

离体胎盘灌注模型应用的研究进展

唐代钰 董晓静

【摘要】 离体胎盘灌注模型是一种模拟生理环境建立胎盘循环的体外模型,是目前应用最广泛的药物胎盘转运研究模型。随着技术进一步发展,其也被应用于研究疾病发生发展机制、治疗方案、毒物经胎盘转运等其他方面。该模型与细胞培养模型、质膜囊泡模型、胎盘绒毛外植体模型等体外模型相比,拥有完整胎盘结构,使得其成为进行胎盘相关研究的最理想模型之一。本文就离体胎盘灌注模型的应用进行综述。

【关键词】 人体胎盘灌注; 体外模型

【中图分类号】 R71

胎盘是连接母胎的重要部分,有屏障作用、物质交换、分泌激素、免疫调控等功能。各种妊娠期母儿疾病均与胎盘功能密切相关。涉及到胎盘的许多研究因伦理问题无法直接在人体开展,动物实验的结果虽有一定参考意义,但又难以全面外推至人体。离体胎盘灌注模型的提出解决了这一难题。

离体胎盘灌注模型最早是由 Panigel 等^[1]提出的,通过灌流管连接供应同一胎盘小叶的脐静脉与脐动脉建立胎儿侧循环,灌流管插入螺旋动脉残端建立母体侧循环,主要用于药物经胎盘转运的相关研究。后经过 Schneider 等^[2]和 Miller 等^[3]的改进,逐渐形成了如下成熟的离体胎盘灌注模型。

收集胎盘并进行灌洗后,在保留完整胎盘的基础上,确定供应同一胎盘小叶的脐静脉与脐动脉,结扎其分支,穿刺置管建立该小叶的胎儿循环,当脐动脉端灌入量与脐静脉端流出量相等时说明该胎盘小叶无渗漏,去除多余的胎盘组织,在该胎盘母体侧绒毛间隙内插入两灌流管 2~3 mm 建立母体循环。离体胎盘灌注模型建立后,母体侧灌注液用 95% 的 O₂ 和 5% 的 CO₂ 混合气体进行氧合,胎儿侧则用 95% 的 N₂ 和 5% 的 CO₂ 混合气体充气,以模拟母体血与胎儿脐动脉血的体内状态^[4]。实验过程中可通过测量胎儿循环侧 pH、温度、压力、耗氧量、胎儿净氧转移、乳酸产量等指标来衡量离体组织活性,但胎儿侧灌注液体积损失测量则被认为是最佳的评价指标,考虑液体残留及水分蒸发,通常胎儿侧灌注液损失量不超过 2~4 mL/min 提示该循环建立成功。安替比林是一种亲水性的小分子化合物,通过被动扩散进入胎盘,因此常被作为胎盘转运研究的阳性参照物,在母体侧以 100% 的浓度加入安替比林,灌注 2.5 h 后安替比林的 F/M 值 >0.75 才能说明模型建立成功^[4]。经不断改进后的离体胎盘灌注模型,被应用于药

物与疾病的各方面研究。

一、药物经胎盘转运

有研究发现,约 23%~85% 的妊娠妇女在妊娠期间需要进行药物治疗^[5],但胎盘屏障作用有限,部分对胚胎有毒性作用的药物进入母体循环后可能通过胎盘进入胎儿循环,从而影响胎儿的生长发育,甚至产生致畸或致死作用。因此,评估胎儿的药物暴露水平成为衡量妊娠期用药安全的重要指标。离体胎盘灌注模型保留了完整的胎盘结构,是评估药物经胎盘转运的最经典的方法。

药物胎盘转运机制包括被动扩散、主动运输、易化扩散、过滤和胞饮作用。其中被动扩散是胎盘转运的重要机制,受物质分子量大小、离子化程度、脂溶性高低等因素影响。通过在开放或封闭离体胎盘灌注系统中进行药物经胎盘转运实验发现,部分药物以被动扩散形式通过胎盘屏障进入母胎循环,例如抗病毒药物替诺福韦^[6]、阿昔洛韦^[7],内分泌用药溴隐亭^[8]等。这些被动扩散物质游离与结合状态的平衡很大程度上影响其经胎盘的运输,故而母体侧血清白蛋白与胎儿侧血清白蛋白浓度是该类物质经胎盘转运的重要限制因素。例如溴隐亭与母体侧蛋白结合率高,其分子量较大,研究显示只有微量溴隐亭通过胎盘转运,其胎儿转移率约 6%^[8]。而 Lee 等^[9]的研究则表明,降糖药物二甲双胍的胎盘转运是由 OCT3 (organic cation transporter) 介导的。Kurosawa 等^[10]和 Freriksen 等^[11]通过采集不同药物经胎盘转运的数据结合药代动力学模型分析以及 hutson 等^[12]进行的一项 meta 分析 ($n=26$) 均表明,离体胎盘灌注模型进行药物实验所得数据与临床观察脐血中相关药物数据高度一致,这表明离体胎盘灌注模型是研究药物经胎盘转运的理想模型。

