeitig gesteigerter Synthese von Thromboxan AII sowie die vermehrte Produktion des vasokonstriktorisch wirkenden Endothelin-1 gegenüber der wahrscheinlich verminderten Synthese von NO als stärksten endogenen Vasodilatator. Die Vasokonstriktion im peripheren GefaÙssystem führt zur Hypertonie, die verminderte Organperfusion zu Ödemen (Müller et al. 1998).

Die wichtigsten Funktionen von endothelial gebildetem Stickstoffmonoxid (NO) sind

Gefäßdilatation und Hemmung der Thrombozytenaggregation. Studien versuchen derzeit zu ergründen, ob NO zur Therapie oder eventuell zur Prophylaxe der Präeklampsie eingesetzt werden könnte (Beinder und Mohaupt 1999).

Die bisher aufgeführten Studien sind richtungsweisend für einen neuen therapeutischen Ansatz bei der Behandlung von Präeklampsie und intrauteriner Wachstumsretardierung mittels exogener Zufuhr von NO-Donoren zur Verbesserung der uteroplazentaren Perfusion.

1.1 Physiologisches NO

Das äußerst kurzlebige (Halbwertszeit von 10-12 Sekunden), gasförmige NO-Radikal ist der natürliche, körpereigene Vasodilatator. Schon erhöhte Scherkräfte in einem zu eng gestellten Blutgefäß stimulieren die durch eine endotheliale NO-Synthase (eNOS) katalysierte Biosynthese von NO aus L-Arginin (s. Abb. 1.2).

Die Oxidation von Arginin zu Citrullin und NO läuft in zwei Monooxygenase-Schritten ab. Beim ersten Schritt handelt es sich um eine Zweielektronen-Oxidation von L-Arginin, beim zweiten um eine Dreielektronen-Oxidation des Zwischenproduktes NG-Hydroxy-L-Arginin. Beide Schritte werden von der NOS katalysiert, deren Tertiärstruktur in eine Oxygenase-Domäne und eine Reduktase-Domäne aufgeteilt werden kann (Mayer und Hemmens 1997).

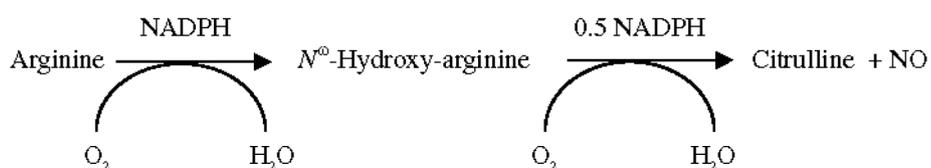


Abbildung 1.2: NO-Synthese (Alderton et al. 2001)

Neben der endothelialen NO-Synthase (eNOS) gibt es noch zwei weitere Isoformen der NO-Synthase, die induzierbare (iNOS) und die neuronale Form (nNOS). Die neuronale NO-Synthase (nNOS) findet man im zentralen und peripheren Nervensystem. Dort reguliert sie die synaptische Transmission, den Blutdruck und die Darmmotilität. Weiterhin steuert die nNOS die Erektilität der männlichen und weiblichen Schwellkörper (Block et al. 1998, Busse 2000, Chakder et al. 1997).

Aber auch in den Reproduktionsorganen spielt NO eine wichtige Rolle. So findet man die induzierbare iNOS im Myometrium, in den Drüsenzellen des Endometriums, im

Zervixgewebe, im maternalen dezidualen Gewebe der Plazenta sowie im Zytotrophoblasten, Syncytiotrophoblasten und in Gefäßen der Chorionplatte (Ramsay et al. 1996, Tschuggel et al. 1999a, Tschuggel et al. 1999b, Yoshiki et al. 2000). Die Funktion der iNOS basiert auf der Induktion durch Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin- 1α (IL- 1α), Interferon- γ (INF- γ) oder dem bakteriellen Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) (Chwalisz and Garfield 1998). Wird die iNOS induziert, produziert sie 1000fach höhere Mengen an NO als die eNOS und nNOS. Derart hohe Konzentrationen wirken zytotoxisch gegen Parasiten, Bakterien, Viren und bewirken Apoptose bei Tumorzellen.

Nicht nur bei immunologischen Vorgängen spielt NO eine bedeutsame Rolle, sondern auch bei zahlreichen Vorgängen der weiblichen Reproduktion und in der Schwangerschaft. So wird der Menstruationsblutung der Frau der programmierte Zelltod Apoptose zugrunde gelegt, vermittelt durch inflammatorische Zytokine, welche eine iNOS-Ausschüttung und damit die NO-Produktion bewirken (Tschuggel et al. 1999a, Tschuggel et al. 1999b). Auch dysmenorrhische Beschwerden, zurückzuführen auf Uterusspasmen, basieren auf der Relaxation glatter Uterusmuskulatur vermittelt über die Bildung von cGMP, welcher einen Calciumausstrom aus der Muskelzelle mit nachfolgender Erschlaffung der Muskulatur bewirkt. Im Tierexperiment mit iNOS knock-out-Mäusen ist nachgewiesen worden, dass die physiologische Ruhigstellung des Uterus während der Schwangerschaft ein NO-vermittelter Prozess ist (Longo et al. 2000).

Eine Vielzahl von Studien beweist die Wirksamkeit von NO selbst sowie verschiedener NO-Donoren zur Hemmung von Spontankontraktionen isolierter Myometriumstreifen *ex vivo* (Buhimishi et al. 1995, Lees et al. 1998, Norman et al. 1997, Wetzka et al. 1998).

In einer Züricher Studie untersuchte man die Abhängigkeit der Oxygenierung der Plazenta von der Aktivität der endothelialen NO-Synthetase (eNOS). Die Ergebnisse zeigten, dass die placentare Sauerstoffversorgung selbst bei systemischen Hypoxien unter Einbeziehung NOS-vermittelter Mechanismen erhalten wird (Schaffer et al. 2006).

Wie in Abbildung 1.3 dargestellt, aktiviert NO nach Diffusion in die Muskelzellen durch Komplexbildung am Häm-Eisen der löslichen Guanylatcyclase (GC) Guanosintriphosphat (GTP) in Guanosinmonophosphat (cGMP). Der daraufhin erhöhte cGMP-Spiegel leitet durch Absenkung des Calcium-Spiegels in der Muskelzelle die

Vasodilatation ein. Aus dieser Wirkung leitet sich die Bezeichnung des NO als endothelialer relaxierender Faktor (EDRF) ab (Stalleicken et al. 2001a).

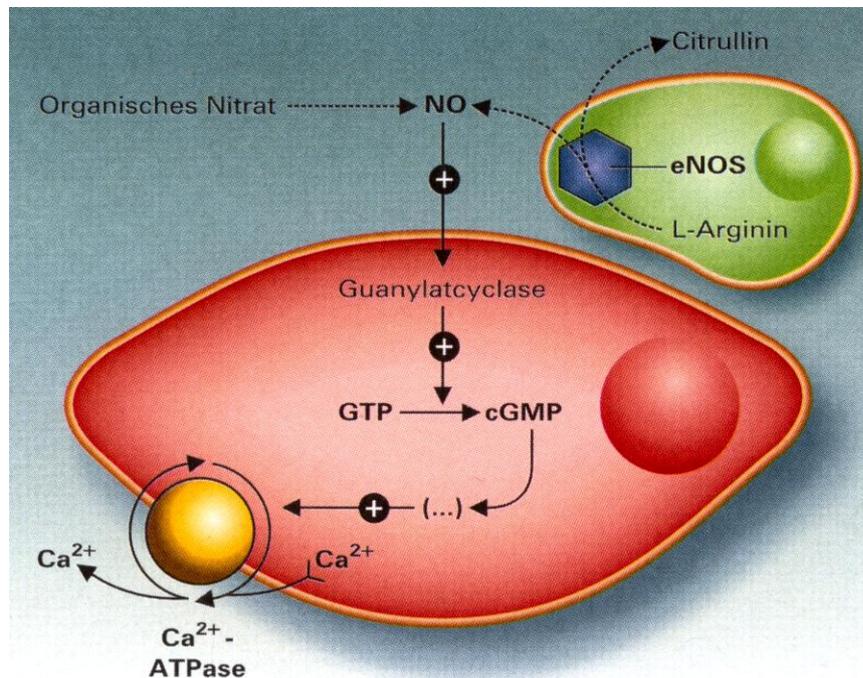


Abbildung 1.3: intrazelluläre Wirkung von NO (Stalleicken et al. 2002)

Um 1980 stellte sich eher durch Zufall für die Forschergruppe um Furchtgott die Frage nach einem endothelium derived relaxing factor (EDRF), der im Endothel bei Bedarf gebildet wird, in die Zellen der umgebenden glatten Gefäßmuskulatur wandert und dort eine Dilatation auslöst. Nahezu zeitgleich fanden die Arbeitsgruppen von Moncada und Ignarro eine Antwort, welche sie 1987 veröffentlichten. EDRF ist Stickstoffmonoxid (Moncada et al. 1987, Ignarro et al. 1987, Lehmann 2000).

Das im Endothel gebildete NO moduliert somit den arteriellen Gefäßtonus, die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen, die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen. Zusätzlich hemmt NO die Aktivierung von Thrombozyten und reguliert die Zellmigration, Angiogenese und vaskuläre Permeabilität (Gimbrone 2000). Angemerkt sei, dass Ferid Murad bereits 1976 die GC-stimulierenden Eigenschaften des NO erkannt, aber noch nicht den Bezug zum natürlichen Geschehen gesehen hatte. Die Gefäßweite wird also nicht nur zentral, sondern auch vor Ort, nach Bedarf und sehr flexibel geregelt (Lehmann 2000).

Die Entdeckung des ubiquitär intra- und extrazellulär vorkommenden Mediators NO war von derart herausragender Bedeutung für die Medizin, dass 1998 seinen Entdeckern Furchtgott, Ignarro und Murad der Nobelpreis verliehen wurde.

Vor allem das gefäßerweiternde und antiatherogene Wirkprinzip wird seit langem in der Kardiologie zur Anfallskupierung von Angina pectoris und als Infarktmedikation durch Verabreichung exogener NO-Donoren wie Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbiddinitrat (ISDN) und Isosorbidmononitrat (ISMN) verwendet (Abrams 1992, di Ponti et al. 1979, Wolf et al. 1979).

Seit der Entdeckung durch den italienischen Chemiker Sobrero 1846 und der erfolgreichen Erstanwendung von Glyceroltrinitrat bei Angina pectoris im Jahre 1879 durch Murrell werden organische Nitrate therapeutisch genutzt. Erst vor etwa 20 Jahren wurde jedoch ihr Wirkungsmechanismus aufgeklärt, die Freisetzung von NO (Sobrero 1846, Murrell 1879).

Weniger vorteilhaft in der Behandlung mit Nitraten erweist sich das Nebenwirkungsprofil, welches sich unter anderem auf den Nitratkopfschmerz und die Nitrattoleranz erstreckt.

Der Nitratkopfschmerz beruht auf der pharmakologischen Wirkung der Nitrate und geht mit der Dilatation der cerebralen Blutgefäße einher. Vor allem zu Beginn einer Nitrattherapie treten Kopfschmerzen und Schläfendruck mit einer Häufigkeit von bis zu 80% auf. Sie gehen meist unter fortgesetzter Nitrateinnahme zurück, bleiben jedoch auch gelegentlich über einen längeren Zeitraum bestehen. Daher sollte man Nitrate einschleichend dosieren (Diener et al. 2001).

Zum Problem der Nitrattoleranz findet man eine Erstbeschreibung einer Tachyphylaxie unter GTN-Dauertherapie datiert auf das Jahr 1888 (Stewart 1888). Beschrieben wurde ein Patient, der zur Erreichung einer gleichmäßigen Wirkung die Tagesdosis selbständig auf nahezu das 80-fache der initialen Verordnung gesteigert hatte. Forschungsergebnisse der letzten Jahre stellen eine Verbindung zwischen der Nitrattoleranz und der nitratinduzierten, vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies her (Münzel et al. 1995). Beide radikalischen Produkte des Nitratmetabolismus reagieren zu Peroxynitrit. Hierin lag nach langjähriger Auffassung die Begründung, dass NO inaktiviert wird und damit seine gefäßerweiternde Wirkung verliert (Diener et al. 2001).

Das zentrale Problem der Nitrat-Therapie stellt auch heute noch der Wirkungsverlust bei länger andauernder Applikation von GTN (Nitrat-Toleranz) dar. Die Toleranz ist als ein multifaktorielles Geschehen anzusehen, für die mehrere Mechanismen verantwortlich sind.

So wird postuliert, dass das vasodilatierende Prinzip (Stickstoffmonoxid, kurz NO, oder

ein verwandtes Molekül) durch einen Biotransformationsschritt in Endothel- bzw. glatten Muskelzellen gebildet wird. Für diese Biotransformation wird nach neuesten Erkenntnissen eine mitochondrial lokalisierte Aldehyddehydrogenase (mt-ALDH) verantwortlich gemacht. Man geht davon aus, dass durch eine chronische Therapie dieses Enzym inaktiviert wird und damit eine Toleranzentwicklung eintritt. Eine weitere Hypothese, aufgestellt von Ignarro, beinhaltet eine intrazelluläre Depletierung von Sulfhydryl (SH)-Gruppen. Das aus GTN freigesetzte NO bildet mit den SH-Gruppen Nitrosothiole (S-NO), die letztendlich die sGC aktivieren und damit die Relaxation auslösen. Eine chronische Therapie führte seiner Meinung nach zu einer intrazellulären Depletierung an SH-Gruppen und damit zu einer verminderten Aktivierbarkeit der sGC (Ignarro et al. 1987). Indirekt unterstützt wurde dieses Konzept durch tierexperimentelle und klinische Beobachtungen, wonach die Gabe von SH-Gruppen (z. B. N-Acetylcystein, NAC) in der Lage war die Nitrattoleranz positiv zu beeinflussen. Man muss jedoch festhalten, dass dieser Effekt nur schwach ausgeprägt und nur zeitlich begrenzt nachweisbar war. Weiterhin wurden diese Effekte nur mit sehr hohen Dosen an NAC erzielt. Gründe, die an der Gültigkeit dieses Konzeptes zweifeln ließen. Die Arbeitsgruppe von Ferid Murad beobachtete in tierexperimentellen Untersuchungen, dass eine chronische GTN Therapie zu einer Toleranzentwicklung, gleichzeitig aber auch zu einer Kreuztoleranz gegenüber SNP und dem endothel-abhängigen Vasodilatator Acetylcholin führt. Er postulierte, dass dies nur über eine Desensitivierung der sGC zu erklären sei. Weitere Konzepte beinhalten die Steigerung der Aktivität der PDE und eine vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (freie Radikale), das so genannte oxidative Stresskonzept der Nitrattoleranz (Münzel 2008).

Die Nitrattoleranz ist seit den ersten klinischen Untersuchungen mit Nitraten in vielfältiger Form beschrieben worden und gehört auch aktuell zu den limitierenden Faktoren bei der Nitrattherapie. Man unterscheidet zwei Toleranzarten. Die in vivo Nitrattoleranz ist zurückzuführen auf eine nitratunspezifische, neurohumorale Gegenregulation, die ebenso bei anderen Vasodilatoren auftreten kann („Pseudotoleranz“) und eine nitratspezifische „vaskuläre Toleranz“, die wirkmechanismusbasiert ist (auch echte oder „klassische Toleranz“). Eine durch ein bestimmtes Nitrat hervorgerufene Verminderung der Gefäßwirksamkeit gegenüber endogen gebildetem (Endothel) oder extern durch andere Nitrate oder NO-Donoren zugeführtem NO wird als „Kreuztoleranz“ bezeichnet (Münzel 2008).

Bei der Pseudotoleranz wird eine neurohumorale Gegenregulation allgemein durch den Nitrat-induzierten, dosisabhängigen Blutdruckabfall induziert, der seinerseits Baroreflexe stimuliert. Eine Vielzahl von Mechanismen setzt sich in der Folge in Gang, Erhöhung der Katecholamin-, Vasopressin-, Angiotensin- und Aldosteronkonzentrationen im Plasma. Eine intravaskuläre Volumenzunahme (Erniedrigung des Hämatokrits) unter Nitratgabe ist die Folge und kann den vorlastsenkenden Effekt der Nitrate abschwächen. Wahrscheinlich steht der Nitratkopfschmerz, die zweite bedeutsame therapielimitierende Nebenwirkung der Nitrate, in engem Zusammenhang mit der Pseudotoleranz. Beide Phänomene sind vor allem zu Therapiebeginn charakteristisch, sehr dosisabhängig und für GTN am ausgeprägtesten (Dupuis et al. 1990, Packer et al. 1987, Parker et al. 1991).

Als Ursachen der klassischen Nitratintoleranz sind verschiedene Mechanismen postuliert worden. Die Beeinträchtigung der Bioaktivierung, Desensibilisierung der sGC, Inaktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinasen, Stimulierung von cGMP/cAMP abbauenden Phosphodiesterasen, Beeinträchtigung der Endothelfunktion bis zu einer Endotheldysfunktion sowie gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Vasokonstriktoren (Endothelin, Angiotensin II) wurden beschrieben (Münzel et al. 2005). Viele dieser Faktoren stehen in engem Zusammenhang zueinander und sollten nicht isoliert betrachtet werden.

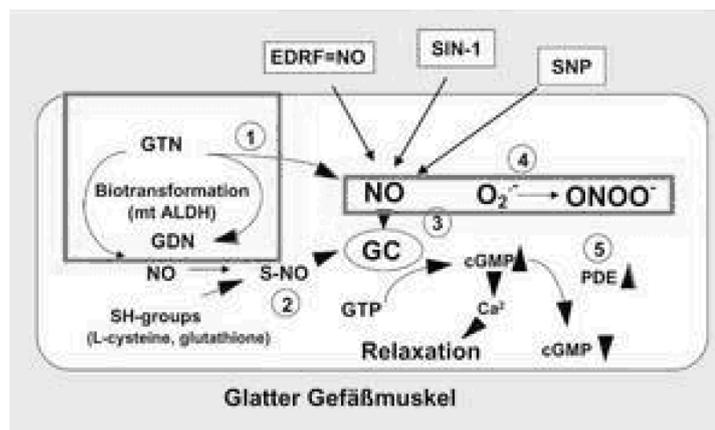


Abbildung 1.4: Zelluläre Mechanismen der Nitratintoleranz (Münzel et al. 2008)

Um die Toleranzentwicklung zu vermeiden, wurden verschiedene Verfahren vorgeschlagen. Das gebräuchlichste ist die Einhaltung einer Nitratpause (Krepp 1985, Silber et al. 1983). In jüngster Zeit wurde auch der Einsatz von Antioxidantien wie Vitamin C, E oder Acetylcystein untersucht (Fung et al. 1988, Hinz and Schröder 1998,

Nickening et al. 1998, Watanabe et al. 1998). Solche Substanzen können die Nitrattoleranz zumindest partiell aufheben (Bassenge et al. 1998).

1.2 Pentaerithrityltetranitrat

Chemisch ist Pentaerithrityltetranitrat (PETN, $C_5H_8N_4O_{12}$) ein Polyester der Salpetersäure mit dem Alkohol Pentaerithritol. Damit gleicht sein Aufbau grundsätzlich den therapeutisch ansonsten verwendeten organischen Nitraten GTN, ISDN und ISMN (Noack et al. 1983).

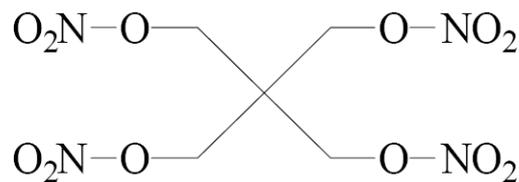


Abbildung 1.5: chemische Formel des PETN

PETN wurde in den 40er Jahren erstmals als Therapeutikum beschrieben und bald danach in die Therapie der Angina pectoris eingeführt. Die präklinische Entwicklung fiel in eine Zeit, in der analytisch- methodische Voraussetzungen zur Untersuchung seiner Pharmakokinetik noch nicht gegeben waren.

In den 60er und 80er Jahren wird der Metabolismus von PETN aufgeklärt. PETN ist unverändert nur bei intravasaler Gabe im systemischen Kreislauf nachweisbar. Nach oraler Applikation findet man aufgrund des intestinalen und hepatischen first-pass-Effekts nur noch die wirksamen Metabolite Pentaerithrityltrinitrat (PEtriN), Pentaerithrityldinitrat (PEdiN) und Pentaerithritylmononitrat (PEmonoN), die überwiegend renal ausgeschieden werden (Taylor et al. 1987, Weber et al. 1995).

In den 70er Jahren konnten die organischen Nitrate GTN und PETN erstmals gaschromatographisch (GC) nachgewiesen werden (Neurath and Dünger 1977). In den 80er Jahren gelang die qualitative und quantitative Bestimmung von PETN mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) (Baaske et al. 1983, Yu et al 1983).

Seit den 90er Jahren nutzt man ein Massenspektrometer (MS) gekoppelt mit einem Gaschromatographen (GC). Mit Hilfe der GC-MS-Technik wurden neue Verfahren zur Bestimmung der organischen Nitrate und deren Abbauprodukte in physiologischen Flüssigkeiten getestet und modifiziert. Dieses Verfahren wendet man vor allem zur

Trennung und Quantifizierung von PETN und dessen Metaboliten an (Weber et al. 1995, Stalleicken et al. 1997).

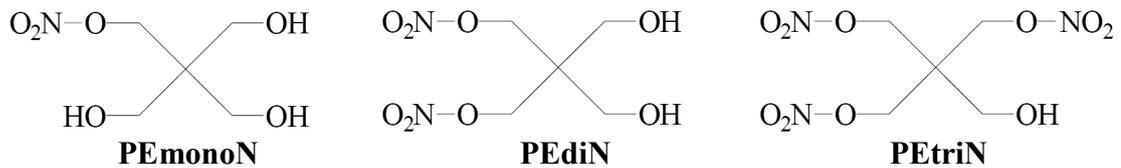


Abbildung 1.6: Metabolite des PETN

PETN ist wie alle organischen Nitrate ein Prodrug, aus dem in vivo NO freigesetzt wird. Es zeichnet sich durch sein geringeres Nebenwirkungsprofil und seine pharmakokinetischen Eigenschaften aus.

Aus klinischer Sicht von besonderer Bedeutung ist die im Vergleich zu GTN hohe Lipophilie von PETN, da Lipophilie und hämodynamische Wirkung sehr eng korrelieren. PETN gehört zu den organischen Nitraten, die aufgrund der hohen Lipophilie sehr starke pharmakodynamische Wirkungen besitzen (Noack et al. 1983).

Die hohe Lipophilie erschwert jedoch die Absorption erheblich, da im Rahmen der weiteren Verstoffwechslung aus PETN seine Metaboliten PEtriN, PEdiN und PEmonoN entstehen, die geringere Lipophilie aufweisen. Diese haben eine größere Halbwertszeit (Bonn 1995, Cawello 1995, Noack 1984). Dadurch besitzt PETN unter den Langzeitnitraten eine Sonderstellung. Es verfügt über einen raschen Wirkungseintritt einerseits und Langzeitwirkung durch Pharmakokinetik der Hauptmetaboliten andererseits. Messungen haben gezeigt, dass PEdiN und PEmonoN ihr Peak im Plasma 3-7 Stunden post applicationem erreichen und nach 4-11 Stunden, in Abhängigkeit von der Verabreichungsform und -menge, eliminiert sind (Weber et al. 1995).

PETN konnte nach oraler Applikation bisher weder selbst noch in Form von PEtriN oberhalb der Bestimmungsgrenze von 50 pg/ml im Serum nachgewiesen werden. Man geht deshalb davon aus, dass PEdiN und PEmonoN die wirksamen Metaboliten darstellen. Nur nach Verabreichung hoher Dosen (10 mg/kg) konnte man Spuren von unverändertem PETN im systemischen Kreislauf der Ratte nachweisen (Weber et al. 1995).

Auch hinsichtlich der Entwicklung von nitratinduzierten Kopfschmerzen als bekannte Nebenwirkung der Therapie mit Nitraten wurde vielfach dokumentiert, dass unter dieser

Behandlungsmethode eine deutlich geringere Kopfschmerzinzidenz auftritt bzw. der Nitratkopfschmerz in seiner Intensität weniger stark ausgeprägt ist. Eine Erklärung liegt in der bevorzugten Wirkung von PETN auf den venösen Gefäßschenkel. Kopfschmerz entsteht durch eine Dilatation der arteriellen Gefäße (Friedrich und Böhm 2006, Schneider et al. 1995).

Ein weiteres Problem der bisherigen Nitrattherapie beruht auf der Entwicklung eines Toleranzphänomens bei längerer Einnahme. Fink und Bassenge berichteten, dass ununterbrochene Verabreichung von PETN bei Hunden keine Toleranz entwickelte (Bassenge et al. 1998).

Bei der chronischen PETN-Therapie hingegen ist bekannt, dass sie keine Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette bewirkt und keine oder kaum vaskuläre NADPH-Oxidantien aktiviert und langfristig Schutzmechanismen in Form der Hämoxygenase-1 und Ferritin stimuliert. Dies hat zur Folge, dass es zu keiner messbaren Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie zu keiner Inaktivierung der ALDH-2 kommt. Dies trägt somit zur Vermeidung der Nitrattoleranz bei. Daneben induziert die chronische PETN-Therapie keine endotheliale Dysfunktion. Eine Akuttherapie mit PETN zeigte ebenfalls keine Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette und Freisetzung von ROS. Vermutlich trägt das langsame Anfluten von PETN zu diesem protektiven Profil bei, indem vor allem die denitrierten Metaboliten im Blut abgefangen werden. Auch hier kommt es nach einer PETN-Bolusgabe zu einem mittelfristigen Schutz des kardiovaskulären Systems vor ischämiebedingten Schäden, trotz des fehlenden oxidativen Stresses. Damit zeigt sich die ischämische Präkonditionierung abermals verantwortlich für diesen anti-ischämischen Schutz.

