

**Aus der Universitätsfrauenklinik Rostock  
Direktor Prof. Dr. med. B. Gerber**

**HYPERGLYKÄMIE UND HORMONEXPRESSION HUMANER  
TROPHOBLASTZELLEN**

**Inauguraldissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock**

**vorgelegt von**

**Maria Petereit  
aus Neustrelitz**

**Rostock, 2010**

**Dekan Prof. Dr. med. E. C. Reisinger**

Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger  
Medizinische Fakultät, Universität Rostock

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Volker Briese,  
Universitätsfrauenklinik und Poliklinik am Klinikum Südstadt Rostock

2. Gutachter: PD Dr. med. Manfred Lehmann,  
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie,  
Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfgang Distler,  
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,  
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Dresden

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>5</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>8</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>9</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>10</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>12</b>
2.1. DIABETES MELLITUS UND SCHWANGERSCHAFT .....	12
2.2. INSULINWIRKUNG IN DER SCHWANGERSCHAFT .....	18
2.3. PLAZENTA UND TROPHOBlast .....	20
2.3.1. <i>Funktion der Plazenta</i> .....	20
2.3.2. <i>Entwicklung der Plazenta</i> .....	21
2.3.3. <i>Aufbau der Plazenta</i> .....	24
2.3.4. <i>Trophoblast</i> .....	25
2.3.4.1 <i>Villöser Trophoblast</i> .....	25
2.3.4.2. <i>Extravillöser Trophoblast</i> .....	26
2.3.4.3. <i>Hormonproduktion des Trophoblasten</i> .....	27
2.3.5. <i>Stofftransport</i> .....	30
2.4. FRAGESTELLUNG .....	32
2.5. HYPOTHESEN .....	33
2.6. KLINISCHER TEIL DER STUDIE .....	33
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>35</b>
3.1. MODELLENTEWICKLUNG .....	35
3.2. EIN- UND AUSSCHLUSSKRITERIEN .....	37
3.3. TROPHOBlastZELLKULTUR .....	37
3.3.1. <i>Gewinnung von Trophoblastzellen</i> .....	37
3.3.2. <i>Zeitlicher Ablauf der Probenentnahme und Glucosezugabe</i> .....	43
3.3.3. <i>Bestimmung der Glucose- und Hormonkonzentrationen</i> .....	43
3.3.4. <i>Zellkulturdokumentation</i> .....	45
3.3.5. <i>LDH – Zytotoxizitätstest</i> .....	45
3.3.6. <i>Nachweis der Trophoblastzellen</i> .....	48
3.3.7. <i>Verwendete Materialien und Chemikalien</i> .....	50
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>53</b>
4.1. LICHTMIKROSKOPIE .....	53
4.2. GLUCOSE- UND HORMONKONZENTRATIONEN .....	55
4.2.1. <i>Glucose- und Hormonkonzentrationen im Low-Glucose-Medium (1 g/l Glucose)</i> .....	55
4.2.2. <i>Glucose- und Hormonkonzentrationen im High-Glucose-Medium (4,5 g/l Glucose)</i> .....	59
4.3. LDH – ZYTOTOXIZITÄTSTEST .....	63
4.4. NACHWEIS DER TROPHOBlastZELLEN .....	66

<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>
5.1. EINFLUSS VON GLUCOSE AUF DIE HORMONEXPRESSION.....	68
5.2. EINFLUSS VON GLUCOSE AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT .....	71
5.3. METHODENKRITIK .....	74
5.4. SCHUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK .....	76
<b>6. THESEN .....</b>	<b>77</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>78</b>
<b>8. ANHANG .....</b>	<b>85</b>
ANHANG A: FORMBLATT DER PATIENTINNENINFORMATION.....	86
ANHANG B: FORMBLATT DER PATIENTINNENEINWILLIGUNG .....	87
ANHANG C: POSTER „HYPERGLYKÄMIE UND HORMONEXPRESSION HUMANER TROPHOBLASTZELLEN“ ANLÄSSLICH DER 125. TAGUNG DER NORDDEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR GYNÄKOLOGIE UND GEBURTHILFE AM 5./.6. JUNI 2009 .....	88
ANHANG D: URKUNDE POSTERPREIS.....	89
ANHANG E: LEBENSLAUF MARIA PETEREIT .....	90
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>91</b>
<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>92</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADA	American Diabetes Association
AGE	Advanced Glycation Endproduct
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BMI	Body Mass Index
CD 95	Cluster of Differentiation 95
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
CYP11A1	Cytochrom P 450 11A1
D	Dalton
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
FKS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glucosetransporter
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
HAPO	Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes
Hb	Hämoglobin
HbF	Fetales Hämoglobin
HBSS	Hank`s Buffered Salt Solution
hCC	humane Chorioncorticotropin
hCG	humane Choriongonadotropin
hCS	human Chorionic Somatotropin (=hPL)
hCT	humane Chorionthyreotropin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl) - 1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HLA-G	Human-Leucocyte-Antigene G
hPL	human Placental Lactogen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IAP	Inhibitor of Apoptosis
IFG	Impaired Fasting Glucose

