

# Magnesium-induzierte Apoptose im Trophoblasten

Von der Medizinischen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Patrick Hamid Alizai

aus

Düren

Berichter: Herr Universitätsprofessor  
Dr. rer. nat. Berthold Huppertz

Herr Universitätsprofessor  
Dr. med. Nikolaus Gaßler

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2009

***Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek  
online verfügbar.***

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	AUFBAU UND FUNKTION DER PLAZENTA	1
1.1.1	ENTWICKLUNG DER PLAZENTA	2
1.1.2	MAKROSKOPISCHER AUFBAU	3
1.1.3	MIKROSKOPISCHER AUFBAU	3
1.1.4	FUNKTION DER PLAZENTA	5
1.1.5	TURNOVER DES TROPHOBLASTEN	6
1.2	APOPTOSE	9
1.3	VISUALISIERUNG DER APOPTOSE	13
1.4	PRÄEKLAMPSIE	17
1.5	PATHOPHYSIOLOGIE DER PRÄEKLAMPSIE	21
1.6	MAGNESIUM IN DER SCHWANGERSCHAFT	28
1.6.1	MAGNESIUM-METABOLISMUS	28
1.6.2	MAGNESIUM UND PRÄEKLAMPSIE	29
1.7	FRAGESTELLUNG	33
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>34</b>
2.1	HERSTELLUNG DER MEDIEN	39
2.2	INKUBATION DER ZOTTEN-EXPLANTATE	40
2.3	AUFBEREITUNG	41
2.4	PROTEINANALYTISCHE METHODEN	42
2.4.1	PROBENVORBEREITUNG	42
2.4.2	PROTEINQUANTIFIZIERUNG	42
2.4.3	PROBENPUFFER	43

2.4.4	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	44
2.4.5	WESTERN-BLOT	45
2.5	DNA-GELELEKTROPHORESE	47
2.5.1	PROBENVORBEREITUNG	47
2.5.2	DNA-GELELEKTROPHORESE	48
2.6	HISTOLOGIE	48
2.6.1	PARAFFINEINBETTUNG	48
2.6.2	HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG	49
2.6.3	IMMUNHISTOCHEMIE	49
2.6.4	TUNEL-TEST	51
2.6.5	LICHTMIKROSKOPIE	52
3	ERGEBNISSE	53
3.1	KULTURMEDIUM	53
3.2	GESTATIONSSALTER	55
3.3	MAGNESIUMKONZENTRATION	57
3.3.1	ZOTTEN-EXPLANTATE	58
3.3.2	KONDITIONIERTES MEDIUM	63
3.4	INKUBATIONSDAUER	68
4	DISKUSSION	70
4.1	MAGNESIUM-INDUZIERTE APOPTOSE IM TROPHOBLASTEN	70
4.1.1	ZOTTEN-EXPLANTAT-MODELL	70

4.1.2 KONZENTRATIONSABHÄNGIGE APOPTOSE	73
4.1.3 ZEITABHÄNGIGE APOPTOSE	78
4.1.4 MAGNESIUM-INDUZIERTER APOPTOSE	79
4.2 PRÄEKLAMPSIE – VON DER PLAZENTADYSFUNKTION ZUM MATERNALEN SYNDROM	82
4.2.1 PLAZENTADYSFUNKTION	82
4.2.2 AUF DER SUCHE NACH DEM „MISSING LINK“	83
4.2.3 DAS MATERNALE SYNDROM	87
4.3 MAGNESIUM IN DER SCHWANGERSCHAFT -EIN ZWEISCHNEIDIGES SCHWERT	89
5 ZUSAMMENFASSUNG	93
6 LITERATURVERZEICHNIS	94
7 ANHANG	120
8 LEBENSLAUF	

# **1 EINLEITUNG**

Seit Jahren werden Risiken und Nutzen der Magnesiumtherapie in der Schwangerschaft kontrovers diskutiert. Die Standpunkte vehementerer Befürworter und rigoroser Kritiker scheinen sich in einer Debatte, die nicht immer sachlich und Evidenz-basiert erfolgt, unversöhnlich gegenüber zu stehen. Besonders der Einsatz des Magnesiums bei der Präeklampsie ist trotz zahlreicher klinischer Studien umstritten. Dabei stellt Präeklampsie nach wie vor eine der führenden Ursachen für maternale und fetale Morbidität und Mortalität in der Schwangerschaft dar. Und trotz intensiver Forschung konnten Ätiologie und Pathogenese bisher nicht vollständig geklärt werden. Unstrittig dagegen ist die Notwendigkeit der Plazenta bei der Entstehung dieser Erkrankung. Um einige Hypothesen zu pathophysiologischen Mechanismen im Rahmen der Präeklampsie zu testen, wurde in Aachen ein Zottenexplantat-Kulturmodell entwickelt. Dieses Modell gewährt neue Einblicke in die In-vitro-Wirkung des Magnesiums auf die Plazenta. Ein Teilbereich der Experimente und die Ergebnisse sind im Rahmen dieser Dissertation erarbeitet worden.

## **1.1 AUFBAU UND FUNKTION DER PLAZENTA**

Die Plazenta ist eine Verwachsung extra-embryonaler Gewebe mit der Uterusschleimhaut, die dem Stoffaustausch dient, den Embryo in einer flüssigkeitsgefüllten Blase umhüllt und Hormone sezerniert. In der Plazenta verlaufen zwei parallel angeordnete Kreisläufe, der der Mutter und der des Embryos, die von placentarem Gewebe vollständig getrennt werden. Die folgenden Ausführungen zu Aufbau und Funktion der Plazenta basieren auf den Erkenntnissen von Kaufmann (1993) sowie Benirschke und Kaufmann (2000).

### 1.1.1 ENTWICKLUNG DER PLAZENTA

Die Implantation der Blastozyste beginnt am 6.-7. Tag nach der Befruchtung, meistens am oberen Teil der uterinen Korpshinterwand. Sie besteht zu diesem Zeitpunkt aus einer einschichtigen Zellschicht, dem Trophoblasten, einem flüssigkeitsgefüllten Hohlraum, der Blastozystenöhle (Blastozöel), und einem innen liegenden Zellhaufen, dem Embryoblasten. Noch vor der Invasion in die Uteruswand verschmelzen Trophoblastzellen zum Synzytiotrophoblast, der durch kontinuierliche Proliferation und Fusion seiner Stammzellen an Masse zunimmt. Mithilfe dieses Synzytiotrophoblasten dringt die Blastozyste in das Endometrium ein. Am 12. Tag ist die Implantation nach vollständiger Invasion der Blastozyste in das Endometrium abgeschlossen. Innerhalb des Synzytiotrophoblasten bilden sich membranumgebene Hohlräume aus, die zu einem verzweigten Lakunensystem konfluieren. Die zwischen den Lakunen verbleibenden Anteile des Synzytiotrophoblasten bilden Trabekel, Vorläufer der Stamm- und Haftzotten der reifen Plazenta.

Mit der Proliferation und dem Eindringen von Zytotrophoblasten in die Trabekel beginnt die Entwicklung der Primärzotten, das Lakunensystem wird jetzt als intervillöser Raum bezeichnet. Extraembryonale Mesenchymzellen dringen ab dem 15. Tag von der Chorionplatte her in die Zotten ein (Sekundärzotten), die nun aus einem mesenchymalen Kern, einer Zellschicht Zytotrophoblast und außen aus dem Synzytiotrophoblast bestehen.

Am Ende der dritten Woche entstehen im Zottenmesenchym hämangiogenetische Zellnester, die sich zu plazentaren Kapillaren und plazentaren Blutzellen differenzieren (Tertiärzotte). Dieses Kapillarsystem tritt um den 28. Tag über den Haftstiel in Kontakt mit Gefäßen des Embryos und schafft so die embryonale Durchblutung der Plazenta.

### **1.1.2 MAKROSKOPISCHER AUFBAU**

Die Plazenta ist scheibenförmig, misst ca. 20 cm im Durchmesser und 3 cm in der Dicke und wiegt 500-700 g. Die fetale Oberfläche wird von der Chorionplatte gebildet. Hier verlaufen eine große Anzahl von Arterien und Venen, die gegen die Nabelschnur hin konvergieren. Das Chorion ist zur Amnionhöhle hin vom Amnionepithel überzogen. Amnion und Fetus produzieren und resorbieren das Fruchtwasser und tragen zu dessen kontinuierlicher Erneuerung bei. Die mütterliche Seite, Basalplatte, besteht aus dem invasivem Trophoblast, Deziduazellen und Fibrinoid. Sie wird von Spiralarterien und Venen durchzogen, die in den intervillösen Raum münden. An der Lösungsfläche der Plazenta lassen sich 10 bis 40 leicht erhabene Lobuli (Kotyledonen) erkennen, die dazwischen liegenden Furchen entsprechen den Plazentasepten im Inneren. Ein Kotyledon enthält ein bis vier Zottenbäumchen. Am Rand der Plazenta verschmelzen Chorionplatte und Basalplatte zum Chorion laeve, das das Fruchtwasser als Fruchtblase umhüllt.

### **1.1.3 MIKROSKOPISCHER AUFBAU**

In der reifen Plazenta verzweigen sich 40 bis 60 Zottenbäume, die im intervillösen Raum vom maternalen Blut umspült werden. Die Basis der Zottenstämme ist kaliberstark und dient der mechanischen Stabilität, dem Längenwachstum und der Durchblutungsregulation. Die Terminalzotten sind der eigentliche Ort des Stoffaustauschs und der Synthese von Hormonen. Eine mehrschichtige Plazentaschranke trennt die fetalen Gefäße in den Zotten vom intervillösen Raum. Der Synzytiotrophoblast bedeckt als Synzytium die Zotten von außen und stellt damit den wichtigsten Bestandteil der Plazentaschranke dar. Er ist an allen maternofetalen wie auch fetomaternalen Transportprozessen beteiligt und sezerniert die Mehrzahl der placentaren Hormone. Darunter folgt eine zunächst geschlossene, im späteren Verlauf der Schwangerschaft lockere Lage von Zytotrophoblasten (LANGHANS-Zellen). Diese Zellen fungieren als Stammzellen, sie fusionieren mit dem Synzytiotrophoblast

und tragen zu dessen Wachstum und Regeneration bei. Außerdem erfolgt in den Zytotrophoblasten die Produktion von Somatostatin, das die Hormonproduktion im Synzytiotrophoblast reguliert. Der Trophoblast sitzt einer Basalmembran auf, die ihn von dem folgenden Zottenstroma abgrenzt. Im Zottenstroma finden sich Fibroblasten, die Kollagenfasern und eine Proteoglykan-reiche Grundsubstanz sezernieren und somit für ausreichende Stabilität der Zottenbäume sorgen. Im Zottenbindegewebe liegen vereinzelt Makrophagen (HOFBAUER-Zellen), die materno-fetale Transportprozesse, insbesondere den Proteintransport, kontrollieren und durch Zytokine Wachstum und Differenzierung der Zotten steuern. Das Endothel der Kapillaren und Sinusoide stellt als passiver Filter für Moleküle über 40000 Dalton die innerste Lage der Plazentaschranke dar. Im letzten Trimenon sind die Kapillaren von einer Basalmembran umkleidet. Im Bereich der Terminalzotten, dem eigentlichen Ort des Stoffaustausches, sind Zytotrophoblasten sowie Zottenstroma nicht Bestandteil der Plazentaschranke und die Basalmembranen von Trophoblasten und Kapillaren sind zu einer gemeinsamen Basalmembran verschmolzen.



**Abb. 1.1** Terminalzotte einer reifen Plazenta. Links: Transmissionselektronenmikroskopischer Querschnitt. SI: Sinusoid, S: Synzytiotrophoblast, CT: Zytotrophoblast, C: Kapillare, H: Hofbauer-Zelle, R: ortsständige Bindegewebszelle. (Original: Prof. Kaufmann, Aachen) Rechts: Phasenkontrastmikroskopie (Original: Dr. Black, Aachen)

Die Schichten der Plazentabarriere sind im Laufe der Schwangerschaft quantitativen Veränderungen unterworfen. So nimmt die Diffusionsstrecke



durch Kaliberreduktion der Zotten und Dilatation der Kapillaren von 100  $\mu\text{m}$  in der 5. Woche pc auf 4-5  $\mu\text{m}$  gegen Ende der Schwangerschaft ab. Die zum Stoffaustausch zur Verfügung stehende Oberfläche vergrößert sich währenddessen kontinuierlich auf beträchtliche 12 bis 14  $\text{m}^2$  zum Zeitpunkt der Geburt.

### 1.1.4 FUNKTION DER PLAZENTA

Die Plazenta dient der Ernährung des Feten und der Produktion von Hormonen. Dabei erbringen die Terminalzotten den Großteil der Transport-, Synthese- und endokrinen Leistungen. Sie gewährleisten den Gasaustausch von Kohlendioxid und Sauerstoff, den Transport von Nährstoffen und die Exkretion von Stoffwechselendprodukten und Wasser.

Synzytiotrophoblast	Zytotrophoblast
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gasaustausch von <math>\text{O}_2</math>, <math>\text{CO}_2</math></li> <li>- Transport von Glukose, Aminosäuren, Laktat, Harnstoff und Elektrolyten</li> <li>- Resorption von Vitamin <math>\text{B}_2</math>, <math>\text{B}_{12}</math>, C</li> <li>- Transzytose von IgG</li> <li>- Produktion von <math>\beta\text{hCG}</math>, hPL, Progesteron und Östrogenen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stammzellfunktion</li> <li>- Produktion von Somatostatin und <math>\alpha\text{HCG}</math></li> </ul>

**Tab. 1.1** Leistungen der Plazenta (Auswahl)

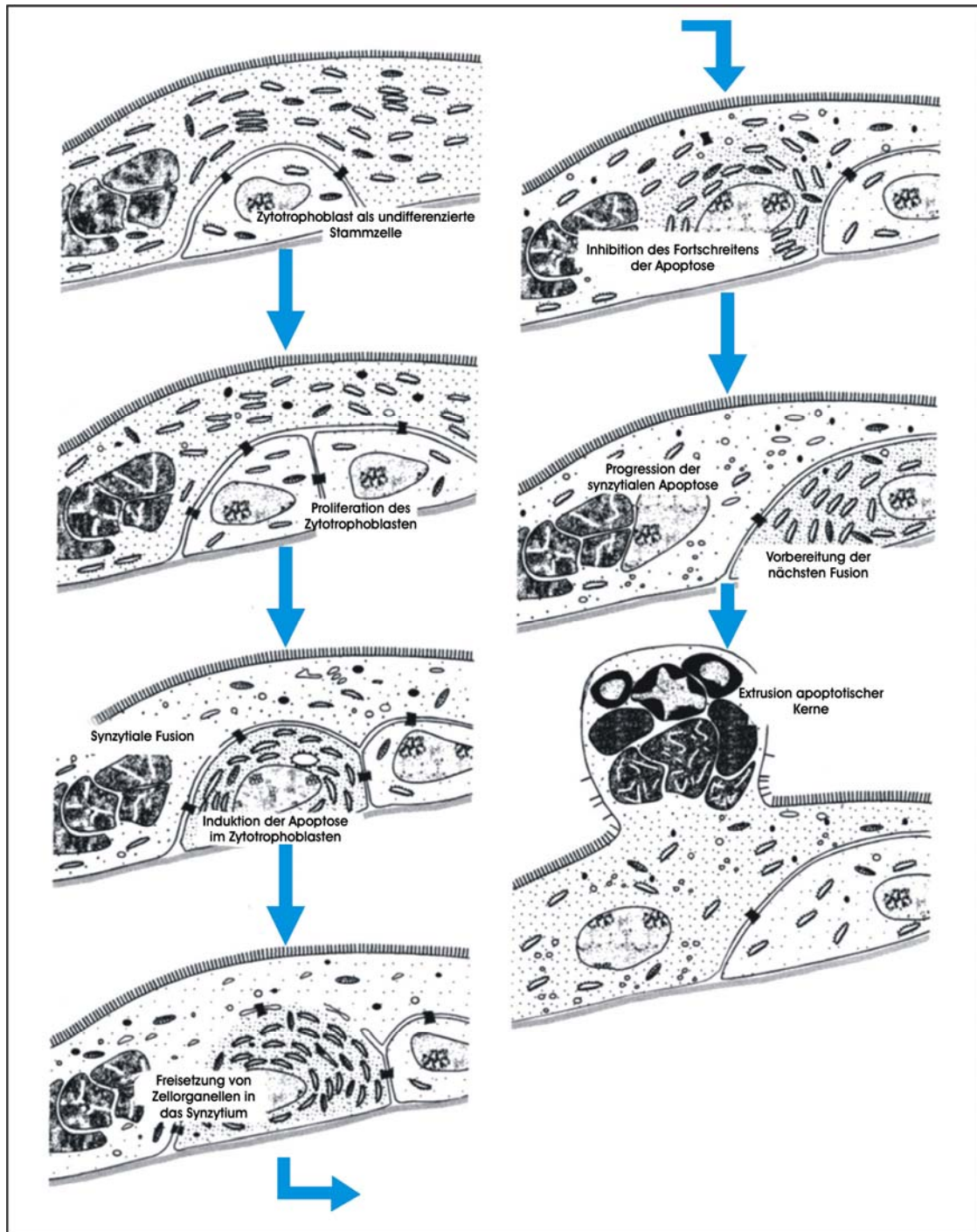
Die in der Plazenta produzierten und sezernierten Hormone haben vor allem das Ziel, die Schwangerschaft zu erhalten. Zu den wichtigsten zählen humanes Chorion-Gonadotropin (hCG), Plazenta-Laktogen (hPL) sowie Progesteron und Östrogene. Der transplazentare Transport von IgG spielt eine wichtige Rolle bei der passiven Immunisierung des Feten. Ferner steht die Plazenta im Dienste der Wärmeregulation und ist Blutbildungsstätte in der Frühschwangerschaft.

### 1.1.5 TURNOVER DES TROPHOBLASTEN

Der villöse Trophoblast stellt den epithelialen Überzug der Zotten in der humanen Plazenta dar. Als fetale Oberfläche der Plazenta findet an ihm der Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind statt und zugleich trennt er maternales und fetales Kompartiment in der Plazenta. Er besteht aus dem Zytotrophoblasten, einer im ersten Trimenon noch zusammenhängenden Lage proliferierender Stammzellen, und dem multinukleären Synzytiotrophoblasten. Der Synzytiotrophoblast ist morphologisch inhomogen und unterscheidet sich hinsichtlich Dicke, Kernreichtum und Organellenbestand. Bezeichnend für den Synzytiotrophoblast sind die Unfähigkeit zur Zellteilung und DNA-Synthese und das nur geringe Ausmaß an RNA-Synthese (Huppertz *et al.* 1999). Seine Aufrechterhaltung und sein Wachstum hängen von der kontinuierlichen synzytialen Fusion des Zytotrophoblasten mit dem Synzytium ab (Benirschke und Kaufmann 2000). Der Zytotrophoblast, Stammzelle des villösen Trophoblasten, ist durch die Präsenz zahlreicher Zellorganellen wie Golgi-Apparat, Mitochondrien, raues Endoplasmatisches Retikulum und Polyribosomen sowie einem großen Zellkern charakterisiert. Der Erhalt der Homöostase des Synzytiotrophoblasten erfolgt durch kontinuierliche Abgabe von überaltertem Zellmaterial auf der maternalen Blutseite. Dieses durchläuft zunächst Stadien der Apoptose und wird dann in Ausstülpungen der apikalen Plasmamembran des Synzytiotrophoblasten eingepackt (Huppertz und Kingdom 2004). Die Ausstülpungen, Synzytialknoten genannt, schnüren sich von der apikalen Membran ab und treten in den maternalen Kreislauf über. Dort sind sie in uterinen Venen und in pulmonalen Kapillaren nachweisbar (Johansen *et al.* 1999). Proliferation des Zytotrophoblasten, Differenzierung, synzytiale Fusion, sowie anschließende Apoptose und Extrusion des apoptotischen Materials wird zusammenfassend als „Turnover“ des villösen Trophoblasten bezeichnet (Huppertz *et al.* 2002).

Der vollständige Turnover, von der Differenzierung bis zum Einpacken des apoptotischen Kerns in einen Synzytialknoten dauert ca. drei bis vier Wochen

(Huppertz et al. 2002). Gegen Ende der Schwangerschaft werden so einige Gramm trophoblastären Materials pro Tag in den maternalen Kreislauf abgegeben (Huppertz et al. 2002). Ein gesteigerter Turnover ist mit zahlreichen Erkrankungen in der Schwangerschaft assoziiert und findet sich u.a. bei fetaler Wachstumsretardierung (Smith et al. 1997; Erel et al. 2001), Präeklampsie (Allaire et al. 2000; Leung et al. 2001), vorzeitiger Plazentalösung (Nakatsuka et al. 1999) und Chorioamnionitis (Nakatsuka et al. 1999). Die pathophysiologische Bedeutung eines erhöhten Turnovers für die Entstehung einer Präeklampsie wird in Abschnitt 1.5 näher erörtert.



**Abb. 1.2** Turnover des villösen Trophoblasten (aus Benirschke und Kaufmann 2000)

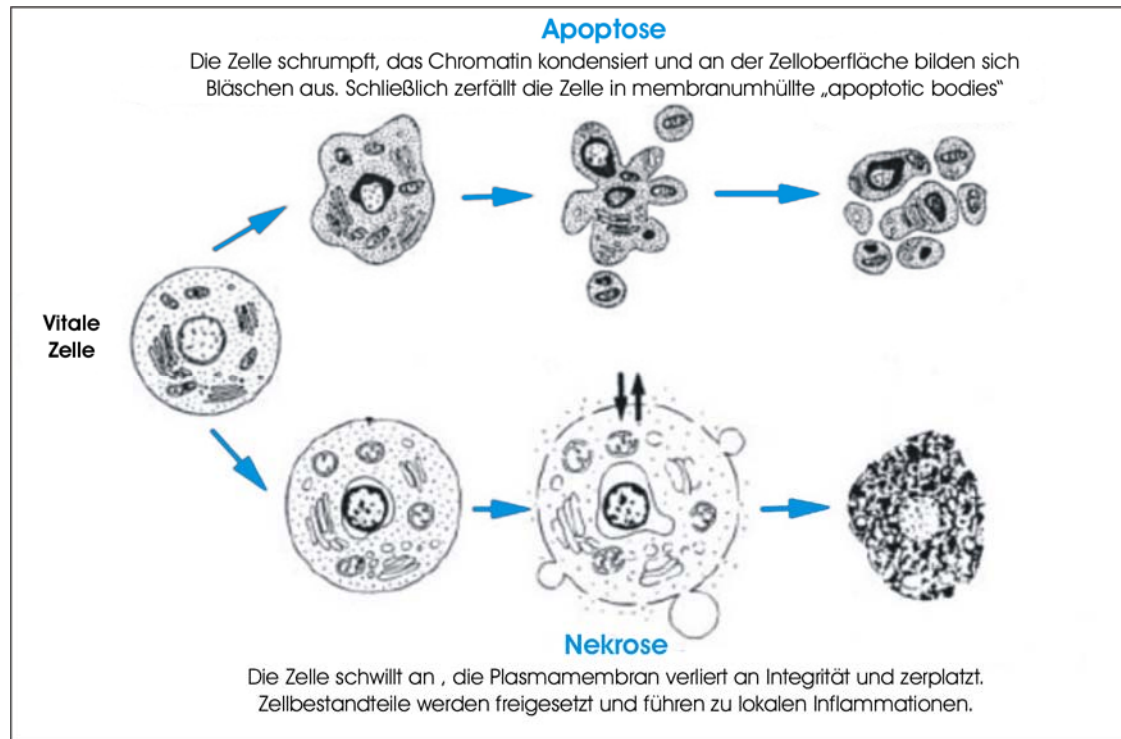
## 1.2 APOPTOSE

Apoptose wurde erstmals 1842 von Carl Vogt beschrieben, geriet dann zunächst in Vergessenheit. Es sollte bis 1972 dauern, ehe sich Kerr et al. der intensiven Erforschung der Apoptose widmeten und den Begriff Apoptose, aus dem Griechischen für „das Abfallen“, „der Niedergang“, einführten. In Abgrenzung vom akzidentellen Zelltod, der Nekrose, meint Apoptose den programmierten bzw. aktivierten Tod einer Zelle in einem mehrzelligen Organismus. Mittlerweile konnten Leist und Jaattela (2001) auch andere Formen des programmierten Zelltodes nachweisen, so dass der Begriff Apoptose im engeren Sinne für einen Prozess Verwendung findet, bei dem spezifische intrazelluläre Proteasen, sog. Caspasen, aktiviert werden.

Nekrose und Apoptose unterscheiden sich sowohl in den Mechanismen der Induktion als auch in den dann folgenden Prozessen. Die Nekrose ist Folge einer irreversiblen Schädigung durch chemische, physikalische oder biologische Noxen und führt über eine Schwellung der Zelle zu deren Zerfall. Sie bedient sich keiner geregelten Mechanismen zum Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren. Vielmehr wird der Zellinhalt, u.a. Zellorganellen, lysosomale Enzyme und Komplement-Proteine, unverändert und nicht membrangebunden freigesetzt. Makrophagen und neutrophile Granulozyten wandern ein, phagozytieren das nekrotische Gewebe und sezernieren proinflammatorische Mediatoren. Es resultiert eine lokale Entzündungsreaktion, mit dem Ziel, potentiell gefährliche Moleküle und Zellbestandteile zu eliminieren (Searle et al. 1982).

Apoptose hingegen ist ein energieabhängiger biologischer Prozess und benötigt ausreichend Zeit zum vollständigen Ablauf der Apoptose-Kaskade (Cotter et al. 1990). Die Membranintegrität bleibt dabei weitgehend erhalten und verhindert so eine Entzündungsreaktion der Umgebung. Apoptose ist ein unabdingbarer physiologischer Vorgang, der eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Erhaltung eines mehrzelligen Organismus spielt und zum Gleichgewicht zwischen Proliferation und Zelltod beiträgt. Als plastisches

Beispiel für den apoptotischen Untergang von Zellen in der Ontogenese mag der massive Zelltod im interdigitalen Weichteilgewebe (*Zuzarte-Luis und Hurle 2002*) dienen. Andere bekannte Beispiele sind die Entwicklung der Reproduktionsorgane (*Meier et al. 2000*) oder des Gehirns. So geht ca. ein Drittel der anfangs angelegten Neurone durch apoptotischen Zelltod unter (*Hutchins und Barger 1998*).



**Abb. 1.3** Schematische Darstellung von Apoptose und Nekrose  
(nach van Cruchten und van den Broeck 2002)

Bekannte Mechanismen zur Induktion der Apoptose sind die Bindung spezifischer Liganden, wie  $\text{TNF}\alpha$  an den Rezeptor  $\text{TNF-R1}$  oder  $\text{FasL}$  an seinen Rezeptor  $\text{Fas}$ , das die Bildung eines death-inducing signalling complex (DISC) zur Folge hat (*Kischkel et al. 1995*). Weitere Auslöser können das genetische Programm einer Zelle, die Trennung von der extrazellulären Matrix oder zytotoxische Lymphozyten sein. Die dabei initiierte Kaskade von sich nacheinander aktivierenden Proteasen erfolgt in drei Stadien.

**Initiationsstadium.** Zunächst aktiviert der DISC Initiator-Caspasen, die im Zytoplasma als inaktive Proform vorliegen, z.B. Caspase 8 (*Fraser und Evan 1996*). Diese bewirken u.a. die Degradation der Flippasen, den ersten Abbau

des Zytoskeletts und die Aktivierung der Exekutionscaspasen. Die Flippasen holen spontan in die äußere Plasmalemm-Schicht flippende Phosphatidylserin-Moleküle in die innere Schicht zurück. Die Hemmung dieser Enzyme bewirkt die Anreicherung von Phosphatidylserin in der äußeren Plasmalemm-Schicht (*Martin et al. 1995*). Dies lockt Makrophagen an (*Savill 1998*), aktiviert die Blutgerinnung (*Bevers et al. 1996*) oder führt zur Bildung von Synzytien, wie dem Synzytiotrophoblasten (*Huppertz et al. 1998*). Der Abbau des Zytoskeletts und damit verbundener Proteine, wie Vimentin (*van Engeland et al. 1997*), Aktin (*Kayalar et al. 1996*) und Fodrin (*Greidinger et al. 1996*) führt zu der charakteristischen Bläschenbildung (Blebbing) an der Zelloberfläche (*McCarthy et al. 1997*).

**Exekutionsstadium.** Die Aktivierung von Exekutionscaspasen, z.B. Caspase 3, bewirkt dann irreversible Veränderungen an Zelle und Zellkern. Dazu zählen der Abbau von Lamin A und B (*Greidinger et al. 1996*), die Spaltung von DNA-Reparatur-Enzymen, wie poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) (*Tewari et al. 1995*) und die Aktivierung von Endonukleasen (*Liu et al. 1997*). PARP bindet spezifisch an DNA-Strangbrüche und erleichtert deren Reparatur. Ferner spalten Caspasen zytoplasmatische und membrangebundene Proteine, wie das Intermediärfilament Zytokeratin 18, und führen so zum weiteren Abbau des Zytoskeletts (*Caulin et al. 1997*).

**Apoptotischer Zelltod.** Die Transkription wird herunterreguliert, die DNA fragmentiert und kondensiert, Zellkern und Zelle schrumpfen (*Huppertz et al. 1999*). Auch in diesem Stadium bleibt die Integrität der Plasmamembran erhalten und intrazelluläre Komponenten werden nicht freigesetzt. Schließlich zerfällt die Zelle in membranumhüllte Apoptose-Körper (*Kerr et al. 1995*), die von Makrophagen abgeräumt werden und so keine lokale Entzündung induzieren.

Die hier dargestellte Apoptose-Kaskade läuft nicht in allen Zellen gleichermaßen ab. So kann die Kaskade zwischenzeitlich unterbrochen und der apoptotische Tod Tage und Wochen hinausgeschoben werden. Dies

geschieht u.a. durch mitochondriale Proteine der Bcl-2-Familie, die die Aktivierung der Exekutionscaspasen hemmen, ein Mechanismus der in vielen Zellen für bestimmte Schritte der Differenzierung genutzt wird (*Hengartner 1997*). Die enge Verknüpfung von Anfangsstadien der Apoptose mit der Differenzierung von Zellen und Geweben zeigt sich u.a. darin, dass beide Prozesse unter Beteiligung von Caspasen (*Ishizaki et al. 1998*) und Bildung TUNEL-positiver DNA-Fragmente (*Morioka et al. 1998*) ablaufen können. Der Phosphatidylserin-Flip von der inneren zur äußeren Schicht des Plasmalemmes ist nicht nur Kennzeichen der Apoptose, sondern auch an der Entstehung von Synzytien beteiligt (*Lyden et al. 1993*). Huppertz et al. (1998) konnten diesen Mechanismus auch bei der Bildung des Synzytiotrophoblasten nachweisen. Darüber hinaus ist die synzytiale Fusion des Zytotrophoblasten abhängig von der Expression und Aktivität der Caspase 8 (*Black et al. 2004*). Stadien der Differenzierung sind somit zugleich oft frühe Stadien der Apoptose.

Formigli et al. (2000) konnten an Fibroblasten-Kulturen zeigen, dass neben den diametral entgegengesetzten Formen des Zelltodes (Apoptose und Nekrose) als Intermediärform die Aponekrose existiert. Die Zellen beginnen mit der Aktivierung der Apoptose-Kaskade, die jedoch zu einem bestimmten Zeitpunkt zusammenbricht. Der Zelltod wird dann als nekrotischer Vorgang fortgesetzt. Ob eine Zelle die Apoptose-Kaskade vollständig durchlaufen kann, ist u.a. abhängig von dem zellulären ATP-Vorrat (*Leist et al. 1997*). Auch die Menge des auf die Zelle einwirkenden Toxins bestimmt die Art des Zelltodes: niedrige Konzentrationen lösen Apoptose aus, größere führen zur Nekrose (*Kroemer 1995*).



### 1.3 VISUALISIERUNG DER APOPTOSE

Der Nachweis einer Apoptose und die Differenzierung gegenüber der Nekrose können anhand von morphologischen Kriterien, mit immunhistochemischen und molekularbiologischen Verfahren erfolgen. Eine Auswahl der zurzeit gängigen Methoden ist in Tabelle 1.2 dargestellt.

Bereits lichtmikroskopisch zu erfassende morphologische Veränderungen der Zelle im Laufe der Apoptose sind das Blebbing an der Zelloberfläche, die Kondensation des Chromatins, das Schrumpfen von Zelle und Zellkern und schließlich der Zerfall in membranumhüllte Apoptose-Körper. Als spezifisch für den Nachweis der Apoptose im Gewebeschnitt können allerdings nur Veränderungen am Nukleus betrachtet werden.

Unterschiedliche immunhistochemische und molekularbiologische Methoden wurden entwickelt, um Apoptose in Zellen nachzuweisen. Die Verfahren unterscheiden sich hinsichtlich Spezifität, Sensitivität und Effektivität teilweise erheblich. Zudem visualisieren die dargestellten Methoden unterschiedliche Stadien der Apoptose-Kaskade.