In der Tat gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass die ischämische Präkonditionierung über eine Induktion der Hämoxygenase vermittelt wird. Dies würde erklären, weshalb PETN als Hämoxygenase-1-induzierende Substanz die Präkonditionierung direkt bewirkt und ohne ROS-Induktion auskommt. Ein ähnliches Bild zeigt sich, wenn man die „schädlichen“ Effekte einer akuten in vivo Gabe von PETN betrachtet. Es kommt zu keiner wesentlichen Induktion der ROS-Bildung, wie von Bassenge et al. bereits gezeigt werden konnte. Anders sieht es hingegen bei einer ex vivo Bolusgabe von hohen PETN-Konzentrationen aus. Hier verhält sich PETN wie jedes andere hochreaktive und hochpotente Nitrat und induziert oxidativen Stress und inaktiviert die ALDH-2. Dies lässt sich darin erklären, dass durch die kurze Behandlungsdauer die Schutzmechanismen von PETN nicht zum Greifen kommen. Das

heißt, dass bei ex vivo Versuchen PETN schlagartig in hohen Dosen aufgenommen wird und keine Zeit bleibt, eine schützende Gegenregulation auf Enzymebene (Hämoxygenase-1 und Ferritin) aufzubauen. Das zelluläre System wird überlastet, damit kommt die Bioaktivierung von PETN zum Erliegen und es entsteht oxidativer Stress (Daiber et al. 2009a).

Eine weitere Untersuchung der akuten Nitrat-Behandlung bei gesunden Probanden zeigte eine GTN-dosisabhängige Steigerung der mitochondrialen ROS-Bildung einhergehend mit der Abnahme der mitochondrialen und monozytären ALDH-2-Aktivität. Dies weist eindeutig darauf hin, dass sich bereits mit geringer Abnahme der ALDH-2-Aktivität eine milde Toleranz und endotheliale Dysfunktion einstellt. Damit ist richtungsweisend, dass die ALDH-2-Inaktivierung ein wesentlicher Bestandteil der Entstehung der Nitratintoleranz ist (Daiber et al. 2009a).

Für die verminderte bzw. fehlende Toleranzentwicklung gibt es demnach verschiedene Erklärungen. Der therapeutische Nutzen in dieser Hinsicht liegt jedoch unumstritten in der Nichtnotwendigkeit eines nitratfreien Intervalls. Als Langzeitnitrat anwendbar, kann man PETN trotz hoher oraler Dosierung über viele Tage verabreichen bei voller hämodynamischer Wirksamkeit.

Es bleibt allerdings weiterhin die Frage, ob die positive Wirkung von PETN tatsächlich nur auf den antioxidativen Eigenschaften der Hämoxygenase-1 und Ferritin basiert oder ob die Induktion weiterer Proteine, die bisher noch nicht identifiziert werden konnten, das positive Wirkungsprofil von PETN beeinflusst.

Eines ist jedoch sicher, die Sonderstellung von PETN unter den organischen Nitraten ist noch lange nicht im Ganzen zu erklären und es bedarf noch weiteren Anstrengungen, zur Aufklärung aller zugrunde liegenden Mechanismen (Bauersachs und Richartz 2009).

Unter Betrachtung aller ex vivo, in vivo und Human-Studien kommt man zu dem Ergebnis, dass es perspektivisch sinnvoll erscheint, Nitrate mit intrinsischen antioxidativen Eigenschaften wie PETN einzusetzen. Der Vorteil dieser Substanz ist, dass PETN keine endotheliale Dysfunktion und Toleranz induziert, aber den hämodynamischen Effekt von GTN und den Isosorbid-Nitraten nicht nur teilt, sondern auch unter chronischer Therapie aufrecht erhält (Lehmann et al. 2009).

1.3 Aufbau und Funktion der Plazenta

Die humane Plazenta hat eine diskusartige Form mit einem Durchmesser von ca. 15-20 cm und einem durchschnittlichen Gewicht von 500g.

Grundlage des kindlichen Teils (Pars fetalis) ist die Chorionplatte, auch fetales Chorion frondosum genannt. Die fetale Seite der Plazenta, die Chorionplatte, ist glatt und von transparentem spiegelndem Amnion überdeckt, welches auch die Nabelschnur überzieht, deren Ansatzstelle sich dort befindet.

Die von der uterinen Seite der Chorionplatte abgehenden, in zahlreiche Chorionzotten verästelten Zottenstämme verbinden sich mit dem mütterlichen Teil (Pars materna oder Pars uterina), der Basalplatte. Die Basalplatte stellt einen Abkömmling der Decidua basalis dar, der an der Gebärmutterwand haftet. Hiervon gehen die Plazentarsepten aus, die das Organ in 15-20 Kotyledonen unterteilen.

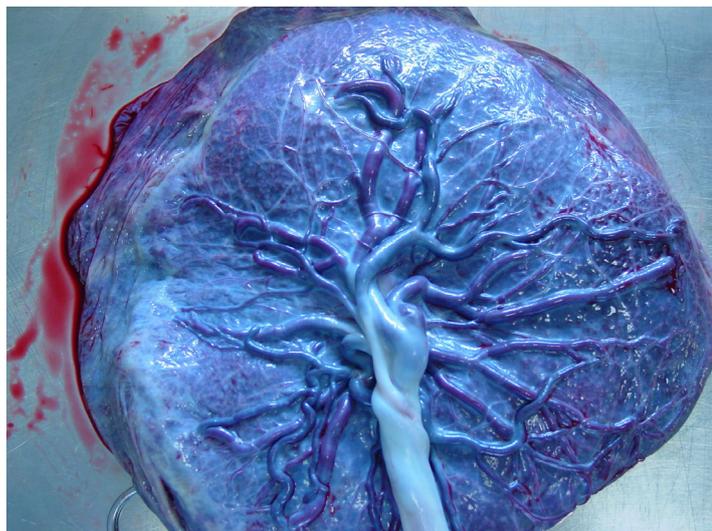


Abbildung 1.7: Fotografie einer reifen Plazenta

Als Austauschorgan benötigt die Plazenta eine doppelte Gefäßversorgung. Die fetale Durchblutung erfolgt über die beiden Nabelschnurarterien des fetalen Gefäßsystems. Sie erreichen die Chorionplatte und teilen sich bis in ihre Stammzottengefäße auf. Diese Zotten sind über die gesamte Decidua basalis verteilt. In Abbildung 1.8 kann man erkennen, dass aus der Chorionplatte (fetaler Anteil der Plazenta) die Chorionzotten in die mütterliche Basalplatte (Decidua basalis) hineinragen. Der venöse Abfluss erfolgt über die Zottenvenen in die Umbilikalvene. Die Gefäßversorgung der maternalen Seite wird über die uteroplazentaren Spiralarterien aufrechterhalten. Aus ihnen tritt das Blut fontänenartig aus, durchfließt den intervillösen Raum, wird von mütterlichen Venen aufgenommen und abtransportiert.

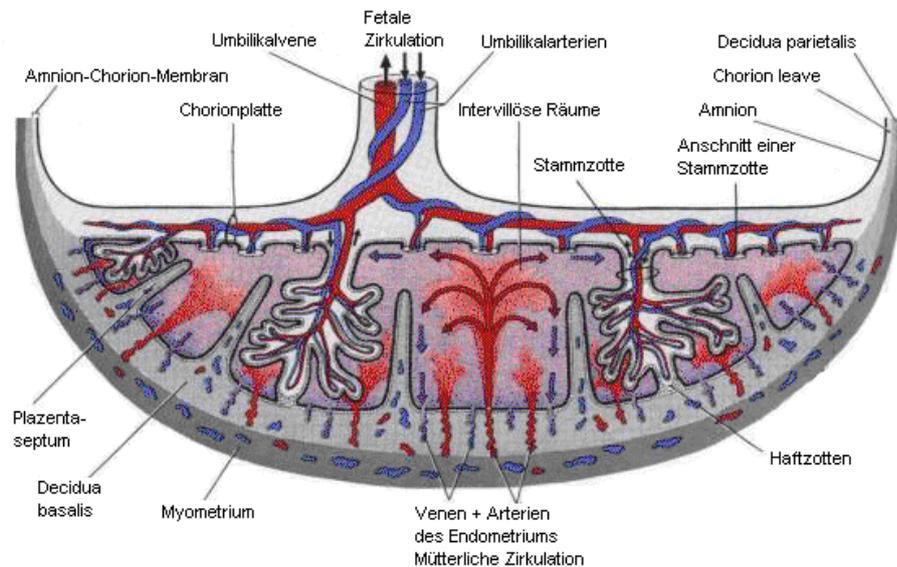


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Plazentastruktur (Moore and Persaud 1993)

Der funktionell wesentliche Teil der Plazenta ist die synzytiokapilläre Stoffwechsellmembran, die im Bereich der Zottenoberfläche das maternale vom fetalen Blut trennt.

Es ist zu beachten, dass die Plazentagrenzfläche häufig ganz unzutreffend als Schranke bezeichnet wird, da es nur wenige niedermolekulare Substanzen gibt, die die Plazenta nicht in messbaren Mengen passieren können. Erst wenn die Moleküle eine bestimmte Größe (Molekularmasse über 800, z. B. Heparin und Insulin), Struktur (starke Bindung an mütterliches Plasmaeiweiß) und Ladung (hydrophile Substanzen) erreichen, hat die Plazenta eine wirkliche Schrankenfunktion. Die meisten Medikamente und viele Chemikalien, die sich im mütterlichen Blut finden, können auch im fetalen Blut nachgewiesen werden. Die Plazentaschranke stellt also nur bedingt eine biologische Barriere zwischen mütterlichem und fetalem Blut dar.

Beim Menschen besteht diese Schranke bis zur 20. Schwangerschaftswoche aus sechs Schichten:

- a.) Synzytiotrophoblast
- b.) Zytotrophoblast
- c.) Epitheliale Basalmembran
- d.) Zottenbindegewebe
- e.) Endotheliale Basalmembran
- f.) Endothel der fetalen Kapillaren

Die Zytotrophoblastmembran bildet sich nach dem 4. Monat zurück.

Eine zentrale Rolle spielt die Plazenta beim Stoffaustausch zwischen fetalem und maternalem Kompartiment. Beim transplazentaren Stoffaustausch werden die Diffusion, erleichterte Diffusion, der aktive Transport und die Pinozytose unterschieden. Der diaplazentare Austausch der meisten Stoffe erfolgt per diffusionem. Schließlich übt die Plazenta auch noch produktive Funktionen aus.

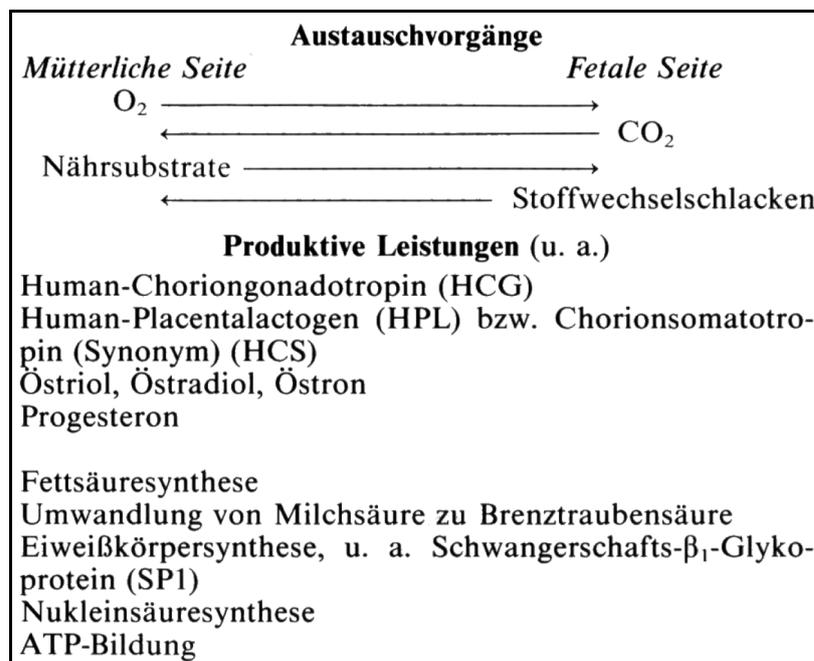


Abbildung 1.9: Fundamentalleistungen der Plazenta (Schmidt-Matthiesen 1985)

Die Austauschvorgänge erfolgen je nach Substrat nach verschiedenen Mechanismen. Ein Austausch durch Diffusion bzw. erleichterte Diffusion ist nur für Gase, Wasser, Kreatinin, Glukose sowie niedermolekulare Medikamente (z. B. Inhalationsnarkotika, lipophile Medikamente) anzunehmen. Die erleichterte Diffusion erfolgt dabei durch Bindung an Carrierproteine. Die Diffusion ist also abhängig von der Molekülgröße und der Fettlöslichkeit der Substanz.

Der enzymatisch gesteuerte aktive Transport ermöglicht den Austausch von hochmolekularen Stoffen und solchen, die entgegen dem fetomaternalen Konzentrationsgefälle transportiert werden sollen, wie z. B. Hydratationswasser, anorganische Ionen, Aminosäuren, Fettsäuren, Vitamine und Hormone. Ihm kommt eine besondere Bedeutung für anabole Prozesse zu. Der aktive Transport ist als energieverbrauchender Vorgang von der Bereitstellung von Adenosintriphosphat (ATP) abhängig. Die Bildung des ATP wird durch das Sauerstoffangebot limitiert. Dieser Transportmechanismus kann durch Zellgifte gehemmt werden.

Auch die Pinozytose gehört zu den aktiven enzymatischen Transportvorgängen. Sie ermöglicht den Übertritt von Proteinen und Lipiden auf die fetoplazentare Einheit. Lipo- und Glycoproteine sowie Immunglobuline beispielsweise werden durch Invagination der Zellmembran als Einschlusskörperchen transportiert. Eine Diapedese ist für Erythrozyten und Leukozyten möglich.

Die produktiven Leistungen der Plazenta sind ebenso wie der aktive Transport teils durch den Grad der anatomischen Integrität, teils durch das Sauerstoffangebot, den Östrogenspiegel sowie gewisse kooperative Leistungen des Feten limitiert. So ist z. B. die Östriolbildung von der Lieferung von Vorstufen durch den Fetus abhängig (Martius 1996, Schmidt-Matthiesen 1985).

2 Ziele der Arbeit

Während organische Nitrate z. B. bereits in Form von Glyceroltrinitrat-Pflastern in der Geburtshilfe zum Einsatz kommen, könnte auch PETN auf Grund seines Wirkungsspektrums und der besseren Verträglichkeit eine weitere Option bei der Behandlung schwerwiegender Schwangerschaftserkrankungen darstellen.

Bisher ist wenig über die Beeinflussung des plazentaren Stoffwechsels während der Applikation von PETN in der Schwangerschaft bekannt. Deshalb soll das Ziel der vorliegenden Arbeit sein, mit Hilfe des ex vivo Modells der zweiseitigen rezirkulierenden Plazentaperfusion den Einfluss von PETN auf den plazentaren Stoffwechsel zu untersuchen.

Folgende Kriterien sollen dabei beurteilt werden:

- der plazentare Energiestoffwechsel anhand der Parameter Glukoseverbrauch, Laktatproduktion, Sauerstoffverbrauch,
- die plazentare Syntheseleistung anhand der β -HCG-Freisetzung,
- die Beeinflussung des Innendruckes der fetalen Gefäße,
- der transplazentare Transfer von PETN und seinen Metaboliten vom maternalen ins fetale Kompartiment.

Als Qualitätskriterium für die durchgeführten Perfusionen dienen die Kontrollparameter Antipyrin und Kreatinin.

3 Methodik

3.1 Perfusionsmodell

Es wurde die 1972 von Schneider, Panigel und Dancis (Schneider et al. 1972) eingeführte und 1985 von Schneider und Huch (Schneider et al. 1985) modifizierte Methode der doppelseitigen rezirkulierenden humanen Plazentaperfusion verwendet. Dabei handelt es sich um Untersuchungen an einem isolierten Kotyledon der menschlichen Plazenta.

Die Durchführung der Perfusionsversuche erfolgte an insgesamt 15 Plazenten. Davon dienten 6 Perfusionen als Vergleichsgruppe, das heißt, es wurde in diesen 6 Versuchen kein PETN in der Hauptphase zugesetzt. Die übrigen 9 Perfusionen wurden jeweils in der Hauptphase mit PETN als zu untersuchenden Wirkstoff versetzt. Die verwendeten Plazenten stammten von gesunden Müttern mit komplikationsloser Schwangerschaft und vaginaler bzw. abdomineller Entbindung. Schwangerschaften mit Erkrankungen wie EPH-Gestose, Diabetes mellitus, Retardierung oder Frühgeburten wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

Die Zeit zwischen Entbindung und Perfusionsbeginn betrug durchschnittlich 25 Minuten. Erfahrungen der Arbeitsgruppen von Schneider und Malek auf diesem Gebiet belegen, dass kurze Ischämiezeiten (max. 30 Minuten) zwischen Ausstoßung der Plazenta und Beginn der Perfusion die Qualität des Perfusionsversuches maßgeblich beeinflussen (Malek et al. 1997).

3.2 Gewinnung und Präparation des Kotyledons

Die Plazenta wurde unmittelbar nach der Ausstoßung in eine Schale mit 37 °C temperierter physiologischer Kochsalzlösung überführt. Für eine bessere Identifizierung der fetalen Gefäße bei der späteren Präparation wurde darauf geachtet, dass die Nabelschnur mit Blut gefüllt blieb.

Im Anschluss wurde ein geeigneter, intakter Kotyledon ausgewählt und für die doppelseitige Perfusion präpariert. Der auszuwählende Lobulus sollte auf der Chorionplatte möglichst von je einer Arterie und einer dazugehörigen Vene versorgt werden und sollte sich nach Möglichkeit am Rand der Plazenta mit einem Stück intakter Eihaut befinden.

Nach Kanülierung der Gefäße wurde der zu perfundierende Bereich über Teflonschläuche mit dem Perfusionssystem verbunden und mittels der

Perfusionsgrundlösung von dem restlichen Blut freigespült. Nach Kontrolle des arteriellen Drucks (<80 mmHg) und der Flussrate wurde der perfundierte und nun helle Bereich (s. Abb. 3.1) vom übrigen Plazentagewebe abgetrennt und in die Perfusionskammer mit der mütterlichen Seite nach oben eingespannt. Um die Ischämiezeit so kurz wie möglich zu halten, begann die Versorgung des maternalen Kompartiments mit oxygenierter Perfusionslösung unmittelbar nach der Fixierung in der Perfusionskammer. Zur Perfusion des mütterlichen Kompartiments wurde ein vierarmiger Katheter mit Knopfkanülen vorsichtig in der Dezidualplatte platziert. Er übernahm die Funktion der Spiralarterien und verteilte das Perfusionsmedium frei im intervillösen Raum. Die maternal-venöse Flüssigkeit trat über Venenöffnungen aus dem Gewebe und wurde am tiefsten Punkt über einen eingelegten Teflonschlauch kontinuierlich abgepumpt.

Zu Beginn jedes Perfusionsversuches wurden mehrere Rückstellproben vom verbliebenen Plazentagewebe genommen.

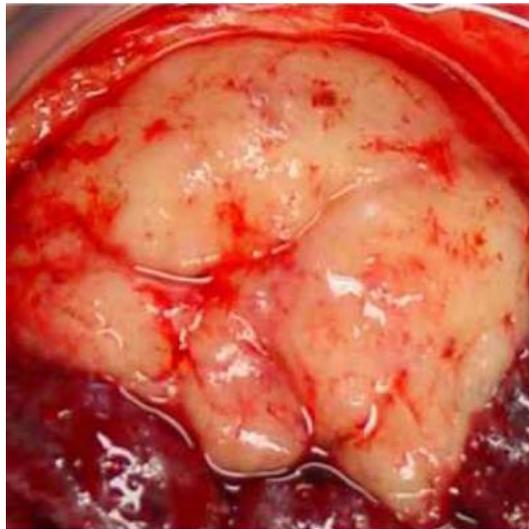


Abbildung 3.1: Fotografie eines präparierten und perfundierten Kotyledons

3.3 Prinzip des Versuchsaufbaus

Jeder Perfusionsversuch gliederte sich in drei Abschnitte, bezeichnet als Vorphase, Kontrollphase und Hauptphase. Die sechs Vergleichsperfusionsen, die ohne Zusatz von PETN durchgeführt wurden, dienten dabei der Qualitätskontrolle des Versuchsaufbaus und der Versuchsdurchführung. Als Ausgangswerte für die biochemischen

Veränderungen in der Hauptphase jeder PETN-Messung galten die zwei Stunden Perfusion vor dem Zusetzen des zu untersuchenden Wirkstoffes.

Zum entsprechenden Zeitpunkt der Versuche wurden Antipyrin, Kreatinin und PETN dem Perfusat auf der mütterlichen Seite zugesetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 M Natronlauge auf $\text{pH} = 7,4$ eingestellt.

Die Zusammensetzung der Lösung in den einzelnen Versuchsphasen ist in nachfolgender Abbildung 3.2 dargestellt:

Perfusionsphase	maternales Reservoir	fetales Reservoir
Vorphase (30 min)	Perfusionsgrundlösung + 80 mg/l Antipyrin	Perfusionsgrundlösung
Kontrollphase (120 min)	Perfusionsgrundlösung + 80 mg/l Antipyrin + 150 mg/l Kreatinin	Perfusionsgrundlösung
Hauptphase (240 min)	Perfusionsgrundlösung + 80 mg/l Antipyrin + 150 mg/l Kreatinin + 700 $\mu\text{g/ml}$ PETN	Perfusionsgrundlösung

Abbildung 3.2: Zusammensetzung der Perfusionslösung in den einzelnen Versuchsphasen

Vorphase

Durch eine 30minütige offene Perfusion beider Zirkulationen wurde jeder Perfusionsversuch eingeleitet. Diese Phase diente dem Freispülen des Kotyledons von Blut und Stoffwechselprodukten, aber auch der Aktivierung des Stoffwechsels des Plazentagewebes nach der Ischämieperiode. Dem maternalen Kompartiment wurden 80 mg/l Antipyrin zugegeben. In dieser Phase wurde generell auf beiden Seiten (maternal, fetal) offen und mit weitgehend konstanten Flussraten ($6,0 \pm 0,2$ ml/min) perfundiert. In regelmäßigen Abständen von zehn Minuten erfolgte eine Kontrolle des maternalen und fetalen Flows, um ein Leak zwischen beiden Kreisläufen auszuschließen. Bei einem Flüssigkeitsverlust von mehr als 0,5 ml aus dem fetalen Reservoir wurde der Versuch abgebrochen. Nach 30 Minuten wurden Proben auf beiden Seiten entnommen, die zur Kontrolle der Flussraten und der Bestimmung der Antipyrin clearance dienten. Unmittelbar an die Vorphase schloss sich die Kontrollphase an.

Kontrollphase

Die Kontrollphase sollte nun für 120 Minuten laufen, nachdem die vorbereiteten Perfusionslösungen gewechselt und der Kreislauf rezirkulierend geschlossen wurde. Sie ist notwendig, um individuelle StoffwechsellLeistungen und Aktivitäten des ausgewählten Kotyledons zu erfassen. Nach 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten wurden aus beiden Kreisläufen jeweils Proben (5 ml) entnommen, für die Blutgasanalyse (pH-Werte, pO₂) und zur Bestimmung der Konzentrationen von Glukose, Laktat und β -HCG sowie zur Kontrolle der Substanzen Antipyrin und Kreatinin. Um zu gewährleisten, dass die gewonnenen Produkte nicht zerfallen, wurden den entnommenen Proben für die Bestimmung von Glukose und Laktat je 50 μ l EDTA/ NaF zugesetzt. Die übrigen Proben dienten der Bestimmung der anderen Parameter.

Hauptphase

Nach der Kontrollphase wurden die Perfusionslösungen erneut gewechselt und PETN zugesetzt. Sie verlief über einen Zeitraum von mindestens 250 Minuten, wovon die ersten zehn Minuten im offenen System perfundiert wurden, um die Einstellung einer bestimmten PETN-Konzentration im intervillösen Raum des Kotyledons zu erreichen. Danach wurden beide Kreisläufe miteinander verbunden und 250 Minuten rezirkulierend perfundiert. Nach 130, 160, 190, 220, 250, 310 und 370 Minuten wurden erneut Proben (6 ml) aus beiden Reservoirren zur Bestimmung der nachstehenden Parameter entnommen: PETN bzw. dessen Metaboliten (PEtriN, PEdiN und PEmonoN), Glukose, Laktat, β -HCG, Antipyrin und Kreatinin, Blutgasanalyse (pH-Wert, pO₂).

Am Ende jedes Perfusionsversuches wurde der perfundierte Lobulus herauspräpariert, gewogen, bei -196 °C in Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die gesamten Proben, die während der Versuche gewonnen wurden, lagerten bis zur Bestimmung der zu messenden Parameter bei einer Temperatur von -20 °C.