---

IGT	Impaired Glucose Tolerance
INT	2-[4-Iodophenyl]-3-[4-Nitrophenyl]-5-Phenyltetrazoliumchlorid
IRDS	Infant Respiratory Distress Syndrome
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
MCF – 7	Michigan Cancer Foundation – 7
MHC II	Major-Histokompatibilität-Komplexe II-Moleküle
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NBCS	New Born Calf Serum
NGT	Normale Glucosetoleranz
NIDDM	Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus
oGTT	oraler Glucosetoleranztest
O <sub>2</sub>	Sauerstoff, Oxygen
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PGF <sub>2</sub> α	Prostaglandin F <sub>2</sub> α
PGH	Placental Growth Hormone
pH	potentia Hydrogenii
pO <sub>2</sub>	partieller Sauerstoffdruck
ROS	Reactive Oxygen Species
SA	Standardabweichung
SIH	Schwangerschaftsinduzierte Hypertonie
SSW	Schwangerschaftswoche
STH	Somatotropes Hormon
TNF	Tumornekrosefaktor, Tumor necrosis factor
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand
TRH	Thyreotropin Releasing-Hormon

---

TSH	Thyroid Stimulating Hormone
TVS	Trypsinverdauungsschritt
U/min	Umdrehungen/Minute
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
ZR	Zentrifugenröhrchen
WHO	World Health Organization

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES FETUS, NABELSCHNUR UND FRUCHTSACK (SCHIEBLER UND KAUFMANN, 1981) .....	21
ABBILDUNG 2: MODELL DER SYNZYTiotROPHOBlastFORMATION IN VITRO (KLIMAN ET AL. 1986) .....	23
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER REIFEN MENSCHLICHEN PLAZENTA IM SCHNITT (MODIFIZIERT NACH SCHIEBLER UND KAUFMANN 1981) .....	25
ABBILDUNG 4: MITTELWERTE DER HCG-PLASMAKONZENTRATIONEN IM VERLAUF DER NORMALEN SCHWANGERSCHAFT. METHODE: RADIOIMMUNOASSAY. (BRAUNSTEIN ET AL. 1976).....	28
ABBILDUNG 5: MITTELWERTE DER HPL-SERUMKONZENTRATIONEN IM VERLAUF DER NORMALEN SCHWANGERSCHAFT. METHODE: RADIOIMMUNOASSAY. (KAPLAN ET AL. 1976).....	29
ABBILDUNG 6: STOFFAUSTAUSCH ÜBER DIE PLAZENTA (DUDENHAUSEN 2003) .....	32
ABBILDUNG 7: BANDENVERTEILUNG NACH PERCOLL-GRADIENTEN-ZENTRIFUGATION (MODIFIZIERT NACH KLIMAN 1999) .....	40
ABBILDUNG 8: PERCOLL-GRADIENT NACH ZENTRIFUGATION .....	41
ABBILDUNG 9: PRINZIP DES LDH-ZYTOTOXIZITÄTSTEST.....	46
ABBILDUNG 10: TROPHOBlastZELLKULTUR 0 STUNDEN, VERGRÖßERUNG 32FACH .....	54
ABBILDUNG 11: TROPHOBlastZELLKULTUR 24 STUNDEN, VERGRÖßERUNG 32FACH .....	54
ABBILDUNG 12: TROPHOBlastZELLKULTUR 48 STUNDEN, VERGRÖßERUNG 32FACH .....	54
ABBILDUNG 13: TROPHOBlastZELLKULTUR 72 STUNDEN, VERGRÖßERUNG 32FACH .....	55
ABBILDUNG 14: TROPHOBlastZELLKULTUR 96 STUNDEN, VERGRÖßERUNG 32FACH .....	55
ABBILDUNG 15: GLUCOSEKONZENTRATIONEN IM LOW-GLUCOSE-ANSATZ .....	57
ABBILDUNG 16: PROGESTERONKONZENTRATIONEN IM LOW-GLUCOSE-ANSATZ .....	58
ABBILDUNG 17: B-HCG-KONZENTRATIONEN IM LOW-GLUCOSE-ANSATZ.....	58
ABBILDUNG 18: ÖSTRADIOLKONZNETRATIONEN IM LOW-GLUCOSE-ANSATZ.....	59
ABBILDUNG 19: GLUCOSEKONZENTRATIONEN IM HIGH-GLUCOSE-ANSATZ.....	61
ABBILDUNG 20: PROGESTERONKONZENTRATIONEN IM HIGH-GLUCOSE-ANSATZ .....	61
ABBILDUNG 21: B-HCG-KONZENTRATIONEN IM HIGH-GLUCOSE-ANSATZ .....	62
ABBILDUNG 22: ÖSTRADIOLKONZENTRATIONEN IM HIGH-GLUCOSE-ANSATZ .....	63
ABBILDUNG 23: ZYTOTOXIZITÄT NACH 120 H IM LOW-GLUCOSE-ANSATZ .....	64
ABBILDUNG 24: ZYTOTOXIZITÄT NACH 120 H IM HIGH-GLUCOSE-ANSATZ .....	65
ABBILDUNG 25: TROPHOBlastZELLE, ANGEFÄRBT.....	66
ABBILDUNG 26: TROPHOBlastZELLEN, ANGEFÄRBT .....	66
ABBILDUNG 27: TROPHOBlastZELLEN, ANGEFÄRBT .....	67

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: KLAFFIKATION DES DIABETES MELLITUS NACH DER ÄTIOLOGIE (MODIFIZIERT NACH DEN EVIDENZBASIERTEN LEITLINIEN DER DDG, AKTUALISIERUNG 10/2004) .....	13
TABELLE 2: DIAGNOSTISCHE KRITERIEN FÜR DIE DIAGNOSE DES DIABETES MELLITUS, IGT UND IFG (MODIFIZIERT NACH DEN EVIDENZBASIERTEN LEITLINIEN DER DDG, AKTUALISIERUNG 10/2004) (BOLLMANN 03.07.2006) .....	14
TABELLE 3: VERWENDETE CHEMIKALIEN .....	50
TABELLE 4: VERWENDETE MATERIALIEN .....	51