**Induktion der Apoptose.** Zahlreiche Antikörper gegen Ligand-Rezeptor-Systeme wie FasL/Fas und  $\text{TNF}\alpha/\text{TNF-R1}$  sind derzeit auf dem Markt erhältlich. Huppertz et al. (1999) sehen deren Verwendung eher kritisch, denn der immunhistochemische Nachweis allein bedeutet nicht unbedingt, dass die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor tatsächlich zur Apoptose in der betreffenden Zelle führt.

**Caspasen.** Auch wenn unterschiedlichste Interaktionen und Stimuli den apoptotischen Zelltod auslösen können, die gemeinsame Endstrecke besteht in der Aktivierung von Caspasen. Die bedeutendste Untergruppe im Rahmen der Apoptose umfasst die CPP32-like Caspasen, zu denen u.a. Caspase 3, 6, 7, 8, 9 und 10 gehören (Miller 1997). Zurzeit existieren nur wenige Antikörper, die isoliert an die aktive Form der Caspasen binden können. Antikörper

erkennen meist entweder die Proform oder die Proform und aktive Form. Um dieses Problem zu umgehen, können eine positive Färbung bei Kombination von Procaspase 8 und einem Ligand/Rezeptor-System als Hinweis für Apoptose in der betreffenden Zelle gewertet werden. Der Nachweis von Caspase 3-Aktivität kann auch mit PhiPhiLux der Fa. Oncolmmunin erfolgen. PhiPhiLux ist ein synthetischer Farbstoff und Substrat der Caspase 3. Nach enzymatischer Umsetzung und Anregung durch Licht wird dieses unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Neuere Entwicklungen nach demselben Prinzip ermöglichen, die Aktivität von Caspase 1, 6, 8, und 9 durchflusszytometrisch oder fluoreszenz-mikroskopisch darzustellen (Caspalux der Fa. Oncolmmunin).

Antikörper gegen die Ligand-Rezeptor-Systeme FasL / Fas und TNF $\alpha$ /TNF-R1
Antikörper gegen Procaspase 3 und 8
Antikörper gegen Procaspase und aktive Caspase 3, 6, 7, 9, 10
Antikörper gegen aktive Caspase 3 und 8
Nachweis der Aktivität von Caspase 3 mit PhiPhiLux
Nachweis der Aktivität von Caspase 1, 6, 8, 9 mit CaspaLux
Nachweis von Phosphatidylserin mit Annexin V
Antikörper gegen PARP
Antikörper gegen Lamin B
Antikörper gegen Neoepitope von Zytokeratin 18 (M30)
Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen mit dem TUNEL-Test
DNA-Laddering in der DNA-Gelelektrophorese

**Tab. 1.2** Auswahl an Apoptose-Markern (nach Huppertz et al. 1999)

**Phosphatidylserin-Flip.** Der Phosphatidylserin-Flip von der inneren zur äußeren Schicht der Plasmamembran zählt zu den frühen Ereignissen während der Apoptose. Der direkte Nachweis lässt sich mit Annexin V erbringen, das spezifisch an Phosphatidylserin bindet (Koopman et al. 1994). Allerdings kann Annexin V im Schnittpräparat nicht zwischen Phosphatidylserin in der inneren und der äußeren Schicht der Plasmamembran differenzieren. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, ist die Bindung nur bei vitalen Zellen, also mit intakter Plasmamembran, als positiv anzusehen. Dies lässt sich mit Propidiumjodid feststellen, das unversehrte Membranen nicht durchdringen kann. Zur Vereinfachung der Methode sind Kits entwickelt worden, die Annexin

V mit Propidiumjodid kombinieren (Beispiel: ApoAlert Annexin V Apoptosis Kit der Fa. Clontech).

**Apoptotische Spaltung von Proteinen.** Zahlreiche zytoplasmatische und membrangebundene Proteine werden im Rahmen der Apoptose gespalten. Dazu zählen u.a.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin (Brancolini et al. 1997; Herren et al. 1998), Zytokeratin 18 (Caulin et al. 1997), Fodrin (Greidinger et al. 1996) und Fak (Focal adhesion kinase; Gervais et al. 1998). Beispiele für nukleäre Proteine sind Lamin A und B (Greidinger et al. 1996), PARP (Tewari et al. 1995) und DNA-PK<sub>CS</sub> (DNA-dependent protein kinase; Itoh und Horio 2001). Die Bindung von Antikörpern gegen PARP und Lamin B weist nicht-apoptotische Zellen nach. Eine reduzierte oder fehlende Färbung kann als Abbau durch Exekutionscaspasen interpretiert werden. Da die Ergebnisse mit PARP-Antikörpern schwierig zu deuten sind, empfehlen Huppertz et al. (1999) die Verwendung von Antikörpern gegen Lamin B bei immunhistochemischen Schnitten.

Die Spaltung des Intermediärfilaments Zytokeratin 18 durch die Exekutionscaspasen 3, 6 und 7 führt zur Freilegung eines Neoepitops, das bei nicht-apoptotischen Zellen nicht vorhanden ist (Leers et al. 1999). Der Antikörper M30 bindet spezifisch an dieses Neoepitop und findet seine Anwendung in der Immunhistochemie (siehe 2.6.3) und beim Western-Blot (siehe 2.4.5). Ein positives Signal weist darauf hin, dass die Zelle sich im Exekutionsstadium befindet.

**DNA-Fragmentation.** Während der Apoptose wird die DNA durch Endonukleasen fragmentiert. In der DNA-Gelelektrophorese führt dies zu einem für die Apoptose typischen Leitemuster (siehe 2.5). In Gewebeschnitten lässt sich die Aktivität der Endonukleasen am besten mit dem TUNEL-Test (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) darstellen. Dabei bindet das Enzym TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) an freiliegende 3'-OH-Enden von DNA-Einzelstrangbrüchen und ermöglicht deren Visualisierung (siehe 2.6.4).

Allerdings sind Einzelstrangbrüche nicht spezifisch für die Apoptose und kommen in allen Phasen des Zellzyklus vor, so dass mit falsch-positiven Ergebnissen zu rechnen ist.

In Abwägung der Vor- und Nachteile der vorgestellten Methoden wurden im Rahmen dieser Dissertation morphologischen Kriterien, der Antikörper M30, der TUNEL-Test und das DNA-Laddering herangezogen, um eine Magnesium-induzierte Apoptose im Trophoblasten nachzuweisen.

## 1.4 PRÄEKLAMPSIE

Die Präeklampsie gehört zum Komplex der hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft und ist eine der führenden Ursachen für maternale und fetale Morbidität und Mortalität. Aus den Anfangsbuchstaben der englischen Worte „hypertension, proteinuria, edema“, die die Kardinalsymptome der Präeklampsie beschreiben, leitet sich die früher oft gebrauchte Bezeichnung EPH-Gestose ab. Da Ödeme auch bei gesunden Schwangeren vorkommen, bei schweren Verlaufsformen aber fehlen können und prognostisch nicht entscheidend sind, ist diese Begrifflichkeit zugunsten der Präeklampsie verlassen worden.

<b>Schwangerschaftsunabhängige Hypertonie</b>	
Essentielle Hypertonie	Sekundäre Hypertonie
<b>Schwangerschaftsbedingte Hypertonie</b>	
<p><b><u>mit Proteinurie</u></b></p> <p>Präeklampsie Pfropfgestose Eklampsie HELLP-Syndrom</p>	<p><b><u>ohne Proteinurie</u></b></p> <p>transiente Schwangerschaftshypertonie</p>

**Tab. 1.3** Klassifikation der Hypertonieformen in der Schwangerschaft

**Definition.** Präeklampsie ist eine schwangerschaftsbedingte Erkrankung, die fast ausschließlich nach der 20. Schwangerschaftswoche auftritt und durch Hypertonie und Proteinurie gekennzeichnet ist. Ein pathologischer Hypertonus in der Schwangerschaft liegt vor, wenn bei mehreren Messungen systolische Werte von 140 mmHg und/oder diastolische Werte von 90 mmHg erreicht oder überschritten werden (National High Blood Pressure Education Program Working on High Blood Pressure in Pregnancy 2000). Als signifikante Proteinurie gilt eine Eiweißausscheidung von mehr als 0,3 g/l im 24 h-Sammelurin (Davey und MacGillivray 1988). Treten Hypertonie oder Proteinurie vor der 20. Schwangerschaftswoche auf, handelt es sich im Allgemeinen um eine

chronische Hypertonie oder primäre Nierenerkrankung (*Davey und MacGillivray 1988*). Die korrekte Klassifikation einer Blutdruckerhöhung in der Schwangerschaft ist therapeutisch und prognostisch richtungweisend, da die leichte chronische Hypertonie nicht mit einem erhöhten Risiko für Mutter und Kind einhergeht (*Homuth et al. 1994, Sibai et al. 1983*).

**Epidemiologie.** Weltweit erkranken 5-7% aller Schwangeren an einer Präeklampsie (*Walker 2000*), die in Abhängigkeit vom Schweregrad mit einer 1-12% perinatalen Mortalität einhergeht. Präeklampsie ist verantwortlich für 7-9% aller Fälle von perinataler Morbidität und Mortalität (*Jones 2000*). Die Häufigkeit der Eklampsie liegt bei 0,1% aller Schwangerschaften und weist eine maternale Mortalität von 5% und perinatale Mortalität von 8-27% auf (*Lenfant 2001*).

**Klinik.** Neben den eingangs beschriebenen Leitsymptomen Hypertonie und Proteinurie finden sich häufig rasch zunehmende generalisierte Ödeme. Die Ausbildung von Ödemen in der Schwangerschaft sind ein uncharakteristisches Syndrom, das nur als relevant zu betrachten ist bei einer Gewichtszunahme von mehr als 2 kg/Woche oder einem ausgeprägten Gesichtsoedem. Zentralnervöse Symptome wie Kopfschmerzen, Augenflimmern, Schwindel, sowie epigastrische Schmerzen mit Übelkeit und Erbrechen können eine schwere Präeklampsie anzeigen oder Prodromi der Eklampsie und des HELLP-Syndroms darstellen. Die Eklampsie ist charakterisiert durch das Auftreten tonisch-klonischer Krampfanfälle mit und ohne Bewusstseinsverlust, die keiner anderen Ursache zugeordnet werden können. Im Rahmen der Eklampsie kann es zu akutem Nierenversagen, disseminierter intravasaler Gerinnung, Hirnödem, Thrombosen und Blutungen kommen.

Das HELLP-Syndrom ist definiert als Trias aus Hämolyse, erhöhten Leberenzymen und erniedrigten Thrombozytenzahlen (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets). In 15% der Fälle fehlen sowohl Hypertonie als auch Proteinurie (*Rath et al. 1994*). Richtungweisend für die Diagnose ist der rechtsseitige Oberbauchschmerz. Als Komplikationen treten Leberruptur,

Niereninsuffizienz, intrazerebrale Blutungen und schwere Gerinnungsstörungen auf. Ob das HELLP-Syndrom, das sich auch ohne die klassischen Merkmale der Präeklampsie entwickeln kann, als eine schwere Verlaufsform der Präeklampsie angesehen werden kann, oder eine eigenständige Erkrankung darstellt, ist zurzeit nicht abschließend geklärt.

Fetale Risiken der Hypertonie in der Schwangerschaft sind fetale Wachstumsretardierung (IUGR), vorzeitige Plazentalösung, hypoxische zerebrale Schädigungen und intrauteriner Fruchttod.

**Therapie.** Behandlungsziel bis zur Entbindung, die einzige kausale Therapie der schwangerschaftsspezifischen Hypertonie, ist die Stabilisierung von Mutter und Kind. Leichte Verlaufsformen der Präeklampsie können bei entsprechender Compliance der Schwangeren unter engmaschiger Kontrolle ambulant behandelt werden. Indikationen für die stationäre Aufnahme sind Blutdruckwerte über 160/100 mmHg bzw. 140/90 mmHg mit Proteinurie, rascher Ödementwicklung oder pathologischen Laborparametern sowie Hinweise für eine fetale Kompromittierung. Prodromalsymptome wie Augenflimmern oder Oberbauchschmerzen und bekannte Risikofaktoren können ebenfalls Anlass zur stationären Behandlung geben (*Rath et al. 2000*).

Randomisierte Studien zur Notwendigkeit einer akuten Blutdrucksenkung in der Schwangerschaft fehlen. Dennoch empfiehlt die Deutsche Hochdruckliga (2003) und die Leitlinienkommission „Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen“ (2007) aus mütterlicher Indikation eine antihypertensive Dauertherapie bei persistierenden Blutdruckwerten über 170/110 mmHg bzw. über 160/100 mmHg bei vorbestehender Nierenerkrankung oder Diabetes mellitus (*Kyle und Redman 1992*). Mittel der 1. Wahl ist  $\alpha$ -Methyldopa, eingeschränkt geeignet sind  $\beta$ 1-selektive Rezeptorenblocker, Dihydralazin und Nifedipin. Nicht geeignet sind Diuretika, ACE-Hemmer und Angiotensin-AT1-Antagonisten. Die Blutdrucksenkung geht allerdings mit einer erhöhten Rate wachstumsretardierter Neugeborener und einem verminderten Geburtsgewicht einher (*Dadelszen et al. 2000*).

Besonders eine zu abrupte Blutdrucksenkung zu Beginn der Therapie kann mit einer akuten Verschlechterung der uteroplazentaren Perfusion einhergehen (*Paterson-Brown et al. 1994*). Daher ist neben kontinuierlichen Blutdruck- und Laborkontrollen auch eine kardiotokographische und dopplersonographische Überwachung des Feten unabdingbar. Diastolische Blutdruckwerte von 90 bis 105 mmHg sollten dabei nicht unterschritten werden (*Sibai 1996*).

Der hypertensive Notfall in der Schwangerschaft wird mit Urapidil, Nifedipin oder Dihydralazin behandelt. Bei Krampfbereitschaft oder aufgetretenen Konvulsionen ist die intravenöse Gabe von Magnesiumsulfat Mittel der ersten Wahl. Eine Überlegenheit gegenüber Phenytoin oder Diazepam in der Prävention von Rekonvulsionen konnte in The Eclampsia Trial (1995) gezeigt werden. Nach Stabilisierung des mütterlichen Status erfolgt die unverzügliche Entbindung.

**Prävention.** Die Prävention ist problematisch, da weder Ätiologie und Pathogenese vollständig bekannt sind, noch allgemein anerkannte Marker zur Früherkennung existieren. Die prophylaktische Gabe von niedrig dosierter Acetylsalicylsäure konnte in einer großen Multicenter-Studie mit über 9000 Schwangeren die Inzidenz der Präeklampsie nicht signifikant reduzieren (CLASP Collaborative Group 1994). Knight et al. (2000) analysierten 42 kontrollierte randomisierte Studien mit insgesamt über 32000 Frauen und fanden ein um 15% vermindertes Präeklampsie-Risiko bei Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern. Einige Autoren empfehlen daher den Einsatz von 100 mg Acetylsalicylsäure/Tag bei schweren Formen der Präeklampsie in einer vorausgegangenen Schwangerschaft. Der prophylaktische Einsatz von Magnesium oder Kalzium führt nicht zu einer signifikanten Reduktion der Inzidenz von Präeklampsie und kann daher nicht generell empfohlen werden (*Bucher et al. 1996, Sibai 2004*). Eine wirkungsvolle Prävention mit Antioxidanzien, wie Vitamin C oder E, konnte ebenfalls nicht gezeigt werden (*Poston et al. 2006*).



## 1.5 PATHOPHYSIOLOGIE DER PRÄEKLAMPSIE

Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten sind Ätiologie und Pathogenese der Präeklampsie bisher nicht vollständig verstanden. Vermutet wird ein multifaktorielles Geschehen, bei dem plazentare und maternale Faktoren interagieren. Unstrittig ist die pathogenetische Schlüsselrolle der Plazenta (*Redman und Sargent 2003*). Präeklampsie ist an die Anwesenheit einer Plazenta geknüpft und kann auch bei der Blasenmole auftreten, wenn nur plazentares Gewebe ohne Fetus vorhanden ist (*Chun et al. 1964*). Die klinische Manifestation als Hypertonie führte lange zu einer Fokussierung auf die Erforschung der hypertensiven Pathomechanismen und der pharmakologischen Intervention. Walsh (1985) konnte beispielsweise ein gestörtes Verhältnis von vasodilatatorisch wirkendem Prostacyclin und dem vasokonstriktorischen Thromboxan A<sub>2</sub> zeigen. Präeklampsie ist jedoch mehr als Bluthochdruck in der Schwangerschaft, so führten die Erkenntnisse über Endotheldysfunktion, metabolische Veränderungen, Aktivierung der Gerinnungskaskade und des Immunsystems zur Vorstellung einer komplexen Erkrankung, die den gesamten mütterlichen Organismus erfasst. Roberts und Gammill (2005) sowie Redman und Sargent (2003) prägten hierfür den Begriff „Maternales Syndrom“ und führten die Komponenten zu einem Zwei-Stufen-Modell zusammen. Auf dem Boden einer Plazentadysfunktion entwickelt sich bei entsprechender Disposition eine maternale systemische Entzündungsreaktion. Bindeglied zwischen den Stadien der Erkrankung sind plazentare Faktoren, die im Rahmen der Präeklampsie vermehrt gebildet werden und im maternalen Kreislauf das Endothel schädigen bzw. aktivieren.



**Abb. 1.4** Zwei-Stadien-Modell der Präeklampsie (nach Roberts und Gammill 2005)

**Plazentadysfunktion.** Gängige Erklärung für die Plazentadysfunktion ist eine Implantationsstörung des extravillösen Trophoblasten mit insuffizienter Invasion der Spiralarterien. Dies führe zu einer Entwicklungsstörung des uteroplazentaren Kreislaufs mit daraus resultierender Ischämie des Trophoblasten. Folge seien Mikrothrombosierungen im Bereich der Endstrombahn, die Plazentainfarkte, fetale Wachstumsretardierung und vorzeitige Plazentalösung nach sich ziehen könnten. Gegen die Hypothese der plazentaren Ischämie spricht, dass bei der Late-onset Präeklampsie nach der 35. SSW, diese Form macht mehr als 90% aller Präeklampsien weltweit aus, die uterinen Spiralarterien keine dopplersonographischen Auffälligkeiten zeigen (Huppertz und Feinberg 2007). Die späte Manifestationsform der Präeklampsie ist auch nicht häufiger mit fetaler Wachstumsretardierung (IUGR) assoziiert als normale Schwangerschaften (Huppertz und Feinberg 2007). Anders verhält sich die Early-onset Präeklampsie vor der 35. SSW: Hier zeigen sich Veränderungen des Bluffußes in Spiral- und Umbilikalarterien und ein gehäuftes Auftreten fetaler Wachstumsretardierung (Huppertz und Feinberg 2007). Eine zu geringe Invasionsdichte und -tiefe des extravillösen Trophoblasten führt offensichtlich eher zu einer IUGR als zur Manifestation der Präeklampsie. Die Ischämie bzw. Hypoxie der Plazenta bei Präeklampsie ist rein hypothetisch und lässt sich bisher, z.B. durch Messungen des  $pO_2$  im intervillösen Raum, nicht objektivieren. Die V. uterina, die das Blut aus dem

intervillösen Raum abtransportiert, kann jedoch als Maß für den intervillösen  $pO_2$  dienen (Huppertz 2005). Sibley et al. (2002) konnten zeigen, dass Präeklampsie mit einem erhöhten  $pO_2$  in der uterinen Vene assoziiert ist. Ferner sind Stadien der Präeklampsie vor der klinischen Manifestation durch eine hyperdynamische Plazentaperfusion gekennzeichnet (Easterling et al. 1999). Eine Reduktion der hyperdynamischen Perfusion durch Antihypertensiva, beispielsweise durch den Betablocker Atenolol, senkt folglich die Inzidenz der Präeklampsie (Easterling et al. 1999).

Die Hypoxie des Trophoblasten ist ein fragwürdiges Konstrukt zur Erklärung der Plazentadysfunktion, vielversprechender ist die Erforschung des trophoblastären Turnovers unter physiologischen und pathologischen Konditionen. Nach Stadien der Proliferation, Differenzierung und synzytialen Fusion endet der Turnover mit der Apoptose des Trophoblasten. Überalterte Zellkerne und andere Zellorganellen werden in Synzytialknoten gepackt, schnüren sich von der apikalen Membran des Synzytiotrophoblasten ab und werden in den mütterlichen Kreislauf freigesetzt (Huppertz und Kingdom 2004). Das apoptotische Material lässt sich im ersten Kapillarbett hinter der Plazenta, der Lunge, nachweisen (Ikle 1964), wo es von pulmonalen Makrophagen phagozytiert wird (Johansen et al. 1999). Das periphere Blut hingegen ist weitestgehend frei von größeren apoptotisch abgegebenen Anteilen des Trophoblasten (Goswami et al. 2006). Diese physiologischen Abläufe im Rahmen einer Schwangerschaft zeigen bei der Präeklampsie qualitative und quantitative Veränderungen. Neben der apoptotischen Freisetzung des plazentaren Materials spielen Nekrose und Aponekrose eine entscheidende Rolle (Huppertz und Feinberg 2007). Bei der Aponekrose (Formigli et al. 2000) läuft die Apoptose-Kaskade nicht vollständig bis zur Bildung membranumhüllter Apoptose-Körper ab, sondern apoptotisches Material wird nekrotisch in die maternale Zirkulation abgegeben. Dies spiegelt sich in einer erhöhten Menge subzellulärer Fragmente, synzytiotrophoblastäre Membranfragmente (STBM) genannt, wider (Knight et al. 1998). STBM finden sich auch im Plasma von gesunden Schwangeren, sind aber bei

Präeklampsie signifikant erhöht (*Knight et al. 1998, Goswami et al. 2006*). Allerdings korreliert die Menge der trophoblastären Fragmente nicht mit der Schwere der Erkrankung (*Johansen et al. 1999*). Im Gegensatz zur normalen Schwangerschaft, bei der membranumhülltes plazentares Material in der Lunge phagozytiert wird, können die STBM bei der Präeklampsie auch systemisch nachgewiesen werden und dort das maternale Endothel schädigen (*Huppertz und Feinberg 2007*).

Zu einem erhöhten Turnover des Trophoblasten bei der Präeklampsie können zwei Faktoren beitragen: eine gesteigerte Apoptose des Trophoblasten und eine vermehrte Proliferation des Zytotrophoblasten. Das Auftreten beider Mechanismen lässt sich bei der Präeklampsie nachweisen. Leung et al. (2001) konnten eine erhöhte Apoptoserate zeigen, die vor allem den Synzytiotrophoblasten betrifft (*Ishihara et al. 2002*). Die Proliferation des Zytotrophoblasten ist ebenfalls gesteigert (*Arnholz et al. 1991*), besonders wenn die Präeklampsie mit einer IUGR vergesellschaftet ist (*Sibley et al. 2002*). Offensichtlich ist der gesamte Turnover des villösen Trophoblasten erhöht, von der Proliferation über die synzytiale Fusion bis zur Apoptose (*Huppertz 2005*). Somit könnte nicht primär die gesteigerte Apoptoserate für die Pathologie der Präeklampsie verantwortlich sein, sondern die vermehrte Proliferation des Zytotrophoblasten. Die Apoptose wäre dann nur konsekutiv erhöht und Ausdruck eines Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Trophoblasten (*Huppertz et al. 2003*). Steigt die Proliferations- und damit die Fusionsrate weiter an, könnte dies durch Apoptose im Synzytiotrophoblasten nicht mehr kompensiert werden. Überschüssiges Material würde teilweise nekrotisch bzw. aponekrotisch freigesetzt (*Huppertz 2005*).

**Maternale systemische Entzündungsreaktion.** Die Freisetzung plazentaren Materials in den mütterlichen Kreislauf führt zu einem generalisierten Endothelschaden in Arteriolen und Kapillaren. Dies ist die Ursache von Vasokonstriktion und erhöhter kapillarer Permeabilität, die sich als Hypertonie

und Ödeme manifestieren. Histologisch imponiert das glomeruläre Endothel geschwollen, teilweise lumenverschießend, begleitet von Veränderungen an Podozyten (*McCartney 1969*). Klinisches Korrelat der glomerulären Endotheliose ist die Proteinurie. Die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung und eine gesteigerte Thrombozytenaggregation führen zur Bildung von okkludierenden Mikrothromben (*Janes et al. 1995; Roberts und Lain 2002*). Obduktionen von Patientinnen, die an einer Präeklampsie verstorben sind, zeigen zahlreiche Endorganschäden. In Leber, Nebennieren und Endokard finden sich Infarzierungen, Nekrosen und intraparenchymatöse Hämorrhagien (*Roberts und Gammill 2005*).

Die Schädigung des maternalen Endothels durch plazentare Fragmente äußert sich auch in einer systemischen Entzündungsreaktion (*Sibai 2004*). Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten werden aktiviert und proinflammatorische Zytokine, wie  $\text{TNF}\alpha$ , sezerniert (*Vince et al. 1995; Kocyigit et al. 2004*). Bereits die normale Schwangerschaft geht mit einer Aktivierung des Immunsystems der Mutter einher. So lassen sich im Serum gesunder Primipara – etwas weniger stark ausgeprägt bei Multipara – anti-Trophoblasten-Antikörper nachweisen, die als freie Antikörper oder als Immunkomplexe vorliegen (*Davies 1985*). Solange die Immunkomplexe in ausreichendem Maße eliminiert werden können, hat das keine pathophysiologischen Konsequenzen. Übersteigt die Freisetzung trophoblastärer Zelltrümmer und konsekutiv die Bildung von Immunkomplexen die maternalen Clearance-Kapazitäten, wird ein proinflammatorischer Prozess in Gang gesetzt, in dessen Verlauf die Plazenta durch oxidativen Stress weiter geschädigt wird. Der oxidative Stress führt zu einer vermehrten trophoblastären Aponekrose und somit zu einem sich selbst verstärkenden Mechanismus (*Huppertz und Feinberg 2007*). Dieser Circulus vitiosus mündet in eine systemische Immunvaskulitis. So wurden bei Biopsien Immunkomplexe und Komplementablagerungen in Gefäßen aus der Leber (*Arias und Mancilla-Jimenez 1976*), den Nieren (*Gallery und Gyory 1978*), der Dezidua (*Kitzmilller und Benirschke 1973*) und der Haut (*Houwert-de Jong et al. 1982*) gefunden.

Bedeutend für die Clearance zirkulierender Immunkomplexe ist u.a. der erythrozytäre Complement receptor type 1 (*E-CR1*; *Schifferli et al. 1988*). *Feinberg et al. (2005)* konnten zeigen, dass die Expression des E-CR1 bei Präeklampsie-Patientinnen vermindert ist und mit der Schwere der Erkrankung korreliert.

Eine Plazentadysfunktion manifestiert sich nicht obligat als Präeklampsie. Auch die fetale Wachstumsretardierung und ein Drittel der Fälle von spontaner vorzeitiger Geburt zeigen eine gestörte Plazentafunktion. Plazentare Faktoren müssen offensichtlich mit maternalen interagieren, damit sich eine Präeklampsie klinisch äußert. Dazu zählen genetische und umweltbedingte Faktoren sowie Vorerkrankungen. So steigt das Risiko einer Erkrankung bei Adipositas (*Sibai et al. 1995*), bestehender Hypertonie (*Caritis et al. 1998*), Diabetes mellitus (*Caritis et al. 1998*), Nierenerkrankungen (*Fisher et al. 1981*), Hyperhomocysteinämie (*Powers et al. 2001*), Hyperandrogenämie (*Laivuori et al. 1998*) und Zugehörigkeit zur schwarzen Rasse (*Eskenazi et al. 1991*). Auch Erstparität, junge Erstgebärende, Spätgebärende (*Eskenzi et al. 1991*) und Mehrlingsgravidität (*Zhang et al. 1997*) erhöhen das Risiko, an einer Präeklampsie zu erkranken. Tabelle 1.4 fasst anamnestische Risikofaktoren mit dazugehörigem relativem Risiko zusammen.

Antiphospholipidantikörpersyndrom ( <i>Arnout et al. 1995</i> )	RR~9
Präeklampsie/Eklampsie in früherer Schwangerschaft ( <i>Sibai et al. 1995</i> )	RR~7
Adipositas, BMI >35 ( <i>Eskenazi et al. 1991</i> )	RR~4
Vorbestehender Diabetes mellitus ( <i>Garner et al. 1990</i> )	RR~3,5
Familiäre Belastung ( <i>Chesley und Cooper 1986</i> )	RR~3
Vorbestehende Nierenerkrankung ( <i>Fisher et al. 1981</i> )	RR~3
Erstparität ( <i>Eskenzi et al. 1991</i> )	RR~2,5
Spätgebärende >40 Jahre ( <i>Eskenzi et al. 1991</i> )	RR~2
Chronische Hypertonie ( <i>Sibai et al. 1998</i> )	RR↑
Lupus erythematoses visceralis ( <i>Arnout et al. 1995</i> )	RR↑↑

**Tab. 1.4** Risikofaktoren für Präeklampsie (RR: relatives Risiko)

Zahlreiche epidemiologische Studien sprechen auch für eine genetische Prädisposition. Schon in Lehrbüchern aus dem 19. Jahrhundert (*Elliot 1873*,

*Scanzoni 1867*) findet die familiäre Häufung der Präeklampsie Erwähnung (*Tempfer 2004*). Die Prävalenz der Präeklampsie bei Töchtern (25%) und Schwestern (37%) ist mehrfach höher als bei Schwiegertöchtern (6%) betroffener Frauen (*Chesley et al. 1961*). Das Risiko für die Tochter verdoppelt sich auch, wenn der Vater einer Schwangerschaft entstammt, in der Präeklampsie aufgetreten ist (*Esplin et al. 2001*). Allerdings existiert kein einzelnes Präeklampsie-Gen, das mendelschen Vererbungsmustern folgt. Eher kann von verschiedenen genetischen Veränderungen ausgegangen werden, die untereinander und mit Umweltfaktoren interagieren, und so zum Vollbild der Erkrankung führen (*Tempfer 2004*).

## 1.6 MAGNESIUM IN DER SCHWANGERSCHAFT

### 1.6.1 METABOLISMUS

Magnesium spielt bei zahlreichen intrazellulären Reaktionen eine wichtige Rolle und ist nach Kalium das mengenmäßig zweitwichtigste Kation in der Zelle (*Flatman 1984*). Magnesium ist an mehr als 300 enzymatischen Reaktionen beteiligt, bei denen Phosphatgruppen übertragen, Phosphatester gespalten oder gebildet werden (*Reinhart 1990*). Es bildet mit ATP  $\text{ATP}^{2-}\text{-Mg}^{2+}$ -Komplexe, die als Substrat von ATPasen in Membranen (*Flatman 1991*), alkalischen und sauren Phosphatasen, Pyrophosphatasen und anderen Enzymen dienen. Magnesium ist in die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien, in verschiedene Stufen der Proteinbiosynthese im Zytosol und in die Nukleinsäurebiosynthese im Zellkern involviert (*Günther 1981*). Teilweise tritt Magnesium als natürlicher Kalziumantagonist auf und blockiert den Kalziumkanal in der glatten Muskulatur und im Myokard (*Altura und Altura 1981; Rubenowitz et al. 1996*). Auf dieser Wirkung basiert der pharmakologische Einsatz bei Schwangerschaftshypertonie und Herzrhythmusstörungen.

**Verteilung im Organismus.** Der Gesamtbestand an Magnesium beträgt bei einem 70 kg schweren Menschen ca. 24 g (*Schroeder et al. 1969*). 95% befinden sich intrazellulär, davon sind 60% im Knochen und 39% in Skelettmuskulatur, Leber, Herz und Weichteilen gebunden (*Ebel und Günther 1980*). Nur ca. 1% des Magnesiumbestandes befindet sich extrazellulär und liegt im Serum in proteingebundener (27%), ionisierter (65%) und mit Anionen komplexierter (8%) Form vor (*Huijgen et al. 1996*). Die Gesamtkonzentration im Plasma beträgt 0,8-1,0 mmol/l.

**Resorption und Ausscheidung.** Magnesium wird vornehmlich im Ileum resorbiert, zu einem geringen Anteil auch im Magen. Allerdings werden unter normalen Ernährungsbedingungen nur ca. 30% über die Dünndarmmukosa aufgenommen und 70% wieder mit der Faeces ausgeschieden (*Graham et*



al. 1960). Die Elimination erfolgt überwiegend über die Glomeruli der Nieren (3-6 mmol/24 h) in Konkurrenz mit Kalziumionen (Sutton und Domrongkitchaipom 1993).