3.4 Aufbau und Funktion der Perfusionsanlage

Der zentrale Teil der Perfusionsapparatur ist eine doppelwandige Kammer aus Plexiglas. Der zwischen den Wänden der Kammer befindliche Hohlraum wird permanent von Wasser aus dem Wärmebad durchflossen, um das Präparat auf einer konstanten Temperatur von 37 °C zu halten.

Vor Beginn des Experiments werden beide Systeme mit der Perfusionslösung luftblasenfrei gefüllt und zur Vermeidung von Luftembolien Blasenfänger vorgeschaltet. Im Wärmebad befinden sich die Perfusionslösungen, die in zwei getrennten Gefäßen als mütterliches und fetales Reservoir aufbewahrt werden. Vom fetalen Reservoir aus gelangt die Lösung durch einen Oxygenator über eine Flüssigkeitsförderpumpe, welche die Lösung mit einem kontinuierlichen Durchflussvolumen von 6 ml/min ($\pm 0,2$ ml/min) in die kanülierte fetale Arterie. Der Rückfluss erfolgt über die fetale Vene zurück in das fetale Reservoir. Die Zufuhr des mütterlichen Perfusionsmediums erfolgt nach dem gleichen Prinzip kontinuierlich mit einem Fluss von 12 ml/min ($\pm 0,2$ ml/min). Die austretende maternal-venöse Lösung wird über eine dritte Pumpe wieder zurück in das maternale Reservoir geführt.

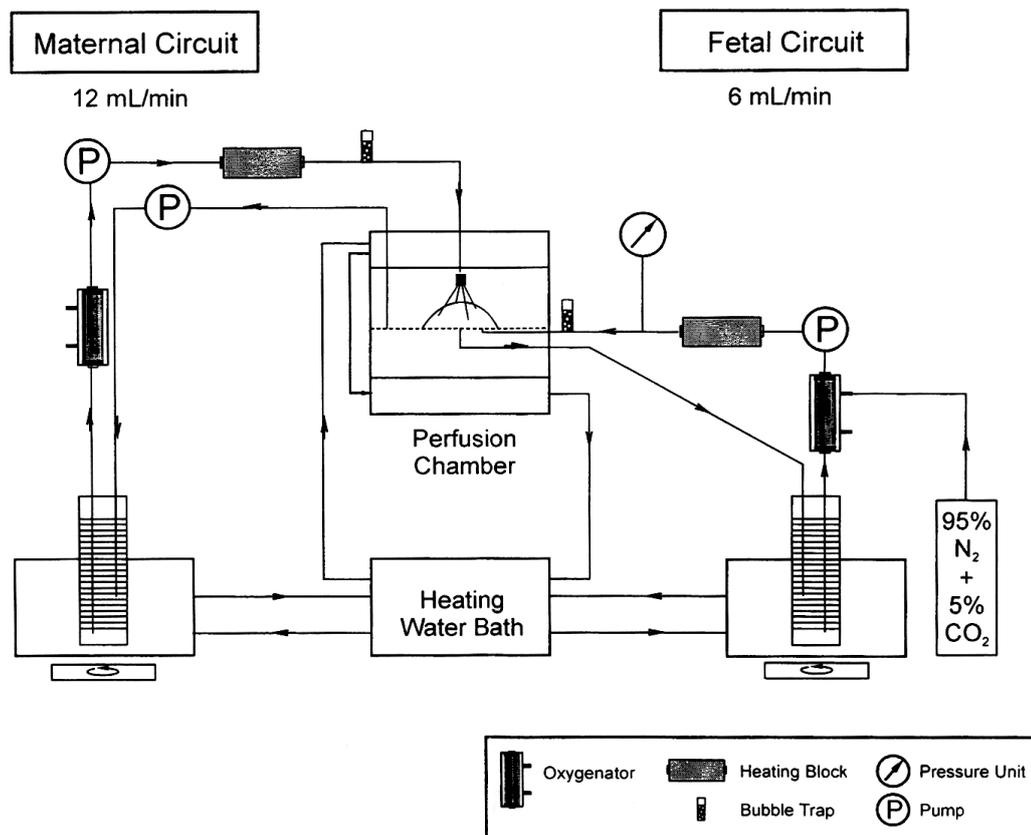


Abbildung 3.3: Schema der Perfusionsanlage

Die stetige Druckkontrolle im fetalen System erfolgt über ein Druckmessgerät. Optimale Druckwerte sollten sich dabei zwischen 15 und 45 mmHg befinden. Als Abbruchkriterium galt eine kontinuierliche Steigerung der Werte über 55 mmHg. Zur Begasung der Perfusionsmedien dienten nachgeschaltete Oxygenatoren, die für den

fetalen Anteil ein Gasgemisch aus 95% Stickstoff und 5% Kohlendioxid enthielten, maternal wurde Luftsauerstoff zugesetzt.

Die intermittierende Überwachung der Blutgaswerte erfolgte mittels Blutgasmessgerät.

3.5 Verwendete Materialien

3.5.1 Perfusionsanlage

- Plexiglasgefäße nach Maßanfertigung zum Temperieren und Fixieren des Probenmaterials
- Thermostat Julabo 500, -50 bis 200 °C
- Flüssigkeitsförderpumpe PD 5201 (Heidolph), 1,5 bis 45 ml/min
- zwei Flüssigkeitsförderpumpen (Ismatec), 1,3 bis 35 ml/min
- 2 Oxygenatoren Silox-S 190×30 mm, Oberfläche 0,3 m² (Mera)
- Druckmessgerät, Auswertesoftware
- diverse Schläuche, Kanülen, Blasenfänger, Präparierbesteck

3.5.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Die Zusammensetzung der Lösungsmittelgemische ist in Volumenprozent (Vol%) angegeben.

PETN für die Perfusionsversuche wurde als Verreibung in Lactose (20% PETN / 80% Lactose) von der Ravensberg GmbH chemische Fabrik, Konstanz zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der Stammlösungen und Standards wurde Methanol in HPLC-Qualität (Roth) eingesetzt. Für alle Versuche wurde Reinstwasser aus der hausinternen Anlage CWD Reinstwassersysteme (Christ) verwendet.

Weitere verwendete Chemikalien:

- PETN Stammlösung in DMSO (20 mg / 10 ml DMSO)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) 0,0067 M (PO₄), pH = 7,4 (Cambrex)
- Bovine Serum Albumin Fraction V, M ≈ 66338 g/mol (ICN Biomedicals Inc.)
- Zellzuchtmedium NCTC 135 Powder (Cambrex)
- Dextran, M = 36000 - 44000 g/mol
- D(+)-Glucose

- Antibiotikum Amoxicillin (Sigma)
- Liquemin® N 25000, enthält Heparin, (Roche)
- Earls Puffer (NaCl 6,5 g/l; KCl 0,4 g/l; NaH₂PO₄ 0,14 g/l; NaHCO₃ 2,2 g/l; MgSO₄ 0,2 g/l; CaCl₂ 0,2 g/l (alles Roth))
- Antipyrin (Fluka)
- Creatinin (Merck)
- Natronlauge-Plätzchen
- Natriumchlorid

3.6 Analytische Methoden

3.6.1 Bestimmung von PETN und seinen Metaboliten

Der Nachweis von PETN und seinen Metaboliten für diese Arbeit erfolgte mittels der HPLC/MS-Technik, welches Gegenstand einer parallel angefertigten Diplomarbeit von S. Voigt war (Voigt 2005).

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung mittels LC-MS von Pentaerithritylmononitrat (PEmonoN), -dinitrat (PEdiN), -trinitrat (PEtriN) und -tetranitrat (PETN) war bisher nicht aus der Literatur bekannt. Die Entwicklung einer geeigneten Methode für die Quantifizierung erwies sich dahingehend als sehr anspruchsvoll, da neben der Ausgangssubstanz PETN auch seine drei bioaktiven Metaboliten erfasst werden sollten, die in ihren physiko-chemischen Eigenschaften stark unterschiedlich sind. Aufgrund seiner vier Nitrogruppen stellt das PETN eine sehr unpolare und hydrophobe Verbindung dar, während das Pentaerithritylmononitrat (PEmonoN) als stark polar und hydrophil einzuordnen ist. Die Polaritäten der Metabolite PEdiN und PEtriN lassen sich zwischen den beiden Extremfällen einordnen.

Die Entwicklung der flüssigchromatographischen Trennmethode der Pentaerithritylnitrate (PEXN) für die vorliegende Arbeit, sowie Extraktions- und Stabilitätsuntersuchungen erfolgten mittels reversed phase (RP)-HPLC an einer HPLC-Anlage der Firma Gynkotek. Zur Trennung der Pentaerithritylnitrate wurde eine Aquasil-Säule (C18) mit Vorsäulenkartusche verwendet. Das HPLC-System wurde isokratisch mit einem Methanol/Wasser-Gemisch (Methanolanteil: 40 Vol%) betrieben. Die Quantifizierung von PETN und seinen bioaktiven Metaboliten erfolgte mittels LC-MS.

Die Proben wurden nach der Elektronensprayionisierungs-Technik (ESI) ionisiert und im negativen Modus gemessen. Zur Optimierung der Detektionsbedingungen des Massenspektrometers wurden Massenspektren der Reinsubstanzen im Bereich zwischen $m/z = 60$ bis 600 bei den Interfacetemperaturen $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgenommen. Da bei $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ Signale mit der höchsten Intensität auftraten, wurden bei dieser Temperatur die Konusspannungen zwischen 30 V und 50 V variiert.

Nach der Optimierung der Detektionsbedingungen wurden die Pentaerithritylnitrate (PEXN) im Single Ion Monitoring (SIM)-Modus detektiert. Der Vorteil des SIM-Modus ist, dass anstatt der vollständigen Spektren die Ionenströme ausgewählter bekannter Massen registriert werden. Um nun die Pentaerithritylnitrate von störenden Fremdsubstanzen unterscheiden zu können, müssen die Signale aller ausgewählten Massen im gleichen Intensitätsverhältnis vorliegen. Zur weiteren Optimierung der massenspektrometrischen Sensitivität wurde durch Veränderung der Konusspannung die Intensität einzelner Ionenkanäle verändert und die günstigsten Bedingungen ermittelt.

Die quantitative Erfassung von PETN und seinen Metaboliten im Perfusionsmedium blieb auf einen exemplarischen Versuch (PETN 08) beschränkt, da der Aufwand dieser Messmethode zu groß ist.

3.6.2 Antipyrinbestimmung

Das nichtsteroidale Antiphlogistikum Antipyrin wird synonym auch als Phenazon bezeichnet. Es gehört der Gruppe der Pyrazolone an. Die chemische Bezeichnung lautet 2,3-Dimethyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-on ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$).

Die Konzentration von Antipyrin wurde nach einer Methode von Brodie und Mitarbeiter (Brodie et al. 1949) bestimmt. Zu $0,5\text{ ml}$ Perfusat wurde je $0,5\text{ ml}$ 10% Zinksulfatlösung und $0,75\text{ M}$ Natronlauge zur Proteinfällung zugegeben, 30 min geschüttelt und $0,5\text{ ml}$ Überstand pipettiert. Das gewonnene Serum wurde mit $0,5\text{ ml}$ einer Lösung, bestehend aus 10 ml $0,2\%$ Natriumnitrat, 10 ml 2 M Schwefelsäure und 80 ml H_2O vermischt und nach 15 min bei einer Wellenlänge $\lambda = 350\text{ nm}$ am Spektrometer als Änderung der Extinktion zum Leerwert gemessen. Mittels einer mitgeführten Eichkurve wurde die Konzentration des Antipyrin mit der Einheit $[\mu\text{g/ml}]$ bestimmt.

Die Antipyrin-clearance dient als ein Qualitätskriterium und wurde während der

30-minütigen, offenen Perfusion vor dem eigentlichen Beginn des Experiments bestimmt.

Um den Antipyrintransfer vom maternalen in den fetalen Kreislauf als Clearance berechnen zu können, kam die folgende Formel nach Schneider und Mitarbeiter zur Anwendung (Schneider et al. 1985):

$$\text{Antipyrin clearance [ml/min]} = \frac{C_{\text{fet}} \cdot Q_{\text{fet}}}{C_{\text{mat}}}$$

C_{fet} : Antipyrinkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] - fetal nach 30 min

C_{mat} : Antipyrinkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] - maternal zum Zeitpunkt Null

Q_{fet} : Flow [ml/min] - fetal

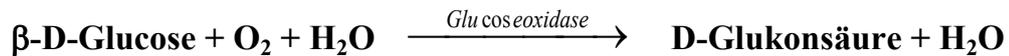
3.6.3 Kreatininbestimmung

Die Konzentration von Kreatinin wurde mittels Kit 555 (SIGMA Diagnostics) kolorimetrisch bestimmt. Die Methode ist ein Farbtest ohne Enteiweißung, bei dem Kreatinin in alkalischer Lösung mit Pikrat einen gelb- orangefarbenen Farbkomplex bildet. Dieses Verfahren beruht auf der Jaffé-Reaktion (Jaffé 1886) und wurde von Slot (Slot 1965) angepasst. Später wurde das Verfahren von Heinegard und Tiderstrom (Heinegard and Tiderstrom 1973) erneut modifiziert, dabei wurde die Notwendigkeit eines Proteinniederschlags aufgehoben. Ein Säurereagenz, bestehend aus Schwefelsäure und Essigsäure löst den Farbkomplex mit Kreatinin bei niedrigem pH-Wert wieder auf. Die Farbintensität vor und nach Säurezugabe wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 500 \text{ nm}$ am Spektrometer gemessen. Die Differenz der gemessenen Farbintensitäten ist der Kreatininkonzentration proportional. Die Kreatininkonzentration wird in der Einheit [$\mu\text{l/ml}$] angegeben.

3.6.4 Glukosebestimmung

Die Glukosekonzentration wurde am Beckman Glucose Analyzer 2 (USA) gemessen. Dem hier verwendeten Prinzip liegt die enzymatische Oxidation von β -D-Glukose in Gegenwart von Glukoseoxidase zugrunde. Die Glukoseoxidase ist in der kommerziellen Enzymlösung GOD in einer Konzentration von 150 kU/l enthalten (Bergmeyer 1974).

Die Reaktionsgleichung lautet:



Die Abnahme des Sauerstoffes wurde an einer Sauerstoffelektrode gemessen und ist der umgesetzten Glukosemenge proportional. Mittels Eichung des Gerätes mit kommerziell erhältlichen Standardlösungen konnte die Konzentration in [mmol/l] bestimmt werden.

3.6.5 Laktatbestimmung

Die Laktatkonzentration wurde am Blood Gas Analyzer Omni 990 (AVL/Roche, Deutschland) bestimmt. Das Gerät ermittelt die Laktatkonzentration [mmol/l] mittels elektrochemischer Messung der Spannungsdifferenz an einer Laktat-selektiven Elektrode.

3.6.6 Bestimmung des Humanen Choriongonadotropin

Humanes Choriongonadotropin (β -HCG) ist ein Hormon, welches von den Trophoblasten sezerniert wird. Es wurde mit einem Mikropartikel-Enzymimmunoassay (MEIA) am AxZYM-Analysegerät nach der Methode von Abbott (Abbott 1997) bestimmt. Der Überstand der zentrifugierten Proben wurde verdünnt und ein Konjugat aus enzymmarkierten β -HCG Antikörper (alkalische Phosphatase) und mit Anti- β -HCG beschichteten Mikropartikeln hinzu pipettiert. Das β -HCG bindet sowohl die enzymmarkierten Antikörper als auch die antikörpergebundenen Mikropartikel. Auf diese Weise entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Dieses Gemisch wurde auf eine Glasfasermatrixzelle überführt, an der sich die Mikropartikel irreversibel binden. Nicht gebundene Substanzen wurden ausgewaschen. Hinzugefügtes 4-Methylumbelliferylphosphat wird von der alkalischen Phosphatase hydrolysiert und es entsteht das Fluoreszenzprodukt Methylumbelliferon. Ein optisches Meßsystem misst das nach einer Anregung von $\lambda = 365$ nm emittierte Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 448$ nm. Die Geschwindigkeit, mit der das Fluoreszenzprodukt auf der Matrix gebildet wird, ist proportional zur Konzentration des β -HCG in der Probe. Man erhält ein quantitatives Ergebnis mit der Einheit [mIU/ml].

3.6.7 Blutgasanalyse

Unmittelbar nach der Probenentnahme wurden Sauerstoffgehalt und pH-Wert am Blutgasmessgerät ABL 500 (Radiometer Kopenhagen) bestimmt. Der pH-Wert wurde in Proben aus dem zuführenden Schenkel des mütterlichen als auch des fetalen Kreislaufes bestimmt und bei Bedarf mit 1 M NaOH auf einen pH = 7,4 korrigiert. Der Sauerstoffgehalt wurde sowohl im zuführenden als auch im abführenden Schenkel beider Kreisläufe gemessen. Aus den Werten wurde der Gesamtverbrauch des Sauerstoffes als Differenz der Konzentrationen im zuführenden und abführenden Schenkel im maternalem Kompartiment, der Transfer vom maternalen zum fetalen Kompartiment und der Sauerstoffverbrauch durch das Plazentagewebe berechnet. Nach Wier und Mitarbeitern (Wier et al. 1983) berechnet sich der Sauerstoffverbrauch und -transfer wie folgt:

$$\text{Gesamt - O}_2 \text{ - Verbrauch [ml/min} \cdot \text{kg]} = \frac{(P_{Mzu} - P_{Mab}) \cdot 0,0239}{(P_B - P_{H_2O})} \cdot \frac{Q_M}{W}$$

$P_{Mzu/Mab}$: Sauerstoffpartialdruck in mmHg im zu-/abführenden Schenkel des maternalen Kompartiments

P_B : Luftdruck in mmHg zum Zeitpunkt der Perfusion

P_{H_2O} : Wasserverdampfungsdruck bei 37 °C in mmHg, $P_{H_2O} = 47,1$ mmHg

Q_M : Flussrate im maternalen Perfusat [ml/min]

W : Kotyledongewicht in kg

Löslichkeitskoeffizient der Perfusionslösung: 0,0239 (Wier et al. 1983)

$$\text{O}_2 \text{ - Transfer [ml/min} \cdot \text{kg]} = \frac{(P_{Fab} - P_{Fzu}) \cdot 0,0239}{(P_B - P_{H_2O})} \cdot \frac{Q_F}{W}$$

P_{Fab} : Sauerstoffpartialdruck in mmHg im ab-/zuführenden Schenkel des fetalen Kompartiments

Q_F : fetale Flussrate [ml/min]

Der Sauerstoffverbrauch des Plazentagewebes berechnet sich aus der Differenz von Gesamtverbrauch und Transfer:

$$\text{Plazentarer O}_2 \text{ - Verbrauch [ml/min} \cdot \text{kg]} = \text{O}_2 \text{ - Gesamtverbrauch} - \text{O}_2 \text{ - Transfer}$$

3.7 Statistische Auswertung

Die gemessenen Konzentrationen von Antipyrin, Creatinin, Laktat, β -HCG, Glukose sowie der Perfusionsdruck wurden als prozentuale Veränderung zur Ausgangskonzentration umgerechnet. Die Absolutwerte sind in Tabellen im Anhang aufgeführt.

Es hat sich in den Messergebnissen gezeigt, dass die unterschiedlichen Plazenten einen unterschiedlichen Stoffumsatz aufwiesen. Durch die Normierung wurde ein Vergleich der Perfusionen verschiedener Plazentakotyledone ermöglicht.

Unter Verwendung der Statistik-Software SPSS 19.0 wurde für die verschiedenen Parameter jeweils eine Varianzanalyse mit Messwiederholung durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mit der „Greenhouse-Geisser“-Methode berechnet. Zur Berechnung der Signifikanzen für den Sauerstofftransfer und -verbrauch wurde der zweiseitige gepaarte T-Test nach Student verwendet.

Unter der Verwendung der Software Microsoft Excel 2003 wurden alle Daten als prozentuale Veränderung zur Ausgangskonzentration umgerechnet und daraus die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen berechnet.

Um den Verlauf der Experimente graphisch darzustellen, wurden die Mittelwerte mit den Standardabweichungen in Liniendiagrammen abgebildet. Zur besseren Übersicht wurden die Standardabweichungen jeweils nur in eine Richtung abgetragen. Für den Sauerstofftransfer und -verbrauch wurden jeweils Boxplots erzeugt.

4 Ergebnisse

4.1 Antipyrin

Während der Dauer der sechsständigen Perfusionen konnten eine Konzentrationsabnahme des Antipyrins im maternalen Kreislauf und eine Konzentrationszunahme im fetalen Kreislauf bestimmt werden. Aufgrund seines niedermolekularen und lipophilen Charakters fand ein flusskontrollierter Übertritt des Antipyrins in den fetalen Kreislauf statt. Es wurde rasch ein Equilibrium der Konzentrationen erreicht (Egbe 2002).

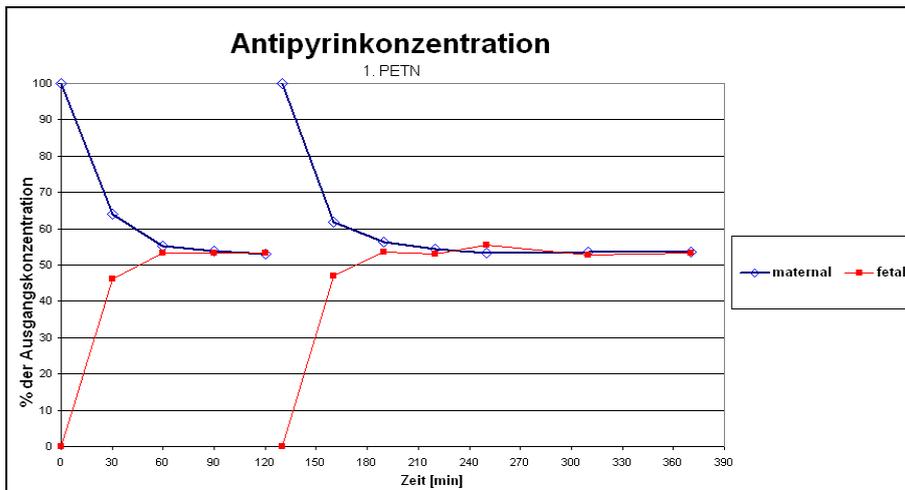


Abbildung 4.1: 1. Versuch unter Zugabe von PETN

Antipyrintransfer vom maternalen zum fetalen Kompartiment; während der Kontrollphase 0-120 min erfolgte eine Perfusion ohne Medikament, die Hauptphase 130-370 min erfolgte unter Zugabe von PETN

Die Kurven in Abbildung 4.1 zeigen den zu erwartenden Konzentrationsverlauf und belegen die Konstanz des Antipyrintransfers.

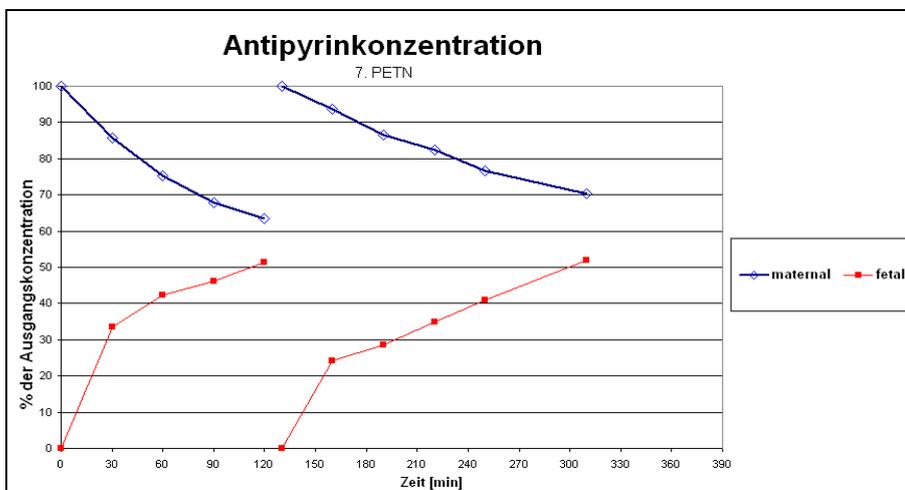


Abbildung 4.2: 7. Versuch unter Zugabe von PETN

Antipyrintransfer vom maternalen zum fetalen Kompartiment; während der Kontrollphase 0-120 min erfolgte eine Perfusion ohne Medikament, die Hauptphase 130-370 min erfolgte unter Zugabe von PETN

Im Gegensatz dazu zeigte der Verlauf im 7. Versuch (s. Abb. 4.2) unter Zugabe von PETN deutlich, dass die perfundierten Areale auf der fetalen und maternalen Seite der Austauschmembran der Plazenta nicht günstig getroffen wurden und somit kein optimaler Transfer stattfinden konnte. Dieser Versuch wurde daher von der gesamten Auswertung ausgeschlossen.

Beim Vergleich der PETN-Perfusionen mit den Leer-Perfusionen (s. Abb. 4.3) ist die Kongruenz der Konzentrationskurven deutlich zu erkennen. Bei der statistischen Auswertung konnten weder auf der maternalen Seite ($p = 0,673$) noch auf der fetalen Seite ($p = 0,532$) signifikante Unterschiede festgestellt werden.