既往研究证实,万古霉素^[13]、罗格列酮^[14]、人胰岛素^[15]、溴隐亭^[8]等药物极少甚至不透过胎盘,在孕期使用有较高的安全性;而缩宫素即使在低于生理浓度的条件下,仍可以由母体侧转运至胎儿侧^[16],故在临床上使用缩宫素进行催产时,应以与生理分娩进展速率相适应的最低剂量给药;西地那非是一种通过增强一氧化氮 (NO) 途径介导血管舒张的药物,动物实验证明其可通过改善子宫胎盘血供从而

基金项目:重庆市自然科学基金(CSTC2019jcyj-msxmX0318);重庆医科大学附属第二医院“宽仁英才”项目(13-003-003);教育部生殖与发育国际合作联合实验室及高等学校学科创新引智计划

作者单位:400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院妇产科

通信作者:董晓静(xffdoctor@163.com)

改善子痫前期母胎结局^[17],但在一项大型临床实验研究中发现,西地那非的应用可能导致一些新生儿疾病甚至新生儿死亡^[18],后利用体外胎盘灌注证实,西地那非可通过健康妇女胎盘,且在子痫前期妇女胎盘中,越早孕周西地那非透过胎盘的剂量越大^[14]。这些结果对于指导西地那非的临床用药有很大参考价值。

二、毒物经胎盘转运

甲醛是常见的家居污染物,动物实验证实暴露于甲醛的小鼠均出现了生殖系统损害以及胎儿畸形^[19]和胎盘损伤^[20],人离体胎盘灌注模型实验证实,甲醛从母体侧经胎盘迅速转移至胎儿侧,通过与蛋白质、核酸、氨基酸等多种生物分子代谢并发生反应,引起 DNA-蛋白质交联,从而在胎盘和胎儿组织中积累,造成胎盘滋养细胞层出现氧化应激样反应,导致胎盘功能障碍^[21]。对羟基苯甲酸酯是一类广泛用于日常用品的防腐剂,存在潜在的内分泌干扰作用,孕期苯甲酸酯的暴露可能导致胎儿体重过度增长^[22],而体外胎盘实验则证实,不同种类苯甲酸酯以及不同浓度苯甲酸酯经胎盘转运时无明显运输动力学差异^[23],但其对胎儿的影响仍需进一步实验研究。草甘膦是众多除草剂的有效成分,既往也被认为是除草剂毒性的主要成分,但在离体胎盘模型实验中发现,以草甘膦为基础的复方农药比单独的草甘膦对胎盘循环和其完整性有更严重的损害,这些复方农药的配方里含有聚氧乙醇胺、多环芳烃或重金属等,这可能是其对胎盘毒性高于单独草甘膦的原因,这也解释了暴露于不含草甘膦的杀虫剂或其他环境污染物的孕妇亦出现不良妊娠结局的原因^[24]。因此,仅以草甘膦作为除草剂毒性所在的说法有待商榷。大量研究表明,空气污染与不良妊娠结局之间存在一定关联,但对于污染颗粒毒性背后机制以及是否能穿过胎盘进入胎儿循环仍未可知。Bongaerts 等^[25]利用离体胎盘灌注模型进行柴油尾气颗粒(diesel exhaust particles,DEPs)的转运和积累研究发现,经过 6 h 灌注后,DEPs 的胎母比值接近于零,在胎儿侧灌注液中没有检测到明显 DEPs 颗粒,但在胎盘组织,尤其是合体滋养层中,检测到大量 DEPs 颗粒蓄积,并在胎儿侧上皮细胞中检测到少量 DEPs 颗粒,表明其毒性作用主要是对胎盘功能影响,但该实验在胎儿侧上皮细胞检测到少量的 DEPs,故亦不排除其直接的胎儿毒性作用。氯氰菊酯、唑丙环唑、比特醇等农药中含有的化学物品^[26]、纳米级粒子^[27]等均可通过胎盘屏障进入胎儿循环。人离体胎盘灌注模型是一个有价值的研究环境污染对母胎影响的系统,值得在环境化学物质研究中得到越来越多关注。