## 1. Zusammenfassung

Sowohl ein vor der Schwangerschaft bestehender Diabetes mellitus als auch ein während der Schwangerschaft auftretender Gestationsdiabetes führen bei insuffizienter oder mangelnder Stoffwechseleinstellung zu maternalen und fetal Hyperglykämien. Diese bewirken Plazentopathologien und einen gestörten fetal Stoffwechsel.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung inwieweit maternale Hyperglykämien die Trophoblastzellfunktion, im speziellen Sinne die Hormonexpression, beeinflussen. Hierfür soll die Expression von Progesteron,  $\beta$ -hCG und Östradiol, als vom Trophoblasten exprimierte Hormone, in primären Trophoblastzellkulturen unter Glucoseeinfluss gemessen werden. Weiterhin wird der Einfluss von Glucose auf die Zytotoxizität untersucht.

Für die Erstellung der primären Trophoblastzellkulturen wurden neun Plazenten von Termingeschädigten (37. bis 42. SSW) verwendet. Um ein diabetisches, hyperglykämisches Milieu zu imitieren, wurden die aus den Plazenten gewonnenen Trophoblastzellen einerseits in einem High-Glucose-Medium (DMEM; 4,5 g/l Glucose; 5 Plazenten) im Vergleich zu einem Low-Glucose-Medium (DMEM; 1 g/l; 4 Plazenten) kultiviert und andererseits durch 25 mmol/l und 50 mmol/l Glucosezusätze stimuliert.

Die Konzentrationen an Progesteron,  $\beta$ -hCG und Östradiol wurden nach 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden im Zellüberstand der Trophoblastzellkulturen bestimmt.

Nach 120 Stunden wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt um eine eventuelle zytotoxische Wirkung durch Glucose darzustellen.

Unsere Studie weist eine signifikante  $\beta$ -hCG- und Progesteronabnahme unter hyperglykämischen Bedingungen ab 20 mmol/l auf.

Im High-Glucose-Medium ohne, mit 25 mmol/l und mit 50 mmol/l Glucosezusatz nahmen die Progesteron- und  $\beta$ -hCG-Konzentrationen signifikant über 96 Stunden ab. Im Vergleich dazu traf dies im Low-Glucose-Medium nur auf die Progesteronkonzentration innerhalb des 50 mmol/l Glucosezusatzes zu.

Die Östradiolkonzentrationen wiesen weder im Low-Glucose-, noch im High-Glucose-Medium signifikante Konzentrationsabnahmen auf. Hier zeigte sich bei allen Glucosezusätzen im Low-Glucose- und High-Glucose-Medium eine Konzentrationszunahme innerhalb des dritten bis vierten Tages.

Wir beobachteten weiterhin im Low-Glucose-Medium mit Glucosezusatz (25 mmol/l, 50 mmol/l) eine niedrigere Zytotoxizität, im High-Glucose-Medium mit Glucosezusatz eine wenig erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zum Kontrollmedium. In Bezug auf die Positivkontrollen zeigte sich in allen Zellkulturen mit und ohne Glucosezusatz eine signifikant niedrigere Zytotoxizität.

Zusammenfassend kommen wir zu dem Ergebnis, dass hyperglykämische Bedingungen in einem Zeitraum von bis zu 120 Stunden zu Störungen der Hormonexpression, im engeren Sinne zu einer verminderten Progesteron- und  $\beta$ -hCG-Expression, jedoch zu keiner signifikant erhöhten Zytotoxizität führen.

## 2. Einleitung

### 2.1. Diabetes mellitus und Schwangerschaft

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselkrankung, die durch chronische Hyperglykämie und daraus folgender Störung anderer metabolischer Prozesse und Organschäden gekennzeichnet ist. Die Einteilung des Diabetes mellitus orientiert sich an der Ätiologie der verschiedenen Diabetesformen und stellt eine Übereinkunft der WHO (World Health Organization), ADA (American Diabetes Association) und DDG (Deutsche Diabetes Gesellschaft) dar.

Der Typ-1-Diabetes wird in einen immunologisch vermittelten und in eine idiopathische beziehungsweise nicht immunogene Form unterteilt. Der Typ-2-Diabetes umfasst den als früher NIDDM (non insulin dependent diabetes mellitus) bezeichneten Diabetes mellitus. Daneben werden Diabetesformen anderer Ursachen und der Gestationsdiabetes klassifiziert.

Jede erstmals in der Schwangerschaft auftretende oder diagnostizierte Glucosetoleranzstörung wird als Gestationsdiabetes bezeichnet. Die Definition schließt die Erstmanifestation eines Typ-1 oder Typ-2 Diabetes mellitus, andere spezifische Diabetesformen (genetische Defekte, Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Infektionen, Endokrinopathien, etc.) oder aber auch einen vorher nicht erkannten bereits präkonzeptionell bestehenden Typ-2 Diabetes ein. Letzterer ist bei einer gestörten Glucosetoleranzstörung im 1. Trimenon sehr wahrscheinlich.

Der Diabetes mellitus ist die am häufigsten auftretende Komplikation der Schwangerschaft. Davon betroffen sind zwei bis fünf Prozent aller Schwangeren, 90 Prozent davon entsprechen einem Gestationsdiabetes (Sepe et al. 1985). Bei der Mehrzahl der Gestationsdiabetikerinnen kehrt die Glucosetoleranz post partum wieder zur Norm zurück. Jedoch besteht ein Risiko von 50 Prozent für das erneute Auftreten einer Glucosetoleranzstörung in einer folgenden Schwangerschaft (Lang, Künzel 1990). Die Wahrscheinlichkeit an einem manifesten Diabetes mellitus, meist

Typ 2, zu erkranken, liegt 10 Jahre nach einem durchgemachten Gestationsdiabetes bei 40 bis 50 Prozent.