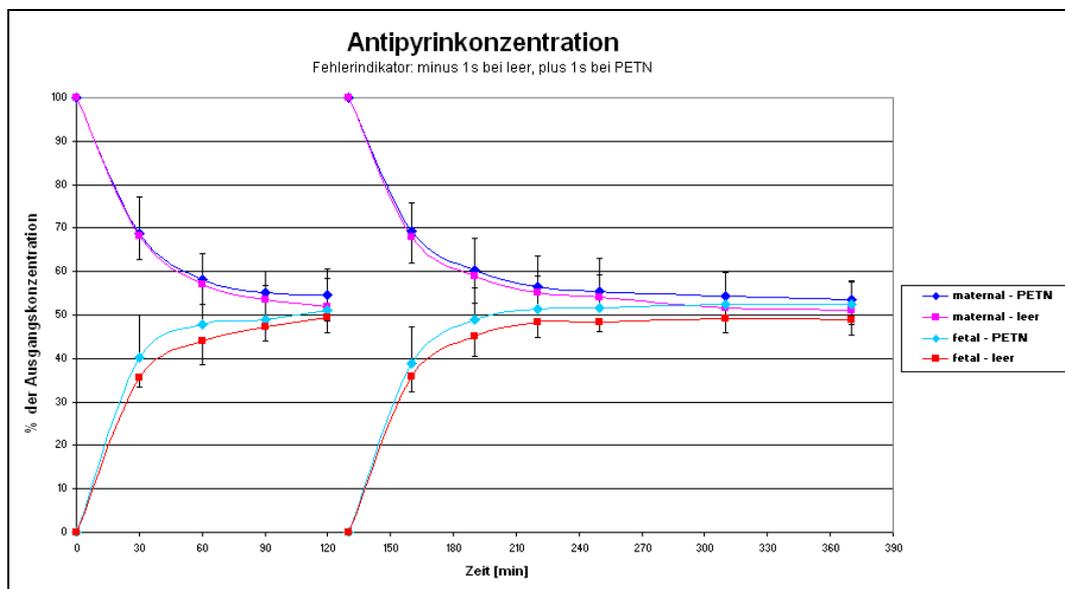


Abbildung 4.3: Antipyrintransfer vom maternalen zum fetalen Kompartiment als Mittelwert

Leer-Perfusion $n=6$, PETN-Perfusion $n=8$; während der Kontrollphase 0-120 Minuten erfolgte eine Perfusion ohne Medikament, die Hauptphase 130-370 Minuten erfolgte unter Zugabe von PETN

Dies verdeutlicht, dass PETN keinen Einfluss auf die Flussrate an der Austauschfläche der Plazenta hatte. Demzufolge kann von einem unbeeinflussten Transfer flussabhängiger Substanzen ausgegangen werden.

4.2 Kreatinin

Die Kreatininkonzentration wurde während der sechsständigen Perfusionen sowohl im maternalen als auch im fetalen Kompartiment bestimmt und ist in nachfolgender Abbildung 4.4 dargestellt.

Das hydrophile Kreatinin diffundiert langsam vom maternalen in den fetalen Kreislauf, so dass nach sechs Stunden noch kein Equilibrium erreicht war. Der Übertritt des Kreatinins ist membranlimitiert und abhängig von der Größe der Austauschfläche. Die Konstanz des Kreatinintransfers beschreibt die Stabilität der Permeabilität während der Dauer der Perfusion und lässt Rückschlüsse auf einen Defekt in der plazentaren Membran zu. Wie der Abbildung 4.4 zu entnehmen ist, bestand kein Membrandefekt während unserer Versuche.

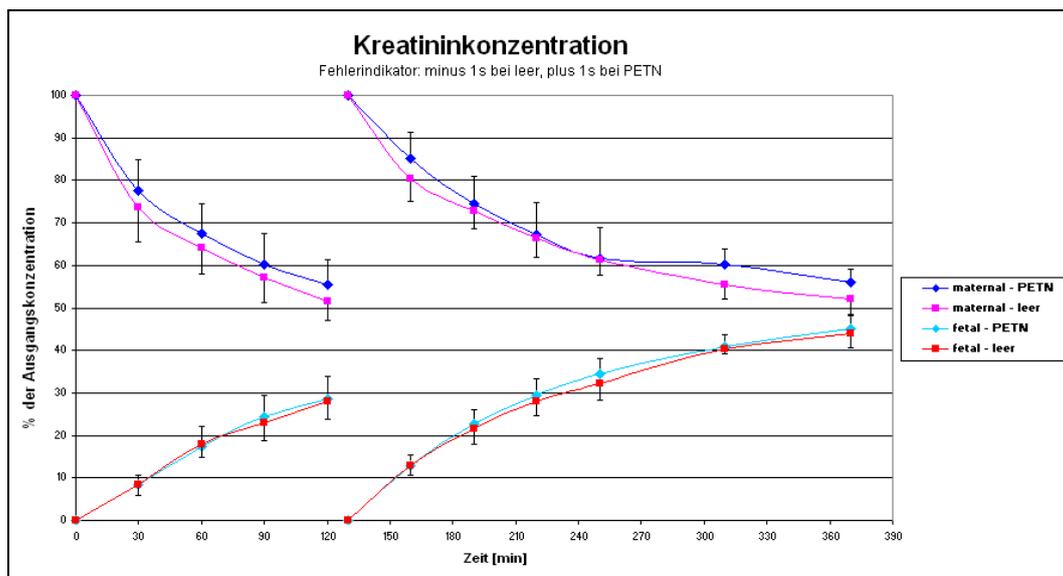


Abbildung 4.4: Kreatinintransfer vom maternalen zum fetalen Kompartiment als Mittelwert

Leer-Perfusion $n=6$, PETN-Perfusion $n=8$; während der Kontrollphase 0-120 Minuten erfolgte eine Perfusion ohne Medikament, die Hauptphase 130-370 Minuten erfolgte unter Zugabe von PETN

Bei dem Vergleich der Leer-Perfusionen mit den Werten der PETN-Perfusionen konnten bei der statistischen Auswertung weder auf der maternalen Seite ($p = 0,767$) noch auf der fetalen Seite ($p = 0,721$) signifikante Unterschiede des Kreatinintransfers festgestellt werden. Das weist darauf hin, dass die Applikation von PETN die Größe der Austauschfläche nicht beeinflusst.

4.3 Glukose

Im Verlauf der Perfusionen mit Pentaerithryltetranitrat entwickelte sich die Glukosekonzentration kontinuierlich sinkend sowohl im fetalen als auch im maternalen Kreislauf. Dies deutet auf die Fähigkeit der Glykolyse des ex vivo Plazentakotyledons hin.

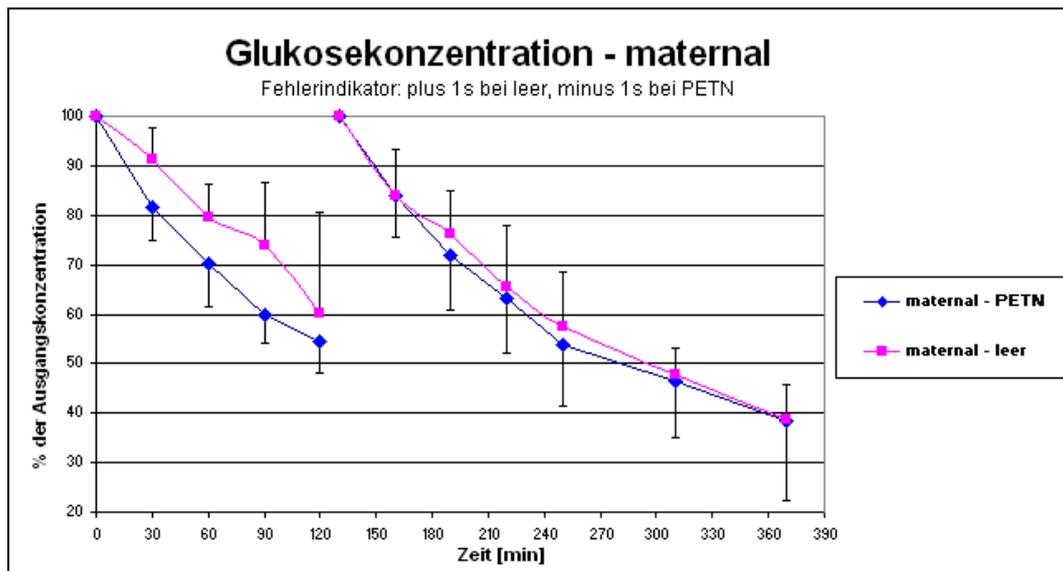


Abbildung 4.5: Glukoseverbrauch im maternalen Kompartiment als Mittelwert

Leer-Perfusion n=6, PETN-Perfusion n=8; während der Kontrollphase 0-120 Minuten erfolgte eine Perfusion ohne Medikament, die Hauptphase 130-370 Minuten erfolgte unter Zugabe von PETN

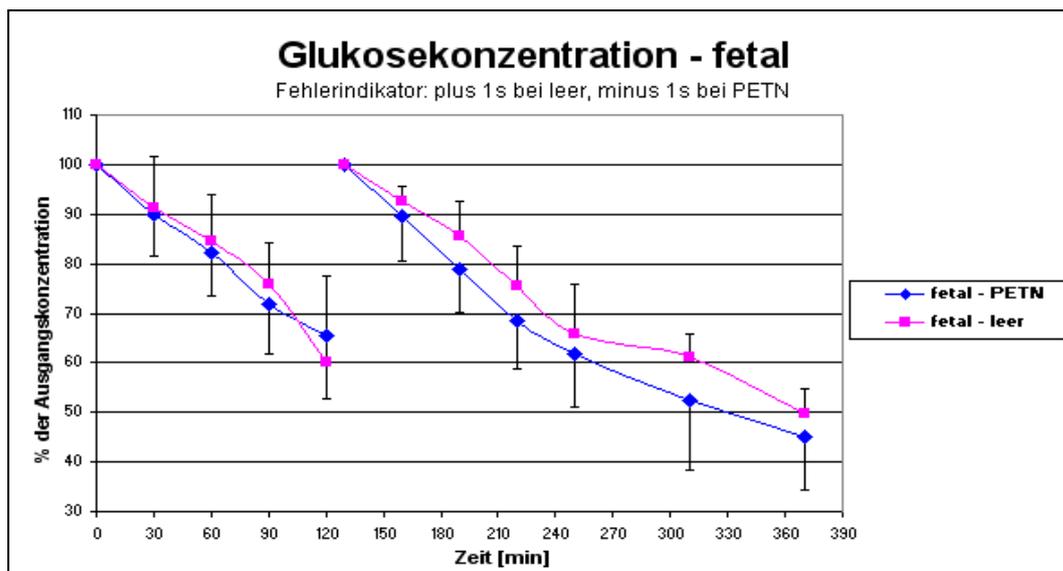


Abbildung 4.6: Glukoseverbrauch im fetalen Kompartiment als Mittelwert

Leer-Perfusion n=6, PETN-Perfusion n=8; während der Kontrollphase 0-120 Minuten erfolgte eine Perfusion ohne Medikament, die Hauptphase 130-370 Minuten erfolgte unter Zugabe von PETN

In den Abbildungen 4.5 und 4.6 stellt sich ein deutlicher Konzentrationsabfall der Glukose dar. Die Abnahme des Glukoseverbrauchs in den letzten beiden Stunden (Minute 250-370) der Experimente beruhte auf dem abnehmenden Glukoseangebot in der Perfusionslösung. Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied sowohl im maternalen ($p = 0,568$) als auch im fetalen ($p = 0,393$) Kreislauf zwischen Leer-Perfusionen und den mit PETN versetzten Perfusionen.

4.4 Laktat

Im Verlauf der sechsstündigen Perfusionen konnte eine Zunahme der Laktatkonzentration gemessen werden. Diese Konzentrationszunahme während der Perfusionen mit PETN war vergleichbar mit der Laktatproduktion in den Leer-Perfusionen (s. Abb. 4.7 u. 4.8).

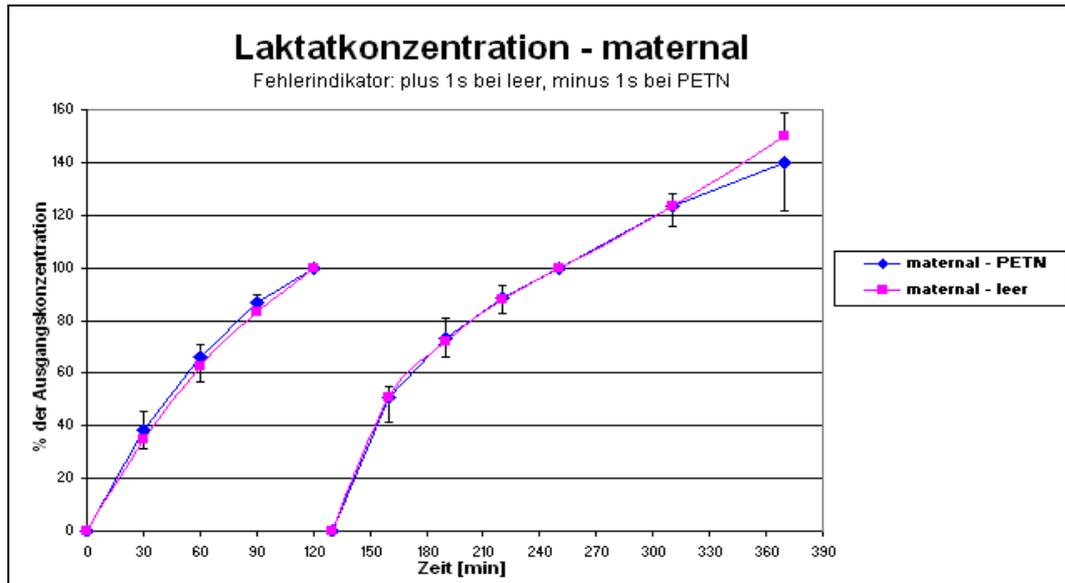


Abbildung 4.7: Laktatproduktion im maternalen Kompartiment als Mittelwert

Leer-Perfusion n=6, PETN-Perfusion n=8; während der Kontrollphase 0-120 Minuten erfolgte eine Perfusion ohne Medikament, die Hauptphase 130-370 Minuten erfolgte unter Zugabe von PETN

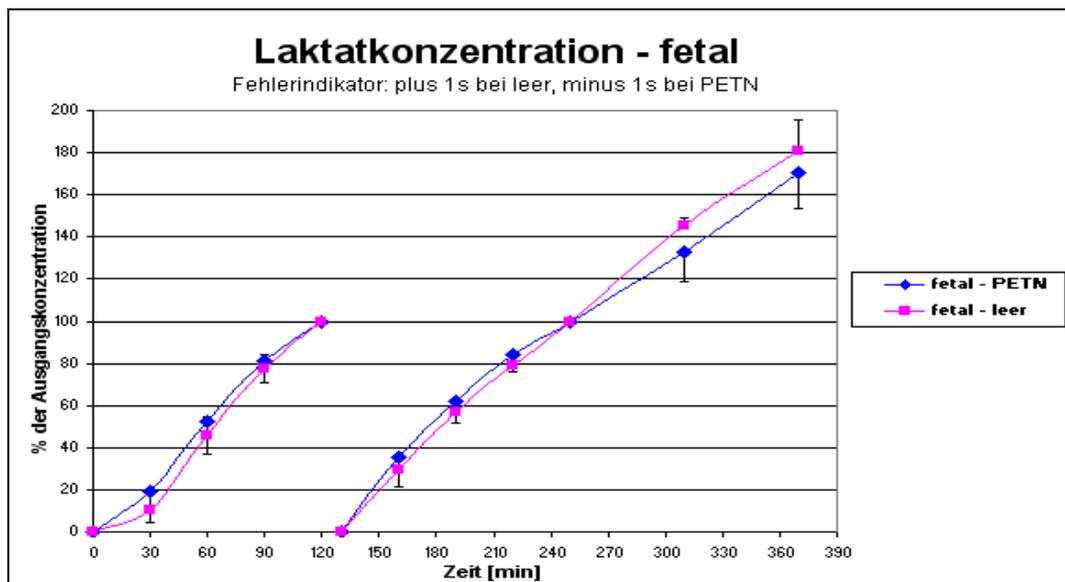


Abbildung 4.8: Laktatproduktion im fetalen Kompartiment als Mittelwert

Leer-Perfusion n=6, PETN-Perfusion n=8; während der Kontrollphase 0-120 Minuten erfolgte eine Perfusion ohne Medikament, die Hauptphase 130-370 Minuten erfolgte unter Zugabe von PETN

Bei der statistischen Auswertung konnten weder auf der maternalen Seite ($p = 0,844$) noch auf der fetalen Seite ($p = 0,299$) signifikante Unterschiede der Laktatproduktion festgestellt werden.

4.5 Humanes Choriongonadotropin

Der ex vivo perfundierte Kotyledon besitzt die Fähigkeit, kontinuierlich das Proteohormon β -HCG zu sezernieren. Im maternalen Kreislauf ließ sich, wie in der Abbildung 4.9 dargestellt, daher eine Zunahme der β -HCG-Konzentration messen.

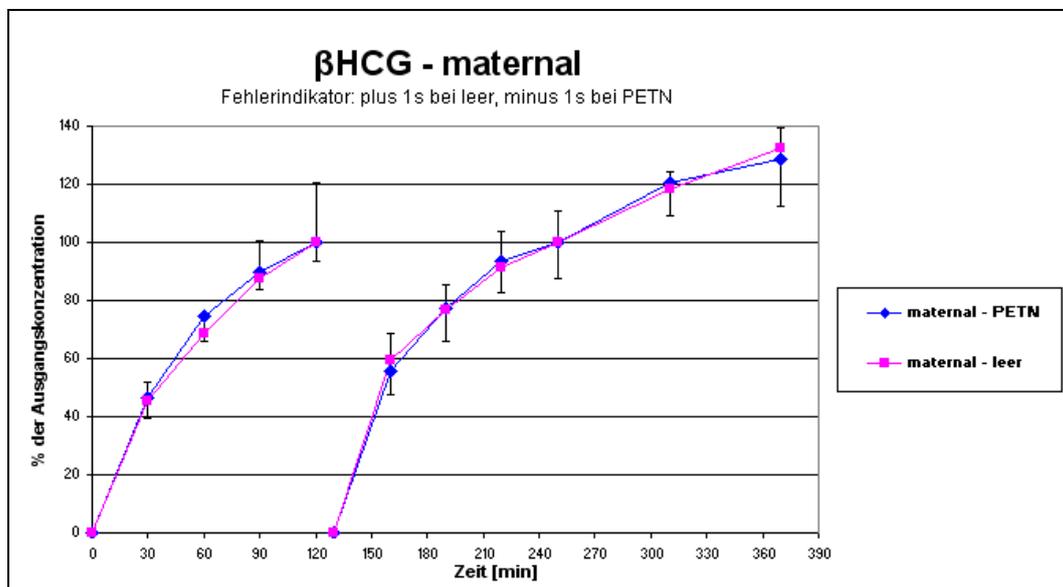


Abbildung 4.9: β -HCG-Produktion im maternalen Kompartiment als Mittelwert

Leer-Perfusion $n=6$, PETN-Perfusion $n=8$; während der Kontrollphase 0-120 Minuten erfolgte eine Perfusion ohne Medikament, die Hauptphase 130-370 Minuten erfolgte unter Zugabe von PETN

Die β -HCG-Sekretion der PETN-Perfusionen war vergleichbar ($p = 0,879$) mit der der Leer-Perfusionen.

4.6 Perfusionsdruck

Während der sechsständigen ex vivo Perfusion von Plazentakotyledonen zeigte sich in den Kontrollexperimenten ein relativ konstanter Perfusionsdruck, der jeweils zum Ende jeder Perfusion einen leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg ($p = 0,253$) zu verzeichnen hatte.

In den vergleichenden Perfusionen, unter Zugabe von PETN, konnte auch hier kein signifikanter Unterschied in der Perfusionsdruckentwicklung gemessen werden ($p = 0,490$).

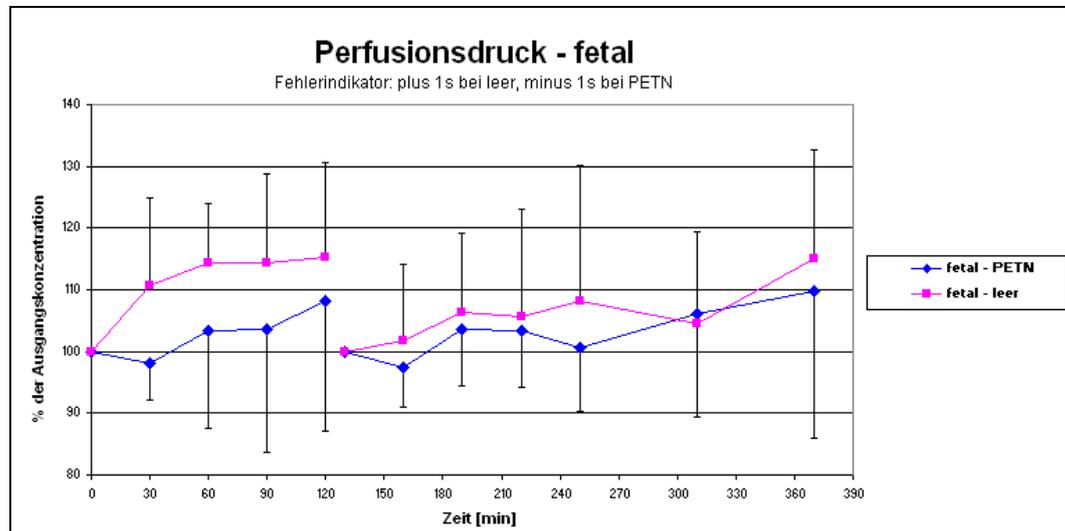


Abbildung 4.10: Perfusionsdruck im fetalen Kompartiment als Mittelwert

Leer-Perfusion $n=6$, PETN-Perfusion $n=8$; während der Kontrollphase 0-120 Minuten erfolgte eine Perfusion ohne Medikament, die Hauptphase 130-370 Minuten erfolgte unter Zugabe von PETN

PETN beeinflusste die Kontraktilität der placentaren Gefäßstrombahn unter normotensiven Druckverhältnissen nicht.

4.7 Sauerstofftransfer

Der Sauerstofftransfer vom maternalen in das fetale Kompartiment blieb auch nach einmaliger Zugabe von PETN in das Perfusionsmedium (Minute 130) konstant. Bei der statistischen Auswertung konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,402$) beim Sauerstofftransfer zwischen den Leer-Perfusionen und den PETN-Perfusionen festgestellt werden.

Wie in der Abbildung 4.11 ersichtlich wird, gab es bei den Messwerten eine erhebliche Variabilität. Dies lässt sich auf die Berechnung des Sauerstofftransfers aus mehreren einzelnen Messungen zurückführen. Diese wurden zum Teil durch unterschiedliche Personen durchgeführt und damit unterschiedlich stark beeinflusst.

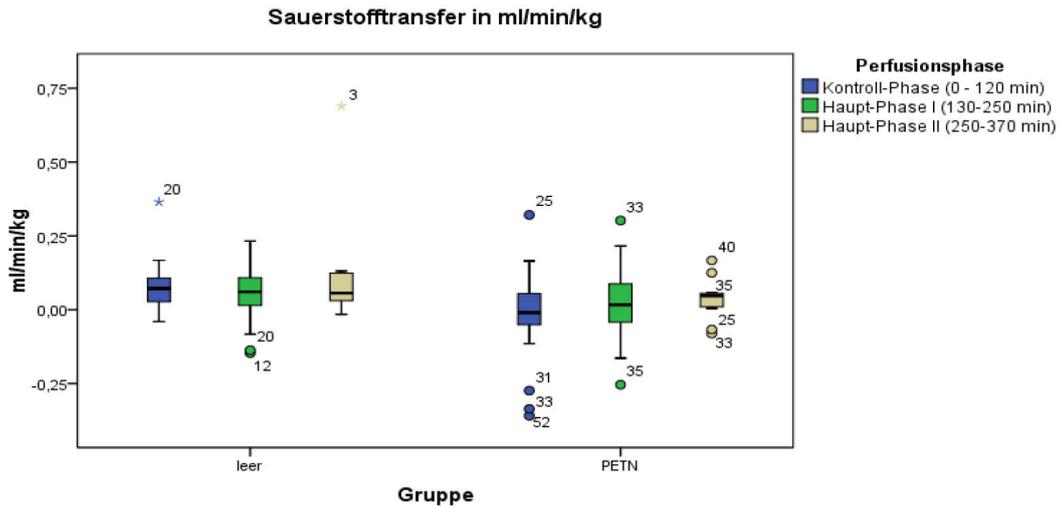


Abbildung 4.11: Sauerstofftransferrate vom maternalen zum fetalen Kreislauf während der Kontrollphase 0-120 Minuten erfolgte eine Perfusion ohne Medikament, die Hauptphase 130-370 Minuten erfolgte unter Zugabe von PETN

4.8 Sauerstoffverbrauch

Beim statistischen Vergleich des Sauerstoffgesamtverbrauches in der Perfusionslösung ließ sich sowohl zwischen den Kontroll- als auch Hauptphasen der Plazentaperfusionen ohne und mit PETN in der Hauptphase ein signifikanter Unterschied ($p = 0,009$) feststellen, der auf die spezifischen Perfusionsbedingungen zurückzuführen ist.

Vergleicht man nun die Kontroll-Phasen der PETN-Perfusionen mit deren Haupt-Phasen, so kann jedoch kein signifikanter Unterschied ($p = 0,869$) nachgewiesen werden.