Verteilung im Plasma	mmol/l	Gesamtmenge
Ionisiert	0,53	55%
Proteingebunden	0,30	32%
Komplexiert	0,07	7%
Andere	0,06	6%
Gesamtmenge	0,96	100%
Normalbereich im Plasma	0,8 - 1,0	

**Tab. 1.5** Verteilung von Magnesium im Plasma (nach Petrides 1997)

**Regulation des Magnesiumstoffwechsels.** Zur Aufrechterhaltung der Magnesium-Homöostase konnte kein spezifisches Hormon identifiziert werden. Vielmehr unterliegt der Magnesium-Metabolismus einer komplexen Regulation durch das neuroendokrine System unter Beteiligung der Antagonisten Parathormon und Calcitonin sowie Adrenalin und Insulin (Durlach 1988). Parathormon und Calcitonin wirken hauptsächlich auf das im Knochen gebundene Magnesium, Adrenalin und Insulin haben ihren Wirkort in der Muskulatur. In der Henle-Schleife wird die Reabsorption durch die cAMP-abhängigen Hormone Parathormon, Calcitonin, Glukagon und ADH (antidiuretisches Hormon) gesteuert (Quamme und Dirks 1986).

## 1.6.2 MAGNESIUM UND PRÄEKLAMPSIE

Die Rolle des Magnesiums in der Präeklampsie ist aus therapeutischer und pathophysiologischer Sicht interessant und umstritten. Bereits 1918 beschrieb Volhard den erfolgreichen Einsatz des Magnesiumsulfats bei der Präeklampsie. Die Ergebnisse wurden später durch weitere Untersuchungen von Lazard (1933) bestätigt. Seitdem sind zahlreiche klinische Studien über den Einsatz von Magnesium zur Therapie und Prophylaxe der Präeklampsie

bzw. Eklampsie durchgeführt worden. Die Ergebnisse waren oft widersprüchlich und gaben Anlass zu kontrovers geführten Diskussionen. Auch die pathophysiologische Rolle des Magnesiums bei der Präeklampsie ist nur unvollständig verstanden. Welche Wirkung Magnesium im maternalen Organismus entfaltet, war Gegenstand diverser Untersuchungen. Zu den Auswirkungen auf die Plazenta hingegen liegen nur wenige Daten vor. Studien zur Magnesiumkonzentration im Serum bei Patientinnen mit Präeklampsie im Vergleich zu gesunden Schwangeren bieten ebenfalls ein uneinheitliches Bild und tragen nur wenig zum pathophysiologischen Verständnis der Präeklampsie bei.

**Therapie.** Bei schwerer Präeklampsie oder Krampfbereitschaft empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) in ihren Leitlinien den Einsatz von Magnesiumsulfat. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass Magnesium anderen Antikonvulsiva überlegen ist (Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy 2000). So verglichen Lucas et al. (1995) in einer randomisierten klinischen Studie mit 2138 Frauen, bei denen die Diagnose hypertensive Schwangerschaftserkrankung gestellt wurde, die Effizienz von Magnesiumsulfat mit Phenytoin und fanden ein besseres Outcome für die Magnesiumgruppe. Auch die Ergebnisse der Eclampsia Trial Collaborative Group (1995) stellten Vorteile der Magnesiumtherapie im Vergleich zur Behandlung mit Diazepam oder Phenytoin fest.

**Pathophysiologie.** Im Allgemeinen ist die Magnesiumkonzentration im Serum während der Schwangerschaft im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen vermindert (Lucas et al. 1995; Handwerker et al. 1995; Sanders et al. 1998). Der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht genau bekannt. Eine plausible Erklärung ist die Hämodilution durch das vermehrte zirkulierende Plasmavolumen während der Schwangerschaft (Sanders et al. 1998). Wahrscheinlich spielen auch noch andere, bisher nicht identifizierte Regulationsmechanismen eine Rolle (Standley et al. 1997). So können auch

die Aufnahme von Magnesium über die Plazenta zum Feten und eine erhöhte renale Ausscheidung zu sinkenden Plasmaspiegeln beitragen (Huppertz 2006).

Die Gesamtkonzentration an Magnesiums im Serum nicht schwangerer Frauen beträgt 0,9 mmol/l ( $\pm 0,07$ ). Während der Schwangerschaft sinkt dieser Wert auf 0,71 mmol/l ( $\pm 0,06$ ) im ersten Trimenon, auf 0,65 mmol/l ( $\pm 0,07$ ) im zweiten Trimenon und erreicht im 3. Trimenon 0,72 mmol/l ( $\pm 0,06$ ) (Sanders et al. 1998). Nur drei Studien haben sich mit dem Verlauf des ionisierten Magnesiums in der Präeklampsie befasst (Handwerker et al. 1995; Standley et al. 1997; Sanders et al. 1998). Da ionisiertes Magnesium die biologisch aktive Form darstellt, sind diese Ergebnisse von besonderem Interesse. So konnten Sanders et al. (1998) zeigen, dass die Konzentration des ionisierten Magnesiums im Serum dem Verlauf des Gesamtmagnesiums folgt. Bei nicht schwangeren Frauen liegt die Konzentration bei 0,56 mmol/l ( $\pm 0,03$ ). Während der Schwangerschaft fällt dieser Wert auf 0,53 mmol/l ( $\pm 0,04$ ) im ersten Trimenon, auf 0,51 mmol/l ( $\pm 0,03$ ) im zweiten Trimenon und beträgt 0,53 mmol/l ( $\pm 0,03$ ) im dritten Trimenon.

	Nicht schwanger	1. Trimenon	2. Trimenon	3. Trimenon	Prä-eklampsie
TMg <sub>i.s.</sub>	0,9	0,71	0,65	0,72	0,85
Mg <sup>2+</sup> <sub>i.s.</sub>	0,56	0,53	0,51	0,53	0,61

**Tab. 1.6** Konzentration des Gesamtmagnesiums (TMg<sub>i.s.</sub>) und des ionisierten Magnesiums (Mg<sup>2+</sup><sub>i.s.</sub>) im Serum [mmol/l] (nach Sanders et al. 1998)

Seydoux et al. (1992) fanden signifikant erhöhte Magnesiumkonzentrationen im Serum präeklampsischer Patientinnen im Vergleich zu gesunden Schwangeren im 3. Trimenon. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Sanders et al. (1998) mit einer Studie an 18 gesunden Schwangeren im 3. Trimenon und 15 Patientinnen, bei denen eine Präeklampsie diagnostiziert wurde. Sowohl die Gesamtkonzentration ( $0,85 \pm 0,11$  mmol/l), als auch das ionisierte Magnesium ( $0,61 \pm 0,06$  mmol/l) waren signifikant erhöht.

Handwerker et al. (1995) und Standley et al. (1997) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration des ionisierten Magnesiums zwischen gesunden und präeklampsischen Patientinnen nachweisen. Diese Diskrepanz ist vermutlich stichprobenbedingt (*Sanders et al. 1999*). So enthielt die von Sanders et al. (1998) untersuchte Gruppe Patientinnen, die schwerer an Präeklampsie erkrankt waren als bei Handwerker et al. (1995) und Standley et al. (1997). Letztlich ist die pathophysiologische Rolle des Magnesiums bei der Präeklampsie nicht verstanden. Deshalb und aufgrund der widersprüchlichen Datenlage sollte die Magnesiumkonzentration im Serum zur klinischen Diagnostik nur eingeschränkte Verwendung finden (*Sanders et al. 1999*).

## 1.7 FRAGESTELLUNG

Bei der Erforschung der Präeklampsie ist Magnesium sowohl aus pathophysiologischer als auch aus therapeutischer Sicht von großem Interesse. Trotz dieser Schlüsselposition zum Verständnis der Präeklampsie liegen nur wenige Daten zur Wirkung des Magnesiums auf die Plazenta vor. Deshalb wurde in Aachen ein Zottenexplantat-Kulturmodell entwickelt, um das Verhalten des Trophoblasten bei verschiedenen Magnesiumkonzentrationen zu studieren. Da vermutlich die Freisetzung plazentaren Materials in den maternalen Kreislauf in die Pathogenese der Präeklampsie involviert ist, wurde auch das Kulturmedium im Anschluss an die Kultivierung der Zottenexplantate untersucht. Erste Daten von Black et al. (2001) lassen den Schluss zu, dass eine Erhöhung der Magnesiumkonzentration im Kulturmedium zur Apoptose im Trophoblasten führt. Zur Unterstützung dieser Hypothese lag der Fokus dieser Arbeit auf Apoptose-spezifische Veränderungen des Trophoblasten. Folgende Fragen sollten dabei geklärt werden:

- Führt Magnesium zur Apoptose im Trophoblasten (Kap. 3)?
- Besteht eine Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration (Kap. 3.3)?
- Welchen Einfluss hat das verwendete Kulturmedium (Kap. 3.1)?
- Welchen Einfluss hat das Gestationsalter (Kap. 3.2)?
- Welchen Einfluss hat die Inkubationsdauer (Kap. 3.4)?
- Wie wirkt sich die Erhöhung der Magnesiumkonzentration auf die Abgabe trophoblastären Materials in das Kulturmedium aus (Kap. 3.3.2)?
- Gibt es Anzeichen für nicht-apoptotische Freisetzung trophoblastären Materials (Kap. 3.3.2)?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

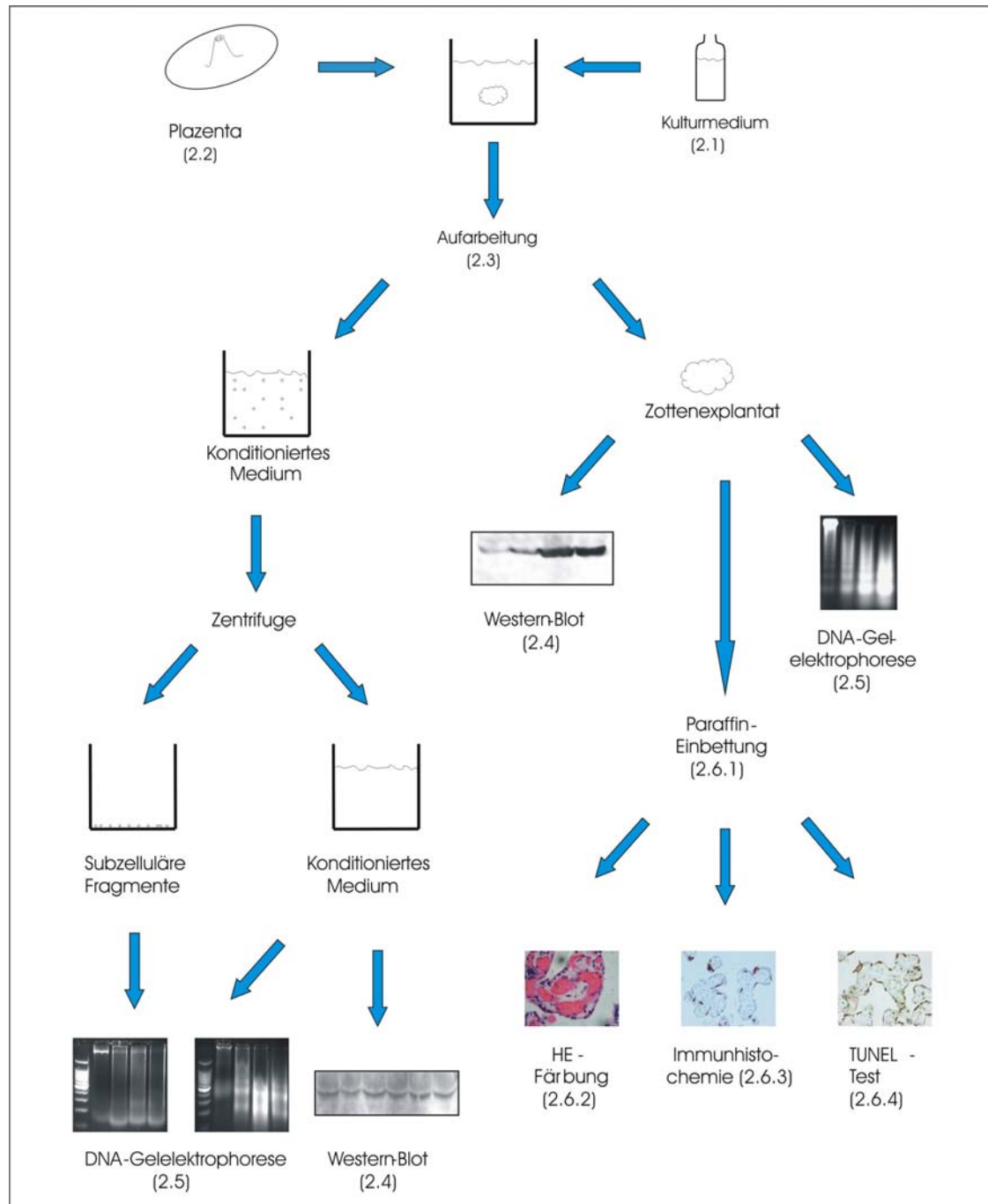
Material	Firma	Katalog-Nr.
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Linaris Wertheim-Bettingen	SK-4200
3-Aminopropyl-ethoxysilan (APES)	Sigma Deisenhofen	A 3648
24 well Mikrotiterplatte	Greiner Frickenhausen	662150
96 well Mikrotiterplatte	Costar Bodenheim	3590
Aceton	Carl Roth Karlsruhe	5025.1
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	Bio-Rad München	161-0154
Agarose-Pulver	Promega Mannheim	V312B
Ammoniumpersulfat 10%	Biomol Hamburg	50404
Amphotericin B	Karl Roth Karlsruhe	0246.1
Antikörper M 30 CytoDeath	Roche Diagnostics Mannheim	12140322001
Antikörper Kaninchen anti-Maus, biotinyliert	Dako Hamburg	E0354
Antikörper Ziege-anti-Maus, konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Jackson Immunore- search Laboratories	115-055-003
Aprotinin	Bayer Leverkusen	48458
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck Darmstadt	805740
Borsäure	Merck Darmstadt	165
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva Heidelberg	17940
Bromphenolblau	Pharmacia Biotech Uppsala, Schweden	17-1329-01
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Merck Darmstadt	2083
Citronensäure	Merck Darmstadt	100241

Dulbecco`s Modified Eagle`s (DMEM)	Sigma Delsenhofen	D 5523
Elektrophoresegerät EPS 3500 XL	Pharmacia Biotech Uppsala, Schweden	
Elektrophoresegerät Power Pack P25	Biometra Göttingen	040-810
Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) -Reader Tecan Sunrise	Tecan Crailsheim	F039300
Eosin	Carl Roth Karlsruhe	0306.2
Eppendorf Gefäße	Eppendorf Hamburg	5490 034.007
Ethanol	Carl Roth Karlsruhe	P075.1
Ethidiumbromid	Carl Roth Karlsruhe	7870.1
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth Karlsruhe	8040.1
Fastblot	Biometra Göttingen	014-200
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma Delsenhofen	F3004
Fettfreies Magermilchpulver	Carl Roth Karlsruhe	T 145.2
Formaldehyd I Formalin 4%	Carl Roth Karlsruhe	4979.2
Fotokamera Hitachi HV-C20A	Hitachi Rodgau	
FragEL DNA Fragmentation Detection Kit	Biochem Karlsruhe	QIA33
Glycerin	Carl Roth Karlsruhe	3783.1
Glyceringelatine	Sigma Delsenhofen	49927
Glycin	Carl Roth Karlsruhe	3908.2
Ham`s F-12	Sigma Delsenhofen	H 6760
Hämatoxylin	Carl Roth Karlsruhe	3816.1
Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma Delsenhofen	H 4385

Heizblock Roth Modell TCR 100	Carl Roth Karlsruhe	
Heparin-Natrium 25000 IE/5 ml	Braun Melsungen	3008768
Immun-Star Chemilumineszenz Substrat	Bio-Rad München	170-5018
Inkubator IG 750	Jouan Unterhaching	
Isopropanol	Sigma Deisenhofen	534021
Kipptisch	Fröbel Labortechnik Lindau	77010
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Sigma Deisenhofen	M 2643
Methanol	Carl Roth Karlsruhe	AE71.2
Methylgrün	Sigma Deisenhofen	M 8884
Mikroskop Leica DMIL	Leica Wetzlar	090-135.002
Mikrotom Leica SM 2000 R	Leica Wetzlar	
N-2-Hydroxyethyl-piperazine-N'-2-Ethan sulfonic acid (HEPES)	Biomol Hamburg	05288
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth Karlsruhe	2326.2
Natriumhydrogenphosphat	Merck Darmstadt	119753
Nitrocellulosemembranen Hybond-C extra	Amersham Biosciences Freiburg	RPN203E
Nonidet P40 (Np40)	Fluka BioChemica Neu-Ulm	74385
Objektträger	Menzel-Glaser Braunschweig	021102
Paraffin	Medis-Weber Buseck	MA-0005
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom Berlin	L182-50
Penicillin	Roche Diagnostics Mannheim	11074440001



Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Deisenhofen	P 7626
Polytron PT 1200 CL	Kinematica Luzern, Schweiz	
Protease Inhibitor Cocktail Complete Mini	Roche Diagnostics Mannheim	04693124001
Protein Assay Reagent A	Bio-Rad München	500-0113
Protein Assay Reagent B	Bio-Rad München	500-0114
Proteinase K	Roche Diagnostics Mannheim	3115836
Ringerlösung	Delta Select Dreiech	
RNase A	Roche Diagnostics Mannheim	109193
Röntgenfilme	Kodak	
SeeBlue Plus2	Invitrogen	Lc5925
SpeedVac Savant Plus SC 110A	Savant Farmingdale NY, USA	
Streptavidin konjugiert mit Horseradish Peroxidase (HRP)	Dako Hamburg	P 0397
Streptomycin	Carl Roth Karlsruhe	0236.2
Tetramethylethyldiamin	Carl Roth Karlsruhe	2037446
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma Deisenhofen	T 6066
Tween	Sigma Deisenhofen	T 5927
Xylol	Carl Roth Karlsruhe	9713.1
Zentrifuge Hermie Modell Z 233 M	Hermie Wehingen	



**Abb. 2.1** Ablauf der Experimente (Zahl in Klammern verweist auf Kapitel)

Abschnitt 1.3 stellt eine Auswahl gebräuchlicher Verfahren zur Visualisierung der Apoptose vor. Im Hinblick auf Magnesium-induzierte Veränderungen an den Zotten-Explantaten setzten wir folgende Verfahren ein:

- Lichtmikroskopie zur Beurteilung und Dokumentation der Morphologie
- Immunhistochemie und Western-Blotting zur Identifizierung des Zytokeratin 18-Neoepitops
- TUNEL-Test und DNA-Gelelektrophorese zum Nachweis charakteristischer DNA-Strangbrüche
- Die Medien, in denen die Explantate kultiviert wurden, -im folgenden *konditionierte Medien* genannt- wurden ebenfalls mittels Western-Blotting und DNA-Gelelektrophorese untersucht

## 2.1 HERSTELLUNG DER MEDIEN

Zur Kultivierung der Zotten-Explantate wurden aus Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS) und Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium / Ham`s F-12 (DMEM/F-12) Medien hergestellt.

**HBSS-Medium.** HBSS, 10% FCS, 25 mM HEPES, 60 U/ml Penicillin, 60  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin, 2,5  $\mu\text{g/ml}$  Amphotericin B, 25 IU/ml Heparin, 100 IU/ml Aprotinin, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4

Anm.: HBSS enthält kein  $\text{Mg}^{2+}$  und wurde je nach Versuch mit  $\text{MgSO}_4$  auf Mg-Konzentrationen zwischen 0 und 2 mM eingestellt. Im Gegensatz zum DMEM/F12-Medium, das bereits 0,7 mM enthält, kann das HBSS-Medium daher für Magnesiumkonzentrationen unter 0,7 mmol/l angewendet werden. Da mit HEPES als organischem Ionenpuffer der pH-Wert nach 24 h fällt, eignet sich dieses Medium für eine Inkubationsdauer bis 24 h. Fetal Calf Serum (FCS),

das die für den Zellstoffwechsel erforderlichen Substrate bereitstellt, wurde in einigen Versuchen gegen humanes Serum ausgetauscht. Zur Vermeidung möglicher bakterieller Kontamination wurden die Antibiotika Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B zugegeben.

**DMEM / F-12 (1:1)-Medium.** DMEM, Ham's F-12, 10% FCS, 25 mM HEPES, 60 U/ml Penicillin, 60  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin, 2,5  $\mu\text{g/ml}$  Amphotericin B, 25 IU/ml Heparin, 100 IU/ml Aprotinin, pH 7,4

Anm.: Da das Medium bereits 0,7 mM  $\text{MgSO}_4$  enthält, wurde nach Bedarf noch 0,7 mM zugesetzt, so dass mit Gesamtkonzentrationen von 0,7 oder 1,4 mM  $\text{MgSO}_4$  gearbeitet wurde. Das Medium DMEM/F-12 gewährleistet physiologisch normale Konditionen für Trophoblasten und eignet sich daher für Langzeitkultivierung bis 72 h ohne Medienwechsel.

Das humane Serum stammte von 8 gesunden Probanden beiderlei Geschlechts. Nach der Blutabnahme wurde es für 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bei 2000 x g für 15 min zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.2 INKUBATION DER ZOTTEN-EXPLANTATE

Die Plazenten stammten aus der Frauenklinik des Universitätsklinikums Aachen und wurden innerhalb von 15 min in gekühlten Boxen in das Labor transportiert. Zur Herstellung der Explantatkulturen wurde Gewebe aus dem Zottenbereich verwendet, das frei von sichtbaren Infarzierungen oder Gefäßen war und keine Anteile von Basal- oder Chorionplatte enthielt. Die Plazenten wurden dazu in 2 cm breite Streifen geschnitten und diese in mehreren Waschschriffen mit steriler Ringerlösung von maternalen Blut gesäubert. Danach wurden dem Gewebe 3  $\text{mm}^3$  große Würfel mit einer Masse von ca. 30-40 mg entnommen und diese in eine „24 well“-Kulturplatte mit jeweils 2 ml der oben genannten Medien gegeben. Die Kulturen wurden

im Jouan IG 750 Inkubator mit 6% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>, ausgeglichen mit N<sub>2</sub>, bei 37°C inkubiert. Die Dauer der Inkubation betrug 4 bis 72 h.

Insgesamt wurden 22 Plazenten zur Herstellung der Zottenexplantat-Kulturen verwendet:

- 9 Plazenten aus dem 1. Trimenon nach Interruptio ohne pathologischen Hintergrund
- 2 Plazenten nach vorzeitiger Geburt (28. und 29. SSW)
- 11 Termingerechte Plazenten nach spontaner Geburt (8) oder Sectio caesarea (3)

Ausgeschlossen wurden Plazenten bei bekannter Schwangerschafts-erkrankung, bekannten genetischen Defekten oder Infektion der Mutter.

## 2.3 AUFBEREITUNG

Nach der Inkubation wurden die Explantate mit einer sterilen Zange aus dem Medium entnommen und weiter aufgearbeitet (s.u.). Die in den Vertiefungen der Kulturplatte verbliebenen Medien, konditionierte Medien genannt, wurden mit sterilen Pipetten in 50 ml Gefäße überführt. Verwendet wurde das konditionierte Medium von mindestens 4 Explantaten (ca. 8 ml), die unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 1500 x g und 4°C wurde der Überstand, der keine sichtbaren Zelltrümmer enthielt, mit einer sterilen Pipette in frische 50 ml Gefäße transferiert. Die so gewonnenen konditionierten Medien wurden bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Pellets wurden zur Durchführung der DNA-Gelelektrophorese in 0,5 ml 70% Ethanol bei 4°C resuspendiert und wie unter 2.5.1 beschrieben weiterverarbeitet.

## 2.4 PROTEINANALYTISCHE METHODEN

Zytokeratin 18 ist ein weit verbreitetes Strukturprotein in Zellen und wird während der Apoptose gespalten. Das dabei gebildete Zytokeratin 18-Neoepitop ist ein charakteristisches Merkmal der Apoptose und kann mit dem spezifischen Antikörper M30 CytoDeath der Fa. Roche im Western-Blot nachgewiesen werden. Untersucht wurden das konditionierte Medium und die Explantate.

### 2.4.1 PROBENVORBEREITUNG

Mindestens 4 Explantate (ca. 120 mg), die unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden, wurden in 50 ml PBS gewaschen. Den gewaschenen Explantaten wurden 2 ml Protein Extraktions Puffer (PBS + Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail) und 2  $\mu$ l 200 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid in Isopropanol) zugesetzt. Anschließend wurden sie bei 4°C und Maximalgeschwindigkeit für 10-20 s mit dem Polytron homogenisiert. Danach wurde das Homogenat bei 1500 x g und 4°C 15 min zentrifugiert, je 500  $\mu$ l des Überstands in 1,5 ml Eppendorf Gefäße transferiert und bei -20°C bis zu weiteren Verwendung gelagert.

### 2.4.2 PROTEINQUANTIFIZIERUNG

Die Proteinbestimmung nach Lowry dient dazu, die Proteinmenge in den konditionierten Medien bzw. den homogenisierten Explantaten zu ermitteln. Dazu wurden folgende Materialien benötigt:

Standard-Protein (1,5 mg/ml bovines Serum- albumin [BSA] in PBS)	Proben der konditionierten Medien bzw. der homogeni- sierten Explantate:  unverdünnt 1 : 5 verdünnt mit Aqua bidest. 1 : 10 verdünnt mit Aqua bidest. 1 : 50 verdünnt mit Aqua bidest. 1 : 100 verdünnt mit Aqua bidest.
96 well Mikrotiterplatten	
D <sub>c</sub> Protein Assay Reagent A	
D <sub>c</sub> Protein Assay Reagent B	

**Tab. 2.1** Material zur Proteinbestimmung nach LOWRY

Die Standards wurden nach Tabelle 7.2 (siehe Anhang) mit verschiedenen Proteinkonzentrationen angesetzt und mit den zu bestimmenden Proben gemäß Tabelle 7.1 (siehe Anhang) in vier „96 well“-Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend wurden in jede Vertiefung je 25  $\mu\text{l}$  Protein Assay Reagent A und 200  $\mu\text{l}$  Protein Assay Reagent B gegeben. Die Mikrotiterplatten wurden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann im ELISA-Reader Tecan Sunrise 15 s geschüttelt. Die Extinktionen wurden bei 750 nm gemessen und mithilfe der Software Magellan 3.1 ausgewertet. Aus drei Proben pro Bedingung wurde die durchschnittliche Proteinkonzentration in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durch Abgleich mit der Standardkurve ermittelt. Das erforderliche Probenvolumen, in dem sich 100  $\mu\text{g}$  Protein befanden, wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{100 \mu\text{g}}{[\text{Protein}] \mu\text{g}/\mu\text{l}}$$

### 2.4.3 PROBENPUFFER

Zunächst wurden die Proben dreimal 15 s mit je 10 min Pause gevortext und dann 10 min bei 1500 x g zentrifugiert. Der Probenpuffer wurde im Verhältnis 1:6 zugesetzt, 1 min zentrifugiert, 5 min bei 100°C im Heizblock inkubiert und erneut 1 min zentrifugiert. Natriumdodecylsulfat führt zur Denaturierung der Proteine und lädt diese negativ. Dadurch wandern die entfalteten Proteine bei der Gelelektrophorese im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Das im Probenpuffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert intra- und intermolekulare Disulfidbrücken.

Probenpuffer	
3 ml	1 M Tris ph 6,8
3 ml	Glycerin
500 $\mu$ l	$\beta$ -Mercaptoethanol
1,2 g	SDS
0,1 ml	10 mg/ml Bromphenolblau
ad 10 m.	Aqua bidest.

**Tab. 2.2** Herstellung der Pufferlösung für die Proben

#### 2.4.4 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Mithilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteingemische nach dem Molekulargewicht (in Dalton bzw. Kilo-Dalton) aufgetrennt werden. Als Träger dient ein hochvernetztes Polyacrylamidgel, das aus Acrylamid und Bisacrylamid hergestellt wird. Durch verschiedene Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid kann die Porengröße variiert werden, um so eine optimale Separierung der Proteine zu erreichen.

Zwischen zwei mit Methanol gereinigte Glasplatten wurde Trenngelpuffer gefüllt und dieser mit Aqua bidest. überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Wasser abgeschüttet und der Sammelgelpuffer zugegeben. Zur Aussparung von Geltaschen wurde ein 10-zähliger Teflonkamm zwischen die Glasplatten in den Sammelgelpuffer eingeführt. War der Sammelgelpuffer ebenfalls auspolymerisiert, konnten die Gele in die Elektrophorese-Kammern gestellt werden. Die Kammern wurden mit Elektrodenpuffer gefüllt und von Luftblasen befreit. Je 10  $\mu$ l einer mit Probenpuffer vorbereiteten Probe wurden in die Geltaschen pipettiert. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes lief auf der ersten Bahn SeeBlue Plus2 der Fa. Invitrogen als Marker mit. Bei einer Stromstärke von 60 mA lief die Elektrophorese ca. 1 h.



10%-iges Trenngel	3%-iges Sammelgel
5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl pH 8,8)	2,5 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8)
6,66 ml Acrylamid- Bisacrylamid-Lsg. 30%	1 ml Acrylamid- Bisacrylamid-Lsg. 30%
8 ml Aqua bidest.	6,3 ml Aqua bidest.
0,2 ml Natrium-Dodecylsulfat 10%	0,2 ml Natrium-Dodecylsulfat 10%
120 µl Ammoniumpersulfat 10%	60 µl Ammoniumpersulfat 10%
10 µl Tetramethylethyldiamin	20 µl Tetramethylethyldiamin
Elektrodenpuffer	Trenngelpuffer
30,3 g Tris	181,71 g Tris
144,1 g Glycin	ad 1 l Aqua bidest.
10 g Natrium-Dodecylsulfat	Sammelgelpuffer
ad 10 l Aqua bidest.	60,57 g Tris
	ad 1 l Aqua bidest.

**Tab. 2.3** Herstellung der Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

### 2.4.5 WESTERN-BLOT

Die Bildung des Zytokeratin 18-Neoepitops gehört zu den charakteristischen Merkmalen einer Apoptose. Beim Western-Blot kann dieses Neoepitop mit dem Antikörper M30 CytoDeath der Fa. Roche detektiert werden. Zunächst müssen die im Gel separierten Proteine auf Nitrocellulosemembranen geblottet werden. Hierzu wurden die Gele zusammen mit den Nitrocellulosemembranen zwischen Filterpapiere gelegt und mit Transferpuffer getränkt. Durch das Abrollen mit einem Fotoroller wurden vorhandene Luftblasen entfernt. Transferiert wurde 30 min mit 200 mA auf dem Fastblot der Fa. Biometra.

<b>Transferpuffer</b>	<b>Blockierlösung</b>
0,6 mg Tris 2,88 mg Glycin 20 ml Methanol ad 200 ml Aqua bidest.	1 x TBS 12,11 g Tris 87,66 g NaCl 5% fettfreies Magermilchpulver ad 1 l Aqua bidest.
<b>TBS (Tris Buffered Saline)</b>	<b>Waschlösung</b>
150 ml NaCl 10 mM Tris	1 x TBS 0,05% Tween 20

**Tab. 2.4** Herstellung der Puffer für das Western-Blotting

Zum Abdecken der freien Bindungsstellen auf den Blotmembranen wurden diese für 60 min in Blockierlösung (1x TBS + 5% fettfreies Magermilchpulver) gelegt. Anschließend wurden die Membranen für 20 min mit Waschlösung auf dem Kipptisch inkubiert, gefolgt von 5 min mit frischer Waschlösung.

Die Inkubation der Membranen mit dem Primärantikörper M30 erfolgte für 24 h bei 4°C (1x TBS + 5% Magermilchpulver + 0,1% M30). Nach einem weiteren Waschschrift wurde für 60 min mit dem Sekundärantikörper, Ziege-anti-Maus-Antikörper konjugiert an alkalische Phosphatase der Fa. Jackson Immunoresearch Laboratories, inkubiert (1x TBS + 5% Magermilchpulver + 0,1% Antikörper). Zur Entfernung der nicht gebundenen Antikörper wurden die Blots 20 und 5 min in Waschlösung gegeben und anschließend 5 min mit 1x TBS gewaschen.

Zur Darstellung der gebundenen Antikörper wurden die Nitrocellulosemembranen mit den Proteinen nach oben in Schälchen gelegt und mit Immun-Star Chemilumineszenz Substrat benetzt. Abschließend wurde der Blot mit Zellophan abgedeckt und mit Röntgenfilmen der Fa. Kodak in Filmkassetten eingelegt. Die Filme wurden zwischen 2 und 10 min der Chemilumineszenz exponiert und in der Dunkelkammer entwickelt.

## 2.5 DNA-GELELEKTROPHORESE

Während der Apoptose wird DNA durch Endonukleasen fragmentiert, es entstehen primär größere DNA Bruchstücke, später Fragmente zwischen 140 und 220 bp (Basenpaare) und deren Vielfachen. Diese Größe ergibt sich aus „Histon-assoziiertes DNA (etwa 140 bp)“ + „Linker-DNA (etwa 20-80 bp)“ und deren Vielfachen. Die Fragmentierung der DNA zu Oligonukleosomen ist durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel nachweisbar. Wir untersuchten (1) Zottenexplantate, (2) konditionierte Medien und (3) subzelluläre Fragmente im konditionierten Medium mit der DNA-Gelelektrophorese im Hinblick auf ein Apoptose-spezifisches „Leitermuster“.