**Tabelle 1: Klassifikation des Diabetes mellitus nach der Ätiologie (modifiziert nach den evidenzbasierten Leitlinien der DDG, Aktualisierung 10/2004)**

Einteilung des Diabetes	
I Typ-1-Diabetes	<p><math>\beta</math>-Zellzerstörung, die üblicherweise zum absoluten Insulinmangel führt</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Autoimmunologisch bedingt</li> <li>• Idiopathisch</li> </ul>
II Typ-2-Diabetes	<p>Vorherrschende Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis vorwiegend sekretorischer Defekt mit Insulinresistenz</p>
III Andere Ursachen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A: Genetische Defekte der <math>\beta</math>-Zellfunktion</li> <li>• B: Genetische Defekte der Insulinwirkung</li> <li>• C: Erkrankungen des exokrinen Pankreas</li> <li>• D: Endokrinopathien</li> <li>• E: Medikamenten- oder Chemikalieninduziert</li> <li>• F: Infektionen</li> <li>• G: Seltene Formen des immunvermittelten Diabetes</li> <li>• Andere, gelegentlich mit Diabetes assoziierte genetische Syndrome</li> </ul>
IV Gestationsdiabetes	

Bei einer venösen Gelegenheits-Plasmaglukose oder einer Nüchternglukose im venösen Plasma  $\geq 100$  mg/dl (5,6 mmol/l) wird zunächst die Nüchternglucose im venösen Plasma kontrolliert. Ein Diabetes mellitus wird daraufhin bei zweimaliger Messung eines Nüchternglucosewerts im venösen Plasma von  $\geq 126$  mg/dl (7,0 mmol/l) diagnostiziert. Wenn eine venöse Gelegenheits-Plasmaglucose bei klassischen Symptomen einmalig  $\geq 200$  mg/dl (11,1, mmol/l) beträgt, so kann sofort die Diagnose Diabetes mellitus gestellt werden.

Im oralen Glucosetoleranztest (oGTT) mit 75 g Glucose liegt der Grenzwert zur Diagnose Diabetes mellitus nach zwei Stunden bei  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol/l) im venösen Plasma. Bei Werten von 140 bis 199 mg/dl (7,8 bis 11,0 mmol/l) im venösen Plasma innerhalb des 2h-Werts im oGTT und abnormen

Nüchternplasmaglucosewerten von 100 – 125 mg/dl spricht man von einer gestörten Glucosetoleranz (Impaired Glucose Tolerance, IGT). Bei der Einstufung IGT anhand des 2h-oGTT muss der Nüchternplasmaglucosewert unterhalb des Grenzwertes für den Diabetes mellitus liegen. Analog zum IGT existiert auch für den Nüchternblutplasmaglucosewert ein Risikobereich (Impaired Fasting Glucose, IFG), der für den Bereich 110 bis 125 mg/dl (6,1 bis 6,95 mmol/l) im venösen Plasma festgelegt ist.

Beim oralen Glucosetoleranztest mit 75 g Glucose ist der 60-Minuten-Wert nicht obligatorisch und somit in Tabelle 2 nicht weiter aufgeführt.

**Tabelle 2: Diagnostische Kriterien für die Diagnose des Diabetes mellitus, IGT und IFG (modifiziert nach den evidenzbasierten Leitlinien der DDG, Aktualisierung 10/2004) (Bollmann 2006)**

		Plasmaglucose venös in mg/dl (mmol/l)	
		Nüchtern	2h-oGTT (75 g Glucose)
NGT	Normale Glucosetoleranz	< 100 (< 5,6)	< 140 (< 7,8)
IFG	Abnorme Nüchternplasmaglucose	100 -125 (5,6 – 6,9)	-
IGT	Gestörte Glucosetoleranz	< 126 (< 7,0)	140 – 199 (7,8 – 11,0)
DM	Diabetes mellitus	$\geq 126$ ( $\geq 7,0$ )	$\geq 200$ ( $\geq 11,1$ )

Zum Screening auf Gestationsdiabetes wird zunächst ein oGTT mit 50 g Glucose durchgeführt werden. Bei pathologischem Ausfall, das heißt bei Glucosewerten von  $\geq 140$  mg/dl (7,8 mmol/l) im venösen Plasma, besteht der Verdacht auf einen Gestationsdiabetes und ein 75-g-oGTT muss angeschlossen werden (zweizeitige Untersuchung).

Die Kombination von Schwangerschaft und Diabetes mellitus stellt ein erhebliches Schwangerschaftsrisiko dar. In Zusammenhang mit einer inadäquaten Stoffwechselinstellung kann es zu schwerwiegenden Komplikationen für Mutter und Kind kommen. Besonders Kinder von Frauen mit einem nicht behandelten Diabetes haben ein erhöhtes Risiko für Fehlbildungen, intrauterinen Fruchttod, Frühgeburt, Organunreife, Makrosomie und damit verbundene perinatale Morbidität und Mortalität (Scherbaum 2008).