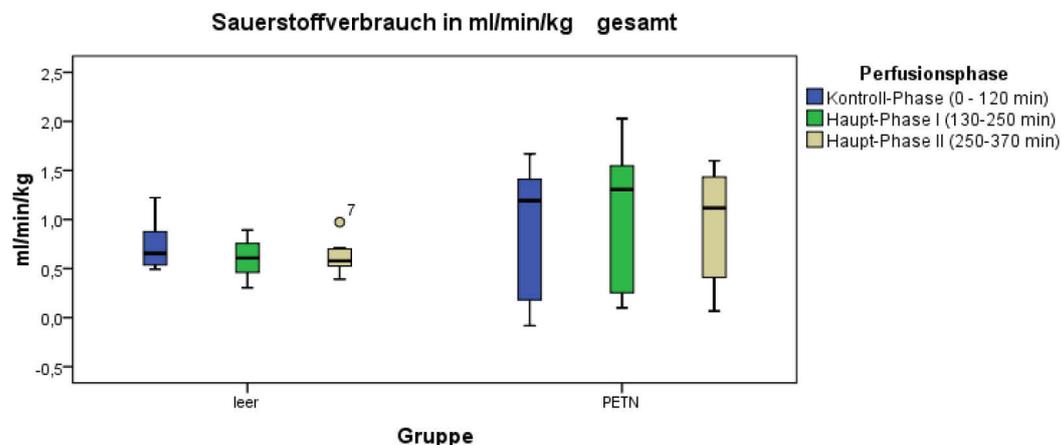


Abbildung 4.12: Sauerstoffgesamtverbrauchsrate in der Perfusionslösung während der Kontrollphase 0-120 Minuten erfolgte eine Perfusion ohne Medikament, die Hauptphase 130-370 Minuten erfolgte unter Zugabe von PETN

In der Abbildung 4.12 wird ersichtlich, dass die berechneten Sauerstoffverbrauchswerte der PETN-Perfusionen im Vergleich zu denen der Leer-Perfusionen eine deutlich größere Streuung aufweisen.

Dies ist analog zum Sauerstofftransfer auf die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs aus mehreren einzelnen Messungen, die von unterschiedlichen Personen durchgeführt wurden, zurückzuführen.

Der plazentare Sauerstoffverbrauch berechnet sich aus der Differenz des Gesamtsauerstoffverbrauches und dem Sauerstofftransfer in den fetalen Kreislauf. Da hier eine direkte Korrelation zu den Ergebnissen des Gesamtverbrauches besteht, enthält das zu erwartende Ergebnis dieselben variablen Werte.

Beim statistischen Vergleich der Kontroll-Phasen der PETN-Perfusionen mit deren Haupt-Phasen konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,941$) beim Sauerstoffverbrauch in der Plazenta festgestellt werden.

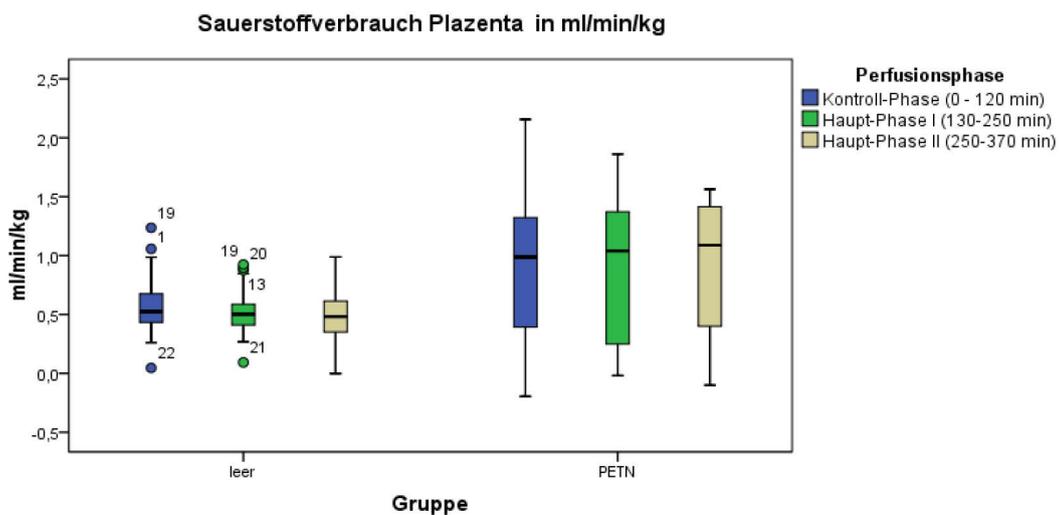


Abbildung 4.13: Sauerstoffverbrauchsrate im fetalen Kreislauf

während der Kontrollphase 0-120 Minuten erfolgte eine Perfusion ohne Medikament, die Hauptphase 130-370 Minuten erfolgte unter Zugabe von PETN

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Berechnungen des Sauerstoffverbrauches und des Sauerstofftransfers sehr variabel sind und durch die Zugabe von PETN unbeeinflusst bleiben.

4.9 Transplazentarer Transfer von PETN und seinen Metaboliten

Nach der Entwicklung einer neuen sensitiveren Nachweismethode für PETN und dessen Metaboliten konnte anhand der Perfusion PETN 08 die Transfercharakteristik bestimmt werden. Nach Zugabe von PETN bei 130 Minuten (M130) ist deutlich zu erkennen (s. Abb. 4.14), dass die Konzentration von PETN im maternalen Kompartiment abnimmt und nach vierstündiger Perfusion (M370) nicht mehr nachzuweisen ist. Stattdessen tritt PE_{di}N als nachweisbarer Metabolit nach drei Stunden (M310) auf, PE_{mono}N und PE_{tri}N hingegen können nicht nachgewiesen werden.

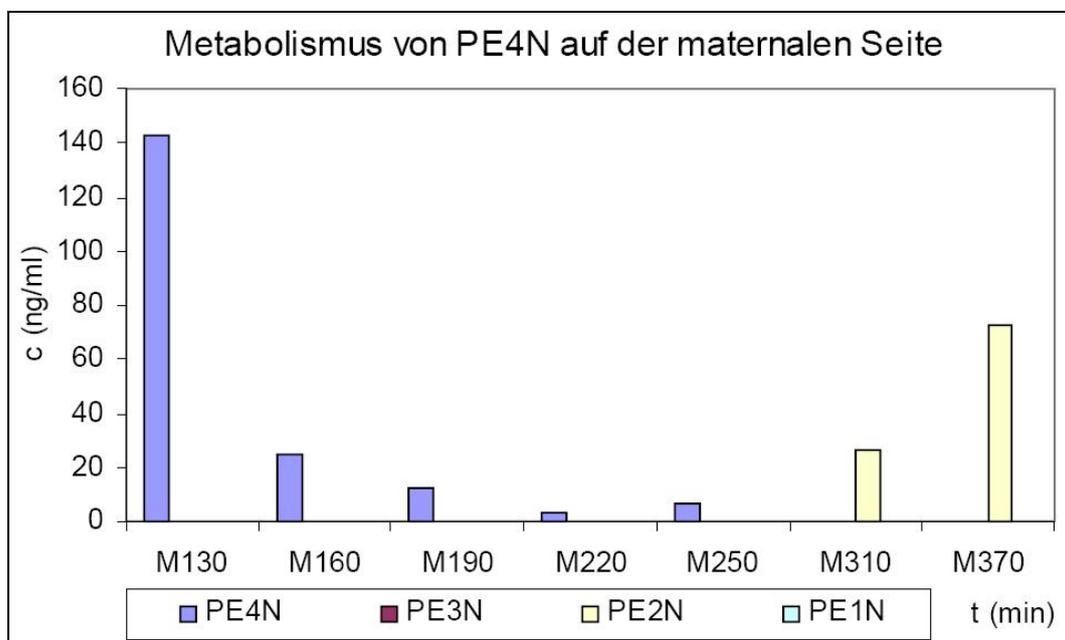


Abbildung 4.14: Messergebnisse des Perfusionsversuches PETN 08.

Die Zahlen an der x-Achse bezeichnen die Minuten der Perfusionsdauer. Bei 130 Minuten erfolgt die Zugabe des PETN in das maternale Medium (Voigt 2005)

Auf der fetalen Seite (s. Abb. 4.15) konnte man nach 90 Minuten Perfusion mit PETN (F220) ausschließlich PE_{di}N als wirksamen Metaboliten erfassen. Über den weiteren Perfusionsverlauf von 4 Stunden wurde kein weiterer Konzentrationsanstieg beobachtet.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass PETN vollständig metabolisiert und als solches nicht in der Lage ist, in das fetale Kompartiment zu wechseln. Dennoch kann eine

Einlagerung von PETN oder seinen Metaboliten in das Plazentagewebe nicht ausgeschlossen werden.

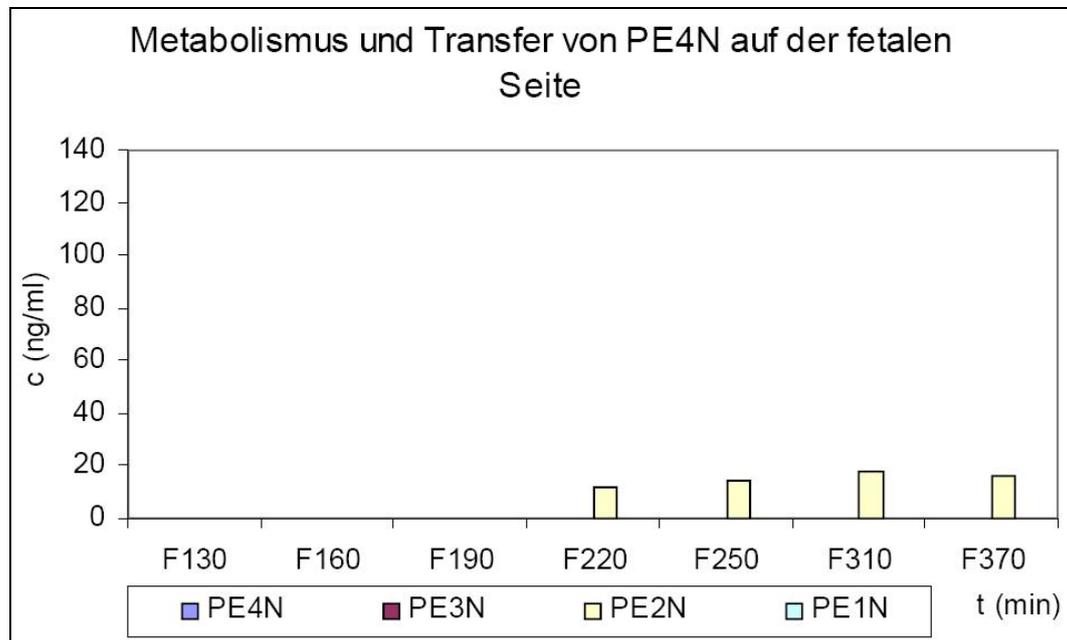


Abbildung 4.15: Messergebnisse des Perfusionsversuches PETN 08.

Die Zahlen an der x-Achse bezeichnen die Minuten der Perfusionsdauer. Bei 130 Minuten erfolgt die Zugabe des PETN in das maternale Medium (Voigt 2005)

5 Diskussion

Das Perfusionsmodell

Eine Schwangerschaft stellt für den menschlichen Organismus eine große Herausforderung dar. Dabei kann es zu Störungen kommen, welche der mütterliche Körper über einen längeren Zeitraum mitunter nicht selbst zu regulieren vermag, z. B. Stoffwechsellentgleisungen wie Diabetes, ungünstige Blutdruckverhältnisse, Gestose, vorzeitige Wehentätigkeit, Infektionen und vieles mehr. Diese können sich ungünstig auf die fetale Entwicklung, aber auch auf das mütterliche Wohlergehen auswirken.

Um dennoch eine optimale Versorgung für Mutter und Kind zu gewährleisten, müssen einige Erkrankungen medikamentös therapiert werden. Da es von vielen Medikamenten nur unzureichende Erfahrungen über die Anwendung in der Schwangerschaft bzw. Auswirkungen auf den Feten gibt, werden medikamentöse Interventionen immer noch zurückhaltend gestellt.

In den vergangenen Jahren wurden einige Studien zur Anwendung von Medikamenten in der Schwangerschaft und Stillzeit durchgeführt, um die therapeutischen Möglichkeiten weiter zu eröffnen. Darunter gibt es aus ethischen Gründen und wegen der unbekanntem Risiken für das Ungeborene und für die Mutter kaum in vivo Studien.

Lediglich wenige Fallbeschreibungen zur Analyse von maternalem und fetalem Blut nach Applikation notwendiger Medikation wurden beschrieben (Bourget et al. 1995). Die meisten in vivo Modelle beruhen auf Versuchen mit trächtigen Tieren. Hierfür werden zunächst Mäuse und Ratten verwendet, in einem späteren Stadium der Testung erfolgen dann Untersuchungen an Kaninchen, Schafen bis hin zu Primaten (Dickinson et al. 1980, Kumar et al. 2000, Omarini et al. 1991, Patterson et al. 2000). Bei den am häufigsten verwendeten in vitro Modellen handelt es sich um Zellkulturversuche mit isolierten Zellen aus Primärmaterial oder Zelllinien (z. B. Corioncarcinomzellen, Trophoblastzelllinien (Malle et al. 2003)). Des Weiteren können plazentare Explantate, Microsomen oder Membranvesikel für Untersuchungen genutzt werden. Bei diesen Untersuchungen stehen jedoch Fragen der Signaltransduktion im Vordergrund, Aussagen zum Transfer können nicht getroffen werden (Myren et al. 2007).

Die ex vivo Plazentaperfusion hingegen bietet gute Voraussetzungen zur Untersuchung des Pharmakatransfers von der Mutter auf den Fetus und möglicher Nebenwirkungen auf den plazentaren Metabolismus. Das in der vorliegenden Arbeit angewandte Modell der zweiseitigen humanen Plazentaperfusion stellt das bei weitem komplexeste Modell

dar, um den transplazentaren Transfer von Substanzen über die humane Plazenta zu untersuchen.

Dabei handelt es sich um ein ex vivo Modell, welches schon für die Testung der unterschiedlichsten Substanzklassen zum Einsatz kam. Neben Pharmaka aus verschiedenen Anwendungsgebieten, Nährstoffen und Umweltschadstoffen, wurden bereits diverse Proteine, Cytokine und Allergene in diesem Modellsystem untersucht (Myllynen et al. 2008, Wick et al. 2009).

Zum Teil liegen auch parallele Untersuchungen zu Tiermodellen oder Untersuchungen an Nabelschnurblutproben bzw. mütterlichen Blutproben vor, die größtenteils mit den in der Perfusion erhaltenen Daten vergleichbar sind (Myren et al. 2007, Vahakangas and Myllynen 2006). Glyceroltrinitrat wurde beispielsweise im Rahmen einer dualen Plazentaperfusion durch Bustard et al. untersucht und konnte im Vergleich mit einer in vivo Versuchsreihe durch Heymann et al. am trächtigen Schaf eine positive Übereinstimmung der erhobenen Daten zeigen (Bustard et al. 2002, Heymann et al. 1994).

Das Modell der zweiseitigen humanen Plazentaperfusion erlaubt nicht nur Rückschlüsse über den transplazentaren Transfer von Substanzen, sondern gestattet darüber hinaus auch Aussagen zum Plazentametabolismus, zum Speicherverhalten, der akuten Toxizität und der Rolle von Transportern, zur Vaskularisierung der humanen Plazenta und erlaubt eine Bewertung hinsichtlich der potentiellen Belastung des Fetus. Auch hier konnten bereits wichtige Ergebnisse in einer Studie der Universitätsfrauenklinik Jena z. B. über den Einfluss von anorganischem Quecksilber auf den Plazentametabolismus erhoben werden (Kluss 2001).

Das Modell weist aber auch einige Einschränkungen auf, die bei der Betrachtung der Ergebnisse ebenfalls berücksichtigt werden müssen: Für die Perfusionsversuche stehen nur Plazenten im letzten Drittel der Schwangerschaft zur Verfügung, Aussagen zur Frühschwangerschaft können an diesem Modell nicht getroffen werden. Ebenso sind chronische Effekte an diesem Modell nicht nachvollziehbar. Die Versuchsbedingungen sind den physiologischen nachempfunden, können sie aber nur bis zu einem bestimmtem Grad simulieren. So fehlt z. B. der Hauptsauerstoffträger im Nährmedium, außerdem wird Rinderserumalbumin in hohen Konzentrationen an Stelle des humanen Pendantes zugesetzt. Somit lassen sich die gewonnenen Ergebnisse nicht direkt auf die Situation in vivo übertragen. Im Ergebnis der Perfusionsversuche können aber Daten

verglichen werden, die in Perfusionen mit und ohne Zusatz der zu untersuchenden Substanz gewonnen wurden.

Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit stand daher die Frage des transplazentaren Übertritts von PETN und seinen Metaboliten in das fetale Kompartiment und dessen Auswirkungen auf den Stoffwechsel, die Sauerstoffversorgung und den Gefäßdruck.

Die Qualitätsmarker - Antipyrin und Kreatinin

Der Zusatz der klassischen Kontrollsubstanzen Antipyrin und Kreatinin diene zur Überprüfung von Membranveränderungen der Gefäße während der Perfusion.

Der Verlauf der Antipyrinkonzentration wurde als Qualitätskriterium für einen optimalen Transfer zwischen maternalem und fetalem Kompartiment bestimmt. Die flusslimitierte Diffusion von Antipyrin erfolgte aufgrund seines niedermolekularen und lipophilen Charakters schnell vom maternalen ins fetale Kompartiment. Es wurden keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der PETN-Perfusionen mit den Leer-Perfusionen festgestellt. Dies zeigt, dass die Verabreichung von PETN keinen Einfluss auf die Flussrate an der Austauschfläche der Plazenten hatte. Demzufolge kann von einem unbeeinflussten Transfer flussabhängiger Substanzen ausgegangen werden.

Als weiteres Qualitätskriterium wurde der Verlauf der Kreatininkonzentration bestimmt. Der Übertritt des Kreatinins ist membranlimitiert und abhängig von der Größe der Austauschfläche. Die Konstanz des Kreatinintransfers beschreibt die Stabilität der Permeabilität während der Dauer der Perfusion und lässt Rückschlüsse auf Defekte in der plazentaren Membran zu, welche während der Versuchsreihen nicht auftraten. Es konnte in der Arbeit nachgewiesen werden, dass die Applikation von PETN die Größe der Austauschfläche nicht beeinflusst.

Vasotonus

Da PETN bisher seine Anwendung hauptsächlich in der Kardiologie gefunden hat, liegen hinsichtlich seiner Wirksamkeit auf den kardialen Blutdruck umfassende Erfahrungen vor. Diese zeigen überwiegend, dass Nitrate vorwiegend blutdrucksenkend wirken bei Hypertonikern, nicht aber bei Normotensiven. Über die Anwendung in der Schwangerschaft jedoch fehlen bisher ausreichende Erfahrungen über das Wirkungsspektrum hinsichtlich der plazentaren Durchblutung und somit auch über die Beeinflussung der fetalen Nutrition.

In einer vorausgegangenen gleichartigen experimentellen Studie, in der das Verhalten von Glyceroltrinitrat an der Plazenta untersucht wurde, zeigte sich, dass bei maternaler Applikation Glyceroltrinitrat zu einer deutlichen Vasorelaxation in den fetalen arteriellen Gefäßen während der Plazentaperfusion geführt hat. Dabei korrelierte die Reduktion des fetalen Perfusionsdruckes mit der GTN-Konzentration im Perfusionsmedium. Des Weiteren wurde beobachtet, dass eine rasche Elimination des GTN aus den Perfusionsmedien zu einem erneuten Druckanstieg führte (Egbe 2002).

Eine vergleichbare gefäßerweiternde Wirkung des GTN wurde in der Vergangenheit bereits in Studien von Reiber und Nöschel bei der zweiseitigen ex vivo Perfusion der Plazenta beobachtet (Nöschel et al. 1982, Reiber et al. 1984).

In Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Myatt und King konnte gezeigt werden, dass NO eine bedeutende Rolle bei der Erhaltung des physiologisch niedrigen fetalen Gefäßtonus im perfundierten humanen Plazentakotyledon spielt (King et al. 1995, Myatt et al. 1991). Weitere Arbeiten wiesen nach, dass neben dem Erhalt des niedrigen Basaltonus der fetalen Gefäße NO die Wirkung von Vasokonstriktoren auf fetale Plazenta- und Chorionplattengefäße abschwächt (Gude et al. 1992, Myatt et al. 1991). Nach Untersuchungen von Byrne et al. beeinflusst GTN den basalen Perfusionsdruck nicht, so dass sie vermuteten, dass die basale NO-Freisetzung bereits zu einer maximalen Gefäßerweiterung in der perfundierten humanen Plazenta führte (Byrne et al. 1997). Tatsächlich untersuchten weitere Arbeitsgruppen die gefäßrelaxierende Wirkung des GTN nachdem sie die Plazentagefäße mit Vasokonstriktoren artifiziell verengten. Alle fanden hier eine gegenüber den Vasorelaxantien herausragende erweiternde Wirkung des GTN (Gude et al. 1992, Howard et al. 1987, Myatt et al. 1991).

In dieser Arbeit wurde mit Plazenten von gesunden Schwangeren gearbeitet, so dass ein erhöhter Vasotonus der plazentaren Gefäße (als Grundlage einer hypertensiven Erkrankung) ausgeschlossen war. Es wurde die Wirkung von PETN an normotensiven Plazenten ohne die vorherige Zugabe von Vasokonstriktoren untersucht.

Während der sechsständigen Perfusionen konnte sowohl im maternalen als auch im fetalen Gefäßbett auch nach Zugabe von PETN ein relativ konstanter Perfusionsdruck beobachtet werden. Lediglich zum Ende der Perfusionen war ein leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg zu verzeichnen. Eine Drucksenkung konnte im Vergleich zu den Arbeiten mit Glyceroltrinitrat bzw. beim therapeutischen Einsatz des PETN im kardiologischen Bereich nicht erzielt werden. Auch in Studien über PETN, seine

Metaboliten und andere Nitrate wurde aufgezeigt, dass die vasorelaxierenden Eigenschaften organischer Nitrate unterschiedlicher als erwartet und hochgradig abhängig von der molekularen Struktur und den Substituenten am molekularen Träger der Nitratgruppe sind (König et al. 2008).

Eine Korrelation des Druckanstieges mit der Konzentrationsabnahme durch die Metabolisation des PETN ist weniger wahrscheinlich, da auch die Zugabe von PETN bei 130 Minuten keine ausreichende Drucksenkung bewirkte.

Der leichte, nicht signifikante Druckanstieg zum Ende der PETN-Perfusionen und der Leer-Perfusionen lässt sich auf physiologische Kriterien der Plazenten unter den nicht idealen Versuchsbedingungen zurückführen. Bei einigen Versuchen führten diese Kriterien sogar zu einem frühzeitigen Abbruch. Durch fehlende Daten im zweiten Teil der Hauptphase sowie den großen Fehlerabweichungen lässt sich der nicht signifikante Druckanstieg statistisch erklären.

Es lässt sich somit zusammenfassend sagen, dass bei normotensiven Druckverhältnissen keine signifikante Drucksenkung durch die Zugabe von PETN als NO-Donor erreicht werden kann. Eine Untersuchung mit Plazenten unter hypertensiven Bedingungen, z. B. unter vorherigem Zusatz vasokonstriktiver Wirkstoffe in den maternalen Gefäßen ist anzustreben, um die positive Anwendung von PETN in der Schwangerschaft zu untermauern.

Sauerstofftransfer und Sauerstoffverbrauch

Eine günstige Drucksituation in der Gefäßstrombahn bewirkt eine optimale Sauerstoffversorgung des Gewebes. Durch die Relaxation der Gefäße kommt es zu einer verlangsamt Fließgeschwindigkeit und somit zu einer verlängerten Verweildauer an der Austauschmembran mit der Folge einer gesteigerten Diffusion von Sauerstoff. Somit wird beispielsweise im kardiologischen Therapiebereich durch die Senkung der Vorlast mittels NO-Donoren eine bessere Sauerstoffversorgung des Myokards erzielt.

In einer vergleichbaren Studie von A. Egbe konnte nach Applikation von GTN in das maternale Kompartiment eine Zunahme des Sauerstofftransfers in das fetale Kompartiment nachgewiesen werden, wobei dies mit einer gleichzeitigen Reduktion des Perfusionsdruckes einher ging (Egbe 2002). Im Rahmen der Versuchsreihen der vorangegangenen Untersuchung ist die Beeinflussung von Sauerstofftransfer und

Sauerstoffverbrauch durch exogene NO-Donoren am Beispiel von PETN sowohl für die Lebensfähigkeit der Plazenta als auch für das fetale Outcome von Bedeutung.

Betrachtet man nun in dieser Arbeit die Entwicklung des Sauerstoffverbrauches, kann man statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Leer-Perfusionen und den PETN-Perfusionen gleichmäßig über alle Phasen hinweg feststellen. Diese lassen sich einerseits mit dem physiologisch variablen Sauerstoffverbrauch der einzelnen Plazenten, andererseits durch die Problematik des stark beeinflussbaren Modus der Probenentnahme begründen. Durch eine im Nachhinein sich als inoptimal darstellende Methodik der Probenentnahme kam es immer wieder zu Veränderungen der O₂- und CO₂-Partialdrücke. Aufgrund verschiedener durchführender Personen in den unterschiedlichen Versuchsabläufen, kann man davon ausgehen, dass die Bedingungen für die Bestimmung des Sauerstoffverbrauches während der Leer-Perfusionen nicht identisch waren im Vergleich mit den PETN-Perfusionen. Beim Vergleich des Sauerstoffverbrauches der Kontrollphasen der PETN-Perfusionen mit den PETN versetzten Hauptphasen ist jedoch kein signifikanter Unterschied mehr feststellbar. Der Sauerstoffverbrauch wurde somit durch PETN nicht verbessert, aber auch nicht negativ beeinflusst.