### 2.5.1 PROBENVORBEREITUNG

Je vier Explantate (ca. 120 mg) wurden in 10 ml 70% Ethanol bei 4°C homogenisiert und bei -20°C mindestens 24 h gelagert. Die zentrifugierten konditionierten Medien wurden mit dem 2,5-fachen Volumen 70% Ethanol versetzt und wie die in 70% Ethanol resuspendierten subzellulären Fragmente für 24 h bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 800 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 2 µl Phosphat-Zitrat-Puffer (192 Anteile 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 8 Anteile 0,1 M Zitronensäure pH 7,8) pro mg Homogenat resuspendiert. Das resuspendierte Homogenat wurde bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert, anschließend mit 1000 x g für 10 min zentrifugiert. 200 µl des resultierenden Überstandes wurde in Eppendorfröhrchen gegeben, mit dem SpeedVac der Fa. Savant 90 min vakuumkonzentriert und dann mit 3 µl NP 40 0,25%, 1 µl (1 mg/ml) RNase A und 9 µl Aqua bidest. bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Proben wurden mit 2 µl (0,5 mg/ml) Proteinase K versetzt und bei 37°C für 30 min reinkubiert. Anschließend wurden 10 µl Ladepuffer hinzugefügt.

Ladepuffer		TBE (Tris-Borat EDTA)	
0,1 g	Natriumdodecylsulfat	108 g	Tris
25 mg	Bromphenolblau	55 g	Borsäure
3 ml	Glycerin	20 ml	0,5 M EDTA
7 ml	Aqua bidest.	ad 1 l	Aqua bidest.

**Tab. 2.5** Herstellung der Puffer für die DNA-Gelelektrophorese

## 2.5.2 DNA-GELELEKTROPHORESE

Die Separierung der DNA-Fragmente erfolgte in 2,2%igen Agarose-Gelen. Zur deren Herstellung wurde 1,32 g Agarose-Pulver mit 60 ml 0,5x TBE-Puffer versetzt und kurz in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l Ethidiumbromid, das der Visualisierung der DNA im UV-Licht dient, wurde die noch flüssige Agarose in die vorbereiteten Gießkassetten gefüllt und ein Kamm zur Aussparung der Geltaschen eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit 0,5x TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und bei 100 mA und 30 V für 3 h aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden im UV-Durchlicht sichtbar gemacht und digital aufgenommen.

## 2.6 HISTOLOGIE

### 2.6.1 PARAFFINEINBETTUNG

Die Zotten wurden in neutral gepuffertem 4%igen Formalin 2 h bei Raumtemperatur fixiert und anschließend in Ethanol aufsteigender Konzentrationen (70%, 95%, 100%, 100%, 100%) für jeweils 45 min entwässert. Darauf folgten drei je 45 minütige Schritte in Aceton, bevor die Explantate zweimal für je 1 h bei 52°C in Paraffin eingebettet wurden. Die paraffineingebetteten Plazentaprobe wurden mit dem Mikrotom SM 2000 R der Fa. Leica in 4  $\mu$ m dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträger

aufgebracht. Diese waren mit APES (3-Aminopropyl-ethoxysilan) beschichtet, um ein Ablösen der Schnitte bei den folgenden Färbungen zu verhindern.

### **2.6.2 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist die klassische Routinefärbung des histologischen Labors. Sie zeichnet sich durch kurze Färbezeiten und einfache Handhabung aus und bietet einen guten Überblick über die Gewebemorphologie. Zunächst müssen die Schnitte entparaffiniert werden. Dazu wurden diese zweimal 5 min in Xylol und einmal 5 min in Isopropanol gegeben und anschließend in 100% Ethanol für zweimal 5 min dehydriert. Nach zehnminütigem Färben der Schnitte mit Hämatoxylin und Abspülen mit Leitungswasser und Aqua bidest. erschienen die Schnitte bläulich. Zur Rotfärbung des Zytoplasmas wurde 0,1%iges Eosin mit 2 Tropfen Eisessig zugegeben, für 5 min inkubiert und danach mit Aqua bidest. gespült. Daraufhin wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 80% und 100% Ethanol für jeweils zweimal 2 min sowie in Isopropanol für 5 min und Xylol für zweimal 5 min entwässert. Abschließend wurden die Präparate mit Glyceringelatine eingedeckt und mit einem Deckglas verschlossen.

### **2.6.3 IMMUNHISTOCHEMIE**

Die Immunhistochemie bietet die Möglichkeit, das bei der Apoptose entstehende Zytokeratin 18-Neoepitop mithilfe des Antikörpers M30 nachzuweisen und semiquantitativ zu erfassen. Ferner lässt sich das Verteilungsmuster in Kombination mit der Zellmorphologie darstellen. Die immunhistochemische Färbung erfolgt in 4 Schritten:

1. Monoklonaler Primärantikörper M30 1:10 60 min
2. Biotinylierter Sekundärantikörper Kaninchen anti-Maus 1:400 30 min
3. Markierung des Sekundärantikörpers mit Streptavidin 1:400 30 min
4. Färbung mit AEC-Kit 10 min

Der gesamte Färbevorgang fand bei Raumtemperatur statt. Zunächst wurden die Schnitte auf folgende Weise entparaffiniert: zweimal je 5 min in Xylol und zweimal je 30 s in 70% Ethanol. Es folgte eine zehnmünütige Inkubation in 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /Methanol (5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 45 ml Methanol), um die endogene Peroxidase-Aktivität zu hemmen und anschließendes Baden in Aqua bidest. für 10 min. Dann erfolgte eine Vorbehandlung in der Mikrowelle mit kochendem Zitronensäurepuffer (2 g/l Zitronensäure, pH 6,0 mit 1 M NaOH eingestellt) für 15 min und drei je fünfminütige Waschschrirte in PBS. Auf die Schnitte wurde für 10 min Blockierlösung gegeben, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern.

<b>Blockierlösung</b>	
1 x	PBS
1%	bovines Serumalbumin
0,1%	Tween 20

**Tab. 2.6** Herstellung der Blockierlösung für die Immunhistochemie

Die Inkubation mit dem Primärantikörper M 30, 1:10 verdünnt in Blockierlösung, erfolgte für 60 min. Nach dreifacher Spülung mit PBS für je 30 s, wirkte der biotinylierte Sekundärantikörper Kaninchen anti-Maus, 1:400 verdünnt in Blockierlösung, 30 min lang ein. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde dreimal mit PBS gespült. Anschließend wurde Streptavidin (1:400 verdünnt in Tris) zugegeben, welches mehrfach an Biotin bindet und so zu einer Verstärkung des Signals führt. Nicht gebundenes Streptavidin wurde durch zweimal fünfminütiges Spülen mit Tris entfernt. Abschließend wurde das an den Antikörper gebundene Streptavidin für 10 min mit dem AEC-Kit der Fa. Linaris gemäß den Angaben des Herstellers gefärbt (5 ml Aqua bidest. + 2 Tropfen Buffer Stock Solution + 3 Tropfen AEC Stock Solution + 2 Tropfen Hydrogen Peroxidase Solution). Die Reaktion wurde durch zweimal fünfminütiges Spülen mit Aqua bidest. gestoppt. Die Präparate wurden mit Hämalaun 30 s gegengefärbt, mit Glyceringelatine eingedeckt und unter

einem Deckglas verschlossen. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch wie unter 2.6.5 beschrieben.

#### 2.6.4 TUNEL-TEST

Während der Apoptose werden durch aktivierte Endonukleasen freie 3'-OH-Gruppen an den Enden von DNA-Fragmenten erzeugt. Beim TUNEL-Test bindet ein spezifisches Enzym, die „Terminal deoxynucleotidyl Transferase“ (TdT) an die exponierten 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente. TdT katalysiert die Anlagerung von Deoxynukleotiden, die beim TUNEL-Test an Biotin gebunden sind. Durch die anschließende spezifische Bindung von Streptavidin an Biotin können die Strangbrüche dargestellt werden. Der Test ist nur positiv im Stadium der Exekution und ermöglicht so die Identifizierung spät-apoptotischer Zellen.

Die Paraffinschnitte werden in einer absteigenden Ethanolreihe auf folgende Weise entparaffiniert: zweimal 5 min in Xylol, zweimal 5 min in 100% Ethanol, jeweils 3 min in 90%, 80% und 70% Ethanol und abschließendes Spülen in TBS. Der TUNEL-Test wurde mit dem FragEL DNA Fragmentation Detection Kit der Fa. Biochem gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgten die Schritte bei Raumtemperatur.

TBS	
8,12 g	NaCl
2,42 g	Tris
ad 900 ml	Aqua bidest.

**Tab. 2.7** Herstellung der TBS-Lösung für den TUNEL-Test

Zunächst wurden die Schnitte 20 min mit Proteinase K (1:100 mit 10 mM Tris verdünnt) inkubiert und dann dreimal 5 min mit TBS gespült. Nach fünfminütigem Einlegen in 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /Methanol (5 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 45 ml Methanol) wurde erneut mit TBS gespült. Anschließend erfolgte die 20 minütige Inkubation mit TdT Äquilibriumspuffer (1:5 mit Aqua bidest.

verdünnt). Nach Abschütten des Äquilibriumspuffers und Abtrocknen des Objektträgers um das Gewebe wurde mit 57  $\mu\text{l}$  TdT „Labeling Reaction Mix“ und 3  $\mu\text{l}$  TdT Enzym für 90 min bei 37°C inkubiert. Um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurden diese mit Parafilm bedeckt. Es folgten ein Spülschritt mit TBS und Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Stopplösung für 5 min. Anschließend wurde erneut mit TBS gespült und mit 100  $\mu\text{l}$  Blockierlösung für 10 min inkubiert. Dann wurden 100  $\mu\text{l}$  Konjugat (1:50 mit Blockierlösung verdünnt) zugesetzt und nach 30 min mit TBS abgespült. Je 100  $\mu\text{l}$  DAB Lösung (1 Tablette DAB und 1 Tablette  $\text{H}_2\text{O}_2$ /Urea in 1 ml Leitungswasser) wurden auf die Schnitte pipettiert und nach 15 minütiger Inkubation mit Aqua bidest. gespült. Die Präparate wurden mit Methylgrün gegengefärbt, mit Glyceringelatine eingedeckt und mit Deckgläsern verschlossen.

### **2.6.5 LICHTMIKROSKOPIE**

Mithilfe der Lichtmikroskopie kann die Morphologie beurteilt werden. Dabei wurde auf Veränderungen geachtet, die im Rahmen der Apoptose oder Nekrose auftreten. Die histologischen Präparate wurden dazu mit dem Mikroskop Leica DMIL bei 50- bis 400-fachen Vergrößerungen untersucht. Zum Einsatz kamen die Durchlicht-, die Phasenkontrastmikroskopie und die Interferenzmikroskopie nach Nomarski. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden exemplarisch repräsentative Gesichtsfeldausschnitte mit der Kamera Hitachi HV-C20A dokumentiert.



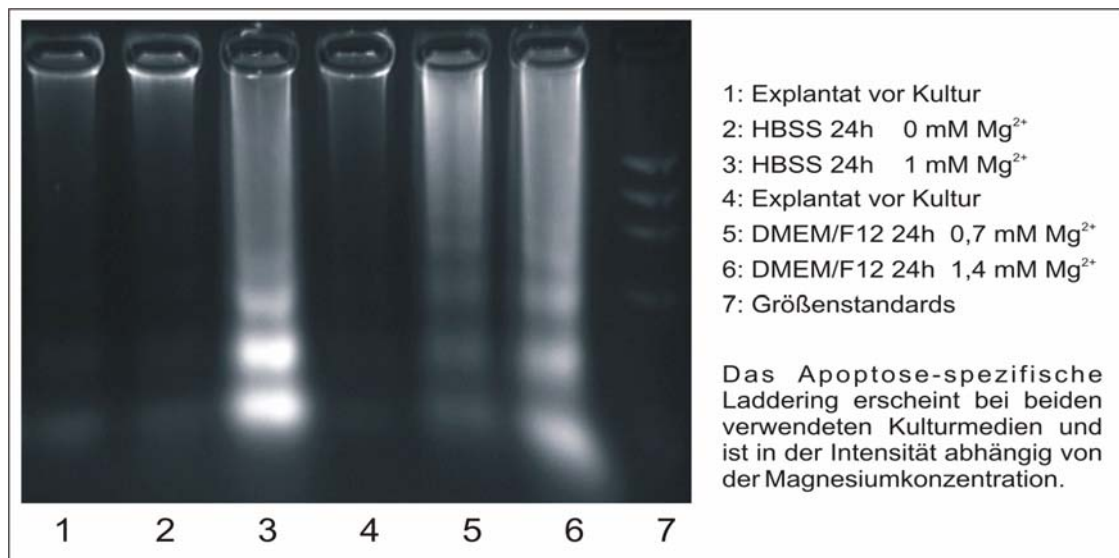
### **3 ERGEBNISSE**

Apoptose führt zu charakteristischen strukturellen Veränderungen an Zellen und zur Bildung spezifischer Abbauprodukte auf Protein- und DNA-Ebene. Diese lassen sich mit einer Vielzahl von Verfahren unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität nachweisen. In dieser Arbeit wurden zum Nachweis Apoptose-spezifischer Vorgänge an den kultivierten Zotten-Explantaten Western-Blotting, DNA-Gelelektrophorese, HE-Färbung, TUNEL-Test und Immunhistochemie eingesetzt. Dabei sollte geklärt werden, welchen Einfluss die Magnesiumkonzentration im Kulturmedium auf die Explantate (3.3.1) bzw. das konditionierte Medium (3.3.2) hat. Eine potenzielle Abhängigkeit von dem verwendeten Kulturmedium (3.1), dem Gestationsalter (3.2) und der Inkubationsdauer (3.4) wurde in gesonderten Versuchsreihen studiert.

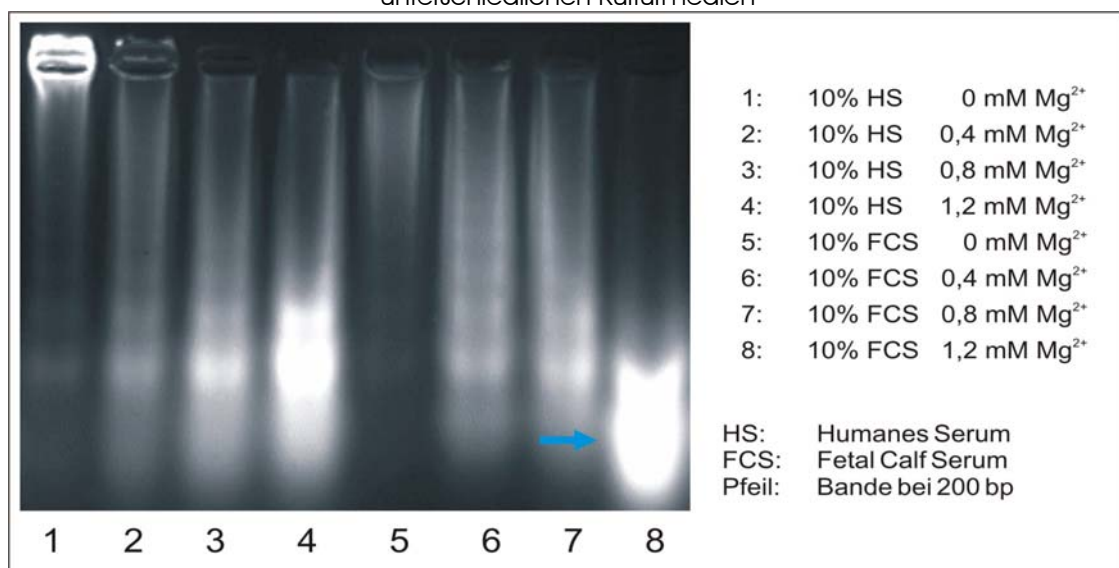
#### **3.1 KULTURMEDIUM**

Die Kultivierung der Zotten-Explantate erfolgte entweder in HBSS oder DMEM/F-12. HBSS ermöglicht Magnesiumkonzentrationen zwischen 0 und 2,0 mM zu verwenden, DMEM/F-12 hingegen eignet sich für die Langzeitkultivierung bis 72 Stunden. Die Wahl des Mediums orientierte sich in den weiteren Versuchen an der jeweiligen Fragestellung. Folglich musste zunächst untersucht werden, ob die Wahl des Kulturmediums auch einen Einfluss auf Apoptose-spezifische Veränderungen an den Zotten-Explantaten ausübt. Dazu wurden Explantate von drei verschiedenen Plazenten in HBSS und DMEM/F-12 mit ansteigenden Magnesiumkonzentrationen für 24 Stunden inkubiert. Die im Anschluss durchgeführten TUNEL-Tests und DNA-Gelelektrophoresen (Abb. 3.1) zeigten keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Medien. Deutlich hingegen zeichnete sich eine Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und der Magnesiumkonzentration ab. In einem weiteren Versuchsabschnitt wurde der Einfluss von humanem Serum bzw. fetalem Kälberserum (FCS) untersucht. Da HBSS im Gegensatz zu DMEM/F12 eine größere Variation bezüglich der

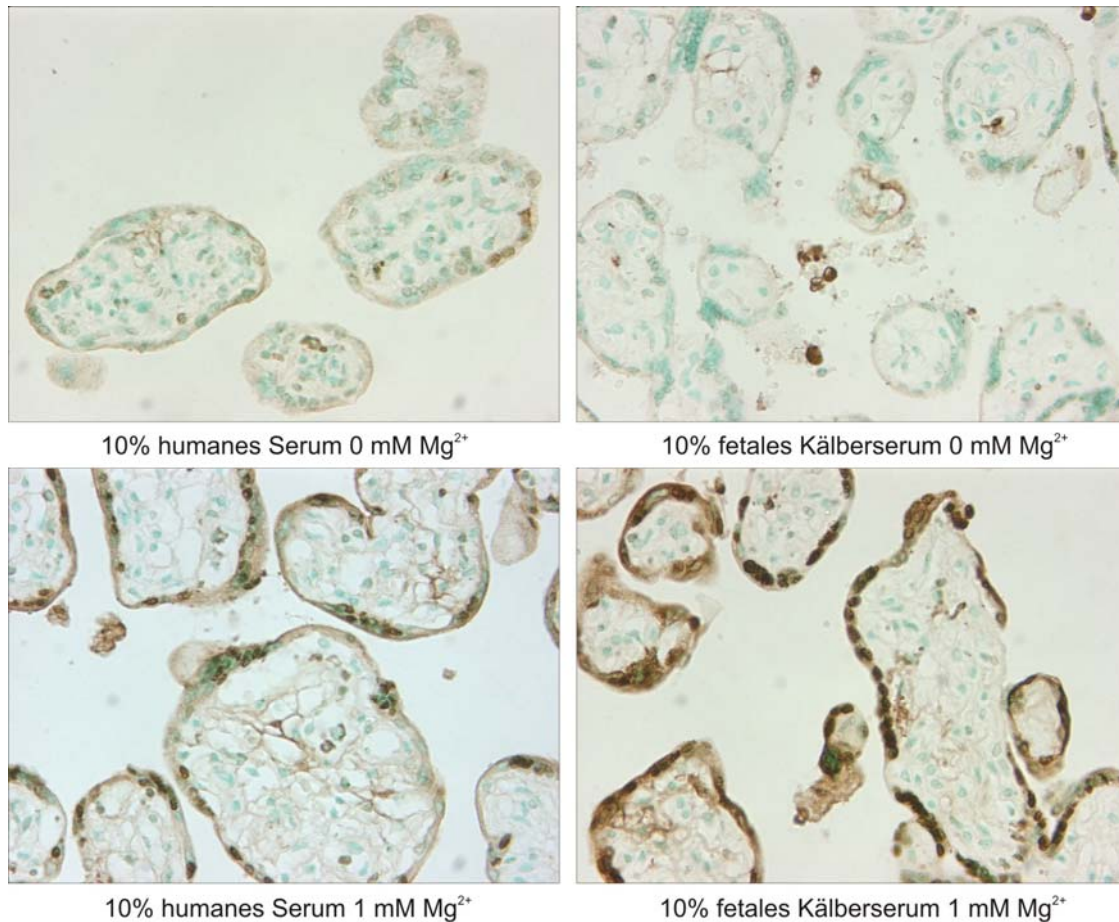
Magnesiumkonzentration zulässt, wurden die folgenden Versuche mit HBSS durchgeführt. Dazu wurden Explantate von drei Plazenten mit 10%igem humanem Serum oder 10%igem FCS für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Explantate mittels DNA-Gelelektrophorese (Abb. 3.2) und TUNEL-Test (Abb. 3.3) untersucht. Bei erhöhten Magnesiumkonzentrationen kam es bei beiden Seren zu einer deutlichen Zunahme der Apoptose. Eine Abhängigkeit vom verwendeten Serum ließ sich nicht nachweisen. Apoptose tritt sowohl unter HBSS wie auch unter DMEM/F-12 auf. Ferner konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen humanem Serum und fetalem Kälberserum festgestellt werden.



**Abb. 3.1** Repräsentative DNA-Gelelektrophorese mit Explantaten einer reifen Plazenta bei unterschiedlichen Kulturmedien



**Abb. 3.2** DNA-Gelelektrophorese mit fetalem Kälberserum und humanem Serum

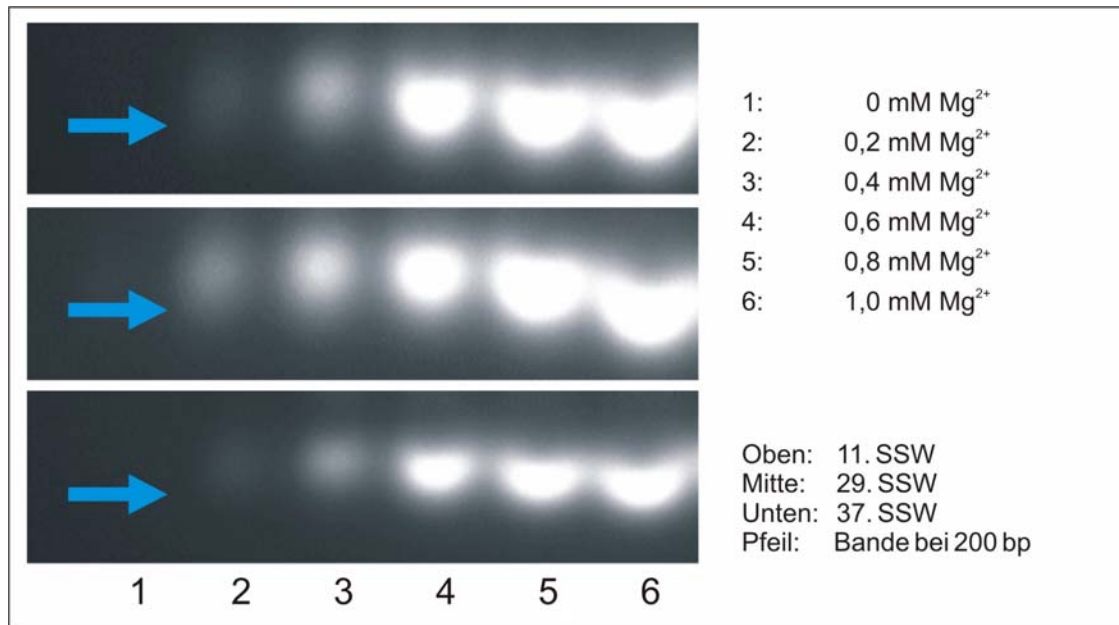


**Abb. 3.3** TUNEL-Test mit Explantaten einer reifen Plazenta (Vergrößerung 200x)

## 3.2 GESTATIONSLALTER

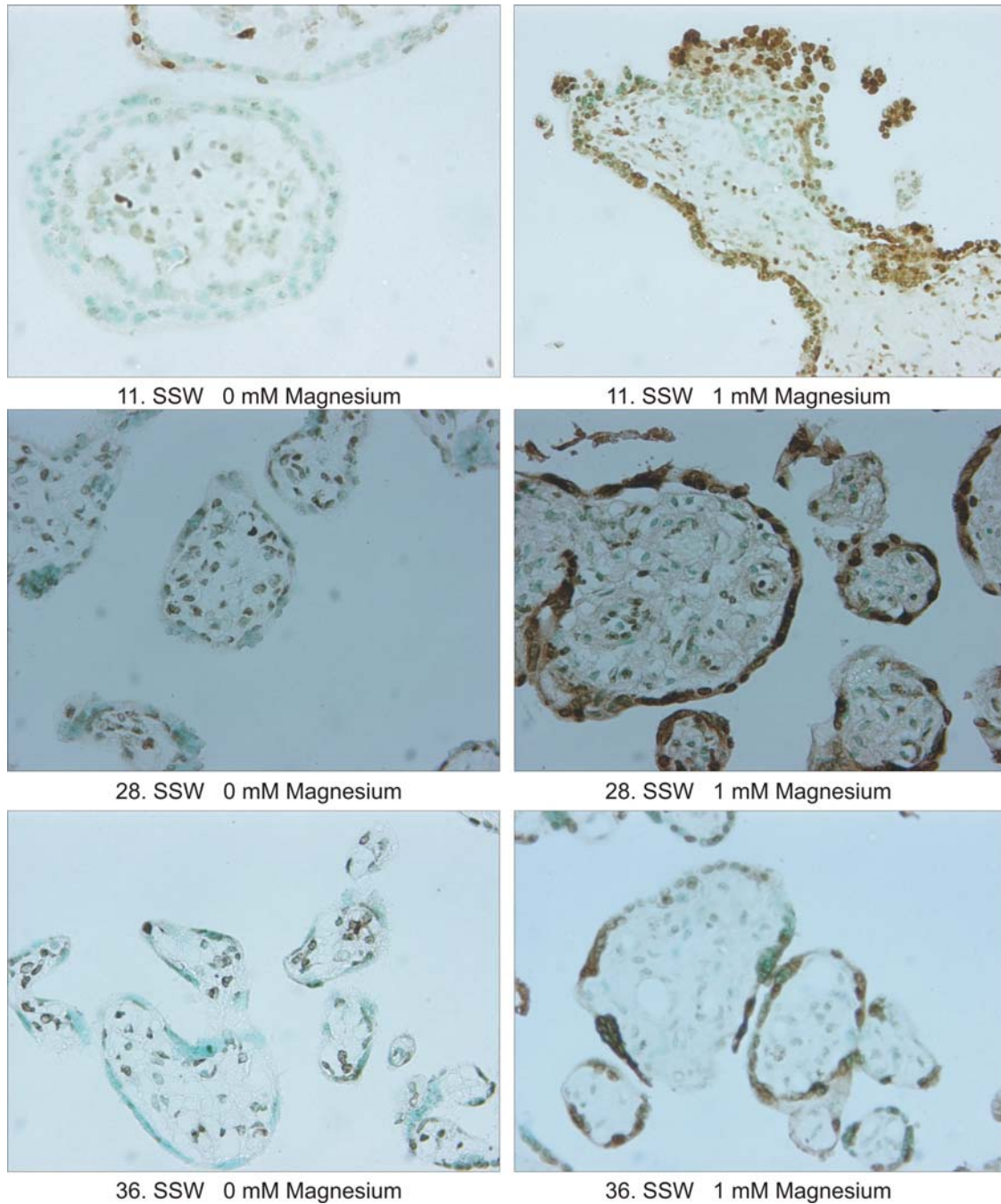
Die Magnesiumkonzentration im Serum gesunder Schwangerer fällt zunächst deutlich ab, um dann gegen Ende der Schwangerschaft wieder leicht anzusteigen. Bei Präeklampsie hingegen liegt die gemessene Magnesiumkonzentration signifikant höher (Abschnitt 1.6). Wie wirken erhöhte Magnesiumkonzentrationen auf Plazenten unterschiedlichen Alters? Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden Versuche mit drei Plazenten aus dem ersten Trimenon (8., 10. und 11. SSW), zwei vorzeitig geborenen (28. und 29. SSW) und drei termingerecht geborenen Plazenten (36. und zweimal 37. SSW) durchgeführt. Zottengewebe dieser Plazenten wurde jeweils 24 Stunden in HBSS mit Magnesiumkonzentrationen von 0 bis 1,0 mM inkubiert. Anschließend wurden DNA-Gelelektrophoresen und TUNEL-Tests durchgeführt. Abbildung 3.4 zeigt je eine repräsentative DNA-Gelelektrophorese pro Bedingung.

Unabhängig vom Gestationsalter fand sich ein Anstieg oligosomaler DNA-Fragmente unter höheren Magnesiumkonzentrationen. Besonders ausgeprägt erschienen Banden im Bereich von 200 Basenpaaren (Pfeile in Abb. 3.4).



**Abb. 3.4** DNA-Gelelektrophorese mit Plazenten unterschiedlichen Gestationsalters

Die identisch behandelten Explantate wurden zusätzlich histologisch aufgearbeitet und mit TUNEL-Tests untersucht. Die Zotten zeigten eine deutliche Zunahme TUNEL-positiver Strukturen bei 1 mM Magnesium im Vergleich zur Inkubation in 0 mM Magnesium (Abb. 3.5). Diese liegen vor allem im Bereich des Trophoblasten, vereinzelt auch im Stroma. Deutliche Unterschiede zwischen Explantaten aus Plazenten unterschiedlichen Gestationsalters lassen sich auch hier nicht nachweisen.



**Abb. 3.5** TUNEL-Test mit Explantaten dreier Plazenten nach 24-stündiger Inkubation (Vergrößerung 200x)

### 3.3 MAGNESIUMKONZENTRATION

Die vorangegangenen Versuchsreihen ließen den Schluss zu, dass erhöhte Magnesiumkonzentrationen im Kulturmedium mit verstärkter Apoptose im Trophoblasten einhergehen. In den folgenden Experimenten sollte diese Abhängigkeit näher untersucht werden. Der Nachweis Apoptose-spezifischer



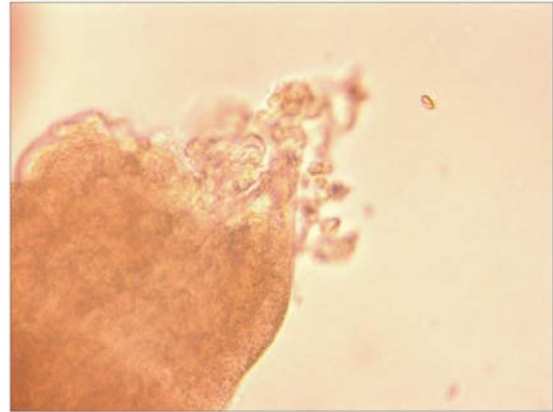
Veränderungen im Trophoblasten erfolgte morphologisch und immunhistochemisch sowie mit TUNEL-Test, DNA-Gelelektrophorese und Western-Blot.

### 3.3.1 ZOTTEN-EXPLANTATE

**Morphologie.** Zur Beurteilung der morphologischen Veränderungen an den inkubierten Explantaten wurden diese nativ mit der Phasenkontrastmikroskopie und nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung untersucht. Nach 48 stündiger Inkubation der Zottenexplantate mit Magnesiumkonzentrationen bis 0,4 mM bildete der Synzytiotrophoblast eine intakte, durchgehende Schicht mit glatt begrenzter Zottenoberfläche. Das Zottenstroma erschien homogen mit gleichmäßig verteilten Zellkernen. Die fetalen Kapillaren waren intakt. Bei Magnesiumkonzentrationen über 0,6 mM zeigte sich eine deutliche Zunahme des trophoblastären Sheddings. Die Oberfläche des Synzytiotrophoblasten wirkte nun ausgefranst und unregelmäßig begrenzt, es bildeten sich vermehrt Bläschen (Pfeile in Abb. 3.7). Magnesiumkonzentrationen von 1,6 mM gingen mit partieller Abschilferung des Synzytiotrophoblasten einher. Fetale Gefäße lagen teilweise ohne Bedeckung durch den Synzytiotrophoblasten frei. In einigen Präparaten war das Endothel der Zottenkapillaren so brüchig, dass fetale Blutzellen im intervillösen Raum anzutreffen waren. Die synzytialen Zellkerne waren geschrumpft und enthielten kondensiertes Chromatin und bildeten teilweise Cluster. Das Stroma bot nun ein inhomogenes, fransiges Bild und im Kulturmedium schwammen Membranfragmente. In Abbildung 3.6 ist das Shedding des Trophoblasten mit Abgabe synzytiotrophoblastärer Membranfragmente in das Kulturmedium besonders gut zu erkennen. Die beobachteten morphologischen Veränderungen an den Zotten-Explantaten, vor allem das kondensierte Chromatin, die Clusterbildung der Zellkerne und die Bläschenbildung an der Oberfläche des Synzytiotrophoblasten sprechen für einen apoptotischen Zelltod.