Im ersten Trimenon bestehen hauptsächlich fetale Komplikationen wie Missbildungen und Aborte. Trotz mangelnder Kenntnisse zur Pathogenese der Missbildungen wird der Hyperglykämie eine dominierende Rolle beigemessen. So zeigt sich ein zunehmendes Missbildungsrisiko bei erhöhten Werten des HbA1c-Wertes größer 6,9 Prozent (Jensen et al. 2009). Im zweiten und dritten Trimenon ist insbesondere auf ein Polyhydramnion zu achten. Dieses stellt die häufigste Komplikation dar und ist bei bis zu 40 Prozent der diabetischen Schwangerschaften zu beobachten. Die Ausbildung eines Hydramnions ist einerseits abhängig von der mütterlichen Hyperglykämie und der erhöhten Fruchtwassermenge, andererseits durch die vermehrte Glucoseaufnahme des Feten, die zu Glucosurie und Polyurie führt. Als Ursache der fetalen Makrosomie ist ebenfalls die maternale Hyperglykämie, die zu verstärkter fetaler Insulinbildung führt, anzusehen. Das beschleunigte Wachstum ist ab der 28. Schwangerschaftswoche zu beobachten (Oberdisse et al. 1975). Die erhöhten fetalen Insulinspiegel nehmen in der Pathogenese des IRDS (infant respiratory distress syndrome) eine bedeutende Rolle ein. Insulin hemmt die Lecithinbildung in der Lunge und führt demnach zur Ausbildung von Hyalinmembranen (IRDS) (Smith et al. 1975). Durch Hemmung der Sekretion des Parathormons durch erhöhte Insulinspiegel kommt es zu Hypokalzämie des Fetus. Weitere Komplikationen maternaler Hyperglykämien sind Kardiomyopathie, Störungen der Entwicklung des Zentralnervensystems und diabetische Fetopathie. Phänotypische Merkmale der diabetischen Fetopathie bestehen in Fettleibigkeit, Nackenfett, Plethora, Akromikrie, Hirsutismus, tiefliegende halonierte Augen und cushingoides Aussehen (Aerts et al. 1988).

Die schwangere Diabetikerin ist im ersten und zweiten Trimenon vermehrt von Genitalinfektionen mit *Candida albicans* und von Harnwegsinfekten betroffen.

Frauen mit einem Diabetes mellitus in der Schwangerschaft besitzen im Vergleich zu stoffwechselgesunden Frauen ein deutlich erhöhtes Risiko an einer

Gestationshypertonie beziehungsweise Präeklampsie zu erkranken (Inzidenz von 20 bis 45 Prozent versus fünf bis zehn Prozent). Dabei sind lange Diabetesdauer, vorbestehende Mikro- oder Makroalbuminurie beziehungsweise neu aufgetretene Proteinurie in der Frühschwangerschaft, diabetische Retinopathie und eine unzureichende Stoffwechseleinstellung in der Frühschwangerschaft als begünstigende Faktoren einer Gestationshypertonie anzusehen (Scherbaum 2008).

In einer retrospektiven Untersuchung von Hopp et al. wurden Schwangerschaftsverlauf sowie maternale und fetale Komplikationen von schwangeren Diabetikerinnen mit diabetischer Retinopathie und Nephropathie der White-Stadien R und F mit schwangeren Diabetikerinnen ohne schwere Mikroangiopathien der White-Stadien C und D verglichen (Hopp et al. 1995). Bei hyperglykämischen Stoffwechselsituations im ersten Trimenon zeigte sich eine signifikante Progression einer Retinopathie. Bei schon proliferativen Retinopathien kam es zur Verschlechterung der Sehkraft und des Fundusbefundes. Diabetikerinnen mit schon fortgeschrittener Mikroangiopathie wiesen signifikant erhöhte diastolische Blutdruckwerte und in 71 Prozent präeklamptische Symptome auf.

Speziell Gestationsdiabetikerinnen sind einer retrospektiven Studie nach einem 4,3fach erhöhtem Risiko für Komplikationen wie Anämie in der Schwangerschaft, Präeklampsie, Eklampsie, Zervixinsuffizienz oder vaginale Blutungen ausgesetzt (Saydah et al. 2005).

Schwangerschaftsinduzierte Hypertonie und Präeklampsie treten nach Xiong et al. bei Schwangeren mit Gestationsdiabetes 1,3 bis 2,5mal häufiger als im gesunden Vergleichskollektiv auf (Xiong et al. 2001). Harnwegsinfektionen, vaginale Infektionen, Plazentainsuffizienz, höhere Komplikationen während der Entbindung wie Schulterdystokie, vaginal-operative Entbindung oder Sectio caesarea sind weitere Risiken. Die akute Plazentainsuffizienz stellt eine Notfallsituation dar und kann zum Tod des Feten führen.

Untersuchungen an der Grazer Frauenklinik zeigten, dass die perinatale Mortalität bei Schwangeren mit gestörter Glucosetoleranz etwa 6-mal höher als bei Rhesusinkompatibilität und 300-mal höher als bei Toxoplasmose ist. Dies unterstützt die Vermutung, dass in etwa einem Drittel aller Fälle eines ungeklärten Fruchttodes ein Gestationsdiabetes als Ursache anzunehmen ist. Es unterstreicht weiterhin die Be-

deutung eines generellen Screenings auf Gestationsdiabetes. Entsprechend den aktuellen Empfehlungen der „Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe“ und der „Deutschen Diabetesgesellschaft“ wird das Screening in der 24. - 28. Schwangerschaftswoche mit einem 50-g-oGTT (oraler Glucosetoleranztest, 50 g Glucose) durchgeführt. Fällt dieser pathologisch aus, muss dieser durch einen 75-g-oGTT komplettiert werden. Bei entsprechenden Risikofaktoren erfolgt bereits im ersten Trimenon ein 75-g-oGTT. In der 24. bis 28. SSW wird das Screening mit einem 50-g-oGTT wiederholt, bei erneut unauffälligem Resultat letztmalig in der 32. bis 34. SSW. Bekannte Risikofaktoren für einen Gestationsdiabetes sind Übergewicht (Body-Mass-Index vor der Schwangerschaft  $\geq 27,0 \text{ kg/m}^2$ ), Diabetes bei Eltern/Geschwistern, Gestationsdiabetes in einer vorangehenden Schwangerschaft, Zustand nach Geburt eines Kindes mit einem Gewicht  $\geq 4500 \text{ g}$ , Zustand nach Todgeburt, schwere kongenitale Fehlbildungen in einer vorangehenden Schwangerschaft, habituelle Abortneigung ( $\geq 3$  Fehlgeburten hintereinander).