三、建立疾病胎盘模型及研究相关疾病发生发展机制

妊娠合并症与并发症多通过影响胎盘功能从而影响胎儿的生长发育,建立体外的胎盘疾病模型有助于进一步研究的开展。子痫前期(preeclampsia,PE)是一种严重影响母胎安全的妊娠期高血压疾病,目前其发病机制被认为与孕早期胎盘浅着床以及孕中晚期胎盘氧化应激反应高度相关,建立 PE 的体外胎盘模型有助于更加透彻的研究其发病机制。对

健康离体胎盘组织进行缺氧灌注后发现,母体侧及胎儿侧不同炎症因子、氧化应激标志物,例如内皮素-1(ET-1)、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)均有不同水平的升高,很好的模拟了 PE 的胎盘炎症反应^[28];通过对比 PE 产妇及正常产妇离体胎盘的三维血管模型发现,PE 产妇胎盘血管床体积较正常产妇减少,1~3 级静脉和 2~3 级动脉管径变小,外周动静脉比增高,这可能是导致 PE 胎盘灌注不足的原因之一^[29]。PE 离体胎盘微囊泡结合的一氧化氮合酶(STBEV-eNOS)水平较低导致 NO 减少^[30],大电导钙激活钾通道(BKCA 通道)的表达下调^[17]都可能是导致胎盘血管收缩的原因。从 PE 离体胎盘分离的微囊泡(STBEV)能导致血小板的活化^[31],这可能是 PE 患者血液高凝的原因。妊娠期糖尿病可能导致早期流产、早产、胎儿生长受限、胎儿畸形、巨大儿等不良妊娠结局,在高糖灌注液模拟的妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus,GDM)胎盘模型中,发现胎儿血管阻力显著增加,同时检测到内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和蛋白激酶(Akt)磷酸化水平降低,这一结果提示高糖通过降低 NO 的生成,导致血管阻力升高^[32]。被疟原虫感染的红细胞表面表达恶性疟原虫红细胞膜蛋白 1(PfEMP1),介导细胞与内皮细胞、血小板、红细胞和合体滋养细胞的粘附,从而逃避循环和免疫,VAR2CSA 作为 PfEMP1 家族的一员,与硫酸软骨素 A(chondroitin sulfonic A,CSA)结合,从而在体外胎盘灌注模型中积累,其分布与自然感染相似,而可溶性 CSA 和抗 VAR2CSA 抗体抑制了感染红细胞的结合^[33],这一发现为胎盘疟疾疫苗的开发提供了新的研究方案。基于此,Pehrson 等^[34]在随后的研究中发现,一种脂质体制剂中的 ID1-ID2a 蛋白(目前处于 I 期试验)有效地诱导了抑制胎盘组织中感染红细胞粘附的抗体。在对胎儿生长受限(fetal growth restriction,FGR)胎盘的研究中发现,吡哆胺 2,3-双加氧酶-1(IDO1)的缺乏会导致色氨酸降解减少,其产生的免疫抑制及胎盘血管舒张作用减弱^[35],与 FGR 的发生密切相关^[36]。FGR 也可能与胎儿-胎盘血管反应性改变有关^[37],在对比正常胎盘与 FGR 胎盘离体条件下对前列腺素 E2(PGE2)的反应性的实验中发现,FGR 胎盘对 PGE2 反应性较正常组降低^[38],证实了上述可能。灌注液中加入牛磺胆酸则可建立妊娠期肝内胆汁淤积症(Intrahepatic cholestasis of pregnancy,ICP)模型^[39]。利用离体胎盘灌注模型还可建立更多疾病胎盘模型,以助于更好的进行相关疾病发生发展机制的研究。

四、研究相关治疗方案

针对妊娠期疾病的部分治疗措施在动物实验中有较好效果,但难以在人体直接开展实验进行验证,且相关治疗的机制亦有待明确。例如在 PE 和正常的离体胎盘灌注模型的母体灌流液中加入硫酸镁,PE 组可溶性 FMS 样酪氨酸激酶-1(sflt-1)浓度较正常对照组并未增加^[40],提示硫酸镁对子痫前期的治疗作用仅在于预防子痫,而与 PE 相关的抗血管生成状态无关。使用编码 VEGF 异构体的腺病毒(Ad)在