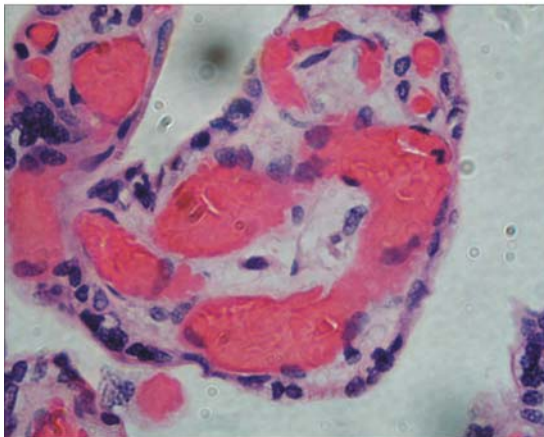
DMEM/F12 0,7 mM Magnesium



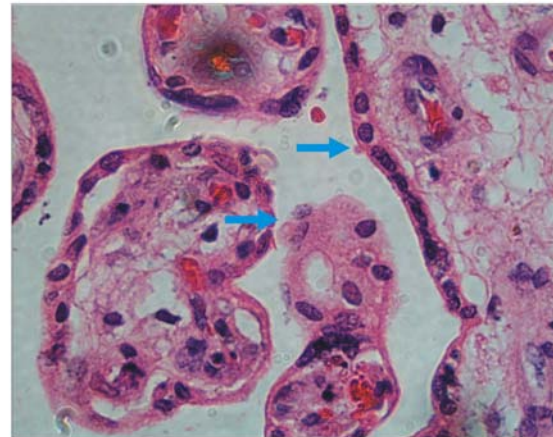
DMEM/F12 1,4 mM Magnesium

Deutlich erkennbar sind das trophoblastäre Shedding und die Abgabe synzytiotrophoblastärer Membranfragmente in das Kulturmedium bei 1,4 mM Magnesium.

**Abb. 3.6** Zotten einer reifen Plazenta nach 24 stündiger Inkubation (Phasenkontrastmikroskopie, Vergrößerung 200x)



HBSS 0 mM Magnesium

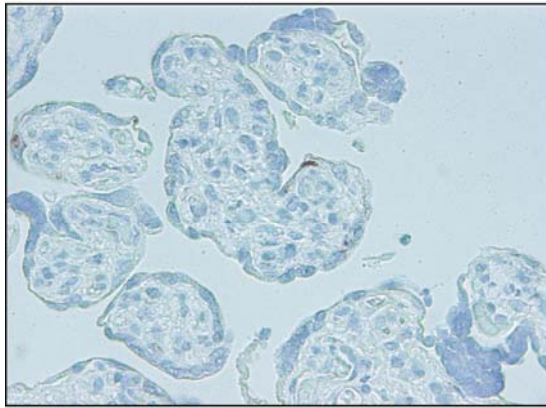


HBSS 1,6 mM Magnesium  
Pfeil: Blebbing an der Zelloberfläche

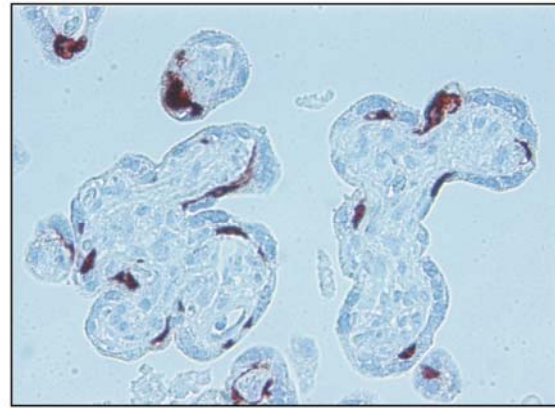
**Abb. 3.7** Zotten einer reifen Plazenta nach 48 stündiger Inkubation (Paraffin-Schnitt in Hämatoxylin-Eosion-Färbung, Vergrößerung 400x)

**Immunhistochemie.** Die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden immunhistochemisch mit dem Antikörper M30 gefärbt und mikroskopisch ausgewertet unter Verwendung von 100-, 200- und 400-fachen Vergrößerungen. Untersucht wurden Plazenten unterschiedlichen Gestationsalters, die jeweils mit 0 oder 1 mM Magnesium für 24 h inkubiert wurden. Eine positive Reaktion mit dem Antikörper M30 lässt sich an einer rötlich-braunen Färbung des Zytoplasmas erkennen. Die Abbildungen 3.8 bis 3.10 zeigen repräsentative Gesichtsfeldausschnitte. Bei einer Magnesiumkonzentration von 0 mM erkennt man vereinzelte M30-positive Strukturen im Bereich des Synzytiotrophoblasten.

Eine deutliche Immunreaktion konnte bei Inkubation mit 1 mM beobachtet werden. Ein Teil der positiven Zellen liegt verstreut im Synzytium, andere bilden Cluster (Pfeile in Abb. 3.10) im Sinne von Synzytialknoten. Das Zottenstroma, als nicht-epitheliales Gewebe, ist frei von M30-positiven Strukturen.



HBSS 0 mM Magnesium

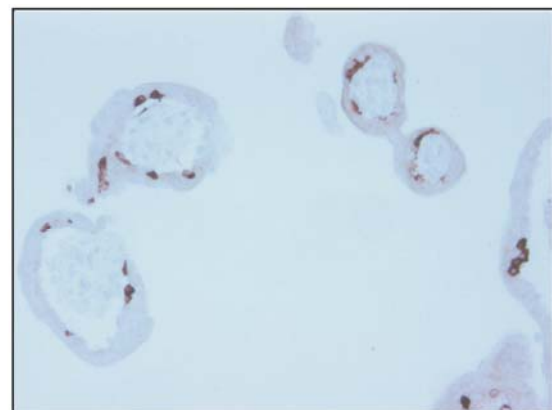


HBSS 1 mM Magnesium

**Abb. 3.8** Plazenta des 1. Trimenons (12. SSW) nach 24 stündiger Inkubation (Interferenzmikroskopie nach Nomarski, Vergrößerung 200x)

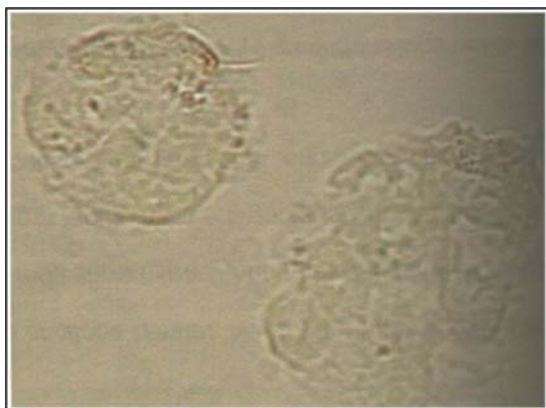


HBSS 0 mM Magnesium

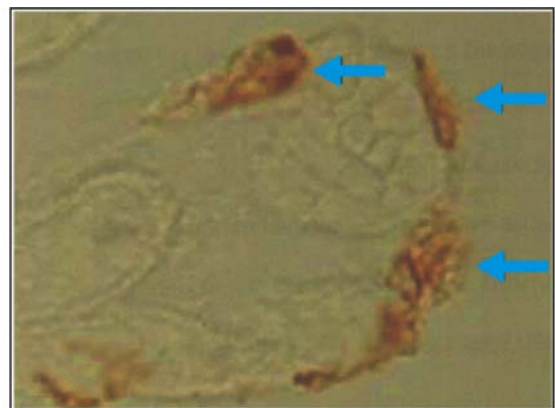


HBSS 1 mM Magnesium

**Abb. 3.9** Vorzeitig geborene Plazenta (29. SSW) nach 24 stündiger Inkubation (Interferenzmikroskopie nach Nomarski, Vergrößerung 200x)



HBSS 0 mM Magnesium

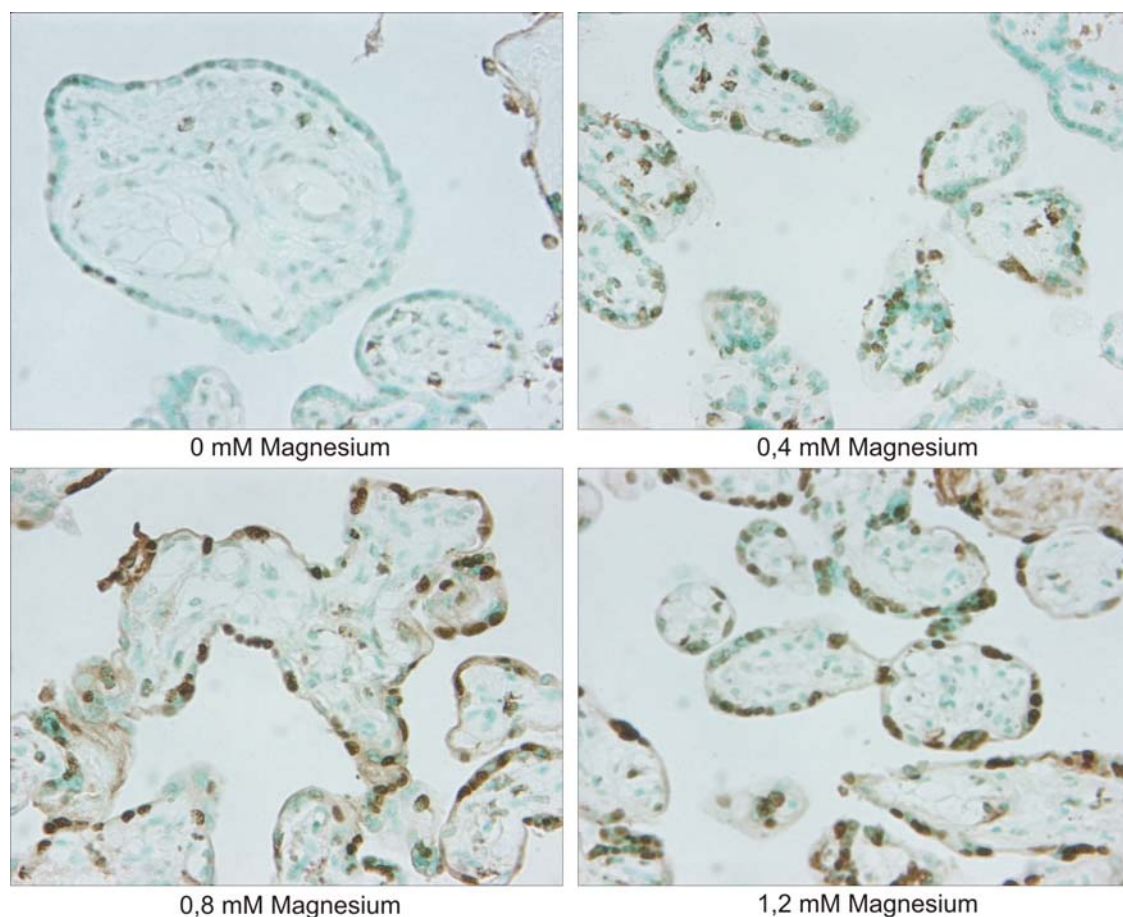


HBSS 1 mM Magnesium (Pfeil: Synzytialknoten)

**Abb. 3.10** Reife Plazenta (36. SSW) nach 24 stündiger Inkubation (Phasenkontrastmikroskopie, Vergrößerung 400x)



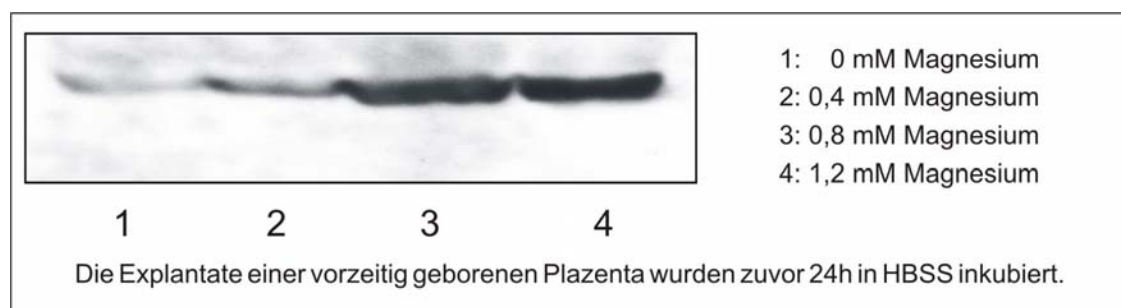
**TUNEL-Test.** Apoptose führt zur Bildung freier 3'-OH- Gruppen an den Enden von DNA-Fragmenten, die sich mit dem TUNEL-Test nachweisen lassen und hier als dunkelbraune Strukturen erscheinen. Dazu wurden Plazenten in Magnesiumkonzentrationen von 0 bis 1,2 mM Magnesium inkubiert. Die Schnitte wurden bei 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung mikroskopisch ausgewertet. Die TUNEL-positiven Strukturen lagen überwiegend im Trophoblasten, vereinzelt auch im Zottenstroma. Da Einzelstrangbrüche nicht Apoptose-spezifisch sind, sondern auch in anderen Phasen des Zellzyklus vorkommen, wurden nur Zellkerne, die sich braun anfärbten und zugleich kondensiertes Chromatin zeigten, als positiv gewertet (Abb. 3.11). Ansteigende Magnesiumkonzentrationen gingen mit einer deutlichen Zunahme TUNEL-positiver Zellkerne einher.



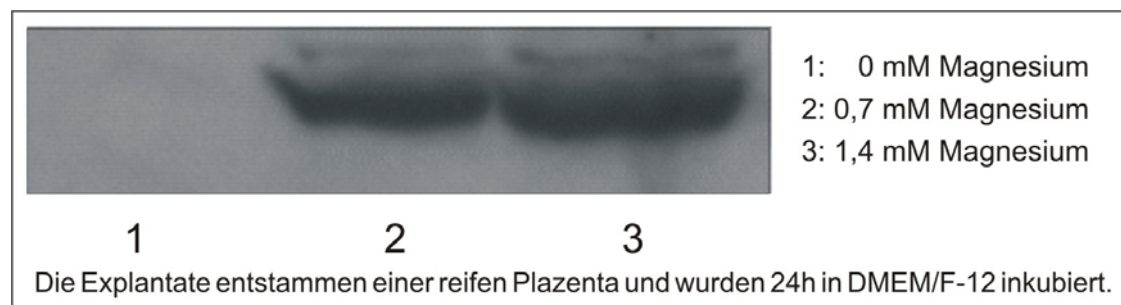
**Abb. 3.11** TUNEL-Test mit Explantaten (29. SSW) nach 24 stündiger Inkubation (Vergrößerung 200x)

**Western-Blot.** Die Proteine der Explantatkulturen wurden in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Blotten und der

Inkubation mit dem Antikörper M30 zeigten sich positive Banden im Bereich von 54 kDa. Dies spricht für die Bildung von Zytokeratin-18-Neoepitopen, die im Rahmen der Apoptose auftreten. Die Stärke des Signals korrelierte mit der Magnesiumkonzentration im Medium. Die Western-Blots wurden mit Explantaten von insgesamt vier reifen Plazenten durchgeführt. Diese Ergebnisse ließen sich mit Gewebeproben von einer Plazenta aus dem ersten Trimenon (nicht dargestellt) und einer vorzeitig geborenen Plazenta reproduzieren. In Abbildung 3.12 und 3.13 sind repräsentative Blots dargestellt.



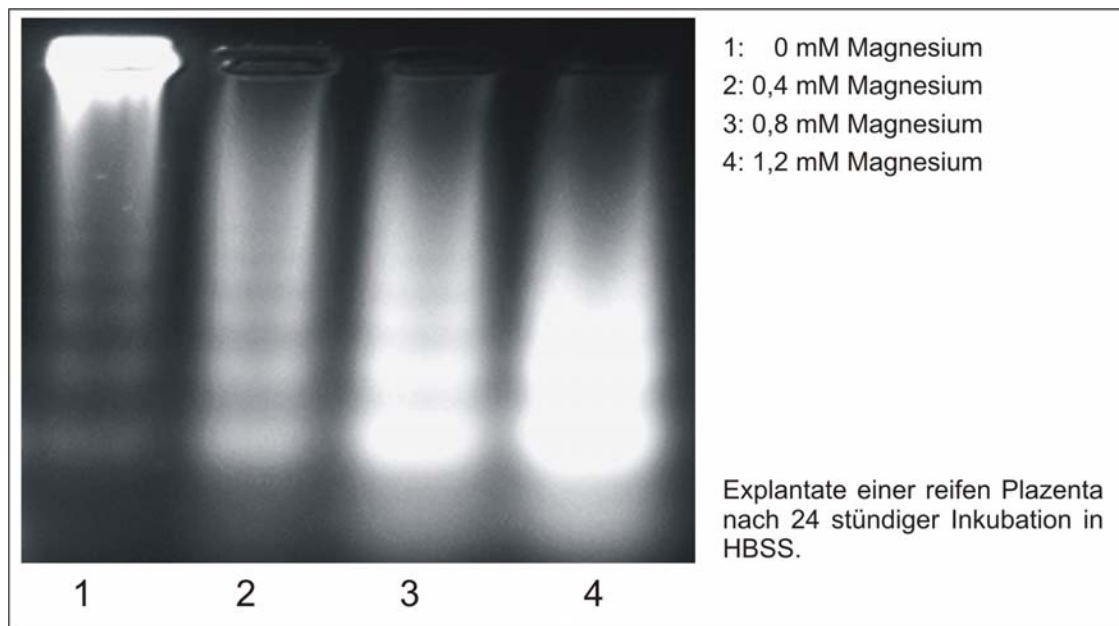
**Abb. 3.12** Western-Blot mit M30



**Abb. 3.13** Western-Blot mit M30

**DNA-Laddering.** Nach Durchführung der DNA-Gelelektrophorese zeigten sich Banden bei 200 bp und Vielfachen. Dieses Muster ist vereinbar mit dem charakteristischen DNA-Laddering, das im Rahmen der Apoptose auftritt. Das Apoptose-spezifische Laddering war bereits bei 0 mM Magnesium zu erkennen, nahm im Bereich höherer Magnesiumkonzentrationen an Intensität zu (Abb. 3.14). Bei Magnesiumkonzentrationen von 1,2 mM wurde fast die gesamte DNA in 200 Basenpaaren Nukleosomen gespalten. Ansteigende Magnesiumkonzentrationen gingen also mit vermehrter Bildung oligosomaler

DNA-Fragmente einher. Diese Experimente wurden mit Explantaten von drei verschiedenen Plazenten wiederholt.



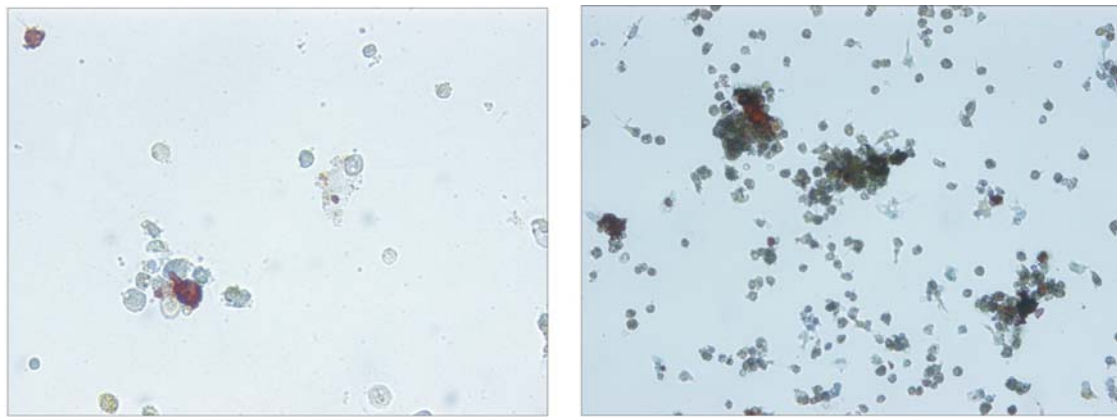
**Abb. 3.14** DNA-Gelelektrophorese

### 3.3.2 KONDITIONIERTES MEDIUM

Nach der Inkubation der Explantate wurden diese mit einer sterilen Zange aus den Kulturmedien entfernt. Die so gewonnenen konditionierten Medien wurden zunächst zentrifugiert. Es resultierte ein am Boden befindliches Pellet mit subzellulären Fragmenten und ein zellfreier Überstand (Tab. 3.1). Das Pellet wurde resuspendiert und die subzellulären Fragmente mit dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Zunahme an Zellen und Zellfragmenten bei höheren Magnesiumkonzentrationen. Durch Färbung mit dem Antikörper M30 ließen sich Zytokeratin-18-Neoepitope innerhalb der subzellulären Fragmente identifizieren (Abb. 3.15). Dies veranschaulicht, dass die subzellulären Fragmente zumindest teilweise apoptotischen Ursprungs sind.

<b>Konditioniertes Medium</b>	
Subzelluläre Fragmente	Zellfreies konditioniertes Medium
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Phasenkontrastmikroskopie nach Färbung mit M30</li> <li>- DNA-Gelelektrophorese der intrafragmentären DNA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bestimmung der Gesamtproteinfreisetzung</li> <li>- DNA-Gelelektrophorese der zellfreien DNA</li> <li>- Western-Blot mit M30</li> </ul>

**Tab. 3.1** Aufbereitung des konditionierten Mediums



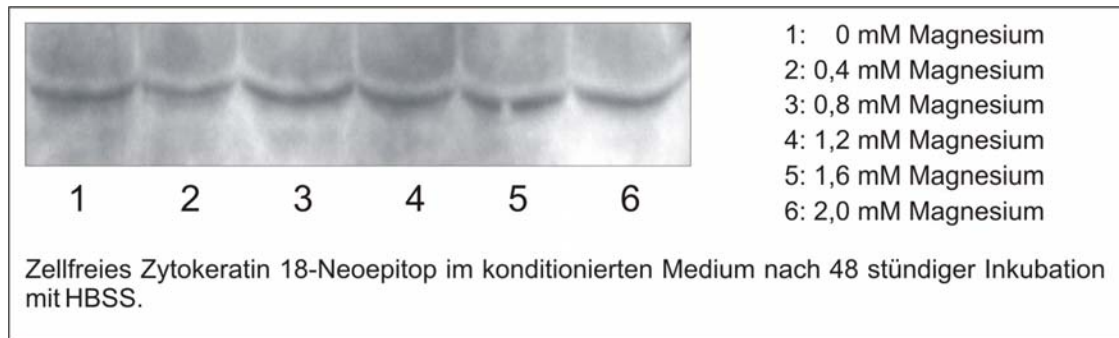
0,7 mM Magnesium

1,4 mM Magnesium

Explantate einer reifen Plazenta nach 24 stündiger Inkubation in DMEM/F-12. Die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper M30 stellt apoptotische Fragmente des Trophoblasten dar. (Phasenkontrastmikroskopie, Vergrößerung links 100x, rechts 50x)

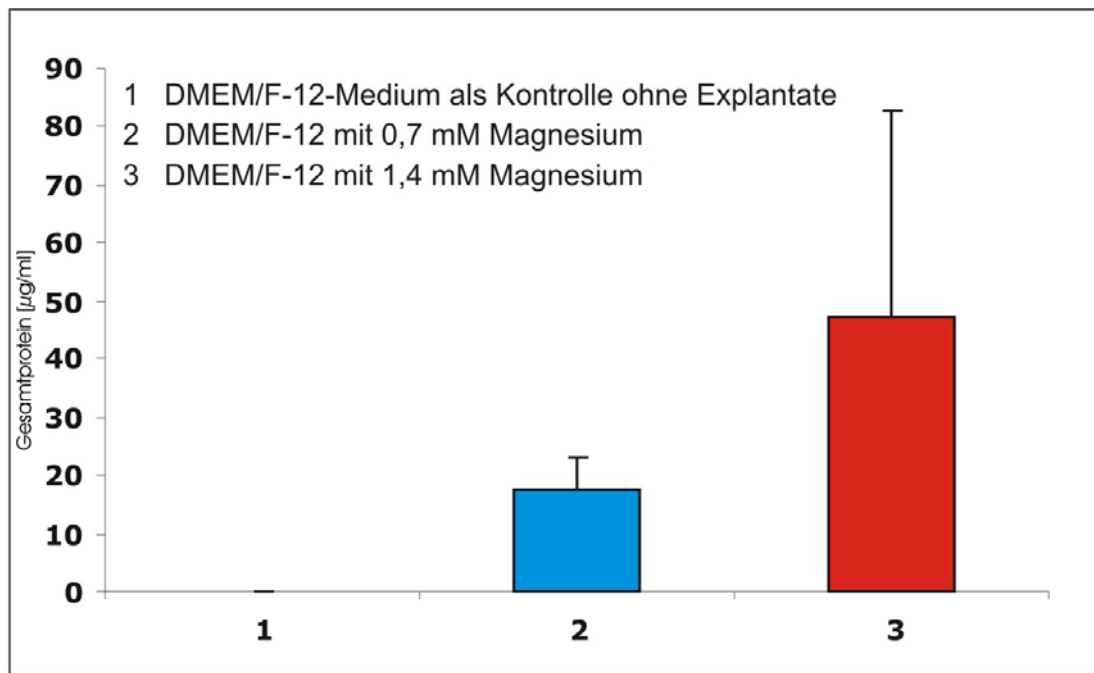
**Abb. 3.15** Subzelluläre Fragmente im konditionierten Medium

**Western-Blot.** Der zellfreie Überstand des konditionierten Mediums wurde ebenfalls mithilfe des Antikörpers M30 auf das Zytokeratin-18-Neoepitop untersucht. Dies konnte auch im Western-Blot nachgewiesen werden, allerdings zeigte sich bei insgesamt vier Plazenten und Inkubationsdauern zwischen 12 und 48 Stunden keine Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration (Abb. 3.16). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu allen bisherigen, die eine positive Korrelation zwischen Magnesiumkonzentration und Bildung von Zytokeratin-18-Neoepitopen ergeben hatten. Dabei nahm die Gesamtproteinfreisetzung aus den Explantaten in das Kulturmedium bei höheren Magnesiumkonzentrationen zu (Abb. 3.17). Vor diesem Hintergrund war eine konstante Menge von Zytokeratin-18-Neoepitopen im Medium umso bemerkenswerter.



**Abb. 3.16** Western-Blot mit M30

Um diese Gesamtproteinfreisetzung zu bestimmen, wurde bei vier Plazenten zunächst eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Anschließend wurden die Gele densitometrisch ausgewertet. Bei höheren Magnesiumkonzentrationen im Medium war die Proteinfreisetzung deutlich vermehrt (Abb. 3.17). Aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs ( $n=4$ ) war der Unterschied zwischen 0,7 mM und 1,4 mM Magnesium allerdings nicht signifikant ( $p < 0.07$ ).

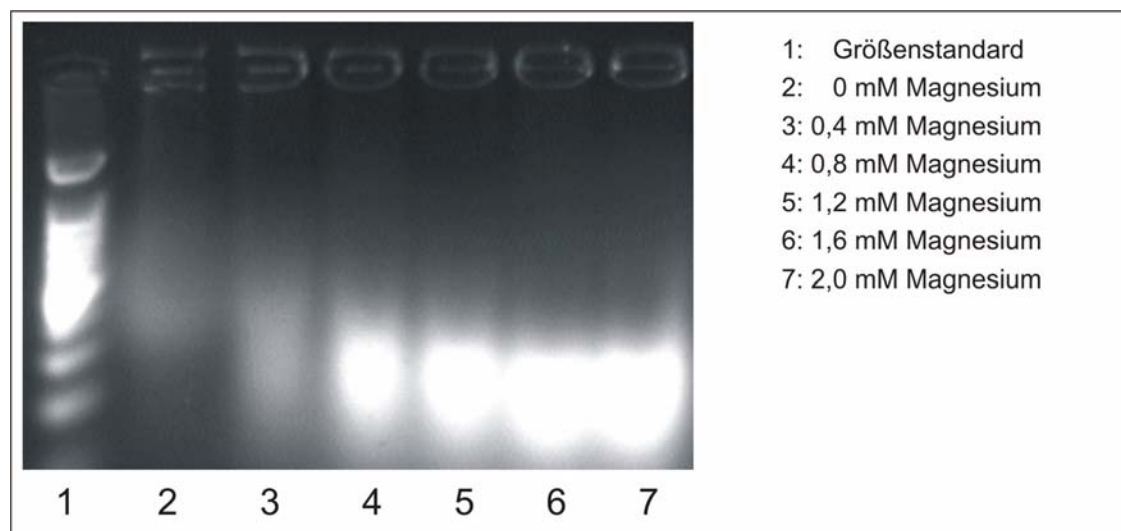


**Abb. 3.17** Gesamtproteinfreisetzung aus den Explantaten in das Medium nach 48 stündiger Inkubation

**DNA-Gelelektrophorese.** Neben der Proteinfreisetzung ins Kulturmedium wurde noch die Abgabe placentarer DNA untersucht. Unterschieden wurde zwischen der zellfreien DNA und der in Zellfragmenten befindlichen

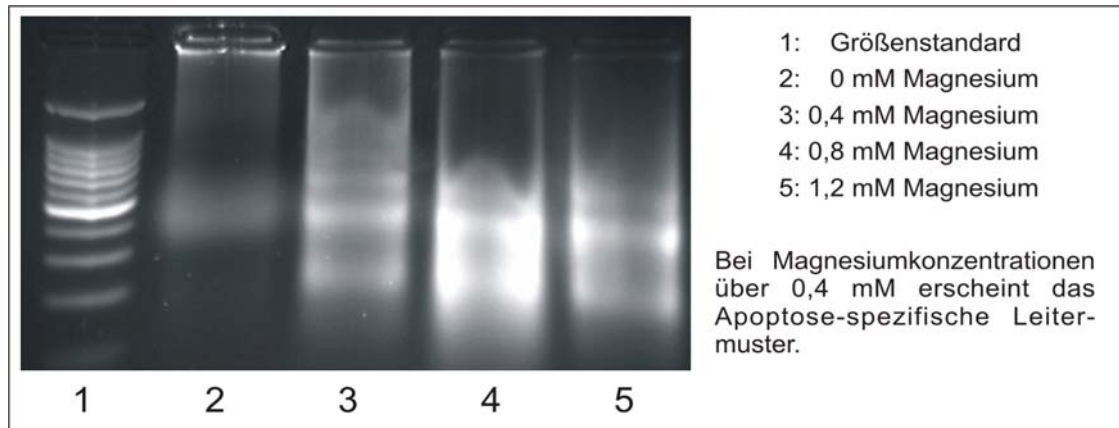


intrafragmentären DNA. Da zellfreie DNA im Rahmen der normalen Apoptose nicht abgegeben wird, spricht deren Vorkommen im konditionierten Medium für Nekrose. Ansteigende Magnesiumkonzentrationen führten zu qualitativen und quantitativen Veränderungen bei der Freisetzung zellfreier DNA. In den konditionierten Medien, die kein zusätzliches Magnesium enthielten, ließ sich keine zellfreie DNA nachweisen. Niedrige Magnesiumkonzentrationen waren mit Nukleosomen der Größenordnung um 400 bis 600 bp assoziiert. Magnesiumkonzentrationen von 0,8 mM führten zu einer Intensitätszunahme der DNA in der Gelelektrophorese. Noch höhere Magnesiumkonzentrationen gingen dann mit niedermolekularen DNA-Fragmenten um 200 bis 400 bp einher. Abbildung 3.18 zeigt eine repräsentative DNA-Gelelektrophorese des konditionierten Mediums. Deutlich werden die Zunahme der Intensität und die Verschiebung hin zu kleineren DNA-Fragmenten mit steigender Magnesiumkonzentration.



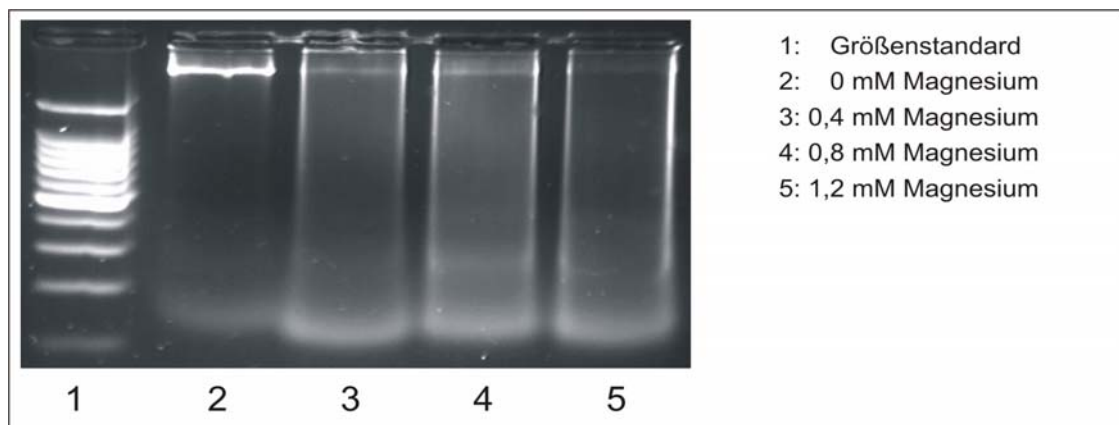
**Abb. 3.18** Zellfreie DNA im konditionierten Medium nach 48 stündiger Inkubation in HBSS

Zusätzlich fiel bei einigen Elektrophoresen mit konditioniertem Medium auf, dass zellfreie DNA auch ein Apoptose-spezifisches Laddering zeigte (Abb. 3.19). Dieses trat jedoch nur bei Konzentrationen über 0,4 mM Magnesium auf. Das Auftreten zellfreier apoptotischer DNA könnte ein Hinweis für eine kombinierte apoptotische und nekrotische Freisetzung von DNA sein. Abschnitt 4.2.2 der Diskussion beschäftigt sich eingehender mit dieser Thematik.