Neuere Studien gehen davon aus, dass schon eine gestörte Glucosetoleranz zu perinatalen Komplikationen führen kann. Besonders zu nennen ist die HAPO-Studie (Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes) (Metzger et al. 2008). An dieser Studie partizipierten über 23.000 Schwangere, bei denen im oralen Glucosetoleranztest mit 75 g Glucose in der 24. – 32. Schwangerschaftswoche eine gestörte Glucosetoleranz festgestellt wurde. Es zeigte sich ein strenger signifikanter Zusammenhang zwischen steigenden maternalen Blutglucosewerten innerhalb der Resultate des 75-oGTT und einem Geburtsgewicht über der 90. Perzentile sowie C-Peptid-Konzentrationen im Nabelschnurblut über der 90. Perzentile. Weiterhin zeigte sich eine positive, aber schwächere Korrelation zu neonataler Hypoglykämie und primären Kaiserschnitt. Es fanden sich zudem Zusammenhänge zwischen erhöhten Nüchternblutglucosewerten sowie erhöhten Blutglucosewerten im 75-oGTT und frühzeitiger Geburt, Schulterdystokie, Geburtsverletzungen, Hyperbilirubinämie und Präeklampsie.

Die Therapie des Diabetes mellitus in der Schwangerschaft richtet sich nach der Pathogenese der Erkrankung. Typ-I-Diabetikerinnen sind auf eine konsequente Insulintherapie angewiesen. Weiterhin sollte therapeutisch auf eine gesunde Ernährung und die Förderung der körperlichen Aktivität geachtet werden. Bei

Gestationsdiabetikerinnen kann primär mit einer Ernährungs- und Bewegungstherapie begonnen werden. Wird die Stoffwechselleage dadurch nicht beherrscht, muss eine Insulintherapie in Betracht gezogen werden.

Orale Antidiabetika sind während der Schwangerschaft weiterhin umstritten. Lange Zeit wurde angenommen, dass orale Antidiabetika teratogenes und toxisches Potential besitzen können, welches in Tierstudien beschrieben worden ist. Neuere Studien kommen zu dem Ergebnis, dass es bei Gabe von Metformin im Vergleich zu Insulin kein erhöhtes Risiko für Malformationen des Feten, neonatale Hypoglykämien, Geburtstraumen und Frühgeburtlichkeit besteht. Weitere Studien demonstrieren, dass es auch unter Glyburid zu keiner Zunahme neonataler Hypoglykämien und kongenitaler Anomalien im Vergleich zur Insulintherapie kommt. Jedoch wird ein aktiver Transport von Glyburid über die Plazentaschranke angenommen. Aufgrund der noch geringen Datenlage zur Sicherheit und Wirkung von Metformin und Glyburid wird die Behandlung mit Metformin, Glyburid und anderen oralen Antidiabetika noch nicht empfohlen (Jovanovic 2009).

## **2.2 Insulinwirkung in der Schwangerschaft**

Die Schwangerschaft bedeutet für den Stoffwechsel eine mehr oder weniger starke Anforderung. Es kommt zur Mobilisierung von Energiereserven mit der Folge einer erhöhten maternalen Glucosebelastung und erhöhter Insulinspiegel. Weiterhin finden sich höhere Serumspiegel an kontrainsulinären oder Insulin-kompetitivhemmenden Hormonen wie Cortisol, hPL (human placental lactogen), Progesteron, Prolactin, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und Leptin (Ryan 2003), sowie Thyroxin, Adrenalin und Östrogen. Es kommt zu einer erhöhten peripheren Insulinresistenz und zu einem vermehrten und beschleunigtem Insulinabbau. Der entstehende relative Insulinmangel wird durch die Langerhans-Inselzellen des Pankreas mit einer erhöhten Insulinausschüttung kompensiert. Ist eine latenterkrankte Bauchspeicheldrüse zu einer Kompensation nicht in der Lage, ergibt sich eine maternale Hyperglykämie bis hin zu einem Gestationsdiabetes.

Die ursächlichen Mechanismen der erhöhten mütterlichen peripheren Insulinresistenz sind noch nicht endgültig geklärt. Bindungsstudien haben jedoch gezeigt, dass die Mechanismen der Insulinresistenz distal vom Insulinrezeptor zu suchen sind

(Puavilai et al. 1982). Im Verlauf der Schwangerschaft nimmt die periphere Insulinresistenz kontinuierlich zu. Während des dritten Trimenons erreicht sie einen Grad, der etwa dem Verlust von 60 Prozent der peripheren Insulinwirkung entspricht. Dieser Verlust wird durch vermehrte Insulinsekretion ausgeglichen.