动物模型中转导子宫动脉可以增加子宫-胎盘血液灌注量 (utero-placental blood perfusion, UBF) 并改善胎儿在子宫内的生长^[41], 但应用于人体需验证其安全性, 在离体胎盘的实验中发现, 胎儿侧静脉灌注液中很少检测到病毒载体, 检测到病毒载体时滴度也非常低^[42], 这一结果为该治疗方法应用于人体提供了一定的依据。双胎输血综合征 (twin to twin transfusion syndrome, TTTS) 的治疗十分有限, 激光治疗是目前较好的办法, 利用离体胎盘灌注模型研究 TTTS 激光治疗时相关因素的影响可为治疗细节提供更多的指导^[43]。干细胞的移植是治疗妊娠期相关疾病的研究热点, 体外胎盘灌注模型是研究间充质干细胞的胎盘迁移和定植的良好工具, 将荧光标记的间充质干细胞注入离体胎盘灌注模型的血管, 从胎盘中将注射后的血管分离、培养、制作切片, 可见间充质干细胞穿过血管内皮屏障, 实验中同样发现, 穿过血管壁迁移的间充质干细胞仍在血管生态位内, 并不迁移至周围组织中, 相关机制有待进一步研究明确^[44]。

五、离体胎盘灌注的代谢

进入胎盘的物质并非均以原型进入胎儿循环, 胎盘的代谢功能对于物质经胎盘转运有一定影响。例如雌激素玉米赤霉烯酮 (zearalenone, ZEN) 进入胎盘后, 经代谢形成活性较高的雌激素及活性较低的 ZEN-14-硫酸盐结合物释放入母体和胎儿循环^[45]。皮质醇在胎盘中被 11 β -羟基类固醇脱氢酶 (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2, 11 β -HSD2) 快速代谢为可的松, 而皮质醇也会影响色氨酸在胎盘中的代谢^[46]。吡哆胺 2,3-双加氧酶-1 (IDO1) 是色氨酸 (TRP) 分解过程中的一种酶, 绒毛膜的血管内皮细胞和蜕膜螺旋动脉的内皮细胞有其定值。IDO1 介导的 TRP 在内皮细胞分解代谢可能产生抗菌活性和免疫抑制, 以及胎盘血管紧张的松弛, 从而促进胎盘灌注和胎盘及胎儿的生长。但胎盘中的 TRP 降解酶也会导致色氨酸的缺乏, 这两个过程的结合对建立和维持胎儿-母体免疫耐受具有重要意义^[36]。胎盘对于不同物质的代谢与其含有的特殊的酶及相关蛋白有关, 离体胎盘灌注模型可让研究者更彻底地研究胎盘的代谢功能。

综上所述, 离体胎盘灌注模型在研究疾病、药物、环境等对母胎的影响上有很高应用价值。其作为最接近生理条件的模型, 是用于研究胎盘功能最经典的方法, 但也存在一定的局限。例如实验中多采用的是妊娠晚期剖宫产或顺产的胎盘, 妊娠晚期随着妊娠进展, 胎盘功能逐渐减退, 实验得出相关结果难以完全代表妊娠早期的胎盘状况; 离体后的胎盘虽在接近于生理的条件下进行试验, 但在例如酶活性、转运体数量、胎盘组织在制备过程中缺血缺氧所致本身损伤等方面与体内均有一定差异。基于此, 近来有学者将离体胎盘灌注与数学建模相结合^[47], 进一步明确胎盘灌注系统的各种实验条件控制及相关影响因素, 这使得研究者可更加便利地模拟各种条件下胎盘功能的研究。尽管离体胎盘灌注存在一定不足, 但作为目前研究胎盘功能最经典的方法, 仍然是众多研究者的选择, 在今后的研究中, 可对影响离体胎盘