Ebenso wenig Beeinflussung fand der Sauerstofftransfer vom maternalen ins fetale Kompartiment. Auch hier konnte keine Signifikanz zwischen den vergleichenden Experimenten ohne und mit PETN über den Zeitraum des sechsständigen Versuchsablaufes nachgewiesen werden. Vielmehr verlief der Transfer relativ konstant, was für eine zuverlässige Lebensfähigkeit und Intaktheit des perfundierten Plazentagewebes spricht. Die Stabilität dieser Funktion kann als Indikator für die Lebensfähigkeit des isolierten Kotyledons gelten (Kluss 2001).

Wie in einer Vielzahl von Studien über Nitrate, die im Verlauf der letzten Jahre publiziert wurden, zeigt sich bei Betrachtung der Druckverhältnisse sowie des Sauerstoffverbrauches und -transfers erneut, dass PETN sich von den anderen Nitraten hinsichtlich seines Wirkungsspektrums im placentaren Gefäßbett unterscheidet (Schröder et al. 2008).

Die Stoffwechsellparameter

Neben der grundsätzlichen Fragestellung nach der Lebensfähigkeit sind die Bestimmungen der verschiedenen Stoffwechsellparameter der Plazenta unter dem

Einfluss von Medikamenten eine Möglichkeit, toxische Wirkungen der Pharmaka zu untersuchen.

Der Plazentametabolismus in den vorliegenden Experimenten wurde anhand der Untersuchung von Glukoseverbrauch, Laktatproduktion und der Synthese des Humanen Choriongonadotropins (β -HCG) bewertet. Dabei dient der kontinuierliche Glukoseverbrauch unter ebenso kontinuierlicher Laktatproduktion als Nachweis für die Stoffwechselaktivität der Plazenta unter Perfusionsbedingungen (Malek et al. 1996, Polliotti et al. 1996). Die Synthese von β -HCG ist hierbei kennzeichnend für die Stoffwechselaktivität des Trophoblasten.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei sämtlichen Parametern keine signifikante Veränderung nach Zugabe von PETN ins Perfusionsmedium erzielt werden.

Der Abbau der Glukosekonzentration erfolgte sowohl in den Leer-Perfusionen als auch in den mit PETN versetzten Perfusionen kontinuierlich im maternalen und fetalen Kreislauf. Dies deutet auf eine unbeeinträchtigte Fähigkeit der Glykolyse des ex vivo Plazentakotyledons hin. Der Glukoseverbrauch unter oxygenierten Verhältnissen ist in den Versuchen dieser Arbeit vergleichbar mit vorausgegangenen Studien (Challier et al. 1985, Egbe 2002, Miller et al. 1985).

Eine ebenso stetige Entwicklung findet man bei Betrachtung der Laktatproduktion. Auch hier gab es im Vergleich zwischen den Perfusionen mit reiner Perfusionslösung sowie denen mit PETN keine signifikanten Differenzen. Gleichartige Aussagen wurden auch schon in früheren Untersuchungen getroffen, welche andere Nitrate untersuchten (Cannell 1988, Egbe 2002, Miller et al. 1985).

Auch auf die plazentare Freisetzung von β -HCG hatte die Zugabe von PETN keinen Einfluss während der sechsständigen Perfusionen. Dabei decken sich die Ergebnisse mit den Daten anderer Autoren, die die Hormonsekretionsrate unter oxygenierten Bedingungen bestimmten (Cannell 1988, Egbe 2002, Kay et al. 1995). Die konstante Sekretion des spezifischen Plazentahormons ist einerseits als Qualitätskriterium der ex vivo Perfusion zu werten, andererseits zeigt es, dass PETN nicht mit den proteinbildenden Enzymen interagiert oder die Exozytose der intrazellulär liegenden Hormon speichernden Granula beeinflusst.

Man kann demzufolge unter dem nachgewiesenen unbeeinflussten Kohlenhydratstoffwechsel und der ebenso unveränderten β -HCG Sekretion unter PETN davon ausgehen, dass die metabolische Aktivität des perfundierten Plazentakotyledons

weder gesteigert noch negativ verändert wird und somit die nutritive Versorgung des Fetten in vivo unbeeinflusst bleiben dürfte.

Transplazentarer Transfer von PETN und seinen Metaboliten

Weiterhin war zu klären, ob PETN die Plazentabarriere vom maternalen in den fetalen Kreislauf überwindet. Es zeigte sich in zahlreichen Studien, dass nach oraler Applikation bisher weder die Muttersubstanz noch PEtriN oberhalb der Bestimmungsgrenze von 50 pg/ml im Serum nachgewiesen werden konnten. Man geht deshalb davon aus, dass PEdiN und PEmonoN die wirksamen Metaboliten darstellen. Nur nach Verabreichung hoher Dosen (10 mg/kg) konnte man Spuren von unverändertem PETN im systemischen Kreislauf der Ratte nachweisen (Weber et al. 1995).

Da bisher keine geeignete Methode zur flüssigchromatographischen Trennung von Pentaerithritylmononitrat (PEmonoN), -dinitrat (PEdiN), -trinitrat (PEtriN) und -tetranitrat (PETN) literaturbekannt war, wurde in einer parallel angefertigten Diplomarbeit von S. Voigt eine geeignete Methode für dieses Trennproblem entwickelt. Die zum Nachweis von PETN und seinen Metaboliten im fetalen Kompartiment erhobenen Daten stützen sich auf eine exemplarische Messung von Proben nur eines Perfusionsversuches, da der Aufwand der Nachweismethode zu groß war. Zudem gestaltete es sich zunächst als Herausforderung, PETN aus der Perfusionslösung zu extrahieren. Die Wiederfindungsraten der Pentaerithritylnitrate zeigte sich als sehr variabel. Dennoch gelang es, eine neue Methode zur Extraktion der Pentaerithritylnitrate aus der Perfusionslösung zu entwickeln, während die literaturbekannten Extraktionsverfahren nicht auf das Perfusionsmedium übertragen werden konnten. Der Nachweis von PETN und seinen Metaboliten für diese Arbeit erfolgte mittels der HPLC/MS-Technik (Voigt 2005).

Des Weiteren wurde untersucht, ob es zu Abbau- bzw. Metabolisierungsreaktionen des PETN während der Perfusionsversuche und der Probenlagerung kam. Dazu wurde das Stabilitätsverhalten der Pentaerithritylnitrate in der Perfusionslösung bewertet. S. Voigt kam zu dem Ergebnis, dass in einem Beobachtungszeitraum von fünf Stunden die Pentaerithritylnitrate keinem Abbau in Perfusionslösung bei 37 °C unterliegen und somit im Rahmen der einzelnen Versuche mit einer experimentellen Dauer von 4 Stunden keine Zersetzung erfolgt. Da der zeitliche Aufwand dieser Versuche allerdings sehr groß ist, wurde jede Messreihe nur einmal durchgeführt. Ebenso

analysiert wurde die Beeinflussung der Pentaerithrylnitrate durch lange Lagerzeiten, Lagerung bei -82 °C nach den einzelnen Versuchen sowie dem Auftauen der Proben. Doch auch hier ließ sich nachweisen, dass die Pentaerithrylnitrate ein stabiles Verhalten zeigen.

Aus den Resultaten dieser Messreihen kann abgeleitet werden, dass eine auftretende Abnahme der Konzentration des PETN sowie die Detektion der Metabolite PEmonoN, PEdiN und PEtriN nicht durch eine Zersetzung der Ausgangssubstanz hervorgerufen wird, sondern durch den plazentaren Metabolismus und Transfer zustande kommen muss (Voigt 2005).

Nach Abschluss der experimentellen Versuchsreihe an der zweiseitig perfundierten Plazenta und nach jeweils einmaliger Dosierung des Pharmakons ins maternale Kompartiment konnte mittels HPLC/MS-Technik kein Nachweis von PETN im fetalen Kreislauf erbracht werden. Vielmehr wurde beobachtet, dass es zu einer stetigen Konzentrationsabnahme des PETN im maternalen Kompartiment kam. Nach vierstündiger Perfusion lag PETN unterhalb der Nachweisgrenze. Im fetalen Kompartiment trat PEdiN als einziger Metabolit des PETN in Erscheinung, wenn auch nur in geringen Mengen. PEmonoN und PEtriN hingegen fanden keinen Nachweis. Von einer vollständigen Metabolisation von PETN vor Übertritt in den fetalen Kreislauf kann somit ausgegangen werden. Im Vergleich zu anderen Studien konnte PEmonoN nicht nachgewiesen werden.

Um diese ersten Resultate auf dem Sektor des Transfers und Metabolismus von PETN zu untermauern, sollten weitere Proben der einzelnen Perfusionen untersucht werden.

6 Schlussfolgerung

Die doppelseitige ex vivo Perfusion der menschlichen Plazenta ist eine etablierte Methode zur Untersuchung von Stoffwechsel- und Transferleistung der Plazenta. Durch das Vorliegen eines isolierten Organs kann unter experimentellen Bedingungen und somit ohne Gefahr für Mutter und Kind der Einfluss von Pharmaka unter speziellen Fragestellungen untersucht werden.

Festzuhalten ist jedoch, dass für die Perfusionsversuche nur Plazenten im letzten Drittel der Schwangerschaft zur Verfügung stehen, Aussagen zur Frühschwangerschaft können an diesem Modell somit nicht getroffen werden. Ebenso sind chronische Effekte durch die ex vivo Perfusion nicht nachvollziehbar. Die Versuchsbedingungen sind den physiologischen nachempfunden, können sie aber nur bis zu einem bestimmtem Grad simulieren. Daher lassen sich die gewonnenen Ergebnisse nicht direkt auf die Situation in vivo übertragen.

PETN hatte in den vorliegenden Experimenten keinen signifikanten Einfluss auf den Metabolismus des zweiseitig ex vivo perfundierten Plazentakotyledons bei vierstündiger Exposition mit dem Pharmakon. Die dabei untersuchten Parameter Glukoseverbrauch, Laktatproduktion, β -HCG-Synthese sowie der Sauerstoffverbrauch/-transfer erfuhren keine Veränderungen im gemessenen Zeitraum. Vielmehr stehen sie als Qualitätskriterien für die uneingeschränkte Lebensfähigkeit und Funktion des Kotyledons. Die unveränderte Stoffwechselleistung ist ein Hinweis dafür, dass PETN den Metabolismus der Plazenta nicht nachhaltig beeinflusst und somit die nutritive Versorgung des Feten nicht gefährdet wird. Es hat sich jedoch auch keine Verbesserung der Stoffwechselleistung gezeigt, so dass PETN insgesamt im Rahmen dieser Versuchsreihe keine Veränderungen bewirkt hat.

PETN konnte im Bereich der Kardiologie bereits gute therapeutische Erfolge verzeichnen. Sein geringes Nebenwirkungsspektrum und seine Sonderstellung im Vergleich zu den anderen Nitraten sind wegbereitend für den zukünftigen Einsatz in anderen Fachgebieten.

Die hier vorgelegten Ergebnisse geben in einem ex vivo Modell wichtige Hinweise für die Sicherheit eines klinischen Einsatzes von PETN hinsichtlich der feto-plazentaren Einheit, da keinerlei Beeinflussung des plazentaren Metabolismus und der Transferleistungen als auch kein pharmakologisch relevanter Übertritt in die fetale Zirkulation nachweisbar ist.

Literaturverzeichnis

- Abbott GmbH.** 1997. Diagnostika. AxZYM Gesamt- β -HCG. B7A591, 67-5211/R6, Produktbeschreibung. Wiesbaden, 1-8
- Abrams J.** 1992. Mechanism of action of the organic nitrates in the treatment of myocardial ischemia. *Am J Cardiol*, 70: 30-42B
- Alderton WK,** Cooper CE, Knowles RG. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615
- Ali M,** Buhimichi I, Chwalisz K, Garfield RE. 1997. Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. *Mol Hum Reprod*, 3: 995-1003
- Baaske DM,** Karnatz NN, Carter JE. 1983. High-performance liquid chromatographic assay for partially nitrated glycerins in nitroglycerin. *J. Pharm. Sci.* 72, 194-196
- Bassenge E,** Fink N, Skatchkov M, Fink B. 1998. Dietary supplement with vitamin C prevents nitrate tolerance. *J Clin Invest*; 102: 67-71
- Bauersachs J.,** Richartz B.M. 2009. Pentaerithryltetranitrat, Experimentelle Befunde und klinische Optionen. Steinkopff Verlag ,10-04
- Beck T.** 1992. Morphologische und hämodynamische Veränderungen der Plazenta bei Präeklampsie. *Gynäkol* 25: 391
- Beinder E,** Mohaupt M. 1999. NO-Donatoren zur Verhütung und Behandlung präeklampsischer Erkrankungen. *Gynäkologe* 32. S 768-775
- Bergmeyer HU.**1974. Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. 2, 3. Aufl., VCH, Weinheim; 1172-1179
- Berkowitz GS** and Papernik E. 1993. Epidemiology of preterm birth. *Epidemiol Rev*; 15: 414-443
- Black RS,** Flint S, Lees C, Campbell S. 1996. Preterm labour and delivery. *Eur J Pediatr*; 155 Suppl 2: 2-7

- Block W**, Klotz T, Sedlacek P, Zumbe J, Engelmann U and Addicks K. 1998. Evidence for the involvement of endothelial nitric oxide synthase from smooth muscle cells in the erectile function of the human corpus cavernosum. *Urol Res*; 26: 129-135
- Böhm C**, Haustein K-O. 1998. The effect of pentaerythryltetranitrate on parameters of the microcirculation. *JCP*; Vol 36; 7: 398-402
- Bonn R**. 1995. Pharmakokinetik organischer Nitrate – Gesetzmäßigkeiten und Hypothesen – Folgerungen für Pentaerythryltetranitrat (PETN). In: Schneider HT, Stalleicken D (Hrsg.) Pentaerythryltetranitrat, Beiträge zum klinischen und pharmakologischen Status. Steinkopff, Darmstadt, S 23-30
- Bourget PC**, Roulot et al. 1995. Models for Placental-Transfer Studies of Drugs. *Clinical Pharmacokinetics* 28(2): 161-180.
- Briese V**. 1995. Aktuelle Aspekte zur Frühgeburt. *Zentralbl Gynäkol*; 117: 393-401
- Brodie B**, Axelrod J, Sobermann R, Levy B. 1949. The estimation of antipyrin in biological materials. *J Biol Chem* 179; 25-29
- Brosens JA**, Robertson WB, Dixon HG. 1972. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet. Gynecol. Ann.* 1. S 177-181
- Buhimishi I**, Yallampalli C, Dong YL, Garfield RE. 1995. Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*; 172:1577-1588
- Busse R**. 2000. Vaskuläre und nicht-vaskuläre Funktionen von NO. Abstract 2. Jenaer Geburtshilfesymposium, 4-5
- Bustard MA**, Farley AE, Smith GN. 2002. The pharmacokinetics of glyceryl trinitrate with the use of the in vitro term human placental perfusion setup. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* - Volume 187 July, Issue 1
- Byrne BM**, Howard RB, Morrow RJ, Whiteley KJ, Adamson SL. 1997. Role of the L-Arginine nitric oxide pathway in hypoxic fetoplacental vasoconstriction. *Placenta* 18: 627-634

- Calder AA.** 1998. Nitric oxide- another factor in cervical ripening. *Hum Reprod* 13: 250-251
- Cannell GR,** Kluck RM, Hamilton SE, Mortimer RH, Hooper WD, Dickinson RG. 1988. Markers of physical integrity and metabolic viability of the perfused human placental lobule. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 15: 837-844
- Cawello W.** 1995. Abhängigkeit von chemischer Struktur und pharmakologischer Wirkung – Exemplarische Untersuchungen mit organischen Nitraten. In: Schneider HT, Stalleicken D (Hrsg.) *Pentaerithryltetranitrat, Beiträge zum klinischen und pharmakologischen Status.* Steinkopff, Darmstadt, S 31-36
- Chaim W,** Mazor M. 1998. The relationship between hormones and human parturition. *Arch Gynecol Obstet*; 262: 43-51
- Chakder S,** Bandyopadhyay A, Rattan S. 1997. Neuronal NOS gene expression in gastrointestinal myenteric neurons and smooth muscle cells. *Am J Physiol*; 273: C1868-1875
- Challier JC,** Hauguelde Mouzon S, Desmaizières V. 1985. Metabolism and transfer of radioactive glucose in the human placenta studied by dual perfusion. *Contr Gynec Obstet* 13: 144-146
- Chwalisz K,** Garfield RE. 1998. Nitric oxide as the final metabolic mediator of cervical ripening. *Hum Reprod*; 13: 245-248
- Chwalisz K,** Garfield RE. 1998. Role of nitric oxide in the uterus and cervix: implications for the management of labour. *Perinat Med*; 448-457
- Chwalisz K,** Shao QS, Garfield RE, Beier HM. 1997. Cervical ripening in guinea-pigs after a local application of nitric oxide. *Hum Reprod*; 12: 2093-2101
- Daiber A,** Coldewey M, Oelze M, Mülsch A, Münzel E. 2004. Inhibition und Protektion der mitochondrialen Aldehyddehydrogenase als mögliche Erklärung für unterschiedliche Toleranzphänomene bei der Nitroglycerin und PETN in vivo und in vitro Behandlung. 11. PETN-Expertentreffen

- Daiber A**, Wenzel P, Oelze M, Mäthner F, Göbel S, Schuhmacher S, Hink U, Münzel T. 2009a. Sonderstellung von Pentaerithryltertannitrat unter den organischen Nitraten, Befunde zur Endothelfunktion und monozytären Aldehyd-Dehydrogenase Aktivität aus Human- und Tierstudien mit akuter sowie chronischer Behandlung. Pentaerithryltertannitrat, Steinkopff Verlag Darmstadt, 5/S.27-43
- Daiber A**, Wenzel P, Oelze M, Münzel T. 2009b. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. *Clin Res Cardiol*, 97: 12-20
- David M**, Walka MM, Schmid B, Sinha P, Veit S, Lichtenegger W. 2000. Nitroglycerin application during cesarean delivery: Plasma levels, fetal/maternal ratio of Nitroglycerin and effect in newborns. *Am J Obstet Gynecol*, 82: 955-961
- Dickinson RG**, Lawyer CH et al. 1980. Materno-fetal pharmacokinetics and fetal distribution of valproic acid in a pregnant rhesus monkey. *Pediatr Pharmacol (New York)* 1(1): 71-83.
- Diedrich K**. 1999. Gynäkologie und Geburtshilfe. Springer, Berlin
- Diener HC**, Kochsiek K, Mutschler E, Schölmerich P, Thews G. 2001. Informationen zur Pharmakotherapie. Sonderdruck AMT; 19: 115-121
- Dikalov S**, Fink B, Skatchkov M, Stalleicken D, Bassenge E. 1998. Formation of Reactive Oxygen Species by Pentaerithryltertannitrat and Glyceryl Trinitrat In Vitro and Development of Nitrate Tolerance. *JPET*; 286: 938-944
- di Ponti C**, Mauri F, Ciliberto GR and Caru B. 1979. Comparatic effects of nifedipin, verapamil, isosorbide dinitrat and propranolol on exercise- induced angina pectoris. *Eur J Cardiol*; 10: 47-58
- Dragoni S**, Gori T, Lisi M, Stolfo G, Pautz A, Kleinert H, Parker J. 2007. Pentaerithryl Tertannitrat and Nitroglycerin, but not Isosorbide Mononitrat, Prevent Endothelial Dysfunction Induced by Ischemia and Reperfusion. *Journal of the American Heart Association, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* Published online

- Dupuis J**, Lalonde G, Lemieux R, Rouleau JL. 1990. Tolerance to intravenous nitroglycerin in patients with congestive heart failure: role of increased intravascular volume, neurohumoral activation and lack of prevention with N-acetylcysteine. *Journal of the American College of Cardiology*; 16(4):923–931
- Egbe A**. 2002. Einfluss von Nitroglycerin und Atosiban auf den Plazentametabolismus und plazentarer Übertritt in der doppelseitigen in vitro Perfusion humaner Plazentakotyledone. Dissertation, unveröffentlicht
- Erdmann E**, Schröder H, Stalleicken D. 2001. Pentaerithrityltetranitrat. Rationale einer modernen Koronartherapie. Steinkopff Verlag Darmstadt; 1-80
- Ertan AK**, Hendrik J, Schmidt W. 2002. Perinatale Auffälligkeiten und Fetal Outcome bei hochpathologischen Doppler-Flow-Befunden in A. umbilicalis und Aorta fetalis. Hrsg.: Merz E.: Sonographische Diagnostik in Gynäkologie und Geburtshilfe Band 2. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag, S. 509
- Fink B**, Bassenge E. 1997. Unexpected, tolerance-devoid vasomotor and platelet actions of pentaerithrityltertaniatrate. *J Cardiovasc Pharmacol*; 30: 831-836
- Folkow B**, Mellander S. 1964. Veins and venous tone. *Am Heart J* 68: 397-408
- Friedrich EB**, Böhm M. 2006. Pentaerithrityltetranitrat. *Arzneimittel & Pharmakotherapie/ Review Article aus Dtsch Med Wochenschr.* 749-750
- Friese K**. 2000. Atosiban zur Wehenhemmung: Erfahrungen mit dem Oxytocin-Rezeptorantagonisten. *Dt Ärzteblatt* 97, Ausgabe 12/2000
- Fung HL**, Chong S, Kowaluk E, Hough K, et al. 1988. Mechanisms for the pharmacologic interaction of organic nitrates with thiols: existence of an extracellular pathway for the reversal of nitrate vascular tolerance by N-acetylcystene. *J Pharmacol Exp Ther*; 245: 524-530
- Gimbrone MA Jr**, Tropper JN, Nagel T, Anderson KR and Garcia-Cardena G. 2000. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*; 902: 230-239

- Gori T.** 2009. Different effects of different organic nitrates with a particular focus on endothelial dysfunction and ischemic preconditioning. Pentaerithryltetranitrat, 6/ S. 47-52
- Grospietsch G.** 1994. Kritische Bewertung der Indikationsstellung zur Tokolyse und Cerclage. In: Wolff F, Hrsg. Standortbestimmung der Tokolysebehandlung. Darmstadt; 343: 1325-1326
- Gude NM,** Boura ALA., King RG, Brennecke SP, Jamal OS, Smith R and Walters WAW. 1992. Evidence for inhibition by endothelium-derived relaxing factor of thromboxane A₂ receptor-mediated vasoconstriction in the fetal vessels of the human perfused placenta. Placenta 13: 597-605
- Hacker A,** Müller S, Meyer W, Kojda G. 2001. The nitric oxide donor pentaerithritol tetranitrate can preserve endothelial function in established atherosclerosis. BJP; 132: 1707-1714
- Haustein KO,** Winkler U, Löffler A, Hüller G. 1995. Absorption and bioavailability of pentaerithryltetranitrate (PETN, Dilcoran 80). J Clin Pharmacol Ther; 33(2): 95-102
- Heinegard D,** Tiderstrom G. 1973. Determination of serum creatinin by a direct colometric method. Clin Chim Acta 43; 305
- Heymann MA,** Bootstaylor B, Roman C et al. 1994. Glyceryl trinitrate stops active labour in sheep. In Moncada S, Feelisch M, Busse R and Higgs EA (eds), Biology of Nitric Oxide, vol. 3. Portland Press, London, pp. 201–203.
- Hinz B,** Schröder H. 1998. Vitamin C attenuates nitrate tolerance independently of its antioxidant effect. FEBS Lett; 428: 97-99
- Howard RB,** Hosokawa T and Maguire MH. 1987. Hypoxia-induced fetoplacental vasoconstriction in perfused human placental cotyledons. Am J Obstet Gynecol 157: 1261-1266
- Hüsgen B,** Noack E, Kojda G. 1995. Comparison of the vasorelaxing effect of different nitrovasodilators in conductive arterial and venous blood vessels. Birkhäuser Verlag Basel; 183-187

- Ignarro LJ**, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:9265-9269.
- Jaffé M.** 1886. Über den Niederschlag, welchen Picrinsäure im normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 10, 391
- Jurt U**, Gori T, Ravandi A, Babaei S, Zeman P, Parker JD. 2001. Differential Effects of Pentaerithritol Tetranitrate and Nitroglycerin on the Development of Tolerance and Evidence of Lipid Peroxidation: A Human In Vivo Study. *JACC Vol* 38, No 3; 854-859
- Kari MA**, Hallmann M, Eronen M, et al. 1994. Prenatal dexamethasone treatment in conjunction with rescue therapie of human surfactant: a randomized placebo-controlled multicenter study. *Pediatrics*; 93: 730-736
- Kay HH**, Robinette B, Shin YY, Siew P, Shellhaas CS, Tyrey L. 1997. Placental villous glucose metabolism and hormone release respond to varying oxygen tension. *J Soc Gynecol Invest* 4: 241-246
- King JF**, Grant A, Keirse MJNC. 1988. Beta-Mimetics in preterm labour: an overview of the randomized control trials. *Br J Obstet Gynaecol*; 95: 211-222
- King RG** et al. 1995. Regulation of Human Placental Fetal Vessel Tone: Role of Ntric Oxide. *Reprod Fertil Dev*; 7: 1407-1411
- Kluss S.** 2001. Einfluß von anorganischem Quecksilber auf den Plazentametabolismus und transplazentarer Übertritt in der doppelseitigen in vitro Perfusion der Humanplazenta [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität
- Kojda G.** 2001. Pentaerithrityltetranitrat. Vaskulärer oxidativer Stress: Mechanismen und therapeutische Möglichkeiten der Vasoprotektion durch NO. Steinkopff Verlag Darmstadt; 1-85
- König A**, Roegler C, Lehmann J. März 2008. PETN-Metabolite und andere Nitrate – die molekulare Struktur bestimmt die Wirkung. *Herz Supplement II/ Cardiovascular Diseases.* Urban & Vogel Verlag, 33. Jahrgang, S 5