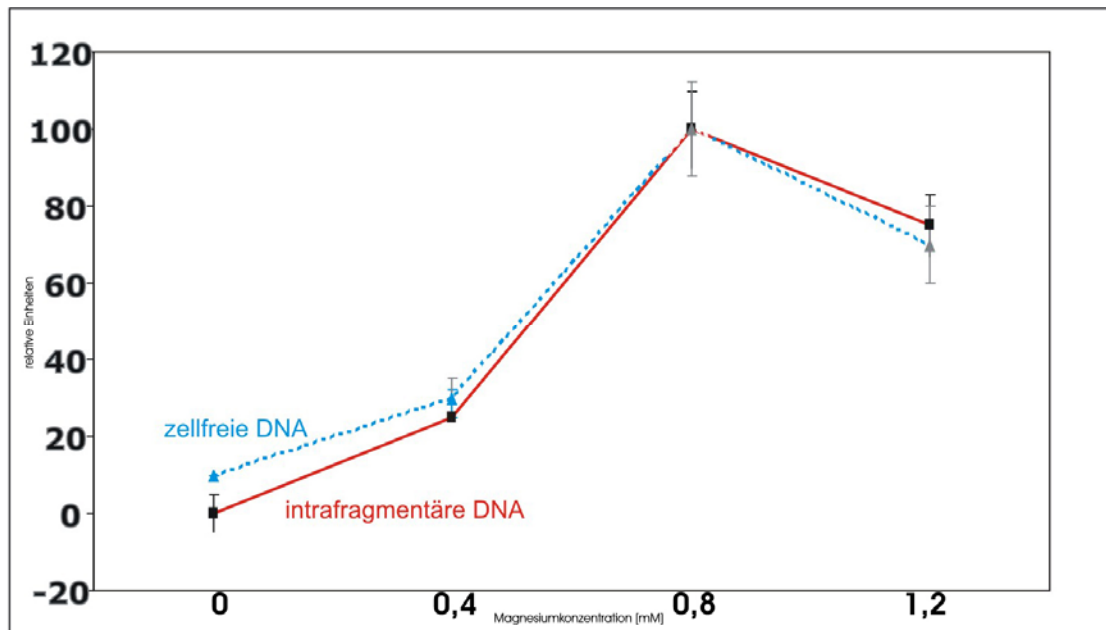


**Abb. 3.19** Zellfreie DNA im konditionierten Medium nach 48 stündiger Inkubation in HBSS

Die elektrophoretische Untersuchung der intrafragmentären DNA zeigte ebenfalls ein Laddering, welches ab 0,4 mM Magnesium auftrat und bei höheren Magnesiumkonzentrationen intensiver ausfiel (Abb. 3.20). Abschließend erfolgte die densitometrische Auswertung der DNA-Gelelektrophoresen für die konditionierten Medien von sechs Plazenten. Abbildung 3.21 zeigt die Ergebnisse für die zellfreie und die intrafragmentäre DNA. Niedrige Magnesiumkonzentrationen waren bei zellfreier und intrafragmentärer DNA mit weniger DNA-Freisetzung assoziiert. Magnesiumkonzentrationen von 0 und 0,4 mM gingen mit einer signifikant geringeren DNA-Freisetzung einher als Konzentrationen von 0,8 mM ( $n=6$ ,  $p < 0.001$ ) bzw. 1,2 mM ( $n=6$ ,  $p < 0.001$ ). Der maximale Wert wurde bei einer Konzentration von 0,8 mM Magnesium im Medium gemessen. Dies ist im Vergleich zu 1,2 mM jedoch nicht signifikant ( $n=6$ ,  $p < 0.065$ ) und am ehesten stichprobenbedingt.



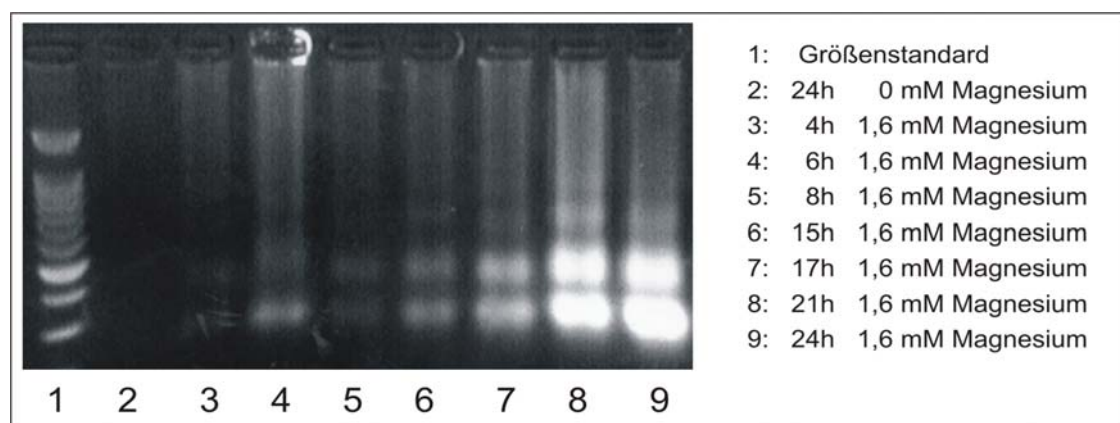
**Abb. 3.20:** Intrafragmentäre DNA im konditionierten Medium nach 24 stündiger Inkubation in HBSS



**Abb. 3.21** Densitometrische Auswertung der DNA-Gelelektrophoresen mit DNA aus den konditionierten Medien

### 3.4 INKUBATIONSDAUER

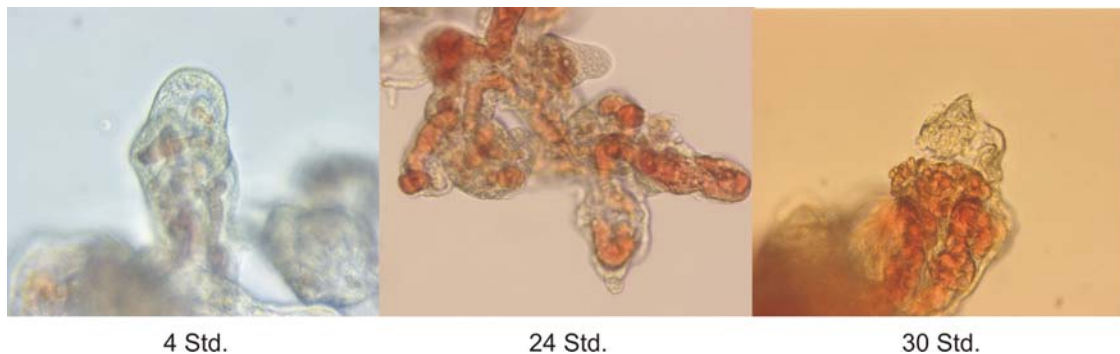
Um Veränderungen an den Explantaten in Abhängigkeit von der Zeit festzustellen, wurden diese bis zu 48 Stunden inkubiert und anschließend mittels DNA-Gelelektrophorese und Lichtmikroskopie untersucht. Explantate von insgesamt drei Plazenten wurden in HBSS mit 1,6 mM Magnesium gegeben. Nach 6 Stunden zeigte sich bereits die Bildung oligosomaler DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese. Dieser Effekt war noch intensiver bei längerer Inkubationsdauer. Als Kontrolle wurden Explantate für 24 Stunden in 0 mM Magnesium inkubiert. Hier fand sich kein Apoptose-spezifisches Laddering (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22** DNA-Gelelektrophorese mit Explantaten einer reifen Plazenta nach Inkubation in HBSS



Abschließend wurden die Explantate einer reifen Plazenta in DMEM/F-12 mit 0,7 mM Magnesium inkubiert. Die lichtmikroskopische Untersuchung der Explantate zeigte eine sukzessive Degeneration der Zottenstruktur. Nach 4 Stunden präsentierten sich die Terminalzotten intakt, während nach 24 Stunden degenerative Veränderungen sichtbar wurden. Das Endothel der fetalen Kapillaren trat in direkten Kontakt mit dem Kulturmedium. Nach 30 Stunden verlor der Trophoblast zunehmend die Integrität, deutlich sichtbar wurde das breitbasige Abschilfern des Synzytiotrophoblasten. Schließlich brachen die exponierten Kapillaren auf und fetale Blutzellen traten in das Kulturmedium über (Abb. 3.23).



**Abb. 3.24** Zottenexplantate nach insgesamt 36 stündiger Inkubation in DMEM/F-12 bei 1,4 mM Magnesium (Phasenkontrastmikroskopie, Vergrößerung 200x)

## 4 DISKUSSION

### 4.1 MAGNESIUM-INDUZIERTE APOPTOSE IM TROPHOBLASTEN

#### 4.1.1 ZOTTEN-EXPLANTAT-MODELL

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Auswahl eines in vitro Modells, welches möglichst vollständig das Verhalten von Plazentagewebe unter Magnesiumexposition abbilden kann und damit Rückschlüsse auf die in vivo Situation ermöglicht. Seit Anfang der 1960er Jahre sind Zotten-Explantat-Modelle ein fester Bestandteil der Plazentaforschung (Carr 1964). Zunächst wurden an ihnen feto-maternale Interaktionen studiert (Tremblay et al. 1965, Dancis et al. 1968, Longo und Kleinzeller 1970). Auch Erkenntnisse über metabolische und endokrine Funktionen sowie den Sauerstoffverbrauch im Trophoblasten konnten aus den Kulturmodellen gewonnen werden (Fox 1970, Ahmed und Murphy 1988). In den 1990er Jahren dienten sie vermehrt der Erforschung von Proliferation und Differenzierung des Trophoblasten (Mayhew et al. 1999, Vicovac et al. 1995). Im letzten Jahrzehnt galt dann die Aufmerksamkeit vor allem apoptotischer Vorgänge im Trophoblasten. Aus den Puzzlesteinen Proliferation, Differenzierung, synzytiale Fusion und apoptotischer Zelltod entstand so ein Gesamtbild, das Huppertz et al. (2002) treffend als Turnover des Trophoblasten beschrieben. Störungen im regelrechten Ablauf des Turnovers äußern sich als Plazentadysfunktion und können sich klinisch in Form einer fetalen Wachstumsretardierung oder einer Präeklampsie manifestieren. Im Hinblick auf erhöhte Magnesiumkonzentrationen im Serum präeklampsischer Frauen und gegebenenfalls therapeutische Magnesiumgaben bei Präeklampsie ist unser Wissen über die Wirkung von Magnesium auf die Plazenta sehr beschränkt. Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Wirkung von Magnesium auf den Trophoblasten in vitro untersucht und somit das pathophysiologische Verständnis der Präeklampsie um einen Baustein bereichert werden.

Bei der Auswahl des Kulturmodells gilt es zwischen isolierten Trophoblasten-Zellkulturen und Zotten-Explantaten zu differenzieren. Keinem der Modelle kann generell der Vorzug gegeben werden, vielmehr sollte sich die Wahl an der zu untersuchenden Fragestellung orientieren. Zum Studium trophoblastärer Vorgänge bietet ein Zotten-Explantat-Modell den Vorteil, den physiologischen Kontext des villösen Trophoblasten mit fetalem Mesenchym, Endothelzellen und plazentaren Immunzellen, wie den Hofbauer-Zellen, zu erhalten. Proliferation und Turnover des Trophoblasten sind weiterhin gewährleistet, Interaktionen zwischen Stroma und Trophoblast können ungestört stattfinden. Allerdings lässt sich mit dieser Methode das Verhalten individueller Zelltypen, im Gegensatz zur isolierten Zellkultur, nur eingeschränkt untersuchen. Hier wurde beabsichtigt, mit den Experimenten generelle Rückschlüsse auf das Verhalten von Plazentagewebe unter Magnesiumexposition zu ziehen. Die Wahl fiel daher auf das Zotten-Explantat-Modell, das einfacher die Übertragung der in vitro gewonnenen Ergebnisse auf die in vivo Situation gestattet.

**Magnesiumkonzentration im Medium.** Um das Verhalten des Trophoblasten bei unterschiedlich hohen Magnesiumkonzentrationen im Medium zu studieren, wurden Konzentrationen gewählt, die Nahe der physiologischen Werte für ionisiertes Magnesium während der Schwangerschaft liegen: 0,53 mmol/l ( $\pm 0,04$ ) im ersten Trimenon, 0,51 mmol/l ( $\pm 0,03$ ) im zweiten Trimenon und 0,53 mmol/l ( $\pm 0,03$ ) im dritten Trimenon (*Sanders et al. 1998*). Auch die im Rahmen der Präeklampsie erhöhten Magnesiumkonzentrationen von  $0,61 \pm 0,06$  mmol/l (*Sanders et al. 1998*) werden in unserem Modell abgebildet. Die maximalen Konzentrationen von 1,4 mM unter DMEM/F-12 bzw. 2,0 mM unter HBSS korrelieren im allgemeinen nicht mit in vivo gemessenen Werten, dienen jedoch der Veranschaulichung eines Trends, der sich bereits bei niedrigeren Konzentrationen abzeichnet.

**Kulturmedien.** Wir verwendeten in Abhängigkeit des Versuchdesigns zwei allgemein anerkannte Medien zur Kultivierung plazentaren Gewebes: Hank`s

Balanced Salt Solution (HBSS) der Firma Sigma oder Dulbecco`s Modified Eagle`s/Ham`s F-12 (DMEM/F-12) der Firma Sigma. HBSS ermöglicht Magnesiumkonzentrationen von 0 bis 2,0 mM und eine Kultivierung der Explantate bis zu 24 Stunden. DMEM/F-12 wurde für Magnesiumkonzentrationen von 0,7 oder 1,4 mM verwandt und eignet sich für Langzeitkultivierungen bis zu 72 Stunden ohne Medienwechsel.

Kulturmedien müssen zwei Anforderungen genügen: ein physiologisches Milieu für die Zotten-Explantate bereitstellen und gleichzeitig die zu untersuchenden Ergebnisse möglichst wenig beeinflussen. Diese Faktoren wurden zunächst in Vorversuchen getestet. So zeigte sich, dass unter niedrigen Magnesiumkonzentrationen selbst bei Langzeitkultivierung die Zotten-Explantate morphologisch intakt waren und übermäßige Zeichen von Apoptose nicht auftraten. Außerdem kultivierten wir Zotten-Explantate parallel in HBSS oder DMEM/F-12 und werteten anschließend die Explantate mittels DNA-Gelelektrophorese, TUNEL-Test und Western-Blot aus (siehe Abschnitt 3.1). Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Wahl des Kulturmediums konnte nicht gezeigt werden.

**Serum.** Bei der Kultivierung von Zellen dienen Seren der Bereitstellung von Substraten für den Metabolismus und enthalten eine Vielzahl bedeutender extrazellulärer Enzyme, Wachstumsfaktoren, Hormone und Transportproteine. Üblicherweise wird fetales Kälberserum eingesetzt, gebräuchlich sind aber auch Seren anderer Spezies wie Pferd, Schwein, Ziege, Schaf oder Kaninchen. Wir testeten den Einfluss von fetalem Kälberserum im Vergleich zu humanem Serum, das von gesunden Probanden unseres Labors stammte. Eine wesentliche Beeinflussung der Ergebnisse durch die Wahl des Mediums konnte nicht nachgewiesen werden (siehe 3.1), so dass wir aus ökonomischen und immunologischen Gründen die folgenden Experimente mit fetalem Kälberserum durchführten.

**Plazentagewebe.** In unsere Versuchsreihe wurden insgesamt 22 Plazenten aus dem ersten oder dritten Trimenon eingeschlossen. Um altersabhängige

Faktoren der Magnesium-induzierten Apoptose im Trophoblasten auszuschließen, wurden in einem gesonderten Versuchsabschnitt Plazenten des 1. Trimenons, vorzeitig und termingerecht geborene Plazenten in aufsteigenden Magnesiumkonzentrationen inkubiert (siehe Abschnitt 3.2). Die anschließende Auswertung mit DNA-Gelelektrophorese und TUNEL-Test zeigte keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich Qualität und Quantität der Apoptose.

Um allgemeingültige Aussagen über den Effekt von Magnesium auf plazentares Gewebe treffen zu können, wurden nur Plazenten ohne bekannten pathologischen Schwangerschaftshintergrund verwendet. Vergleichende Studien zwischen gesunden und präeklampsischen Plazenten sollen in später folgenden Versuchsreihen durchgeführt werden. Die hier vorgelegten Ergebnisse sind repräsentativ für Magnesiumeffekte auf die gesunde Plazenta jeden Gestationsalters, lassen sich jedoch nur eingeschränkt auf die Verhältnisse bei Präeklampsie übertragen.

#### **4.1.2 KONZENTRATIONSABHÄNGIGE APOPTOSE**

In den oben beschriebenen Vorversuchen zu Kulturmedien, verwendeten Seren und Gestationsalter zeigte sich bereits eine Abhängigkeit der Apoptose von der Magnesiumkonzentration im Medium. Die daraus abgeleitete Hypothese einer konzentrationsabhängigen Magnesium-induzierten Apoptose im Trophoblasten sollte in den folgenden Versuchsreihen systematisch untersucht werden. Zotten-Explantate unterschiedlichen Gestationsalters wurden in aufsteigenden Magnesiumkonzentrationen inkubiert und anschließend apoptotische Vorgänge morphologisch, immunhistochemisch und proteinbiochemisch dargestellt. Zur Visualisierung von DNA-spezifischen Veränderungen setzten wir den TUNEL-Test und die DNA-Gelelektrophorese ein. Die Methoden sind in der Wissenschaft allgemein anerkannte und vielfach erprobte Verfahren, insbesondere zur Darstellung des apoptotischen Zelltodes finden sie breite Anwendung. Im folgenden Abschnitt sollen Vor- und

Nachteile der einzelnen Methoden im Hinblick auf die Apoptose im Trophoblasten kurz diskutiert und die Ergebnisse unserer Studien vorgestellt werden.

**Morphologie.** Zunächst untersuchten wir die Zotten-Explantate nativ mit Phasenkontrastmikroskopie und anschließend nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die lichtmikroskopische Untersuchung mit 100facher Vergrößerung verschaffte grob orientierend einen Überblick über die morphologischen Veränderungen an den Explantaten und dem konditionierten Medium. Höhere Magnesiumkonzentrationen gingen mit vermehrtem trophoblastärem Shedding einher, fetale Gefäße lagen teilweise ohne synzytiotrophoblastäre Bedeckung frei und im konditionierten Medium nahm die Menge synzytiotrophoblastärer Membranfragmente zu. Die 200- bzw. 400fache Vergrößerung offenbarte Bläschenformationen an der Oberfläche des Trophoblasten und eine Kondensation des Chromatins.

Die strukturellen Veränderungen zu Beginn der Apoptose wie das Blebbing der Plasmamembran können isoliert betrachtet nicht zum Nachweis der Apoptose dienen. Erst fortgeschrittene Stadien mit Veränderungen der Kernmorphologie sind Apoptose-spezifische Kriterien. Die Interpretation der nativen bzw. HE-gefärbten Präparate ist in hohem Maße abhängig von der Erfahrung des Betrachters. Subjektive Bewertungen, eine Verzerrung der Ergebnisse durch die Auswahl des Gesichtsfeldes und Fehlinterpretationen aufgrund von Artefakten sind bei dieser Methode nicht auszuschließen. Dennoch sind in Zusammenschau der von uns erhobenen Befunde die morphologischen Veränderungen der Zotten-Explantate bei höheren Magnesiumkonzentrationen eindeutig mit Apoptose vereinbar.

**Immunhistochemie.** Die Immunhistochemie ist die Methode der Wahl zur Lokalisation eines Proteins im Gewebe. Wir setzten den monoklonalen Antikörper M30 zur Detektion von Zytokeratin 18-Neoepitopen ein, die Caspase-vermittelt beim Abbau des Zytoskeletts freigelegt werden. Die Verwendung des Antikörpers wurde bereits für andere epitheliale Gewebe

dargestellt, u.a. Endometrium (*Morsi et al. 2000*), Kolon (*Carr 2000*), Speicheldrüsen (*Kusama et al. 2000*) und Leber (*Ballardini et al. 2001*). Kadyrov et al. (2001) konnten für plazentares Gewebe zeigen, dass M30 sehr spezifisch spät-apoptotische Trophoblasten markiert. M30 ist dabei dem TUNEL-Test überlegen, da der Antikörper weniger falsch-positive Ergebnisse liefert, durch einfache Handhabung besticht und wenig anfällig für Artefakte ist.

Die immunhistochemische Auswertung der histologischen Präparate bestätigte die Hypothese einer konzentrationsabhängigen Magnesium-induzierten Apoptose im Trophoblasten. Die Bildung der Zytokeratin 18-Neoepitope beschränkte sich in unseren Schnitten auf den Trophoblasten, im Zottenstroma ließ sich keine positive Reaktion nachweisen. Da Zytokeratine epitheliale Strukturen sind, wären Anfärbungen des Stromas als falsch-positiv zu werten gewesen. Unsere Erfahrungen decken sich mit Kadyrov et al. (2001), nach denen der Antikörper M30 hervorragend geeignet ist, apoptotische Strukturen im Trophoblasten darzustellen.

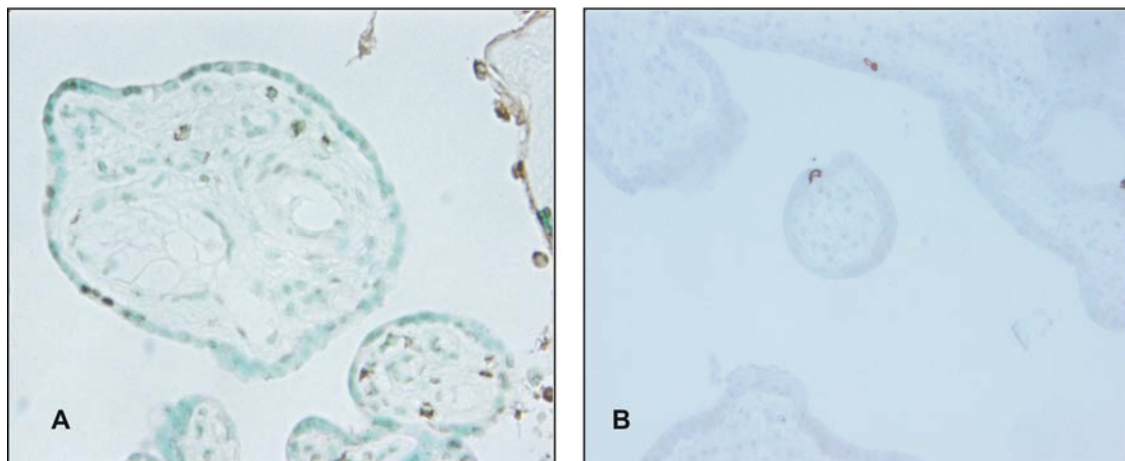
**TUNEL-Test.** Der TUNEL-Test ermöglicht die Visualisierung von DNA-Einzelstrangbrüchen, wie sie im Rahmen der Apoptose auftreten. Die TUNEL-Färbung wurde erstmalig von Gavrieli et al. (1992) beschrieben und ist seitdem eine weit verbreitete Technik. Einige methodische Schwächen müssen allerdings bei der Auswertung bedacht werden: DNA-Einzelstrangbrüche ereignen sich nicht nur bei der Apoptose, sondern treten auch während der Mitose, bei exzessiver Vorbehandlung mit Proteinase K oder bei Nekrose auf (*Huppertz et al. 1999, Charriaut-Marlangue und Ben-Ari 1995*). Ein standardisiertes Protokoll und der Vergleich von positiven Reaktionen mit morphologischen Aspekten sind hilfreich, falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Die Auswertung unserer Schnitte mit der TUNEL-Färbung unterstützte die bisher erhobenen Daten. Je höher die Magnesiumkonzentration im Medium gewählt wurde, desto mehr TUNEL-positive Strukturen imponierten auf dem Präparat.

Allerdings zeigten sich auch bei 0 mM Magnesium viele positive Reaktionen. Dies lässt sich durch zwei Faktoren erklären:

(1) Apoptose ist ein normaler Prozess im Rahmen des Turnovers im Trophoblasten. Daher wird man auch unter physiologischen Bedingungen stets einige apoptotische Zellen in den Zotten-Explantaten finden. Smith et al. (1997) beziffern nach lichtmikroskopischen Untersuchungen an reifen Plazenten die Inzidenz apoptotischer Zellen mit 0,14%; Austgulen et al. (2002) fanden immunhistochemisch mit dem Antikörper M30 einen etwas geringen Anteil von 0,03%.

(2) Vergleicht man die Ergebnisse von TUNEL-Test und Western-Blot fällt auf, dass bei gleicher Magnesiumkonzentration mit der TUNEL-Methode mehr positive Strukturen pro Gesichtsfeld erscheinen als bei der Färbung mit M30 (Abb. 4.1). Zieht man bei der Beurteilung morphologische Kriterien, wie kondensiertes Chromatin hinzu, müssen ein Teil der TUNEL-positiven Kerne als falsch-positiv angesehen werden. Im Hinblick auf eine höhere Spezifität des Antikörpers M30 im Vergleich zum TUNEL-Test stehen unsere Ergebnisse daher im Einklang mit denen von Kadyrov et al. (2001) und Austgulen et al. (2002).



**Abb. 4.1** Vergleich von TUNEL-Test (A) und Immunhistochemie mit M30 (B). Beide Explantate stammen von der gleichen Plazenta (29. SSW) und wurden für 24 h in 0 mM Magnesium inkubiert. Deutlich mehr positive Reaktionen pro Gesichtsfeld beim TUNEL-Test.

**Western-Blot.** Das Western-Blotting ist ein bewährtes Verfahren zur Identifizierung und zum semiquantitativen Nachweis von Proteinen. Zunächst



wurden die Proteine in einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde ein Polyacrylamidanteil von 30% verwendet, der sich als optimal zur Detektion von Zytokeratin-18-Neoepitopen der Größe 54 kDa erwies. Zahlreiche Fehlerquellen galt es auszuschalten, um reproduzierbare und untereinander vergleichbare Resultate zu gewährleisten: exakte Ermittlung der Proteinmasse in den Proben, blasen- und faltenfreie Handhabung beim Transfer und sorgfältige Waschschriffe in Tris-gepufferter Kochsalzlösung mit Tween. Das Western-Blotting war eine aufwendige und stör anfällige Methode und erforderte exakte Einhaltung standardisierter Protokolle, bot dann jedoch mit dem Antikörper M30 ein hohes Maß an Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von Zytokeratin-18-Neoepitopen.

Die Blotbilder zeigten positive Banden im Bereich von 54 kDa, der Molekülgröße von Zytokeratin-18-Neoepitopen. Während Magnesiumkonzentrationen von 0,4 mM mit einer schmalen Bande einhergingen, war ab 0,7 mM Magnesium im Medium die Signalstärke deutlich angehoben. Eine Differenzierung, aus welchem Anteil der Zotten die Zytokeratin-18-Neoepitope stammten, ist naturgemäß mit dieser Methode nicht möglich. Eine Herkunft aus dem Trophoblasten als einzigem epitheliale m Gewebe in den Zotten-Explantaten ist jedoch nahe liegend.

**DNA-Gelelektrophorese.** Während der Apoptose wird DNA durch Endonukleasen zu Oligonukleosomen fragmentiert, die sich durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel nachweisen lassen (Arends *et al.* 1990). Es entsteht ein Leiternmuster, das für späte Phasen der Apoptose spezifisch ist und eine gute Differenzierung zur Nekrose bietet. Zur Extraktion der DNA wurde die Methode nach Gong *et al.* (1994) verwendet, die einfach in der Handhabung ist und verlässliche Ergebnisse liefert. Um quantitative Aussagen über das Maß an Apoptose zu erhalten, wurden die Gele anschließend densitometrisch ausgewertet.

Die DNA-Gelelektrophoresen zeigten klar ausgebildete Banden im Bereich von 200 bp und deren Vielfachen, vereinbar mit dem Apoptose-spezifischen

Leitermuster. In Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration wurden qualitative und quantitative Veränderungen gefunden. Bereits bei 0 mM Magnesium bildete sich ein schwach ausgeprägtes Leitermuster, der überwiegende Anteil war jedoch hochmolekulare DNA. Dieses Ergebnis spiegelte sich bereits in vorangegangenen Versuchen wider und spricht dafür, dass permanent ein Teil der Trophoblasten Stadien der Apoptose durchläuft. Bei höheren Magnesiumkonzentrationen nahm das Leitermuster an Intensität zu, was sich auch densitometrisch objektivieren ließ. Zudem erkennt man eine Tendenz zu kleineren Oligonukleosomen, so findet man bei Konzentrationen über 1,4 mM Magnesium fast ausschließlich Nukleosomen der Größe 200 oder 400 bp. Die DNA-Gelelektrophorese bestätigte die bisherigen Ergebnisse, nach denen die Magnesium-induzierte Apoptose im Trophoblasten konzentrationsabhängig stattfindet. Allerdings lässt sich mit dieser Methode die Herkunft des apoptotischen Materials aus der Zotte nicht lokalisieren. In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus den übrigen Experimenten ist die überwiegende Herkunft aus dem Trophoblasten wahrscheinlich.

### **4.1.3 ZEITABHÄNGIGE APOPTOSE**

Die bisher durchgeführten Versuche bestätigten die Hypothese einer konzentrationsabhängigen Magnesium-induzierten Apoptose. Die Ergebnisse legten auch die Vermutung nahe, dass der Faktor Zeit eine bedeutende Variable sein könnte. Daher wurde das Versuchsdesign abschließend modifiziert, um eine mögliche Korrelation zwischen Zeit und Ausmaß der Apoptose zu testen. Dazu wurden Zotten-Explantate in 1,4 mM oder 1,6 mM Magnesium für bis zu 48 h inkubiert. Es wurden gezielt Konzentrationen verwendet, bei denen eindeutig apoptotische Vorgänge in den vorangegangenen Versuchen aufgetreten waren. Die morphologischen und elektrophoretischen Auswertungen zeigten bei längeren Inkubationszeiten eine Zunahme an Apoptose. Als Kontrollgruppe wurden Zotten-Explantate derselben Plazenta in 0 mM Magnesium gegeben. Diese präsentierten sich am Ende der Inkubationszeit als morphologisch intakt.

Die Magnesium-induzierte Apoptose erweist sich also nicht nur abhängig von der verwendeten Konzentration, sondern verläuft zudem zeitabhängig. Diese Feststellung ist keineswegs trivial oder lässt sich aus der ersten ableiten. Denkbar wäre auch eine Adaptation des Trophoblasten an konstant erhöhte Magnesiumkonzentrationen. Dann würde sich auf einem erhöhten Niveau ein neuer Steady-State ausbilden. Wir fanden hingegen ein stetig zunehmendes Ausmaß an Apoptose, je länger die Inkubation in unphysiologisch hohen Magnesiumkonzentrationen dauerte. Bei der Präeklampsie sind die Magnesiumspiegel im Serum im Vergleich zu gesunden Schwangeren ebenfalls permanent erhöht. Übertragen auf die in vivo Verhältnisse bei Präeklampsie könnte dies bedeuten, der Trophoblast reagiert mit zunehmender Dauer der Schwangerschaft verstärkt mit Apoptose auf die erhöhten Magnesiumspiegel. Von Inkubationszeiten bis 48 h auf eine neun Monate dauernde Schwangerschaft zu schließen, ist jedoch rein spekulativ. Die Situation in vivo umfasst durch das komplexe Zusammenspiel von Plazenta und maternaler systemischer Inflammation zu viele Variablen, als dass es sich mit unserem Zotten-Explantat-Modell abbilden ließe.

#### **4.1.4 MAGNESIUM-INDUZIERTE APOPTOSE**

Apoptose ist ein energieabhängiger biologischer Prozess, der kaskadenförmig abläuft, genetisch programmiert ist und an dessen Ende der Suizid der Zelle steht. Im Gegensatz zum nekrotischen Zelltod ist die Apoptose ein hoch differenzierter Ablauf, der in bestimmten Stadien induziert, stimuliert oder inhibiert werden kann. Einige Induktoren sind bereits bekannt, dazu zählen spezifische Rezeptor-Ligand-Interaktionen (z.B. bindet FasL an den Rezeptor Fas oder  $\text{TNF}\alpha$  an  $\text{TNF-R1}$ ), Proteasen zytotoxischer Lymphozyten (wie Granzym B und Perforin) oder Wachstumsfaktoren (z.B.  $\text{TGF}\beta$ ). Auch der Verlust von Zell-Zell-Kontakten bzw. der Zell-Matrix-Verankerung und nicht-physiologische Stimuli (Huppertz *et al.* 1999), wie UV- oder Röntgenbestrahlung, können Apoptose auslösen.