灌注的各项因素进行更深入的了解, 以提供更加接近体内环境的离体胎盘灌注模型。

参 考 文 献

- 1 Panigel M, Pascaud M, Brun JL. Radioangiographic study of circulation in the villi and intervillous space of isolated human placental cotyledon kept viable by perfusion. *J Physiol (Paris)*, 1967, 59:277.
- 2 Schneider H, Panigel M, Dancis J. Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium and leucine. *Am J Obstet Gynecol*, 1972, 114:822-828.
- 3 Miller RK, Wier PJ, Maulik D, et al. Human placenta in vitro: characterization during 12 h of dual perfusion. *Contrib Gynecol Obstet*, 1985, 13:77-84.
- 4 Mathiesen L, Mose T, Mørck TJ, et al. Quality assessment of a placental perfusion protocol. *Reprod Toxicol*, 2010, 30:138-146.
- 5 Gendron MP, Martin B, Oraichi D, et al. Health care providers' requests to teratogen information services on medication use during pregnancy and lactation. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009, 65:523-531.
- 6 De Sousa Mendes M, Hirt D, Vinot C, et al. Prediction of human fetal pharmacokinetics using ex vivo human placenta perfusion studies and physiologically based models. *Br J Clin Pharmacol*, 2016, 81:646-657.
- 7 Liu XI, Momper JD, Rakhmanina N, et al. Physiologically based pharmacokinetic models to predict maternal pharmacokinetics and fetal exposure to emtricitabine and acyclovir. *J Clin Pharmacol*, 2020, 60:240-255.
- 8 Zheng Q, Zhou Q, Li J, et al. Placental transfer of bromocriptine in an ex vivo human placental perfusion model. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2019, 32:1155-1159.
- 9 Lee N, Hebert MF, Wagner DJ, et al. Organic cation transporter 3 facilitates fetal exposure to metformin during pregnancy. *Mol Pharmacol*, 2018, 94:1125-1131.
- 10 Kurosawa K, Chiba K, Noguchi S, et al. Development of a pharmacokinetic model of transplacental transfer of metformin to predict in vivo fetal exposure. *Drug Metab Dispos*, 2020, 48:1293-1302.
- 11 Freriksen JJM, Schalkwijk S, Colbers AP, et al. Assessment of maternal and fetal dolutegravir exposure by integrating ex vivo placental perfusion data and physiologically-based pharmacokinetic modeling. *Clin Pharmacol Ther*, 2020, 107:1352-1361.
- 12 Hutson JR, Garcia-Bournissen F, Davis A, et al. The human placental perfusion model: a systematic review and development of a model to predict in vivo transfer of therapeutic drugs. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 90:67-76.
- 13 Hnat MD, Gainer J, Bawdon RE, et al. Transplacental passage of vancomycin in the ex vivo human perfusion model. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2004, 12:57-61.
- 14 Holmes HJ, Casey BM, Bawdon RE. Placental transfer of rosiglitazone in the ex vivo human perfusion model. *Am J Obstet Gynecol*, 2006, 195:1715-1719.
- 15 Holcberg G, Tsadkin-Tamir M, Sapir O, et al. Transfer of insulin lispro across the human placenta. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*,