HPL besitzt wahrscheinlich aufgrund seiner Ähnlichkeit zu STH (Somatotropes Hormon) eine diabetogene Wirkung. Grumbach und Kaplan glauben, dass hPL mit seiner vorwiegend katabolen Wirkung im maternalen Organismus Glucose, freie Fettsäuren und Ketonkörper mobilisiert und somit eine Versorgung des Feten mit energiereichen Substraten garantiert (Kaplan, Grumbach 1964). Seine Konzentration steigt während der Schwangerschaft stetig an. Es kommt zur Verschlechterung der Glucosetoleranz mit Zunahme des Insulinbedarfs.

Cortisol wirkt insulinantagonistisch. Da in der Schwangerschaft jedoch nur die biologisch inaktive, gebundene Fraktion durch Vermehrung des Transcortins unter dem Einfluss der erhöhten Östrogenaktivität erhöht ist, scheint ein wesentlicher Einfluss der Corticosteroide auf den Stoffwechsel der Schwangeren nicht zu bestehen (Bibergeil et al. 1972)

Das plazentare Östrogen, als auch Progesteron können die Glucosetoleranz verschlechtern. Progesteron verstärkt die Insulinausschüttung nach Glucosereiz und bewirkt eine verminderte periphere Empfindlichkeit gegenüber Insulin (Kalkhoff et al. 1970).

Ferner entwickelt sich im Laufe der Schwangerschaft eine reduzierte Empfindlichkeit der  $\beta$ -Zellen des Pankreas auf Glucosereiz. Somit kann der erhöhte Bedarf an Insulin nicht gedeckt werden. Der hyperglykämische Zustand zeigt häufiger im zweiten Trimenon, seltener auch schon im ersten Trimenon seine Auswirkungen.

Glucose passiert die Plazenta nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion. Für Insulin besteht dagegen nur eine deutlich eingeschränkte Plazentapassage. Somit wird Glucose im fetalen Kreislauf überwiegend über fetales Insulin abgebaut. Über das Ausmaß der fetalen Hyperinsulinämie und dem damit verbundenen Risiko der fetalen Makrosomie entscheidet demnach das Ausmaß der mütterlichen Hyperglykämie, die plazentare Glucosepassage sowie die Glucoseempfindlichkeit der fetalen  $\beta$ -Zellen.

## 2.3. Plazenta und Trophoblast

Die Plazenta stellt eine zwischen dem mütterlichen und dem kindlichen Kreislauf geschaltete Scheidewand dar. Durch diese vollzieht sich der Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind.

### 2.3.1. Funktion der Plazenta

Die Plazenta erfüllt zwei Hauptfunktionen. Zum einen gewährleistet sie den Austausch von Stoffwechselprodukten und Gasen zwischen mütterlichem und fetalem Blut bei vollständiger Trennung der beiden Kreisläufe, zum anderen ist sie ein endokrines Organ. Sie synthetisiert mehrere Proteohormone wie das humane Choriongonadotropin (hCG), das humane Plazentalactogen (hPL), das humane Chorionthyreotropin (hCT) und das humane Chorioncorticotropin (hCC). Des Weiteren werden Steroidhormone wie Progesteron und östrogene Hormone, insbesondere Östriol, und Releasing-Faktoren wie luteinisierendes Releasing-Hormon (LHRH), Thyreotropin Releasing-Hormon (TRH) und Corticotropin Releasing-Hormon (CRH) gebildet (Dudenhausen, Briese 2003)

Als weitere Funktion nimmt die Plazenta eine immunologische Rolle ein. Der Embryo beziehungsweise der Fetus ist ein „Semi-Allotransplantat“. Da dieser maternale, als auch paternale Gene trägt, ist der Fetus dem mütterlichen Organismus zur Hälfte fremd. Für die immunologische Toleranz des Fetus sind die Zytotrophoblastzellen, welche die Grenzschicht zwischen Mutter und Kind bilden, essentiell. Sie exprimieren keine klassischen Major-Histokompatibilität-Komplexe II-Moleküle (MHC II) und verhindern damit eine Abstoßung der Leibesfrucht (Redman 1983). Zudem bilden sie das humane Leukozyten-Antigen G (HLA-G), welches die zytolytische Aktivität von natürlichen Killerzellen hemmt (Allan et al. 1999; Deniz et al. 1994).