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Magnesium im Trophoblasten zur Apoptose führt. Der zugrunde liegende molekularbiologische Prozess einer Magnesium-vermittelten Apoptose ist bisher nicht ausreichend erforscht, so dass zurzeit lediglich Hypothesen über relevante Mechanismen aufgestellt werden können.

**Oxidativer Stress.** Oxidativer Stress scheint eine wichtige Komponente bei der Entstehung der Präeklampsie zu sein (*Many et al. 2000*). So finden sich bei Präeklampsie vermehrt Lipidhydroperoxide und deren Metabolite sowie eine verminderte Aktivität antioxidativer Substanzen im Plasma (*Hubel et al. 1989; Walsh 1998*). Reaktive Sauerstoffspezies können mit Stickstoffmonoxid, das von der NO-Synthase im villösen Trophoblasten gebildet wird (*Eis et al. 1995*), das hochreaktive Peroxynitrit  $\text{ONOO}^-$  bilden. Stickstoffmonoxid, Nitrate und Nitrite führen gemeinsam mit reaktiven Sauerstoffspezies zu oxidativem Stress in der Plazenta und konsekutiv im maternalen Kreislauf (*Many et al. 2000*).

Magnesium erhöht in Endothelien die NO-Freisetzung konzentrationsabhängig (*Yang et al. 2000*). Möglich wäre auch eine konzentrationsabhängige Magnesium-induzierte NO-Synthase im Trophoblasten. Stickstoffmonoxid-vermittelt könnte durch oxidativen Stress die Apoptose im Trophoblasten gesteigert werden. Unterstützt wird diese Hypothese durch Nakatsuka et al. (2000), die experimentell die NO-Synthase mittels Aminoguanidin hemmten und dadurch die Apoptose im Trophoblasten reduzierten.

**$\text{Ca}^{2+}$ -sensing Rezeptor.** Denkbar wäre auch eine Interaktion des Magnesiums mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing Rezeptor. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing Rezeptor reguliert u.a. die Kalzium-Homöostase und wurde zunächst in der Nebenschilddrüse gefunden (*Brown et al. 1993*). Später entdeckte man auch in anderen Organen, die in die Aufrechterhaltung des Kalziumhaushaltes involviert sind, diesen Rezeptor: thyreoidale C-Zellen (*Garrett et al. 1995*), Niere (*Riccardi et al. 1995*), Knochen (*House et al. 1997*) und Darm (*Chattopadhyay et al. 1998*). Mittlerweile ist bekannt, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing Rezeptor zudem an diversen Prozessen partizipiert, die nicht primär der Kalzium-Homöostase dienen. Der

Rezeptor stimuliert Proliferation und Differenzierung, verstärkt die Sekretion von einigen Hormonen und ist an der Hyperpolarisation von Membranpotentialen beteiligt (*Chattopadhyay 2000*). Unterschiedliche Arbeitsgruppen konnten in jüngster Zeit zeigen, dass die Stimulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing Rezeptors Apoptose induzieren kann: Zhang et al. (2007) für Kardiomyozyten, Mizobuchi et al. (2007) für Zellen in der Nebenschilddrüse und Mentaverri et al. (2006) für Osteoklasten. Auch ist seit längerem bekannt, dass der Rezeptor im Synzytiotrophoblasten, in geringem Ausmaß auch im Zytotrophoblasten, exprimiert wird und dort am feto-maternalen Kalziumtransfer beteiligt ist (*Bradbury et al. 2002*). Da der Rezeptor nicht nur Kalzium bindet, sondern u.a. auch Magnesium (*Chattopadhyay 2000; Bradbury et al. 1998*), wäre eine Magnesium-induzierte Apoptose, vermittelt über den  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing Rezeptor, eine plausible Hypothese.

Beide Mechanismen sind so in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um konträre Hypothesen. So konnte Tfelt-Hansen (2008) jüngst zeigen, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing Rezeptor die Expression einer Isoform der NO-Synthase erhöht, was von einer vermehrten Produktion an Stickstoffmonoxid begleitet war. Letztlich können wir zurzeit eine Magnesium-induzierte Apoptose nicht detailliert erklären. Offensichtlich gibt es neben den klassischen Induktoren der Apoptose, wie FasL oder  $\text{TNF}\alpha$ , eine Vielzahl anderer Auslöser, die noch identifiziert werden müssen.

## 4.2 PRÄEKLAMPSIE – VON DER PLAZENTADYSFUNKTION ZUM MATERNALEN SYNDROM

### 4.2.1 PLAZENTADYSFUNKTION

Die Ursache der weit verbreiteten und potentiell lebensbedrohlichen Präeklampsie bleibt nach wie vor unklar. Ein anerkanntes pathophysiologisches Konzept, das Zwei-Stadien-Modell nach Roberts und Gammill (2005), wurde bereits vorgestellt. Das präklinische Stadium 1 ist durch eine Plazentadysfunktion gekennzeichnet. Hieraus entwickelt sich im Stadium 2 das Maternale Syndrom, die klinische Manifestation der Präeklampsie mit den bekannten Symptomen Hypertonie, Proteinurie und Ödemen. Im folgenden sollen die Erkenntnisse unserer Untersuchungen in das Modell eingereiht und das „Missing Link“ zwischen beiden Stadien näher beschrieben werden.

**Plazentadysfunktion.** Das Vorhandensein einer Plazenta ist unabdingbare Voraussetzung für die Entstehung einer Präeklampsie und Entfernen der Plazenta durch Geburt oder Sectio beendet die Symptome. So kann die Erkrankung auch ohne Fetus, wie bei der Blasenmole, auftreten (*Chun et al. 1964; Borzychowski et al. 2006*). Trotz der elementaren Bedeutung der Plazentadysfunktion bei der Entwicklung der Präeklampsie ist unser Wissen über pathologische Vorgänge in der Plazenta begrenzt und teilweise widersprüchlich. Einige Forscher favorisieren das Modell einer reduzierten placentaren Durchblutung (*Käär et al. 1980*), andere beschreiben eine hyperdynamische Plazentaperfusion (*Easterling et al. 1999*). Die unterschiedlichen Konzepte wurden bereits an anderer Stelle eingehender behandelt (siehe Abschnitt 1.5) und spielen für unser Zotten-Explantat-Modell eine untergeordnete Rolle. Denn die gemeinsame Endstrecke beider Hypothesen ist eine gesteigerte Apoptoserate im Trophoblasten (*Allaire et al. 2000*). Neben der Apoptose scheinen auch andere Formen des Zelltodes, wie Aponekrose oder Nekrose, relevant zu sein (*Huppertz und Feinberg 2007*).

Wir konnten mit der Magnesiumkonzentration im Medium einen bedeutenden Faktor identifizieren, der das Ausmaß an Apoptose im Trophoblasten reguliert. Die Magnesiumkonzentration im Medium steht analog zu Magnesiumspiegeln im maternalen Serum *in vivo*. Die Magnesiumwerte im Serum von Präeklampsie-Patientinnen sind im Vergleich zu gesunden Schwangeren erhöht. Unsere Experimente lassen den Schluss zu, dass erhöhte Magnesiumkonzentrationen zu vermehrter Apoptose im villösen Trophoblasten führen. Und je länger die Trophoblasten dem Magnesium exponiert sind, desto ausgeprägter das Ausmaß an Apoptose. Die Komplexität der Erkrankung macht jedoch ein multifaktorielles Geschehen wahrscheinlich. So führt eine isolierte Erhöhung der Magnesiumkonzentration im Serum schwangerer Frauen alleine sicherlich nicht zur Präeklampsie. Die Magnesium-induzierte Apoptose im Trophoblasten stellt jedoch eine relevante Komponente der Plazentadysfunktion dar.

#### **4.2.2 AUF DER SUCHE NACH DEM „MISSING LINK“**

Das Bindeglied zwischen Stadium 1 und Stadium 2 ist der „Heilige Gral“ der Präeklampsie-Forschung (*Roberts und Gamill 2005*). Die Identifikation der Faktoren, die aus dem lokalen Geschehen der Plazentadysfunktion eine generalisierte Entzündungsreaktion machen, bedeutet, therapeutische Angriffspunkte zu haben. Unterschiedlichste Kandidaten, wie Zytokine, Hormone oder Wachstumsfaktoren, wurden angeschuldigt, der „Faktor X“ zu sein, und später rehabilitiert. Synzytiotrophoblastäre Membranfragmente (STBM) werden zurzeit als aussichtsreiche Anwärter für das „Missing Link“ gehandelt. Diese werden vom Trophoblasten apoptotisch und nekrotisch freigesetzt und führen im maternalen Blutkreislauf zur Aktivierung des Immunsystems und Schädigung des Endothels (*Redman und Sargent 2000*).

**Synzytiotrophoblastäre Membranfragmente (STBM).** Wir wissen mittlerweile, dass ständig Mikropartikel von Zellmembranen abschilfern und in die Blutbahn gelangen. Die Mikropartikel stammen u.a. von Thrombozyten, Erythrozyten, Leukozyten und Endothelzellen (*Ratajczak et al. 2006*). Auch bei Zellkulturen

finden sich abgeschilferte Mikropartikel im Kulturmedium, ausgelöst durch inflammatorische Stimuli oder Kalziumeinstrom in die Zelle (Yano *et al.* 1993). Der physiologische Prozess des Abschilfern von Mikropartikeln in die Blutbahn kommt in gesteigerter Form bei der Sepsis, dem metabolischen Syndrom, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie oder systemischem Lupus erythematodes vor (Redman und Sargent 2007). Es sind verallgemeinernd ausgedrückt systemische Entzündungsreaktionen, die mit einer vermehrten Bildung dieser Mikropartikel assoziiert sind (Piccin *et al.* 2007). Auch die normale Schwangerschaft wird von der permanenten Bildung synzytiotrophoblastärer Membranfragmente begleitet, die in die maternale Zirkulation freigesetzt werden (Knight *et al.* 1998). Bei präeklampsischen Frauen findet dies jedoch in verstärkter Form statt (Redman und Sargent 2007). Unsere Versuche zur Magnesium-induzierten Apoptose zeigten ebenfalls ein Abschilfern von Mikropartikeln in das Kulturmedium. Dieses konditionierte Medium wurde im Hinblick auf synzytiotrophoblastäre Fragmente genauer untersucht.

**Konditionierte Medien.** Die Explantate wurde nach Abschluss der Inkubation entfernt und das verbleibende konditionierte Medium zunächst mikroskopisch betrachtet. Wir fanden einhergehend mit höheren Magnesiumkonzentrationen eine Zunahme an Zellen und Zellfragmenten. Dies war nach Auswertung der bisherigen Versuche zu erwarten, denn erhöhte Magnesiumkonzentrationen waren mit vermehrter Apoptose im Trophoblasten assoziiert. Das apoptotische Material schnürte sich vom Synzytiotrophoblasten ab und wurde ins Medium freigesetzt. Wenn die Mikropartikel tatsächlich apoptotischen Ursprungs sind, müsste man folglich Apoptose-spezifische Fragmente auf DNA- und Proteinebene finden. Dies sollte mithilfe des Antikörpers M30 im Western-Blot und der DNA-Gelelektrophorese geklärt werden, und in der Tat gelang der Nachweis von Apoptose-spezifischen Zytokeratin-18-Neoepitopen und DNA-Leiternmustern.



Zunächst wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und die Gele anschließend densitometrisch ausgewertet (Abb. 3.17). Bei höheren Magnesiumkonzentrationen war die Proteinfreisetzung deutlich erhöht. Die Detektion von Zytokeratin-18-Neoepitopen im Western-Blotting ergab dann ein unerwartetes Ergebnis. Wir fanden zwar Zytokeratin-18-Neoepitope als Ausdruck einer Abgabe von apoptotischem Material in das Medium, jedoch ließ sich keine Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration nachweisen. Obwohl die Bildung von Zytokeratin-18-Neoepitopen im Trophoblasten bei höheren Magnesiumkonzentrationen zunahm und auch die Gesamtprotein-freisetzung konzentrationsabhängig verlief, blieb die Menge an Zytokeratin-18-Neoepitopen im Medium konstant (Abb. 3.16). Offensichtlich wird nur ein Teil der neu gebildeten Zytokeratin-18-Neoepitope ausgeschleust, während der überwiegende Teil im Synzytiotrophoblasten verbleibt.

Bei der Freisetzung von DNA aus dem Trophoblasten in das Medium muss zwischen *intrafragmentärer* DNA und *zellfreier* DNA differenziert werden. Als *intrafragmentäre* DNA bezeichnen wir DNA im konditionierten Medium, die membranumhüllt in den Zellfragmenten zu finden ist. Die Auswertung der DNA-Gelelektrophorese ergab ein DNA-Laddering mit zunehmender Intensität bei höheren Magnesiumkonzentrationen. Die apoptotische Freisetzung von DNA verläuft also anders als die Freisetzung von Zytokeratin-18-Neoepitopen konzentrationsabhängig (Abb. 3.20 und 3.21). Interessanter sind jedoch die Ergebnisse zur *zellfreien* DNA. Wie eingangs beschrieben, führt der apoptotische Zelltod zur Abgabe von Zellbestandteilen in membranumhüllten Vesikeln. Zellfreie DNA dürfte also bei rein apoptotischer Abgabe im Medium nicht nachweisbar sein, sondern ist ein Charakteristikum der Nekrose. Wir fanden jedoch konzentrationsabhängig zellfreie DNA im konditionierten Medium (Abb. 3.19). Die Menge an zellfreier DNA nahm unter höheren Magnesiumkonzentrationen zu und partiell zeigte sich ein schwach ausgeprägtes DNA-Laddering. Zellfreie DNA, die bei Nekrose entsteht, in Kombination mit einem DNA-Laddering, das Apoptose-spezifisch ist, spricht für eine aponekrotische DNA-Freisetzung aus dem Trophoblasten. Diese Form

des Zelltodes wird Caspase-abhängig initiiert, verläuft jedoch nicht bis zum vollständigen Abschluss der Apoptose-Kaskade (*Formigli et al. 2000*). Abhängig vom zellulären ATP-Vorrat und der Magnesiumkonzentration wird die Kaskade vorzeitig beendet und die Freisetzung apoptotischer Zellfragmente nekrotisch fortgesetzt. Eine Beteiligung der Aponekrose konnte auch bei anderen Prozessen nachgewiesen werden, beispielsweise Chlamydieninfektion von humanem Endothel (*Marino et al. 2008*), Atrophie von murinem Skelettmuskel (*Ferreira et al. 2007*), systemischer Lupus erythematodes (*Elliott et al. 2005*) oder Nervenzelltod durch Trauma oder Apoplex (*Yakovlev und Faden 2004*). So zeichnet sich durch die Erforschung der Apoptose in den letzten Jahren ein differenziertes Bild über Formen des Zelltodes ab. Diese bilden ein Kontinuum von Caspase-abhängiger Apoptose, über Caspase-unabhängige Apoptose und Nekrose-ähnlichem programmiertem Zelltod bis hin zur Nekrose (*Yakovlev und Faden 2004*). Apoptose und Nekrose sind keine zwangsläufig unabhängigen Wege, vielmehr teilen sie sich im Hinblick auf Signaltransduktion und frühe Phasen des Zelltodes einige Mechanismen. Beispielsweise können die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL hypoxisch-induzierte Nekrose verzögern (*Shimizu et al. 1996*). Die Magnesium-induzierte Freisetzung zellfreier DNA aus dem Trophoblasten stellt eine weitere Facette der zahlreichen Verflechtungen zwischen Apoptose und Nekrose dar.

Übertragen auf in vivo Verhältnisse lassen sich aus den Ergebnissen zur zellfreien DNA im konditionierten Medium zwei Hypothesen entwickeln: (1) Wenn zellfreie DNA im konditionierten Medium nachweisbar ist, müsste diese auch im Serum schwangerer Frauen vorhanden sein. (2) Bei Präeklampsie, die mit erhöhten Magnesiumkonzentrationen im Serum einhergeht, müsste die Menge an zellfreier fetaler DNA vermehrt sein. Beide Hypothesen zur zellfreien fetalen DNA korrespondieren tatsächlich mit Ergebnissen klinischer Studien. Zahlreiche Untersuchungen bestätigten das Vorhandensein zellfreier fetaler DNA im Serum schwangerer Frauen (*Holzgreve und Hahn 2001*). Die Konzentration zellfreier DNA ist bei Patientinnen mit Präeklampsie im Vergleich zu gesunden Schwangeren erhöht (*Lo et al. 1999, Zhong et al. 2001, Zhong*

*et al. 2002*). Bei Schwangerschaften, die mit einem erhöhten Präeklampsie-Risiko assoziiert sind, lassen sich ebenfalls erhöhte Konzentrationen fetaler DNA im Plasma nachweisen (*Leung et al. 2001*). Die Menge an zellfreier DNA ist somit nicht nur von pathophysiologischem Interesse, sondern könnte als früher Marker zur Diagnose einer Präeklampsie vor der klinischen Manifestation dienen.

### **4.2.3 DAS MATERNALE SYNDROM**

Die klinische Manifestation der Präeklampsie lässt sich pathophysiologisch auf eine Schädigung des Endothels und Aktivierung des Immunsystems zurückführen. Die vermehrte Freisetzung synzytiotrophoblastärer Membranfragmente (STBM) in den Kreislauf der Mutter würde beide Komponenten des Maternalen Syndroms erklären. Die Ursachen dieser gesteigerten trophoblastären Abgabe von Mikropartikeln sind noch nicht vollständig verstanden. Plazenten präeklampsischer Frauen zeigen allerdings eine signifikant erhöhte Apoptose-Aktivität im Vergleich zu Plazenten aus gesunden Kontrollgruppen (*Allaire et al. 2000*). Mit unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass Magnesium ein potenter Induktor plazentärer Apoptose ist. Auch wenn die vielfältigen Wirkungen des Magnesiums bei der Präeklampsie noch nicht in toto aufgeklärt sind, lässt sich aus unseren Ergebnissen ableiten, dass die in vivo erhöhte Magnesiumkonzentration im Serum präeklampsischer Frauen eine mögliche Ursache für gesteigerte Apoptose-Aktivität im Trophoblasten ist. Apoptose führt wiederum zur vermehrten Freisetzung synzytiotrophoblastärer Mikrofragmente (*Knight et al. 1998*). Dies steht im Einklang mit unseren Beobachtungen, so fanden wir bei erhöhten Magnesiumkonzentrationen verstärkt apoptotische und aponekrotische Fragmente im konditionierten Medium.

Die Mikropartikel schädigen und aktivieren das maternale Endothel mit den bekannten klinischen Folgen: Vasokonstriktion, Kapillarleck und glomeruläre Endotheliose (*Redman und Sargent 2000; Borzychowski et al. 2006*). Smárason et al. (1993) inkubierten mechanisch gewonnene STBM mit

Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC). Die trophoblastären Mikropartikel hemmten die Proliferation der HUVECs und führten zur Zellschädigung. Zwischen STBM von gesunden und präeklampsischen Plazenten bestand jedoch kein deutlicher Unterschied. Die STBM wurden in beiden Gruppen auf mechanische Weise gewonnen, waren folglich eher nekrotischen Ursprungs. In eigenen Studien gaben wir konditionierte Medien, also Medien, in denen zuvor Zotten-Explantate kultiviert wurden, zu HUVECs. Die konditionierten Medien enthielten apoptotische, aponekrotische und nekrotische STBM. Es zeigte sich ebenfalls eine signifikante Reduktion vitaler Endothelzellen bei Inkubation in konditionierten Medien im Vergleich zu frischen Medien (*Adzic 2004*).

Wie bereits im Abschnitt 1.5 beschrieben, bewirken die synzytiotrophoblastären Mikropartikel ferner eine systemische Entzündungsreaktion (*Sibai 2004*). So binden STBM an Monozyten und induzieren die Bildung von  $\text{TNF}\alpha$ , IL-12, IL-18 und  $\text{IFN}\gamma$  (*Redman und Sargent 2007*). Da jede Schwangerschaft mit der Bildung von STBM einhergeht, lassen sich die Komponenten Endotheldysfunktion und systemische Inflammation auch bei gesunden Schwangeren nachweisen. Bei der Präeklampsie sind jedoch die Freisetzung der STBM und folglich auch die endotheliale und entzündliche Reaktion des maternalen Organismus gesteigert (*Redman et al. 1999*). Die normale Schwangerschaft zeichnet sich durch eine gelungene Adaptation an die trophoblastären Fragmente aus. Bei Dekompensation der Adaptationsmechanismen würde sich dann klinisch eine Präeklampsie manifestieren. Weitere Forschung auf diesem Gebiet ist erforderlich, um diese Hypothese zu verifizieren.

### **4.3 MAGNESIUM IN DER SCHWANGERSCHAFT – EIN ZWEISCHNEIDIGES SCHWERT**

Unsere Versuche mit Zottenexplantaten zeigten eine Magnesium-induzierte Apoptose im Trophoblasten. Diese war konzentrations- und zeitabhängig und ließ sich bei Plazenten unterschiedlicher Gestationsalter nachweisen. Da eine gesteigerte Apoptoserate im Trophoblasten ein wesentlicher pathogenetischer Pfeiler der Präeklampsie ist, stellt sich die berechtigte Frage nach dem Sinn einer Magnesiumgabe während der Schwangerschaft. Andererseits kennen wir Magnesium seit Jahrzehnten als bewährtes Therapeutikum bei Eklampsie und schwerer Präeklampsie. Ein Blick auf experimentelle und klinische Studien ermöglicht eine Annäherung an das Paradoxon.

Trotz vielfacher Anwendung von Magnesium in der Schwangerschaft ist das Wissen um die Wirkung von Magnesium auf die Plazenta mangelhaft. Lediglich zwei experimentelle Studien untersuchen die Rolle des Magnesiums im Hinblick auf Apoptose. Black et al. (2001) konnten zeigen, dass physiologische Konzentrationen von extrazellulärem Magnesium plazentare Apoptose stimulieren und dass Antioxidanzien die Magnesium-induzierte Apoptose vermindern. Gude et al. (2000) fanden eine Verstärkung der Apoptose in der Plazenta unter hypoxischen Kulturbedingungen. Leider versäumten es die Autoren, die Wirkung von Magnesium unter normoxischen Verhältnissen zu testen. Ferner wird als Nachweismethode lediglich die DNA-Gelelektrophorese herangezogen. Unsere Versuche zur Magnesium-induzierten Apoptose sind deutlich umfangreicher, so gelingt der Nachweis von Apoptose auf DNA- und Proteinebene und mit morphologischen Kriterien.

Andere experimentelle Studien befassen sich im Wesentlichen mit Veränderungen der plazentaren Durchblutung durch Magnesiumsubstitution. Kovac et al. (2003) fanden unter experimenteller Angiotensin II-Zufuhr einen

erhöhten Perfusionsdruck in präeklampsischen Plazenten im Vergleich zu gesunden. Der Perfusionsdruck sank bei den präeklampsischen Plazenten nach Magnesiumgabe. Skoczynski et al. (2001) konnten einen mit Thromboxan A<sub>2</sub> erhöhten Perfusionsdruck ebenfalls durch Magnesiumzufuhr senken. Letztlich ist unklar, welchen Einfluss die plazentare Perfusion auf die Pathogenese der Präeklampsie hat. Wahrscheinlich ist die Präeklampsie mit einer hyperdynamischen Plazentaperfusion vergesellschaftet (*Easterling et al. 1999*). Die Erkenntnisse von Kovac et al. (2003) und Skoczynski et al. (2001) könnten erklären, warum die Magnesiumsubstitution unter diesen Bedingungen durchaus auch positive Effekte in vivo entfalten kann.

Ähnlich kontrovers wie die Ergebnisse experimenteller Studien wird die klinische Datenlage diskutiert. Gesichert ist die Wirksamkeit der intravenösen Gabe von Magnesiumsulfat bei Eklampsie. Magnesiumsulfat ist dabei anderen Antikonvulsiva, wie Phenytoin und Diazepam, in der Prävention von Rekonvulsionen und im Hinblick auf das neonatale Outcome überlegen (*The Eclampsia Trial 1995*). Um mögliche Nebenwirkungen frühzeitig zu erkennen, sollten Reflexstatus, Atemfrequenz und Nierenfunktion intensiv überwacht werden. Auch zur Prophylaxe einer Eklampsie bei schwerer Präeklampsie, insbesondere bei Vorliegen zentralnervöser Symptome, ist Magnesium geeignet. Duley et al. (2003) fanden bei ihrer Metaanalyse von sechs Studien mit insgesamt über 11000 Frauen eine Reduktion des Eklampsierisikos um mehr als die Hälfte. Die Anwendung von Magnesiumsulfat zur Anfallsprophylaxe bei milder Präeklampsie ist hingegen zurzeit nicht abschließend geklärt. Eine groß angelegte kontrollierte randomisierte Studie schloss über 10000 Schwangere mit milder und schwerer Präeklampsie ein und zeigte eine Halbierung des Eklampsie-Risikos unter Magnesiumgabe gegenüber Placebo (*The Magpie Trial 2002*). Gesundheitsgefährdende Effekte für Mutter und Kind konnten weder im kurzfristig noch im Follow-up nach 18 Monaten nachgewiesen werden (*The Magpie Trial 2007*). Allerdings wurde im Magpie Trial Magnesium maximal 24 Stunden vor der Geburt gegeben. Eine Aussage über die Wirkung von Magnesium bei längerfristigen

Gaben während der Schwangerschaft kann aus den Ergebnissen des Magpie Trial nicht hergeleitet werden.

Neben den Effekten von Magnesium auf Plazenta und mütterlichem Organismus ist ein entscheidendes Kriterium bei der Indikationsstellung die Wirkung auf den Fetus. Magnesium wird in der Plazenta aktiv aus dem maternalen Blut resorbiert und in das fetale abgegeben (*Nandakumaran et al. 2002*). So kann eine Langzeittherapie mit intravenösem Magnesiumsulfat zu neonatalen Knochenabnormalitäten führen (*Matsuda et al. 1997*). Shelton et al. (1999) fanden erhöhte Troponin T-Werte bei Neugeborenen, die einer Magnesiumsulfat-Gabe in utero exponiert waren, und Hallak et al. (1999) konnten eine Assoziation mit reduzierter Herzfrequenz und Herzschlagvariabilität beim Feten zeigen. Die Autoren beider Studien betonen allerdings, die klinische Relevanz dieser Ergebnisse sei fraglich. Auch im Hinblick auf die neonatale Überlebensrate ist die Datenlage widersprüchlich. Die Magpie Trial Collaboration Group konnte weder kurzfristig (2002) noch im Follow-up nach 18 Monaten (2007) einen signifikanten Unterschied zwischen Magnesium- und Placebogruppe nachweisen. Dem gegenüber stehen Ergebnisse anderer Studien, die durchaus eine erhöhte fetale und neonatale Mortalität bei Magnesiumgabe während der Schwangerschaft zeigen. In einer Metaanalyse von Crowther et al. (2002) zur Tokolyse mit Magnesium war die Mortalität der Magnesiumgruppe signifikant erhöht. Eine andere Studie zur Prävention infantiler Zerebralparese mit Magnesiumsulfat wurde vorzeitig abgebrochen, nachdem signifikant mehr Kinder in der Gruppe, deren Mütter Magnesium erhielten, verstarben (*Mittendorf et al. 1998*).

Die Heterogenität der Ergebnisse zum Einsatz von Magnesiumsulfat in der Schwangerschaft resultiert nicht zuletzt aus den recht unterschiedlichen Therapieregimen in den vorgestellten Studien. Vor allem der kurze zeitliche Abstand bis zur Geburt im Magpie Trial vermag das gute Outcome der Magnesiumgruppe erklären. Wir konnten mit unseren Versuchen auf molekularbiologischer Ebene zeigen, dass die Magnesium-induzierte

Apoptose im Trophoblasten vor allem konzentrations- und zeitabhängig verläuft. Letztlich wusste schon Paracelsus (1538): „Dosis sola facit venenum“. Unsere Ergebnisse in das bisherige Verständnis der pathophysiologischen Abläufe bei der Präeklampsie zu integrieren und daraus die klinische Relevanz abzuleiten, fällt zurzeit schwer. Vor dem Hintergrund vieler offener Fragen und der Verantwortung für Mutter und Kind, sollte dies Anlass genug sein, die Indikation zur Magnesiumgabe während der Schwangerschaft restriktiv zu stellen.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

### MAGNESIUM-INDUZIERTE APOPTOSE IM TROPHOBLASTEN

**Einleitung:** Die Magnesiumgabe während der Schwangerschaft ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Neben evidenz-basierten Indikationen, wie der Eklampsie, gibt es auch zahlreiche fragwürdige Indikationen. Wenig hingegen ist bekannt über die Wirkung von Magnesium auf die Plazenta. Erste Studien weisen auf eine Apoptose-induzierende Wirkung von Magnesium hin, so dass dies im Rahmen dieser Untersuchungen systematisch überprüft werden sollte.

**Methoden:** Zottenexplantate von insgesamt 22 Plazenten aus dem ersten und dritten Trimenon wurden in Magnesiumkonzentrationen von 0 bis 2,0 mM inkubiert und anschließend im Hinblick auf Apoptose-spezifische Veränderungen untersucht. Zum Nachweis von Apoptose wurden allgemein anerkannte Methoden herangezogen: morphologische Kriterien, Detektion von Zytokeratin-18-Neopeptiden in der Immunhistochemie und dem Western-Blotting, TUNEL-Test und DNA-Laddering in der DNA-Gelelektrophorese.

**Ergebnisse:** Magnesium induzierte im Trophoblasten konzentrations- und zeitabhängig Apoptose. Insbesondere Magnesiumkonzentrationen über 0,7 mM gingen mit Apoptose-spezifischen Veränderungen einher. Nach Inkubation fanden sich im Kulturmedium bei höheren Magnesiumkonzentrationen deutlich mehr apoptotisch und apoptotisch freigesetzte Zellfragmente und zellfreie DNA.

**Diskussion:** Magnesium hat eine Apoptose-induzierende Wirkung im Trophoblasten. Vor dem Hintergrund einer gesteigerten Apoptoserate im Trophoblasten bei Präeklampsie sollte die Magnesiumgabe während der Schwangerschaft, speziell bei Präeklampsie, kritisch überdacht werden und nur nach streng evidenz-basierten Kriterien erfolgen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

[No authors listed]. AWMF-Leitlinie „Diagnostik und Therapie hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen“. AWMF online 2007; Nr. 015/018.

[No authors listed]. AWMF-Leitlinie „Prävention, Erkennung, Diagnostik und Therapie der arteriellen Hypertonie der Deutschen Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes“. AWMF online 2003; Nr. 46/001.

[No authors listed]. CLASP: a randomised trial of low-dose aspirin for the prevention and treatment of pre-eclampsia among 9364 pregnant women. CLASP (Collaborative Low-dose Aspirin Study in Pregnancy) Collaborative Group. *Lancet* 1994; 343:619-629.

[No authors listed]. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(1):S1-S22.

[No authors listed]. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163(5 Pt 1):1691-1712.

[No authors listed]. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(1):S1-S22.

[No authors listed]. The Eclampsia Trial Collaborative Group. Which anticonvulsant for women with eclampsia? Evidence from the Collaborative Eclampsia Trial. *Lancet* 1995; 345:1455-1463.

[No authors listed]. The Magpie Trial Collaborative Group. Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial. A randomized, placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 359:1877-1890.

[No authors listed]. The Magpie Trial Follow-Up Study Collaborative Group. The Magpie Trial: a randomised trial comparing magnesium sulphate with placebo for pre-eclampsia. Outcome for children at 18 months. *BJOG* 2007; 114(3):289-99.

Adzic J. Plazentares Material als Auslöser der Apoptose von Endothelzellen in vitro. Dissertation. Aachen 2004; 31-40.

Ahmed NA, Murphy BE. The effects of various hormones on human chorionic gonadotropin production in early and late placental explant cultures. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159(5):1220-1227.

Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. Placental Apoptosis in Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 96(2): 271-276.

Altura BM, Altura BT. Magnesium ions and contraction of vascular smooth muscles: relationship to some vascular diseases. *Fed Proc* 1981; 40(12):2672-2679.

Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136(3):593-608.

Arias F, Mancilla-Jimenez R. Hepatic fibrinogen deposits in preeclampsia. Immunofluorescent studies. *N Engl J Med* 1976; 295:578-582.

Arnholt H, Meisel F, Fandrey K, Lohrs U. Proliferation of villous trophoblast of the human placenta in normal and abnormal pregnancies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1991; 60:365-372.