- 2004,115:117-118.
- 16 Nathan NO, Hedegaard M, Karlsson G, et al. Intrapartum transfer of oxytocin across the human placenta: An ex vivo perfusion experiment. *Placenta*,2021,112:105-110.
- 17 Davis EF, Lazdam M, Lewandowski AJ, et al. Cardiovascular risk factors in children and young adults born to preeclamptic pregnancies: a systematic review. *Pediatrics*,2012,129:e1552-e1561.
- 18 Hawkes N. Trial of viagra for fetal growth restriction is halted after baby deaths. *BMJ*,2018,362:k3247.
- 19 Duong A, Steinmaus C, McHale CM, et al. Reproductive and developmental toxicity of formaldehyde: a systematic review. *Mutat Res*,2011,728:118-138.
- 20 Monfared AL. Histomorphological and ultrastructural changes of the placenta in mice exposed to formaldehyde. *Toxicol Ind Health*,2014,30:174-181.
- 21 Pidoux G, Gerbaud P, Guibourdenche J, et al. Formaldehyde crosses the human placenta and affects human trophoblast differentiation and hormonal functions. *Plos One*,2015,10:e0133506.
- 22 Leppert B, Strunz S, Seiwert B et al. Maternal paraben exposure triggers childhood overweight development. *Nat Commun*, 2020, 11:561.
- 23 Andersen MHG, Zuri G, Knudsen LE, et al. Placental transport of parabens studied using an *ex-vivo* human perfusion model. *Placenta*, 2021,115:121-128.
- 24 Simasotchi C, Chissey A, Jungers G, et al. A glyphosate-based formulation but not glyphosate alone alters human placental integrity. *Toxics*,2021,9:220.
- 25 Bongaerts E, Aengenheister L, Dugershaw BB, et al. Label-free detection of uptake, accumulation, and translocation of diesel exhaust particles in ex vivo perfused human placenta. *J Nanobiotechnology*, 2021,19:144.
- 26 Mathiesen L, Mørck TA, Poulsen MS, et al. Placental transfer of pesticides studied in human placental perfusion. *Basic Clin pharmacol Toxicol*,2020,127:505-515.
- 27 Aengenheister L, Favaro RR, Morales-Prieto DM, et al. Research on nanoparticles in human perfused placenta: State of the art and perspectives. *Placenta*,2021,104:199-207.
- 28 Jain A, Schneider H, Aliyev E, et al. Hypoxic treatment of human dual placental perfusion induces a preeclampsia-like inflammatory response. *Lab Invest*,2014,94:873-880.
- 29 Yin G, Chen M, Li J, et al. Vascular corrosion casting of normal and pre-eclamptic placentas. *Exp Ther Med*,2017,14:5535-5539.
- 30 Motta-Mejia C, Kandzija N, Zhang W, et al. Placental vesicles carry active endothelial nitric oxide synthase and their activity is reduced in preeclampsia. *Hypertension*,2017,70:372-381.
- 31 Tannetta DS, Hunt K, Jones CI, et al. Syncytiotrophoblast extracellular vesicles from pre-eclampsia placentas differentially affect platelet function. *PLoS One*,2015,10:e0142538.
- 32 Reed LC, Estrada SM, Walton RB, et al. Evaluating maternal hyperglycemic exposure and fetal placental arterial dysfunction in a dual cotyledon, dual perfusion model. *Placenta*,2018,69:109-116.
- 33 Pehrson C, Mathiesen L, Heno KK, et al. Adhesion of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes in ex vivo perfused placental tissue: a novel model of placental malaria. *Malaria J*,2016,15:292.
- 34 Pehrson C, Heno KK, Adams Y, et al. Comparison of functional assays used in the clinical development of a placental malaria vaccine. *Vaccine*,2017,35:610-618.
- 35 Sedlmayr P, Blaschitz A, and Stocker R. The role of placental tryptophan catabolism. *Front Immunol*,2014,5:230.
- 36 Zardoya-Laguardia P, Blaschitz A, Hirschmugl B, et al. Endothelial indoleamine 2,3-dioxygenase-1 regulates the placental vascular tone and is deficient in intrauterine growth restriction and pre-eclampsia. *Sci Rep*,2018,8:5488.
- 37 Mills TA, Wareing M, Bugg GJ, et al. Chorionic plate artery function and Doppler indices in normal pregnancy and intrauterine growth restriction. *Eur J Clin Invest*,2005,35:758-764.
- 38 Luria O, Bar J, Barnea O, et al. Reactivity of blood vessels in response to prostaglandin E₂ in placentas from pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Prenat Diagn*, 2012, 32: 417-422.
- 39 Dolinsky BM, Zelig CM, Paonessa DJ, et al. Effect of taurocholic acid on fetoplacental arterial pressures in a dual perfusion placental cotyledon model: a novel approach to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Reprod Med*,2014,59:367-370.
- 40 Eshkoli T, Holcberg G, Bronfenmacher B, et al. Perfusion with magnesium sulfate increases sFlt-1 secretion only in the fetal side of placenta of women with preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2013,26:116-122.
- 41 David AL, Torondel B, Zachary I, et al. Local delivery of VEGF adenovirus to the uterine artery increases vasorelaxation and uterine blood flow in the pregnant sheep. *Gene Ther*,2008,15:1344-1350.
- 42 Desforges M, Rogue A, Pearson N, et al. In vitro human placental studies to support adenovirus-mediated VEGF-D ($\Delta N^A C$) maternal gene therapy for the treatment of severe early-onset fetal growth restriction. *Hum Gene Ther Clin Dev*,2018,29:10-23.
- 43 Akkermans J, van der Donk L, Peeters SHP, et al. Impact of laser power and firing angle on coagulation efficiency in laser treatment for twin-twin transfusion syndrome: an ex vivo placenta study. *Fetal Diagn Ther*,2017,42:204-209.
- 44 Al-Sowayan B, Keogh RJ, Abumaree M, et al. An ex vivo human placental vessel perfusion method to study mesenchymal stem/stromal cell migration. *Stem Cell Investig*,2019,6:2.
- 45 Warth B, Preindl K, Manser P, et al. Transfer and metabolism of the xenoestrogen zearalenone in human perfused placenta. *Environ Health Perspect*,2019,127:107004.
- 46 Mathiesen L, Bay-Richter C, Wegener G, et al. Maternal stress and placental function; ex vivo placental perfusion studying cortisol, cortisone, tryptophan and serotonin. *PLoS One*,2020,15:e0233979.
- 47 Lewis RM, Cleal JK, Sengers BG. Placental perfusion and mathematical modelling. *Placenta*,2020,93:43-48.