- Krepp HP.** 1985. Langzeitbehandlung der koronaren Herzerkrankung mit Elantan long. In: Borchard U, Rafflenbeul W, Schrey A, Hrsg. Mononitrat. München: Verlag Wolf & Sohn; 176-183
- Kumar S, Wong H et al.** 2000. Disposition of valproic acid in maternal, fetal, and newborn sheep. I: placental transfer, plasma protein binding, and clearance. *Drug Metab Dispos* 28(7): 845-56.
- Lee CN et al.** 1997. Nitrous Oxide Synthase Expression in Placenta of Preeclampsia. *JKMS*; 12: 532-538
- Lees C et al.** 1994. Arrest of preterm labour and prolongation of gestation with glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor. *Lancet*; 343:1325-1326
- Lees C, Lojaco A, Thompson C, Danti L, Black R, Tanzi P, White I, Cambell S.** 1999. Glyceryltrinitrate and ritodrine on tocolysis: an international multicenter randomised study. *Obstet Gynecol*; 94: 403-408
- Lees C, Valensise H, Black R et al.** 1998. The efficacy and fetal-maternal cardiovascular effects of transdermal glyceryl trinitrate in the prophylaxis of pre-eclampsia and its complications: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 12: 334-338
- Lehmacher W.** 2004. Therapeutischer Nutzen von PETN. Vergleichende biometrische Bewertung. Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Epidemiologie der Universität zu Köln. 11. Expertentreffen Pentaerithryltetranitrat. Jena
- Lehmann J.** 2000. NO-Donoren - Übersicht und neuere Entwicklungen. Buchbeitrag Pentaerithryltetranitrat, Steinkopff Verlag, Darmstadt Hrsg.: E. Mutschler, D. Schneider, D. Stalleicken
- Lehmann J.** März 2009. Protektive, antioxidative Eigenschaften von PETN – Forschungsergebnisse und ihre Bedeutung für die Praxis. *Herz Supplement II/ Cardiovascular Diseases*. Urban & Vogel Verlag, 34. Jahrgang
- Longo M, Jain V, Vedernkov Y, Faccinetti, Saade G, Garfield R.** 2000. Uterine contractility in pregnant mice lacking a functional inducible nitric oxide synthase. *Am J Obstet Gynecol*; 182: 196

- Lüllmann H**, Mohr K. 1999. Pharmakologie und Toxikologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart/ New York; 4: 112-113; 5: 157-159
- Luzi G**, Caserta G, Iammarino G, Clerici G, D Renzo GC. 1999. Nitric oxide donors in pregnancy: fetomaternal effects induced in mild pre-eclampsia and threatened preterm labor. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 14: 101-109
- Lyall F**, Greer IA, Young A, Myatt L. 1996. Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in intrauterine growth restriction. *Placenta*. 17:165-168
- Lyall F**, Young A, Greer IA. 1995. Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 173:714-718
- Malek A**, Sager R, Lang AB, Schneider H. 1997. Protein transport across the in vitro perfused human placenta. *AJRI* 38 S 263-271
- Malle E**, Wadsack C et al. 2003. Trophoblast-like human choriocarcinoma cells serve as a suitable in vitro model for selective cholesteryl ester uptake from high density lipoproteins. *European Journal of Biochemistry* 270(3): 451-462
- Martius G**. 1996. Bau und Funktion von Plazenta, Eihäuten, Fruchtwasser und Nabelschnur. In: Martius G, Beckwoldt M, Pfeleiderer A (Hrsg.). *Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2. Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart S 51-60
- Mayer B**, Hemmens B. 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* 22, 477-481
- Mercier F**, Dounas M, Bouaziz H, Lhuissier C, Benhamou D. 1997. IV Nitroglycerin to relieve intrapartum fetal distress related to uterine hyperactivity: a prospective observational study. *Anesth Analg*; 84: 1117-1120
- Miller RK**, Wier PJ, Maulik D, di Sant'Agnes PA. 1985. Human placenta in vitro: characterization during 12 h of dual perfusion. *Cont Gynecol Obstet* 13: 77-84
- Moore KL**, Persaud TVN. 1993. Embryologie: Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen (Titel der Originalausgabe: *The Developing Human Clinically Oriented Embryology*, Philadelphia 1993), 4. Auflage, Stuttgart; New York

- Moncada S**, Palmer RMJ, Ferrige AG. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526
- Müller HM**, Widschwendter M, Mörtl MG, Schröcksnadel H. 1998. Prädiktion der Präeklampsie: neue Hypothesen, neue Ansätze. *Gynäkol. Geburtshilfliche Rundsch* 38 S 222-231
- Münzel T**. 2008. Neue Erkenntnisse bei der Nitratwirkung, Nitratbioaktivierung und Toleranzentwicklung *Dtsch med Wochenschr*; 133: 2277-2282
- Münzel T**. 2004. Differentialtherapeutischer Einsatz von organischen Nitraten. Johannes Gutenberg Universität, Mainz. 11. PETN-Expertentreffen.
- Münzel T**, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, et al. 1995. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. *J Clin Invest*; 95: 187-194
- Münzel T**, Daiber A, Mülsch A. 2005. Explaining the Phenomenon of Nitrate Tolerance. *Circ. Res.* 97: 618-628
- Murrell W**. 1879. Nitroglycerine as a remedy for angina pectoris. *Lancet* I; S 80
- Mutschler E**, Erdmann E, Stalleicken D. 2003. Pentaerithryltetranitrat. Vasoselektivität und therapeutische Perspektiven. Steinkopff Verlag Darmstadt; 1-50
- Mutschler E**, Schneider D, Stalleicken D. 2000. Pentaerithryltetranitrat. NO-Substitution als pharmakologisch begründetes Therapieprinzip. Steinkopff Verlag Darmstadt; 1-68
- Myatt L** et al. 1991. The action of nitric oxide in the perfused human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol*; 687-692
- Myllynen PK**, Loughran MJ et al. 2008. Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta. *Reprod Toxicol* 26(2): 130-7.
- Myren M**, Mose T et al. 2007. The human placenta-an alternative for studying foetal exposure. *Toxicol In Vitro* 21(7): 1332-40

- Neurath GB**, Dünger M. 1977. Blood levels of the metabolites of glyceryl trinitrate and pentaerythritol tetranitrate after administration of a two-step preparation, *Arzneim.-Forsch.*, 27, 416-419
- Nickening G**, Waßmann S, Böhm M. 1998. Beeinflussung der Nitrattoleranz durch Antioxidantien. *Dtsch med Wochenschr*; 123: 1556-1561
- Noack E**. 1984. Investigation on structure-activity relationship in organic nitrates. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 6:583-586
- Noack E**, Bonn R, Sandrock K. 1983. Beziehungen zwischen den chemisch-physikalischen Eigenschaften organischer Nitrate als Anhalt für ihre Wirksamkeit und Wirkdauer. In Köhler E, Noack E, Schrey A, Weiß M (Hrsg.) *Mononitrat II*. Wolf & Sohn, München, S 10-20
- Noack E**, Koida G. 1994. Basalpharmakologische Eigenschaften und vaskuläre Selektivität von PETN. In Schneider HT (Hrsg.) *Pentaerithryltetranitrat*. Steinkopff Verlag Darmstadt; S 6-8
- Nöschel H**, Reiber W, Schröder S. 1982. Untersuchungen zur medikamentösen Beeinflussung des Kontraktionszustandes der fetalen Plazentagefäße an der in vitro beidseitig infundierten menschlichen Plazenta. *Zbl Gynäkol*, 104: 1149-1154
- Norris LA**, Higgins JR, Darling MRN, Walshe JJ, Bonnar J. 1999. Nitric Oxide in the uteroplacental, fetoplacental, and peripheral circulations in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 93: 958-963
- Norman JE**, Thomson AJ, Greer IA. 1998. Cervical ripening after nitric oxide. *Hum Reprod*; 13: 251-252
- Norman JE**, Ward LM, Martin W, Cameron AD, McGrath JC, Greer IA, Cameron IT. 1997. Effects of cGMP and the nitric oxide donors glyceryltrinitrate and sodium nitroprusside on contractions in vitro of isolated myometrial tissue from pregnant woman. *J Reprod Fertil*; 110: 249-254
- Oberle S**, Abate A, Grosser N, Vreman HJ, Dennery PA, Schneider HT, Stalleicken D, Schröder H. 2002. Heme Oxygenase-1 Induction May Explain the Antioxidant Profile of Pentaerithryl Trinitrate. *Biochem and Biophys Research Comm* 290, S 1539-1544

- Olthoff KH**, Wustmann U. 1981. Latente und Belastungsherzinsuffizienz - Eine Indikation für Nitrate. *Z. ges. inn. Med.*; 18: 644-649
- Omarini D**, Barzago MM et al. 1991. Placental transfer of theophylline during in situ perfusion in the rabbit. *J Pharmacol Methods* 25(4): 263-73.
- Oppermann M**, Balz V, Adams V, Dao V, Bas M, Suvorava T, Kojda G. 2009. Pharmacological induction of vascular extracellular superoxide dismutase expression in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 13, No 7, pp. 1271-1278
- Packer M**, Lee WH, Kessler PD, Gottlieb SS, Medina N, Yushak M. 1987. Prevention and reversal of nitrate tolerance in patients with congestive heart failure. *N Engl J Med*, 317(13): 799–804
- Parker JD**, Farrell B, Fenton T, Cohanin M, Parker JO. 1991. Counter-regulatory responses to continuous and intermittent therapy with nitroglycerin. *Circulation*, 84(6): 2336–2345
- Patterson TA**, Binienda ZK et al. 2000. Transplacental pharmacokinetics and fetal distribution of 2',3'-dideoxy-3'-deoxythymidine (d4T) and its metabolites in late-term rhesus macaques. *Teratology* 62(2): 93-99.
- Pautz A**, Rauschkolb P, Schmidt N, Art J, Oelze M, Wenzel P, Förstermann U, Daiber A, Kleinert H. 2009. Effects of nitroglycerin or pentaerythryl tetranitrate treatment on the gene expression in rat hearts: evidence for cardiotoxic and cardioprotective effects. *Physiol Genomics* May 5, 38: 176-185
- Pfaffenrath V**, de la Motte S, Harrison F, Rütthning C. 1998. Wirkungen von Pentaerythryltetranitrat, Isosorbidmononitrat und Placebo auf den Kopfschmerz und auf die Beeinträchtigung der Arbeitsfähigkeit gesunder Probanden. *Arzneim Forsch/drug Res*; 48: 646-650
- Polliotti BM**, Holmes R, Cornish JD, Hulseley M, Keesling S, Schwartz D, Abramowsky CR, Huddleston J, Panigel M, Nahamias AJ. 1996. Long-term perfusion on isolated human placental lobules with improved oxygenation for infectious diseases research. *Placenta* 17: 57-68
- Poston L**. 1997. The control of blood flow to the placenta. *Exp Physiol*. 82: 377-387

- Predel HG**, Knigge H, Prinz U, Kramer HJ, Stalleicken D, Rost RE. 1995. Exercise Increases Endothelin-1 Plasma Concentrations in Patients with Coronary Artery Disease: Modulatory Role of LDL Cholesterol and of Pentaerithryltetranitrate. *J Cardiovasc Pharmacol*; 26: 497-501
- Ramsay B**, Sooranna SR and Johnson MR. 1996. Nitric oxide synthase activities in human myometrium and villous trophoblast through pregnancy. *Obstet Gynecol*; 87: 249-253
- Reiber W**, Nöschel H, Schröder S. 1984. Medikamentöse Beeinflussung der fetoplazentaren Durchblutung. *DDR Med Rep*; 13: 7-9
- Rettwitz-Volk W**. 1996. Epidemiologische Aspekte der Frühgeburtlichkeit. *Perinat-Med*; 8: 15-18
- Richartz BM**, Silber S. 2009. Die „Moderne Nitratherapie“ unter besonderer Berücksichtigung der COURAGE- und MASS-II-Studien. *Pentaerithryltetranitrat*, 9/ S. 75-79
- Roe CM**, Leitch IM, Boura AL, Smith R. 1996. Nitric oxide regulation of corticotropin-releasing hormone release from the human perfused placenta in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*; 81: 763-769
- Rowlands S**, Trudinger B, Visva LS. 1996. Treatment of preterm cervical dilatation with glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor. *Aust NZJ Obstet Gynecol*; 36: 377-381
- Sand AE**, Andersson E, Fried G. 2002. Effects of nitric oxide donors and inhibitors of nitric oxide signalling on endothelin- and serotonin-induced contractions in human placental arteries. *Acta Physiol Scand*; 174: 217-223
- Schaffer L**, Vogel J, Breyman C, Gassmann M, Marti HH. 2006. Preserved placental oxygenation and development during severe systemic hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 209(3): R 844-851
- Schiewe R**, Schnorbus B, Ostad MA, Medler C, Wenzel P, Seiler H, Daiber A, Münzel T, Warnholtz A. 2009. Die Wirkung von Pentaerithryltetranitrat auf die Endothelfunktion bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK). *PENTA-Studie: Studiendesign und klinische Relevanz. Pentaerithryltetranitrat*, 8/ S. 65-73

- Schleußner E**, Richter S, Groß W, Kähler C, Möller U, Seewald HJ. 2001. Nitroglyzerinpflaster zur Tokolyse- ein prospektiv randomisierter Vergleich mit Fenoterol per infusionem. *Z Geburtshilfe Neonatol*; 205: 189-194
- Schleußner E**. 2002. Wehenhemmung mit Nitroglyzerin. Bisherige Erfahrungen. *Gynäkolog.Prax.*; 26: 23-29
- Schmidt-Matthiesen H**. 1985. Entwicklung der Plazenta und des Fetus. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Schattauer Verlag, Stuttgart. 3: 183-186
- Schneider H**, Dancis J. 1987. In vitro human placental perfusion of human placenta. *Trophoblast Research*; 2: 597-605
- Schneider H**, Huch A. 1985. Dual in vitro perfusion of an isolated lobe of human placenta: Method and instrumentation. *Contr Gynec Obstet* 13; 40-47
- Schneider H**, Panigel M, Dancis J. 1972. Transfer across the perfused human placenta of antipyrin, sodium and leucine. *AM J Obstet Gynecol* 114; 822-828
- Schneider H**, Prögler M, Sodha RJ. 1985. Effect of flow ratio on the diffusion of antipyrin and H₂O in the isolated dually in vitro perfused lobe of the human placenta. *Contr Gynec Obstet* 13; 114-123
- Schneider HT**. 1994. Pentaerithryltetranitrat. Kenntnisstand und Perspektiven in Pharmakologie und Kinetik. Steinkopff Verlag Darmstadt; 1-32
- Schneider HT**, Stalleicken D. 1995. Pentaerithryltetranitrat. Beiträge zum klinischen und pharmakologischen Status. Steinkopff Verlag Darmstadt; 1-131
- Schröder H**, Oberle-Plümpe S, Abate A, Dennery PA, Vreman HJ, Schneider HT, Stalleicken D. 2004. PETN schützt Endothelzellen vor reaktiven Sauerstoffspezies – Mediatorfunktion von Stressgenen. 11. PETN-Expertentreffen.
- Schröder H**, Oberle-Plümpe S, Stalleicken D. 2008. Neue Erkenntnisse zur vasoprotektiven Wirkung des NO-Donors PETN. *Arzneimitteltherapie*, 26: 126-129

- Schütz A**, Kötting J, Epple F, Ziegler R, Maier-Lenz H, Stalleicken D. 1999. Quantitative gaschromatographische/ massenspektrometrische Bestimmung der PETN-Metaboliten Pentaerthrityltrinitrat, Pentaerthrityldinitrat und Pentaerthritylmononitrat in Humanplasma. *Arzneim.-Forsch./ Drug Res.* 49 (II); 11: 891-895
- Seligman SP**, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson. 1994. SB The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 171: 944-948
- Silber S**, Krause KH, Garner C, Theisen K, et al. 1983. Anti-ischemic effects of an 80 mg tablet of isosorbide dinitrate in sustained-release form before and after 2 weeks treatment with 80 mg once-daily or twice-daily. *Z Kardiol*; 72 (Suppl 3): 211-217
- Slot C**. 1965. Plasma creatinin determination. A new and specific Jaffé reaction method. *Scand J Clin Lab Invest* 17; 381
- Sobrero MA**. 1846. Sur plusieurs composés détonants produits avec l'acide nitrique et de la surce, la dextrine, la mannite et la glycérine. *CR Acad Sci* 25 :247-248
- Stalleicken D**, Kuntze U, Schmid B, Hiebl R, Ring J, Michaelis K. 1997. Quantitative determination of pentaerythrityl tetranitrate and its metabolites in human plasma by gas chromatography/mass spectrometry, *Arzneim.-Forsch.*, 47, 347-352.
- Stalleicken D**, Langenfeld, Schröder H, Erdmann E. 2002 Pentaerithrityltertanitrat (PETN). *Dt Apotheker Zeitung*; 15: 46-60
- Stalleicken D**, Langenfeld, Schröder H, Erdmann E. 2001a. Pentaerithrityltetranitrat und andere organische Nitrate. *Arzneimitteltherapie*; 19: 115-121
- Stalleicken D**. 2001b Pentaerithrityltetranitrat. Therapierelevanter Wissensstand zu Pharmakologie und Klinik. Steinkopff Verlag Darmstadt; 2:7-102
- Stewart DD**. 1888. Remarkable tolerance to nitroglycerin. *Philadelphia Policlinic*:12
- Sun K**, Smith R, Robinson PJ. 1994. Basal and KCL- stimuliert corticotropin- releasing hormone release from human placental syncytiotrophoblasts is inhibited by sodium nitroprusside. *J Clin Endocrinol Metab*; 79: 519-524
- Taylor T**, Taylor W, Chasseaud LF, Bonn R. 1987. Pharmacokinetics and metabolism of organic nitrate vasodilators. *Progress in Drug Metabolism*; 10: 207-336

Thadani U, et al. 1993. Therapie and the Development of Tolerance. ARCH FAM MED; 2: 880-885

Thadani U, Lipicky RJ. 1994. Short and Long-Acting Oral Nitrates for Stable Angina Pectoris. Cardiovasc Drugs Ther; 8: 611-623

Thomson AJ, Lunan CB, Cameron AD, Cameron IT, Greer IA, Norman JE. 1997. Nitric oxide donors induce ripening of the human uterine cervix: a randomized controlled trial. Br J Obstet Gynecol; 104: 1054-1057

Tschuggel W, Schneeberger C, Lass H, Stonek F, Zaghlula MB, Czerwenka K, Schatten C, Kaider A, Husslein P, Huber JB. 1999a. Human cervical ripening is associated with an increase in cervical inducible nitric oxide synthase expression. Biol Reprod; 60: 1367-1372

Tschuggel W, Schneeberger C, Unfried G, Bräutigam G, Stonek F, Wieser F, Vytiska-Binstorfer E, Czerwenka K, Weninger W, Kaider A, Bursch W, Breitschopf H, Huber JC. 1999b. Elevation of inducible nitric oxide synthase activity in human endometrium during menstruation. Biol Reprod; 60: 297-304

Tschuggel W, Schneeberger C, Unfried G, et al. 1998a. Induction of inducible nitric oxide synthase expression in human secretory endometrium. Hum Reprod; 13: 436-444

Tschuggel W, Schneeberger C, Unfried G, et al. 1998b. The role of nitric oxide in reproduction. Gynäkol Geb Rundschr.; 38: 44-46

Vahakangas K, Myllynen P. 2006. Experimental methods to study human transplacental exposure to genotoxic agents. Mutat Res 608(2): 129-35.

Voigt S. 2005. Untersuchungen von Pentaerythryltetranitrat und ausgewählten Metaboliten mittels HPLC. Diplomarbeit bisher unveröffentlicht. Chemisch-Geowissenschaftliche Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Walker JJ. 1998. Antioxidants and inflammatory cell response in preeclampsia. Semin. Reprod. Endocrinol. 16 S 93-104

Watanabe H, Kakihana M, Ohtsuka S, Sugishta S. 1998. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of the preventive effect of supplemental oral vitamin C on attenuation of development of nitrate tolerance. J Am Coll Cardiol; 31: 1323-1329

- Weber W**, Michaelis K, Luckow U, Stalleicken D. 1995. Pharmacokinetics and Bioavailability of Pentaerithryl Tetranitrate and Two of its Metabolites. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 45 (II); 7: 781-784
- Wenzel P**, Oelze M, Müller J, Hink U, Münzel T, Daiber A. 2009. Antioxidative Prinzipien und Strategien in der Therapie mit organischen Nitraten. *Pentaerithryltetranitrat*, 4/S. 23-25
- Wenzel P**, Oelze M, Coldewey M, Hortmann M, Seeling A, Hink U, Mollnaus H, Stalleicken D, Weiner H, Lehmann J, Li H, Förstermann U, Münzel T, Daiber A. 2007. Heme Oxygenase-1 A Novel Key Player in the Development of Tolerance in Response to Organic Nitrates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1729-1735
- Wenzel P**, Schulz E, Gori T, Ostad M, Mäthner F, Schildknecht S, Göbel S, Oelze M, Stalleicken D, Warnholtz A, Münzel T, Daiber A. 2009. Monitoring White Blood Cell Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Activity: Implications for Nitrate Therapy in Humans. *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, Vol 330, No 1, Jul, 36-71
- Wetzka B**, Stehmanns A, Wilhelm Ch, Breckwoldt M, Zahradnik HP. 1998. Mechanische und biochemische Effekte von Glyceroltrinitrat auf spontan kontrahierende, schwangere Myometriumstreifen in vitro. *Arch Gynecol Obstet*; 261: 58
- Wick P**, Malek A et al. 2009. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ Health Perspect* 118(3): 432-6.
- Wieser F**, Gruber DM, Tschuggel W, Huber JC. 1997. Progesterone and nitric oxide systems. *Zentralbl Gynäkol*; 119 Suppl 2: 12-16
- Wier PJ**, Miller RK, Maulik D, Di Sant`Agnese PA. 1983. Bi-directional transfer of α -Aminoisobutyric acid by the perfused human placental lobule. *Trophoblast Research* 1; 37-54
- Wolf R**, Pretschner P, Hundeshagen H, Lichtlen PR. 1979. Isosorbide-dinitrate in myocardial perfusion. *Z Kardiol*; 68: 676-686

Yoshiki N, Kubota T, Aso T. 2000. Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in human non-pregnant and pregnant endometrium. *Mol Hum Reprod*; 6: 238-247

Yu WC, Goff EU. 1983. Determination of vasodilators and their metabolites in plasma by liquid chromatography with a nitrosyl-specific detector, *Anal. Chem.*, 55, 29-32

Zygmunt M, Lang U, Münstedt K. 2002. Früherkennung der Präeklampsie. *Gynäkologe*; 35: 644-651

Zygmunt S, Szwed H, Kośmicki M, Wojciechowski D, Kowalewski M, Kowalik I, Korzeniowska-Kubacka I, Piotrowicz R. 2004. Comparison of the clinical efficacy of two doses of pentaerythritol tetranitrate in patients with stable angina. 11. PETN-Expertentreffen.