Arnout J, Spitz B, Van Assche A, Vermylen J. The antiphospholipid syndrome and pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 1995; 14:147-178.

Austgulen R, Chedwick L, Vogt Isaksen C, Vatten L, Craven C. Trophoblast apoptosis in human placenta at term as detected by expression of a cytokeratin 18 degradation product of caspase. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126(12):1480-1486.

Ballardini G, Guidi M, Susca M, Ghetti S, Grassi A, Lari F, Fusconi M, Zauli D, Bianchi FB. Bile duct cell apoptosis is a rare event in primary biliary cirrhosis. *Dig Liver Dis* 2001; 33(2):151-156.

Benirschke K, Kaufmann P. *Pathology of the human placenta*. 4th ed. Springer, New York, 2000.

Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RFA. Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. *Lupus* 1996; 5:480-487.

Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N, Huppertz B. Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ* 2004; 11(1):90-98.

Black S, Yu H, Lee J, Sachchithananthan M, Medcalf RL. Physiologic concentrations of magnesium and placental apoptosis: prevention by antioxidants. *Obstet Gynecol* 2001; 98(2):319-324.

Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11(5):309-316.

Bradbury RA, Cropley J, Kifor O, Lovicu FJ, de longh RU, Kable E, Brown EM, Seely EW, Peat BB, Conigrave AD. Localization of the extracellular Ca(2+)-sensing receptor in the human placenta. *Placenta* 2002; 23(2-3):192-200.

Bradbury RA, Sunn KL, Crossley M, Bai M, Brown EM, Delbridge L, Conigrave AD. Expression of the parathyroid Ca(2+)-sensing receptor in cytotrophoblasts from human term placenta. *J Endocrinol* 1998; 156(3):425-430.

Brancolini C, Lazarevic D, Rodriguez J, Schneider C. Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of a beta-catenin. *J Cell Biol* 1997; 139:759-771.

Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi D, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993; 366:575-580.

Bucher HC, Guyatt GH, Cook RJ, Hatala R, Cook DJ, Lang JD, Hunt D. Effect of calcium supplementation on pregnancy-induced hypertension and preeclampsia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 1996; 275:1113-1117.

Caritis S, Sibai B, Hauth J, Lindheimer MD, Klebanoff M, Thom E, VanDorsten P, Landon M, Paul R, Miodovnik M, Meis P, Thurnau G. Low-dose aspirin to prevent preeclampsia in women at high risk. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *N Engl J Med* 1998; 338(11):701-705.

Carr MC. Human term placental villi in explant tissue culture. 1. Behavior. *Am J Obstet Gynecol* 1964; 88:584-591.

Carr NJ. M30 expression demonstrates apoptotic cells, correlates with in situ end-labeling, and is associated with Ki-67 expression in large intestinal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 1768-1772.

Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 138:1379-1394.

Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 1995; 7(1):61-64.

Chattopadhyay N, Cheng I, Rogers K, Riccardi D, Hall A, Diaz R, Hebert SC, Soybel DI, Brown EM. Identification and localization of extracellular Ca(2+)-sensing receptor in rat intestine. *Am J Physiol* 1998; 274(1 Pt 1):G122-130.

Chattopadhyay N. Biochemistry, physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32(8):789-804.

Chesley LC, Cooper DW. Genetics of hypertension in pregnancy: possible single gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93:898-908.

Chesley LC, Cosgrove RA, Annitto JE. Pregnancy in the sisters and daughters of eclamptic women. *Pathol Microbiol* 1961; 24:662-666.

Chun D, Braga C, Chow C, Lok L. Clinical Observations on some aspects of hydatidiform moles. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1964; 71:180-184.

Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ. Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells. *Anticancer Res* 1990; 10(5A):1153-1159.

Crowther CA, Hiller JE, Doyle LW. Magnesium sulphate for preventing preterm birth in threatened preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; (4):CD001060. Review.

Cruchten S van, Broeck W van den. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002; 31(4):214-223.

Dadelszen P von, Ornstein MP, Bull SB, Logan AG, Koren G, Magee LA. Fall in mean arterial pressure and fetal growth restriction in pregnancy hypertension: a meta-analysis. *Lancet* 2000; 355:87-92.

Dancis J, Money WL, Springer D, Lewitz M. Transport of amino acids by placenta. *Am J Obstet Gynecol* 1968; 101:820-829.

Davey DA, MacGillivray I. The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:892-898.

Davies M. The formation of immune complexes in primiparous and multiparous human pregnancies. *Immunol Lett* 1985; 10:199-205.

Dizon-Townson DS, Nelson LM, Easton K, Ward K. The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175:902-905.

Duley L, Gülmezoglu AM, Henderson-Smart DJ. Magnesium sulphate and other anticonvulsants for women with pre-eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; (2):CD000025. Review

Durlach J. Magnesium research: a brief historical account. *Magnes Res* 1988; 1(1-2):91-95.

Easterling TR, Brateng D, Schmucker B, Brown Z, Millard SP. Prevention of preeclampsia: a randomized trial of atenolol in hyperdynamic patients before onset of hypertension. *Obstet Gynecol* 1999; 93(5 Pt 1):725-733.

Ebel H, Gunther T. Magnesium metabolism: a review. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980; 18(5):257-270.

Eis AL, Brockman DE, Pollock JS, Myatt L. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human villous and extravillous trophoblast populations and expression during syncytiotrophoblast formation in vitro. *Placenta* 1995; 16(2):113-126.

Elliott JI, McVey JH, Higgins CF. The P2X7 receptor is a candidate product of murine and human lupus susceptibility loci: a hypothesis and comparison of murine allelic products. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(3):R468-75.

Emerson DL, Arnaud P, Galbraith RM. Evidence of increased Gc:actin complexes in pregnant serum: a possible result of trophoblast embolism. *Am J Reprod Immunol* 1983; 4(4):185-189.

Engeland M van, Kuijpers HJ, Ramaeckers FC, Reutelingsperger CP, Schutte B. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp Cell Res* 1997; 235:421-430.

Erel CT, Dane B, Calay Z, Kaleli S, Aydinli K. Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR. *Int J Gynaecol Obstet* 2001; 73(3):229-235.

Eskenazi B, Fenster L, Sidney S. A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia. *JAMA* 1991; 266:237-241.

Esplin MS, Fausett MB, Fraser A, Kerber R, Mineau G, Carrillo J, Varner MW. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N Engl J Med* 2001; 344(12):867-872.

Feinberg BB, Jack RM, Mok SC, Anderson DJ. Low erythrocyte complement receptor type 1 (CR1, CD35) expression in preeclamptic gestations. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54(6):352-357.



Ferreira R, Vitorino R, Neuparth MJ, Appell HJ, Amado F, Duarte JA. Cellular patterns of the atrophic response in murine soleus and gastrocnemius muscles submitted to simulated weightlessness. *Eur J Appl Physiol* 2007; 101(3):331-340.

Fisher KA, Luger A, Spargo BH, Lindheimer MD. Hypertension in pregnancy: clinical-pathological correlations and remote prognosis. *Medicine* 1981; 60:267-276.

Flatman PW. Magnesium transport across cell membranes. *J Membr Biol* 1984; 80(1):1-14.

Flatman PW. Mechanisms of magnesium transport. *Annu Rev Physiol* 1991; 53:259-271.

Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 2000; 182: 41-49.

Fox H. Effect of hypoxia on trophoblast in organ culture. A morphologic and autoradiographic study. *Am J Obstet Gynecol* 1970; 107:1058-1064.

Fraser A, Evan G. A license to kill. *Cell* 1996; 85:781-784.

Gallery EDM, Gyory AZ. Immunoglobulin deposits in the kidney in preeclampsia. Its significance. *Aust N Z J Med* 1978; 8:408-412.

Garner PR, D'Alton ME, Dudley DK, Huard P, Hardie M. Preeclampsia in diabetic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163:505-508.

Garrett JE, Tamir H, Kifor O, Simin RT, Rogers KV, Mithal A, Gagel RF, Brown EM. Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an extracellular calcium receptor gene. *Endocrinology* 1995; 136(11):5202-5211.

Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* 2004; 104(8):2543-2548.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119(3):493-501.

Gervais FG, Thornberry NA, Ruffolo SC, Nicolson DW, Roy S. Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polypeptide. *J Biol Chem* 1998; 273: 17102-17108.

Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 1994; 218(2):314-349.

Goswami D, Tannetta DS, Magee LA, Fuchisawa A, Redman CW, Sargent IL, Dadelszen P von. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta* 2006; 27:56-61.

Graham LA, Caesar JJ, Burgen ASV. Gastrointestinal absorption and excretion of Mg<sup>28</sup> in man. *Metabolism* 1960; 9(5):646-659.

Greidinger EL, Miller DK, Yamin TT, Casciola-Rosen L, Rosen A. Sequential activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligand Jurket cells. *FEBS Lett* 1996; 390:299-303.

Gude NM, Stevenson JL, Moses EK, King RG. Magnesium regulates hypoxia-stimulated apoptosis in the human placenta. *Clin Sci* 2000; 98(4):375-380.

Günther T. Biochemistry and pathobiochemistry of magnesium. *Artery* 1981; 9(3):167-181.

Hallak M, Martinez-Poyer J, Kruger ML, Hassan S, Blackwell SC, Sorokin Y. The effect of magnesium sulfate on fetal heart rate parameters: A randomized, placebo-controlled trial. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181(5 Pt 1):1122-1127.

Handwerker SM, Altura BT, Altura BM. Ionized serum magnesium and potassium levels in pregnant women with preeclampsia and eclampsia. *J Reprod Med* 1995; 40(3):201-208.

Hengartner MO. Apoptosis and the shape of death. *Dev Genet* 1997; 21:245-248.

Herren B, Levkau B, Raines EW, Ross R. Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteases. *Mol Biol Cell* 1998; 9:1589-1601.

Holzgreve W, Hahn S. Prenatal diagnosis using fetal cells and free fetal DNA in maternal blood. *Clin Perinatol* 2001; 28(2):353-365.

Homuth V, Jupner A, Busjahn A, Ruckert E, Reichert M, Faulhaber HD, Luft FC. Untersuchungen zur Klinik und Differentialtherapie der milden Hypertonie in der Schwangerschaft. *Zentralbl Gynakol* 1994; 116:267-270.

House MG, Kohlmeier L, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Leboff MS, Glowacki J, Brown EM. Expression of an extracellular calcium-sensing receptor in human and mouse bone marrow cells. *J Bone Miner Res* 1997; 12(12):1959-1970.

Houwert-de Jong MH, te Velde ER, Nefkens MJ, Schuurman HJ. Immune complexes in skin of patients with pre-eclamptic toxemia. *Lancet* 1982; 2:387.

Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rogers GM, McLaughlin MK. Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161(4):1025-1034.

Huijgen HJ, van Ingen HE, Kok WT, Sanders GT. Magnesium fractions in serum of healthy individuals and CAPD patients, measured by an ion-selective electrode and ultrafiltration. *Clin Biochem* 1996; 29(3):261-266.

Huppertz B, Black S, Kaufmann P. Trophoblast apoptosis and maternal endothelial dysfunction. In: Critchley H, MacLean A, Poston L, Walker J (eds). *Preeclampsia*. RCOG Press, London, 2003.

Huppertz B, Feinberg BB. Preeclampsia: Placental Origins, new Predictors and new Therapeutic Strategies. *Current Women's Health Reviews* 2007 (in press).

Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade – morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 1999; 200:1-18.

Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol* 1998; 110(5):495-508.

Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom JC, Korr H, Kaufmann P. Apoptosis cascade progresses during turnover of human Trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Invest* 1999; 79:1687-1702.

Huppertz B, Kaufmann P, Kingdom JC. Trophoblast turnover in health and disease. *Fetal Maternal Med Rev* 2002; 13:103-118.

Huppertz B, Kingdom JC. Apoptosis in the trophoblast- role of apoptosis in placental morphogenesis. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11:353-362.

Huppertz B. Das Epithel der Plazentazotten: Veränderungen des Trophoblasten bei Präeklampsie. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2005; 2(2):84-89.

Huppertz B. Risiken und Nutzen der Magnesiumtherapie. *DHZ* 2006; 8:50-53.

Hutchins JB, Barger SW. Why neurons die: cell death in the nervous system. *Anat Rec* 1998; 253(3):79-90.

Ikle FA. Trophoblastzellen im strömenden Blut. *Schweiz Med Wochenschr* 1964; 91:934-945.

Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either Preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:158-166.

Ishizaki Y, Jacobson MD, Raff MC. A role for caspases in lens fiber differentiation. *J Cell Biol* 1998; 140:153-158.

Itoh T, Horio T. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is cleaved during UV-induced apoptosis. *J Dermatol Sci* 2001; 25(1):72-77.

Janes SL, Kyle PM, Redman C, Goodall AH. Flow cytometric detection of activated platelets in pregnant women prior to the development of pre-eclampsia. *Thromb Haemost* 1995; 74(4):1059-1063.

Johansen M, Redman CW, Wilkens T, Sargent IL. Trophoblast deportation in human pregnancy – its relevance for pre-eclampsia. *Placenta* 1999; 20:531-539.

Jones WK. Improving Women's Health: National Strategy is needed. *Chronic Disease Notes & Reports*. National Center for Disease Prevention and Health Promotion 2000; 13:1-7.

Käär K, Jouppila P, Kuikka J, Luotola H, Toivanen J, Rekonen A. Intervillous blood flow in normal and complicated late pregnancy measured by means of an intravenous  $^{133}\text{Xe}$  method. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1980; 59(1):7-10.

Kadyrov M, Kaufmann P, Huppertz B. Expression of a cytokeratin 18 neo-epitope is a specific marker for trophoblast apoptosis in human placenta. *Placenta* 2001; 22(1):44-48.

Kaufmann P. Plazenta. Benninghoff A: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen 15. Aufl. 1993; 164-173.

Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT, Bredesen DE. Cleavage of actin by interleukin  $1\beta$ -converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:2234-2238.

Kerr JF, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV. Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol* 1995; 46:1-27.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4):239-257.

Kingdom JC, Kaufmann P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta* 1997; 18:613-621.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14:5579-5588.

Kitzmiller JL, Benirschke K. Immunofluorescent study of placental bed vessels in pre-eclampsia of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 115:248-251.

Knight M, Duley L, Henderson-Smart DJ, King JF. Antiplatelet agents for preventing and treating pre-eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; (2):CD000492. Review.

Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105(6):632-640.

Kocyigit Y, Atamer Y, Atamer A, Tuzcu A, Akkus Z. Changes in serum levels of leptin, cytokines and lipoprotein in pre-eclamptic and normotensive pregnant women. *Gynecol Endocrinol* 2004; 19(5):267-273.

Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, Oers MHJ van. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84:1415-1420.

Kovac CM, Howard BC, Pierce BT, Hoeldtke NJ, Calhoun BC, Napolitano PG. Fetoplacental vascular tone is modified by magnesium sulfate in the preeclamptic ex vivo human placental cotyledon. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189(3):839-842.

Kroemer G. The pharmacology of T cell apoptosis. *Adv Immunol* 1995; 58:211-296.

Kusama K, Jiang Y, Ohno J, Shikata H, Ishikawa F, Taguchi K, Kikuchi K, Mori K, Sakashita H, Sakagami H, Kaneko T, Yamamoto Y. Immunohistochemical detection of cytokeratin 18 and its neo-epitope in human salivary glands and pleomorphic adenomas. *Anticancer Res* 2000; 20(4):2485-2487.

Kyle PM, Redman CW. Comparative risk-benefit assessment of drugs used in the management of hypertension in pregnancy. *Drug Saf* 1992; 7:223-234.

Laivuori H, Kaaja R, Rutanen EM, Viinikka L, Ylikorkala O. Evidence of high circulating testosterone in women with prior preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(2):344-347.

Lazard EM. An analysis of 575 cases of eclamptic and pre-eclamptic toxemias treated by intravenous injections of magnesium sulphate. *Am J Obst Gynec* 1933; 26:647-656.

Leers MPG, Kölgen W, Björklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Björklund P, Ramaekers FCS, Björklund B, Nap M, Jörnval H, Schutte B. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999; 187(5):567-572.

Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(8):589-598.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997; 185(8):1481-1486.

Lenfant C. National Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Working group report on high blood pressure in pregnancy. *J Clin Hypertens* 2001; 3(2):75-88.

Leung DN, Smith SC, To KF, Sahota DS, Baker PN. Increased placental apoptosis in pregnancies complicated by Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:1249-1250.

Leung TN, Zhang J, Lau TK, Chan LY, Lo YM. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem* 2001; 47(1):137-139.



Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004; 350(7):672-683.

Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of Caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997; 89:175-184.

Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ, Redman CW. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999; 45(2):184-188.

Longo LD, Kleinzeller A. Transport of monosaccharides by placental cells. *Fed Proc* 1970; 29:802.

Lucas MJ, Leveno KJ, Cunningham FG. A comparison of magnesium sulphate with Phenytoin for the prevention of eclampsia. *N Engl J Med* 1995; 333(4):201-205.

Lyden TW, Ng AK, Rote NS. Modulation of phosphatidylserine epitope expression by BeWo cells during forskolin treatment. *Placenta* 1993; 14:177-186.

Many A, Hubel CA, Fisher SJ, Roberts JM, Zhou Y. Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *Am J Pathol* 2000; 156(1):321-331.

Marino J, Stoeckli I, Walch M, Latinovic-Golic S, Sundstroem H, Groscurth P, Ziegler U, Dumrese C. *Chlamydomonas pneumoniae* derived from inclusions late in the infectious cycle induce apoptosis in human aortic endothelial cells. *BMC Microbiol* 2008; 8:32.

Martin SJ, O'Brien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahboubi A, Saido TC, Green DR. Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem* 1995; 270(12):6425-6428.

Matsuda Y, Maeda Y, Ito M, Sakamoto H, Masaoka N, Takada M, Sato K. Effect of magnesium sulfate treatment on neonatal bone abnormalities. *Gynecol Obstet Invest* 1997; 44(2):82-88.

Mayhew TM, Leach L, McGee R, Ismail WW, Myklebust R, Lammiman MJ. Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13-41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes). *Placenta* 1999; 20(5-6):407-422.

McCarthy NJ, Whyte MK, Gilbert CS, Evan GI. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* 1997; 136:215-227.

McCartney CP. The acute hypertensive disorders of pregnancy, classified by renal histology. *Gynaecologia* 1969; 167(4):214-220.

Meier P, Finch A, Evan G 2000. Apoptosis in development. *Nature* 2000; 407(6805): 796-801.

Mentaverri R, Yano S, Chattopadhyay N, Petit L, Kifor O, Kamel S, Terwilliger EF, Brazier M, Brown EM. The calcium sensing receptor is directly involved in both osteoclast differentiation and apoptosis. *FASEB J* 2006; 20(14):2562-2564.

Miller DK. The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin Immunol* 1997; 9:35-49.

Miller RK, Genbacev O, Turner MA, Aplin JD, Caniggia I, Huppertz B. Human placental explants in culture: approaches and assessments. *Placenta* 2005; 26(6): 439-448.

Mittendorf R, Pryde P, Khoshnood B, Lee KS. Is tocolytic magnesium sulfate associated with excess total pediatric mortality, what is its impact? *Obstet Gynecol* 1998; 92(2):308-311.

Mizobuchi M, Ogata H, Hatamura I, Saji F, Koiwa F, Kinugasa E, Koshikawa S, Akizawa T. Activation of calcium-sensing receptor accelerates apoptosis in hyperplastic parathyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362(1):11-16.

Morioka K, Tone S, Mukaida M, Takano-Ohmuro H. The apoptotic and nonapoptotic nature of the terminal differentiation of the erythroid cells. *Exp Cell Res* 1998; 240:206-217.

Morsi HM, Leers MP, Jäger W, Björklund V, Radespiel-Tröger M, el Kabarity H, Nap M, Lang N. The patterns of expression of an apoptosis-related CK18 neopeptide, the bcl-2 proto-oncogene, and the Ki67 proliferation marker in normal, hyperplastic, and malignant endometrium. *Int J Gynecol Pathol* 2000; 19(2):118-126.

Nakatsuka M, Asagiri K, Kimura Y, Kamada Y, Tada K., Kudo T. Generation of peroxynitrite and apoptosis in placenta of patients with Chorioamnionitis: possible implications in placental abruption. *Hum Reprod* 1999; 14(4):1101-1106.

Nakatsuka M, Asagiri K, Noguchi S, Habara T, Kudo T. Nafamostat mesilate, a serine protease inhibitor, suppresses lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthesis and apoptosis in cultured human trophoblasts. *Life Sci* 2000; 67(10):1243-1250.

Nandakumaran M, Dashti HM, Al-Zaid NS. Maternal-fetal transport kinetics of copper, selenium, magnesium and iron in perfused human placental lobule: in vitro study. *Mol Cell Biochem* 2002; 231(1-2):9-14.

Paterson-Brown S, Robson SC, Redfern N, Walkinshaw SA, de Swiet M. Hydralazine boluses for the treatment of severe hypertension in pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101:409-413.

Petrides P. Wasser- und Elektrolythaushalt. *Biochemie und Pathobiochemie* 1997; 680-705.

Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007; 21(3):157-171.

Poston L, Briley AL, Seed PT, Kelly FJ, Shennan AH; Vitamins in Pre-eclampsia (VIP) Trial Consortium. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2006; 367(9517):1145-1154.

Powers RW, Evans RW, Ness RB, Crombleholme WR, Roberts JM. Homocysteine and cellular fibronectin are increased in preeclampsia, not transient hypertension of pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2001; 20(1):69-77.

Quamme GA, Dirks JH. The physiology of renal magnesium handling. *Ren Physiol* 1986; 9(5):257-269.

Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 2006; 20(9):1487-1495.

Rath W, Heilmann L, Faridi A. Arbeitsgemeinschaft Schwangerschafts-hochdruck/Gestose: Empfehlungen für Diagnostik und Therapie bei Bluthochdruck in der Schwangerschaft. *Frauenarzt* 2000; 41:139-142.

Rath W, Loos W, Kuhn W. HELLP syndrome. *Zentralbl Gynakol* 1994; 116(4):195-201.

Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180(2 Pt 1):499-506.

Redman CW, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta* 2000; 21(7):597-602.

Redman CW, Sargent IL. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. *Placenta*. 2003; 24 Suppl A:S21-27.

Redman CWG, Sargent IL. Microparticles and immunomodulation in pregnancy and pre-eclampsia. *J Reprod Immunol* 2007; 76(1-2):61-67.

Reinhart RA. Magnesium metabolism. *Wis Med J* 1990; 89(10):579-583.

Riccardi D, Park J, Lee WS, Gamba G, Brown EM, Hebert SC. Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(1):131-135.

Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia- recent insights. *Hypertension* 2005; 46:1243-1249.

Roberts JM, Lain KY. Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta* 2002; 23(5):359-372.

Rubenowitz E, Axelsson G, Rylander R. Magnesium in drinking water and death from acute myocardial infarction. *Am J Epidemiol* 1996; 143(5):456-462.

Sanders GT, Huijgen HJ, Sanders R. Magnesium in disease: a review with special emphasis on the serum ionized magnesium. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37(11-12):1011-1033.

Sanders R, Konijnenberg A, Huijgen HJ, Wolf H, Booer K, Sanders GT. Intracellular and extracellular, ionized and total magnesium in pre-eclampsia and uncomplicated pregnancy. *Clin Chem Lab Med* 1998; 37(1):55-59.

Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online* 2006; 13(5):680-686.

Savill J. Phagocytic docking without shocking. *Nature* 1998; 392(6675):442-443.

Schaaps JP et al. Shunting the intervillous space: new concepts in human uteroplacental vascularisation. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 323-332.

Schifferli JA, Ng YC, Estreicher J, Walport MJ. The clearance of tetanus toxoid/anti-toxoid immune complexes from the circulation of humans. Complement- erythrocyte complement receptor 1-dependent mechanisms. *J Immunol* 1988; 140:899-904.

Schroeder HA, Nason AP, Tipton IH. Essential metals in man. Magnesium. *J Chronic Dis* 1969; 21(11):815-841.

Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982; 17:229-259.

Seydoux J, Girardin E, Paunier L, Beguin F. Serum and intracellular magnesium during normal pregnancy and in patients with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; 99(3):207-211.

Shelton SD, Fouse BL, Holleman CM, Sedor FA, Herbert WN. Cardiac troponin T levels in umbilical cord blood. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181(5 Pt 1):1259-1262.

Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H, Tsujimoto Y. Retardation of chemical hypoxia-induced necrotic cell death by Bcl-2 and ICE inhibitors: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transductions. *Oncogene* 1996; 12(10):2045-2050.

Sibai BM, Abdella TN, Anderson GD. Pregnancy outcome in 211 patients with mild chronic hypertension. *Obstet Gynecol* 1983; 61:571-576.

Sibai BM, Gordon T, Thom E, Caritis SN, Klebanoff M, McNellis D, Paul RH. Risk factors for preeclampsia in healthy nulliparous women: a prospective multicenter study. The National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172(2 Pt 1):642-648.

Sibai BM, Lindheimer M, Hauth J, Caritis S, VanDorsten P, Klebanoff M, MacPherson C, Landon M, Miodovnik M, Paul R, Meis P, Dombrowski M. Risk factors for preeclampsia, abruptio placentae, and adverse neonatal outcomes among women with chronic hypertension. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *N Engl J Med* 1998; 339:667-671.

Sibai BM, Ramadan MK, Chari RS, Friedman SA. Pregnancies complicated by HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets): subsequent pregnancy outcome and long-term prognosis. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172:125-129.

Sibai BM. Magnesium sulfate prophylaxis in preeclampsia: Lessons learned from recent trials. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190(6):1520-1526.

Sibai BM. Preeclampsia: an inflammatory syndrome? *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:1061-1062.

Sibai BM. Treatment of hypertension in pregnant women. *N Engl J Med* 1996; 335(4):257-65. Review.

Sibley CP, Pardi G, Cetin I, Todros T, Piccoli E, Kaufmann P, Huppertz B, Bulfamante G, Cribiu FM, Ayuk P, Glazier J, Radaelli T. Pathogenesis of intrauterine growth restriction (IUGR)-conclusions derived from a European Union Biomed 2 Concerted Action project 'Importance of Oxygen Supply in Intrauterine Growth Restricted Pregnancies'-a workshop report. *Placenta* 2002; 23 Suppl A:S75-79.

Skoczyński M, Semczuk M. Influence of magnesium sulphate and isradipine on human placental cotyledon fetal vessels in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 100(1):25-28.

Smárason AK, Sargent IL, Starkey PM, Redman CW. The effect of placental syncytiotrophoblast microvillous membranes from normal and pre-eclamptic women on the growth of endothelial cells in vitro. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100(10):943-949.

Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet and Gynecol* 1997; 177(6):1395-1401.

Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177(1):57-65.

Standley CA, Whitty JE, Mason BA, Cotton DB. Serum ionized magnesium levels in normal and preeclamptic gestation. *Obstet Gynecol* 1997; 89(1):24-27.

Sutton RA, Domrongkitchaiporn S. Abnormal renal magnesium handling. *Miner Electrolyte Metab* 1993; 19(4-5):232-240.



Tempfer C. Genetische Aspekte der Präeklampsie. *Spekulum* 2004; 22(3):16-18.

Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose)polymerase. *Cell* 1995; 81:801-809.

Tfelt-Hansen J. The role of calcium-sensing receptor and signalling pathways in the pathophysiology in two in vitro models of malignant hypercalcemia: the rat rice H-500 Leydig testis cancer and prostate cancer (PC-3) cells. Expression and regulation of pituitary tumor transforming gene in Leydig testis cancer and astrocyte and astrocytoma cells. *Dan Med Bull* 2008; 55(1):17-46.

Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(8):569-579.

Tremblay PC, Sybulski S, Maughan GB. Role of the placenta in fetal nutrition. *Am J Obstet Gynecol* 1965; 91:560-597.

Vićovac L, Jones CJ, Aplin JD. Trophoblast differentiation during formation of anchoring villi in a model of the early human placenta in vitro. *Placenta* 1995; 16(1):41-56.

Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW. Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102(1):20-25.

Volhard F. Die doppelseitigen haematogenen Nierenerkrankungen. Springer Berlin 1918.

Walker JJ. Preeclampsia. *Lancet* 2000; 356:1260-1265.

Walsh SW. Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16(1):93-104.

Walsh SW. Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 152(3):335-340.

Yakovlev AG, Faden AI. Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *NeuroRx* 2004; 1(1):5-16.

Yang ZW, Gebrewold A, Nowakowski M, Altura BT, Altura BM. Mg(2+)-induced endothelium-dependent relaxation of blood vessels and blood pressure lowering: role of NO. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278(3):R628-639.

Yano Y, Shiba E, Kambayashi J, Sakon M, Kawasaki T, Fujitani K, Kang J, Mori T. The effects of calpeptin (a calpain specific inhibitor) on agonist induced microparticle formation from the platelet plasma membrane. *Thromb Res* 1993; 71(5):385-396.

Zhang J, Zeisler J, Hatch MC, Berkowitz G. Epidemiology of pregnancy-induced hypertension. *Epidemiol Rev* 1997; 19:218-232.

Zhang WC, Zhang WH, Wu B, Zhao YJ, Li QF, Xu CQ. [The role of calcium-sensing receptor on ischemia/reperfusion-induced rat cardiomyocyte apoptosis]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2007; 35(8):740-744.

Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Circulatory fetal and maternal DNA in pregnancies at risk and those affected by preeclampsia. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945:138-140.

Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. The levels of circulatory cell free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2002; 21(1):77-83.

Zuzarte-Luis V, Hurlle JM. Programmed cell death in the developing limb. *Int J Dev Biol* 2002; 46(7):871-876.

## 7 ANHANG

<b>Belegung der Mikrotiterplatte</b> <i>(am Beispiel der Medienproben mit 3 Stunden Inkubation)</i>												
LW	30	75	150	300	450	600	900	1500	X	X	X	A
LW	30	75	150	300	450	600	900	1500	X	X	X	B
LW	30	75	150	300	450	600	900	1500	X	X	X	C
3h/1	3h/1	3h/1	3h/2	3h/2	3h/2	3h/3	3h/3	3h/3	3h/4	3h/4	3h/4	D
1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1	
3h/1	3h/1	3h/1	3h/2	3h/2	3h/2	3h/3	3h/3	3h/3	3h/4	3h/4	3h/4	E
1 : 5	1 : 5	1 : 5	1 : 5	1 : 5	1 : 5	1 : 5	1 : 5	1 : 5	1 : 5	1 : 5	1 : 5	
3h/1	3h/1	3h/1	3h/2	3h/2	3h/2	3h/3	3h/3	3h/3	3h/4	3h/4	3h/4	F
1 : 10	1 : 10	1 : 10	1 : 10	1 : 10	1 : 10	1 : 10	1 : 10	1 : 10	1 : 10	1 : 10	1 : 10	
3h/1	3h/1	3h/1	3h/2	3h/2	3h/2	3h/3	3h/3	3h/3	3h/4	3h/4	3h/4	G
1 : 50	1 : 50	1 : 50	1 : 50	1 : 50	1 : 50	1 : 50	1 : 50	1 : 50	1 : 50	1 : 50	1 : 50	
3h/1	3h/1	3h/1	3h/2	3h/2	3h/2	3h/3	3h/3	3h/3	3h/4	3h/4	3h/4	H
1 : 100	1 : 100	1 : 100	1 : 100	1 : 100	1 : 100	1 : 100	1 : 100	1 : 100	1 : 100	1 : 100	1 : 100	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

**Tab. 7.1** Belegung der Mikrotiterplatte  
(am Beispiel der Medienproben mit 3 Stunden Inkubation)

<b>Ansätze der Standards zur Proteinbestimmung nach Lowry</b>		
Volumen Standard ( $\mu\text{l}$ )	Aqua bidest. ( $\mu\text{l}$ )	Proteinkonzentration ( $\mu\text{l/ml}$ )
2	98	30
5	95	75
10	90	150
20	80	300
30	70	450
40	60	600
60	40	900
100	0	1500
0 (Leerwert)	100	0

**Tab. 7.2** Ansätze der Standards zur Proteinbestimmung nach Lowry

## **Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung**

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei mir, **Patrick Hamid Alizai, Theaterplatz 1, 52062 Aachen**, hinterlegt sind.

# 8 Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Patrick Hamid Alizai
Geburtsdatum	20. Mai 1977
Geburtsort	Düren
Konfession	römisch-katholisch
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulbildung

08/1983 – 07/1987	Städtische Grundschule Paul-Gerhardt, Düren
09/1987 – 06/1996	Städtisches Gymnasium am Wirteltor, Düren

## Hochschulbildung

10/1996 – 09/1998	Mathematik und Geschichte auf Lehramt, Universität Köln
10/1999 – 11/2006	Humanmedizin, RWTH Aachen
04/2002	Ärztliche Vorprüfung (Note 2,00)
11/2006	Ärztliche Prüfung (Gesamtnote 1,83)
01/2007	Approbation als Arzt

## Ärztliche Tätigkeit

04/2007 –	Chirurgische Klinik, Universitätsklinikum Aachen bei Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. V. Schumpelick
-----------	--