Anhang

Messwerte

<i>Tabelle a:</i>	<i>Plazentadaten</i>	82
<i>Tabelle b:</i>	<i>Antipyrin – maternal</i>	83
<i>Tabelle c:</i>	<i>Antipyrin – fetal</i>	84
<i>Tabelle d:</i>	<i>Kreatinin – maternal</i>	85
<i>Tabelle e:</i>	<i>Kreatinin – fetal</i>	86
<i>Tabelle f:</i>	<i>Glukose – maternal</i>	87
<i>Tabelle g:</i>	<i>Glukose – fetal</i>	88
<i>Tabelle h:</i>	<i>Laktat – maternal</i>	89
<i>Tabelle i:</i>	<i>Laktat – fetal</i>	90
<i>Tabelle j:</i>	<i>βHCG – maternal</i>	91
<i>Tabelle k:</i>	<i>Perfusionsdruck – fetal</i>	92
<i>Tabelle l:</i>	<i>Sauerstofftransfer</i>	93
<i>Tabelle m:</i>	<i>Sauerstoffverbrauch gesamt</i>	94

Versuch	GeburtsN.	EM	PG in g	Geb.G in g	SSW	Alter	Gravida	Parität	KG in g
PETN 01	457/02	spontan	450	3190	38+1	30	I	I	16,0
PETN 02	482/02	sectio	1020	2620	37+2	28	II	II	56,0
PETN 03	656/02	sectio	700	3660	39+2	35	IV	II	21,5
PETN 04	752/02	spontan	460	3430	38+7	21	I	I	14,5
PETN 05	930/02	spontan	700	3900	37+2	24	II	I	18,0
PETN 06	1044/02	sectio	576	2800	39+0	29	I	I	32,0
PETN 07	884/03	sectio	734	3290	40+0	30	I	I	10,3
PETN 08	796/04	sectio	552	3100	39+1	20	I	I	53,8
PETN 09	564/05	spontan	558,3	3680	40+0	27	I	I	30,0
leer 01	1088/01	sectio	640	3580	40+0	24	I	I	22,6
leer 02	1103/01	sectio	440	3350	38+0	30	II	II	22,5
leer 03	1121/01	sectio	660	3670	40+0	31	II	II	25,1
leer 04	1142/01	sectio	624	3240	36+6	34	II	II	33,1
leer 05	1149/01	sectio	578	2930	39+1	32	I	I	21,2
leer 06	400/02	sectio	738	3200	39+3	34	III	II	37,5

Tabella a: Plazentadaten

Klinische Daten der 15 Patientinnen, deren Plazentas zur Verfügung gestellt wurden (EM = Entbindungsmodus, PG = Plazentagewicht in Gramm, Geb.G = Geburtsgewicht des Kindes, SSW = Schwangerschaftswoche, Alter = Alter der Patientin, Gravida = Schwangerschaft, Parität = Geburt, KG = Kötyleongewicht)

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	130 min	160 min	190 min	220 min	250 min	310 min	370 min
PETN 01	34,0	21,8	18,8	18,3	18,0	34,3	21,2	19,3	18,7	18,3	18,4	18,4
PETN 02	34,0	25,9	20,1	19,5	17,9	35,4	24,7	18,7	16,2	17,0		
PETN 03	27,5	18,0	15,8	15,4	17,4	32,4	20,2	16,7	17,4	16,1	16,1	16,6
PETN 04	31,5	18,0	16,0		15,8	28,5	19,6	17,0	16,7	15,8	17,3	16,1
PETN 05	29,3	18,3	15,2	14,2	15,0	27,5	17,9	16,9	14,8	15,8	14,9	15,4
PETN 06	33,7	23,1	21,1	19,7	20,6	31,7	22,5	21,1	20,5	20,0		
PETN 07	32,0	27,4	24,1	21,7	20,3	32,6	30,5	28,2	26,9	25,0	22,9	
PETN 08	38,0	31,5	26,5	23,7	22,5	38,6	31,7	28,5	26,4	26,6	23,4	22,3
PETN 09	33,5	24,6	19,4	16,5	15,6	33,3	24,5	20,0	17,4	16,0	15,7	15,6
leer 01	108,2	63,8	53,5	51,2	49,7	104,4	64,3	54,6	53,8	53,6	50,3	49,9
leer 02	95,7	69,4	57,3	54,0	51,3	95,4	72,2	67,3	58,9	54,3		
leer 03	88,6	60,9	51,6	49,0	46,5	83,6	59,7	49,3	47,9	47,1	44,8	45,1
leer 04	98,8	66,6	58,0	52,8	53,9	95,6	64,1	55,5	52,6	52,0	52,1	51,2
leer 05	91,7	68,5	56,8	53,8	49,5	99,2	60,3	53,8	50,6	50,9	49,9	48,5
leer 06	34,0	22,7	18,4	17,2	17,2	31,0	21,9	18,5	16,8	17,0		

Tabelle b: Antipyrin – maternal in µg/ml

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	130 min	160 min	190 min	220 min	250 min	310 min	370 min
PETN 01	4,3	15,7	18,1	18,1	18,1	5,1	16,1	18,4	18,2	19,0	18,1	18,3
PETN 02	4,8	11,5	15,4	16,9	17,1	4,8	11,6	16,3	15,9	15,0		
PETN 03	2,7	14,3	15,3	15,3	15,9	2,2	14,5	15,5	16,6	16,3	15,8	15,8
PETN 04	4,0	13,9	17,2		15,7	3,7	12,6	16,7	17,1	17,1	16,5	16,5
PETN 05	1,3	11,6	14,1	14,3	14,4	1,3	11,4	14,1	15,5	14,9	16,5	14,6
PETN 06	5,3	16,7	18,5	18,9	19,5	6,9		17,5	18,6	19,0		
PETN 07	5,5	10,7	13,5	14,8	16,4	5,7	7,9	9,3	11,4	13,3	16,9	
PETN 08	8,6	12,5	15,7	17,2	21,1	8,9	15,0	16,9	19,2	20,1	21,4	22,3
PETN 09	0,3	7,6	10,0	11,2	11,9	0,3	7,8	11,7	12,6	13,2	13,5	14,4
leer 01	5,1	40,9	38,5	48,6	50,0	5,8	36,4	45,1		49,3	52,6	
leer 02	6,3	35,4	45,0	47,4	48,9	6,4	28,4	36,4	40,7	43,7		
leer 03	1,6	30,4	34,8	37,4	38,9	3,1	29,0	35,6	39,3	38,9	37,1	37,7
leer 04	7,8	35,0	45,8	48,1	50,3	7,4	36,1	47,8	48,7	48,2	49,6	49,7
leer 05	8,7	29,5	44,8	46,4	49,0	8,1	38,6	46,3	49,6	49,5	50,1	49,4
leer 06	3,5	12,8	16,0	16,2	17,5	3,2	12,4	15,5	15,7	15,8		

Table c: *Antipyrin – fetal in $\mu\text{g/ml}$*

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	130 min	160 min	190 min	220 min	250 min	310 min	370 min
PETN 01	148,0	116,9	100,3	92,7	88,0	152,5	126,5	112,1	99,2	93,0	86,5	79,9
PETN 02	164,5	125,6	103,8	87,6	79,7	146,4	117,9	94,9	77,4	68,7		
PETN 03	130,7	102,5	92,0	82,8	72,0	139,0	117,3	104,6	96,9	88,7	81,8	78,4
PETN 04	141,2	105,7	93,6		77,8	128,3	116,5	100,1	100,5	89,2	81,4	77,4
PETN 05	127,1	88,2	74,1	65,2	62,9	126,8	97,2	85,6	79,1	77,0	71,6	68,1
PETN 06	143,4	98,3	88,6	80,2	75,2	134,9	107,8	96,6	88,3	76,8		
PETN 07	141,5	127,5	117,2	107,0	103,6	134,9	134,0	130,7	123,0	117,0	110,2	
PETN 08	123,8	107,5	90,9	80,8	70,6	110,6	102,5	90,1	81,6	77,1	72,3	65,5
PETN 09	130,1	115,0	103,8	92,0	86,5	132,7	123,6	110,7	92,8	84,9	79,8	71,5
leer 01	127,0	90,2	80,7	71,3	65,5	149,1	108,7		90,1	84,8	78,6	70,7
leer 02	135,1	97,7	88,1	79,4	73,2	148,0	123,3	109,9	101,8	96,0		
leer 03	137,4	96,2	80,8	71,8	66,9	134,0	116,0	103,8	94,5	87,7	78,2	72,6
leer 04	137,3	88,9	79,6	70,3	61,8	140,2	105,7	93,3	85,7	80,3	73,6	70,7
leer 05	141,4	126,1	107,2	95,7	82,1	161,4	128,9	114,7	113,5	102,4	94,6	90,5
leer 06	144,2	108,4	92,6	81,6	75,2	140,6	118,1	104,8	93,9	85,3		

Tabella d: Kreatinin – maternal in µg/ml

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	130 min	160 min	190 min	220 min	250 min	310 min	370 min
PETN 01	-0,3	11,7	25,5	32,9	41,5	0,5	18,3	32,3	46,5	55,0	66,3	71,9
PETN 02	-0,8	11,5	32,3	46,0	51,8	-1,3	18,9	35,2	45,1	50,5		
PETN 03	-1,1	9,6	21,0	31,0	38,3	-1,1	17,8	27,9	41,5	47,9	55,5	62,1
PETN 04	-3,3	8,2	18,6		33,3	-1,0	11,6	25,4	31,1	38,2	47,9	54,2
PETN 05	-0,7	15,9	32,2	39,2	44,0	-1,6	21,0	35,4	41,9	49,8	55,0	60,4
PETN 06	0,0	16,3	31,3	41,8	47,4	0,2		37,2	47,7	52,5		
PETN 07	1,1	5,4	10,6	15,6	22,9	-0,2	5,0	10,0	13,3	17,9	27,8	
PETN 08	3,7	10,1	18,1	23,7		3,0	16,9	23,6	29,2	33,7	42,4	44,0
PETN 09	3,1	9,5	15,5	22,4	24,9	3,2	14,6	24,7	34,6	41,6	57,6	64,6
leer 01	-2,6	13,5	27,1	36,5	44,2	-1,7	22,0	36,1	43,3	50,7	59,9	69,2
leer 02	-1,2	7,3	17,6	23,9	30,2	-1,6	13,5	23,6	32,0	37,5		
leer 03	-1,1	12,7	24,3	31,3	36,8	-0,9	19,9	31,6	39,1	46,8	56,4	62,2
leer 04	-1,0	14,4	25,3	33,1	40,3	-1,2	19,0	32,4	44,1	49,8	57,2	60,8
leer 05	4,3	7,7	23,7	27,0	36,6	-0,4	19,8	29,7	46,9	48,8	62,6	63,6
leer 06	-0,6	12,4	28,4	36,7	42,3	-0,8	17,8	33,6	40,1	46,2		

Tabella e: Kreatinin – fetal in $\mu\text{g/ml}$

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	130 min	160 min	190 min	220 min	250 min	310 min	370 min
PETN 01	139,7	122,4	98,4	90,8	80,5	133,7	114,1	87,0	74,3	61,9	48,3	40,5
PETN 02	39,3	32,2	27,9	25,2	22,4	37,3	26,6	19,6	16,0	12,8		
PETN 03	101,7	88,9	81,0	54,9	49,2	99,5	87,2	80,1	74,2	67,9	60,7	55,4
PETN 04	142,0	120,9	110,3		90,2	143,0	128,5	115,6	103,5	93,0	80,8	60,9
PETN 05	62,0	51,8	46,1	40,7	37,6	68,0	50,4	43,3	40,0	32,7	26,6	37,6
PETN 06	29,6	24,4	20,7	17,8	16,0	28,9	27,3	22,2	20,0	3,2		
PETN 07	92,7	89,7	85,6	78,0	69,0	95,1	91,3	87,5	84,2	81,8	73,6	
PETN 08	20,8	13,9	10,8	10,4	9,1	20,6	16,3	14,6	12,1	10,6	7,1	3,2
PETN 09	36,5	28,5	24,3	22,1	18,7	35,8	31,6	30,6	26,0	22,7	18,7	10,8
leer 01	81,3	70,8	62,7	55,6	49,9	77,5	69,6	62,9	55,6	49,8	41,0	34,9
leer 02	51,7	53,1	45,0	48,8	42,2	65,2	59,5	55,6	50,4	46,2		
leer 03	38,4	35,6	32,9	31,5	28,2	62,8	52,6	44,0	39,6	31,6	25,2	19,5
leer 04	44,9	40,8	37,4	30,5	26,6	47,6	39,2	37,3	32,3	27,6	22,4	16,5
leer 05	84,8	71,4	62,2	61,8	53,7	81,4	73,3	65,6	57,7	50,0	41,2	36,2
leer 06	52,6	47,0	37,7	30,5	11,8	54,6	36,2	33,5	23,3	21,8		

Tabelle f: Glukose – maternal in mmol/kg

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	130 min	160 min	190 min	220 min	250 min	310 min	370 min
PETN 01	126,4	126,4	118,4	113,2	99,8	128,4	128,0	107,8	86,9	79,1	67,6	56,4
PETN 02	37,2	35,0	32,1	26,8	24,0	38,1	33,7	30,9	27,0	21,5		
PETN 03	105,1	98,7	90,7	83,2	80,2	99,7	97,0	91,9	81,7	76,2	70,0	59,7
PETN 04	144,9	143,8	134,0		119,4	142,7	138,1	125,1	114,3	107,3	95,8	76,8
PETN 05	52,2	45,3	38,1	31,9	26,3	55,6	46,9	43,7	39,3	34,8	26,7	21,1
PETN 06	25,8	23,1	21,0	18,8	16,4	31,5	22,8	21,3	16,8	25,1		
PETN 07	92,7	90,8	83,5	75,1	66,8	99,7	90,8	83,5	74,3	66,0	48,3	
PETN 08	19,6	15,8	14,0	12,1	10,0	19,3	16,7	13,5	11,7	9,1	6,7	5,9
PETN 09	38,3	29,1	28,2	25,5	21,5	36,5	32,8	25,8	23,0	19,7	15,1	15,8
leer 01	84,1	61,9	57,9	58,1	48,4	84,2	79,8	76,4	69,6	65,8	56,9	46,9
leer 02	71,9	61,0	55,7	45,4	36,0	75,3	66,1	56,2	45,6	35,6		
leer 03	49,7	49,7	45,9	42,5	37,4	85,6	78,7	69,1	64,0	57,2	51,8	43,8
leer 04	45,2	44,7	41,6	37,2	34,4	48,0	44,5	45,6	38,8	32,8	27,2	21,3
leer 05	83,8	77,7	75,6	66,2	58,3	85,4	78,2	73,0	66,4	59,8	51,6	41,0
leer 06	55,6	54,4	47,8	42,7	17,3	53,1	51,2	45,6	41,4	33,9		

Tabelle g: Glukose – fetal in mmol/kg

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	130 min	160 min	190 min	220 min	250 min	310 min	370 min
PETN 01	0,0	9,0	17,3	25,5	30,1	0,0	16,4	21,0	25,7	30,3	35,2	39,0
PETN 02	0,0	3,8	7,3	29,9	11,5	0,0	4,3	5,4	6,4	6,4		
PETN 03	0,0	4,8	8,9	9,4	10,8	0,0	7,0	10,4	13,7	16,1	21,6	26,9
PETN 04	0,0	10,5	18,8		32,3	0,0	18,1	27,4	32,3	35,6	43,2	45,9
PETN 05	0,0	10,6	16,1	19,3	21,8	0,0	12,5	17,4	19,0	22,1	25,3	30,0
PETN 06	0,0	5,3	7,9	10,8	11,8	0,0	8,8	10,2	12,4	2,3		
PETN 07	0,0	10,7	19,4	26,6	32,2	0,0	5,4	11,3	14,9	20,0	27,0	
PETN 08	0,0	2,2	3,8	5,7	6,8	0,0	3,4	5,5	6,7	8,0	9,9	8,0
PETN 09	0,0	3,7	6,0	7,5	8,6	0,0	4,1	7,1	9,0	10,1	13,3	10,7
leer 01	0,0	4,0	9,3	11,4	14,4	0,0	9,4	13,6	17,0	19,7	24,9	31,5
leer 02	0,0	4,6	8,6	12,7	16,3	0,0	1,3	10,4	15,2	18,0		
leer 03	0,0	9,0	13,2	16,9	18,2	0,0	11,9	16,3	19,8	20,7	24,2	23,9
leer 04	0,0	7,3	11,8	15,1	17,3	0,0	10,0	14,6	16,7	19,2	23,4	27,6
leer 05	0,0	7,4	14,4	20,8	26,6	0,0	12,6	18,5	25,0	26,9	34,3	39,4
leer 06	0,0	3,4	6,5	8,4	4,8	0,0	5,3	8,7	8,5	10,5		

Tabelle h: Laktat – maternal in mmol/kg

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	130 min	160 min	190 min	220 min	250 min	310 min	370 min
PETN 01	0,0	2,0	9,3	16,4	22,8	0,0	4,0	10,4	16,2	21,0	31,2	38,6
PETN 02	0,0	1,7	6,2	8,8	11,1	0,0	4,2	6,2	7,9	8,4		
PETN 03	0,0	0,0	4,2	7,9	12,2	0,0	2,2	5,7	8,7	11,7	16,6	21,8
PETN 04	0,0	0,0	5,3		17,4	0,0	5,3	10,9	14,2	18,3	26,5	30,7
PETN 05	0,0	2,8	6,9	8,9	10,3	0,0	3,4	6,4	8,9	10,6	13,0	15,0
PETN 06	0,0	2,2	3,8	6,2	6,8	0,0	7,3	4,5	5,5	18,4		
PETN 07	0,0	2,1	4,9	4,4	9,3	0,0	2,1	4,9	7,0	7,8	8,7	
PETN 08	0,0	2,6	5,0	6,8	7,3	0,0	3,8	4,8	6,2	7,1	8,8	12,8
PETN 09	0,0	2,6	4,9	6,1	7,3	0,0	4,0	6,4	8,1	8,8	10,1	14,3
leer 01	0,0	0,0	3,8	8,8	10,2	0,0	3,7	7,0	10,7	15,3	22,7	30,0
leer 02	0,0	0,0	1,9	4,0	5,6	0,0	2,1	5,0	6,8	8,8		
leer 03	0,0	2,5	7,3	11,5	14,6	0,0	4,6	9,0	12,4	15,9	23,4	29,4
leer 04	0,0	3,6	8,2	12,4	15,2	0,0	5,3	9,1	12,4	15,4	21,5	24,7
leer 05	0,0	2,3	11,1	15,1	21,3	0,0	7,3	12,4	16,9	21,1	30,9	38,4
leer 06	0,0	1,3	4,3	7,7	4,2	0,0	3,3	7,0	9,2	10,6		

Tabelle i: Laktat – fetal in mmol/kg

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	130 min	160 min	190 min	220 min	250 min	310 min	370 min
PETN 01	0,0	3,5	5,7	7,1	8,3	0,2	3,6	4,3	5,5	5,9	6,6	7,3
PETN 02	0,0	2,6	4,3	5,5	5,8	0,0	1,8	2,1	2,3	2,3		
PETN 03	0,0	2,3	3,6	3,4	3,9	0,0	2,0	2,7	3,2	3,8	5,0	5,6
PETN 04	0,0	2,0	3,3		5,4	0,8	2,2	3,5	3,9	4,2	5,0	5,0
PETN 05	0,0	2,7	4,1	4,8	5,4	0,0	2,1	2,9	3,6	3,8	4,2	4,7
PETN 06	0,0	6,0	9,2	10,0	11,4	0,0	7,1	9,0	11,1			
PETN 07	0,0	15,0	22,2	28,1	31,8	0,0	3,7	6,0	8,1	9,4	12,4	
PETN 08	0,0	0,2	0,3	0,4	0,5	0,0	0,1	0,2	0,3	0,3	0,4	
PETN 09	0,0	0,9	1,4	1,8	2,0	0,0	0,5	0,8	1,0	1,1	1,3	1,0
leer 01	0,0	3,2	4,9	5,9	6,6	0,0	3,5	4,5	5,2	5,8	6,7	8,2
leer 02	0,0	1,4	2,3	3,2	3,6	0,0	1,2	1,8	2,4	2,5		
leer 03	0,0	3,6	5,1	7,0	7,6	0,0	4,2	5,1	5,7	6,2	7,4	8,1
leer 04	0,0	3,0	4,3	5,2	6,3	0,0	3,4	4,0	4,7	5,2	6,0	6,3
leer 05	0,0	3,0	4,7	5,8	6,8	0,0	3,0	4,0	5,0	5,4	6,7	7,4
leer 06	0,0	2,7	3,7	4,1	2,0	0,0	1,5	2,5	2,2	2,5		

Tabelle j: β HCG – maternal in IU/g

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	130 min	160 min	190 min	220 min	250 min	310 min	370 min
PETN 01	13	14	17	15	15	14	15	15	15	14	14	13
PETN 02	31	30	32	32	32	31	29	31	31	30		
PETN 03	25	26	28	28	28	31	28	28	28	28	28	30
PETN 04	27	24	24	24	24	25	26	27	27	27	30	33
PETN 05	28	26	22	19	22	21	21	24	25	25	28	31
PETN 06	14	14	16	19	21	26	26	30	42	64		
PETN 07	50	50	54	55	54	54	51	52	51	52	54	
PETN 08	40	39	40	42	44	46	43	46	47	46	46	46
PETN 09	27	26	27	27	29	30	27	28	29	27	28	27
leer 01	22	25	24	23	23	27	32	32	32	32	32	32
leer 02	34	31	39	36	38	39	33	37	34	35		
leer 03	37	38	39	37	37	34	33	32	31	30	30	35
leer 04	19	24	24	25	25	26	26	29	29	29	30	36
leer 05	19	24	24	25	25	26	25	25	25	25	25	26
leer 06	19	20	20	22		22	25	27	29	32		

Tabella k: Perfusionsdruck – fetal in mmHg

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	130 min	160 min	190 min	220 min	250 min	310 min	370 min
PETN 01		0,321	-0,359	-0,100	-0,008		0,168	0,302	-0,041	0,194	-0,081	-0,067
PETN 02		-0,004	0,007	0,060	-0,011		-0,065	-0,048	0,085	0,216		
PETN 03		-0,035	0,028	0,049	0,131		-0,090	-0,254	-0,018	0,007	0,057	0,125
PETN 04		0,165	0,118	0,126	-0,336		-0,021	0,181	0,090	0,188	0,054	0,014
PETN 05		-0,036	-0,115	-0,034	-0,022		0,021	-0,095	-0,029	-0,041	0,051	0,046
PETN 06		-0,010	-0,065	-0,037	-0,084		-0,156	0,071	-0,043			
PETN 07		0,706	0,605	0,694	0,686		1,094	0,554	0,758	0,864	0,405	
PETN 08		-0,274	-0,010	-0,024	0,021		0,059	0,062	0,039	0,090	0,005	0,028
PETN 09		0,017	0,113	-0,080	0,116		0,049	-0,164	0,017	-0,015	0,048	0,167
leer 01		0,166	0,014	0,043	0,072		0,120	0,047	0,137	0,034	0,029	-0,016
leer 02		0,091	0,106	0,040	0,365		0,093	0,038	0,064	-0,137		
leer 03		0,119	0,056	-0,040	-0,010		-0,014	0,094	0,062	0,233	0,690	0,117
leer 04		0,057	0,041	0,005	0,167		0,012	0,038	0,069	0,017	0,033	0,053
leer 05		0,082	0,084	0,108	0,102		0,129	0,150	0,123	0,096	0,131	0,060
leer 06		-0,027	0,125	-0,015			-0,083	-0,147	-0,049	0,059		

Tabelle I: Sauerstofftransfer in ml/min/kg

	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	130 min	160 min	190 min	220 min	250 min	310 min	370 min
PETN 01		1,399	1,420	1,674	1,375		2,029	1,341	1,271	1,444	1,482	0,989
PETN 02		0,427	0,403	0,450	0,437		0,163	0,314	0,290	0,198		
PETN 03		1,228	1,280	0,788	1,099		1,068	1,481	1,490	1,184	1,548	1,246
PETN 04		1,669	1,594	1,735	1,820		1,612	1,683	1,187	1,197	1,599	0,435
PETN 05		1,156	1,064	1,414	0,027		1,271	1,434	1,419	1,390	1,333	1,384
PETN 06		0,864	1,012	0,969	1,027		0,904	0,760	0,828			
PETN 07		0,680	0,269	0,556	0,393		0,382	0,468	0,495	0,332	0,255	
PETN 08		0,267	0,096	0,377	0,409		0,152	0,356	0,389	0,213	0,384	0,530
PETN 09		0,054	-0,082	0,135	0,097		0,099	0,104	0,153	0,162	0,158	0,067
leer 01		1,223	0,946	1,029	1,308		0,859	0,892	1,013	0,958	0,711	0,973
leer 02		0,520	0,541	0,633	0,677		0,597	0,603	0,674	0,759		
leer 03		0,807	0,515	0,221	0,609		0,305	0,651	0,330	0,326	0,688	0,559
leer 04		0,493	0,560	0,402	0,213		0,564	0,449	0,480	0,536	0,553	0,597
leer 05		0,559	0,749	0,632	0,754		0,654	0,473	0,456	0,580	0,500	0,392
leer 06		0,634	0,526	0,789			0,403	0,267	0,453	0,477		

Tabelle m: Sauerstoffverbrauch gesamt in ml/min/kg

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die an der Erstellung der vorliegenden Dissertation beteiligt waren und ohne deren Hilfe das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ekkehard Schleußner bedanken, der mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt und die Arbeit im Plazentalabor ermöglicht hat. Ebenfalls danke ich ihm sehr für seine kritische Diskussionsbereitschaft.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Lydia Seyfarth und Frau Dr. rer. nat. Heike Keutel, für die große Unterstützung bei der Durchführung der einzelnen Experimente, aller fachlichen und methodischen Fragen sowie Anregungen zur Erstellung der Dissertation.

Sandra Voigt danke ich, denn sie hat mit ihrer Diplomarbeit „Untersuchungen von Pentaerithryltetranitrat und ausgewählten Metaboliten mittels HPLC“ maßgeblich zur Bearbeitung des Themas beigetragen.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. rer. pol. Thomas Lehman vom Institut für medizinische Statistik für die wertvollen Hinweise bei der statistischen Auswertung der Messdaten.

Mein größter Dank gebührt jedoch meinem Mann, der mir bei der Erstellung dieser Dissertation mit konstruktiver Kritik, formellen Tipps und vor allem Motivation stets zur Seite stand. Dabei verbrachte er viel Zeit damit, mir Aufmunterung und Rückhalt zu geben und somit die Fertigstellung der Arbeit voranzutreiben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Prof. Dr. med. Ekkehard Schleußner, Dr. rer. nat. Heike Keutel, Dr. rer. nat. Lydia Seyfarth, Dr. rer. pol. Thomas Lehman, Dipl.-Ing. Lars Rößner,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Gera, den 19. April 2012

Jana Rößner