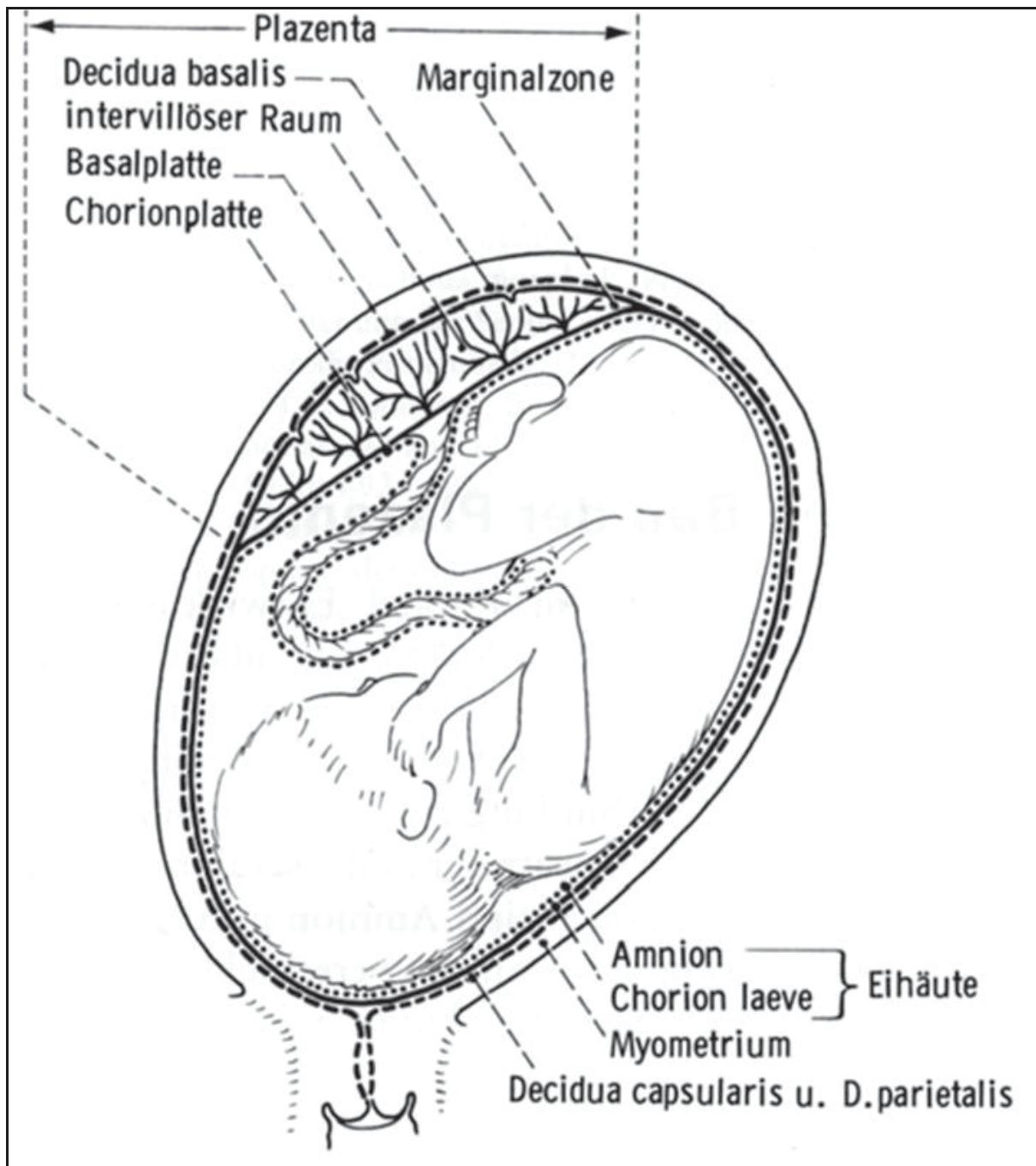


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Fetus, Nabelschnur und Fruchtsack (Schiebler und Kaufmann, 1981)

### 2.3.2. Entwicklung der Plazenta

Die Zygote durchläuft eine Reihe von Zellteilungen bis sie am dritten Tag nach der Befruchtung das 32-zellige Morulastadium erreicht. Die Morula bildet eine

Blastozystenhöhle aus, wodurch sie sich in eine äußere 53-zellige Zellmasse, aus der der Trophoblast hervorgeht, und in eine innere 5-zellige Zellmasse, aus der der Embryoblast entsteht, teilt. Mit Entstehen der Blastozyste trennt sich die Zygote von der Zona pellucida und die Trophoblastzellen beginnen zwischen die Epithelzellen der Uterusschleimhaut einzudringen. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die Ausbildung der Plazenta (Aplin 2000). Die Nidation der Blastozyste wird innerhalb des Endometriums durch Umwandlung der Lamina functionalis zur Dezidua basalis und durch Ausbildung eines subepithelialen Kapillarnetzes ausgehend von Spiralarterien gewährleistet. Im Verlauf der zweiten Woche kommt es zur Implantation der Blastozyste. Der Trophoblast bildet eine innere, aktiv proliferierende Schicht, den Zytotrophoblasten, und eine äußere vielkernige Schicht, den Syncytiotrophoblasten (Syncytium). Im Syncytiotrophoblasten bilden sich Lakunen aus, in die aus arrodierten mütterlichen Gefäßen Blut einströmt. Ein uteroplazentarer Kreislauf entsteht. Zu Beginn der dritten Woche besitzt der Trophoblast zahlreiche Primärzotten, die jeweils aus einem Zytotrophoblastenkern und einer Schicht aus Syncytium bestehen. In der weiteren Entwicklung bilden sich die Sekundärzotten aus, indem Mesodermzellen aus dem extraembryonalen parietalen Mesoderm in den Zottenkern eindringen. Am Ende der dritten Woche beginnen sich die Mesodermzellen zu differenzieren und bilden Blutzellen und Kapillaren. Mit dem Auftreten von Blutgefäßen werden die Sekundärzotten zu Tertiärzotten. Das Kapillarsystem der Zotten verbindet sich mit Gefäßen, die in der Chorionplatte und im Haftstiel entstehen. Der Haftstiel enthält zwei Umbilikalarterien, eine Umbilikalvene, die Allantois und Mesodermzellen. In der fünften Woche wird er durch das Amnionektoderm überzogen, wodurch sich der eigentliche Nabelstrang bildet. Das Bindegewebe des Nabelstrangs, die sogenannte Wharton-Sulze, bildet sich aus dem primären Mesoderm. Als Chorion wird der vom extraembryonalen Mesoderm bedeckte Trophoblast bezeichnet. Zusammen mit dem Amnion, welches sich dem Chorion durch zunehmende Fruchtwasserbildung in der Amnionhöhle unter Verdrängung der extraembryonalen Leibeshöhle anlegt, bildet es die Eihäute aus.

In der vierten Entwicklungswoche dringen Zytotrophoblastzellen aus den Zotten zwischen Syncytium und maternalem Endometrium und umgeben schließlich die ganze Frucht als äußere Zytotrophoblasthülle. Zotten, die die Chorionplatte mit der

Basalplatte verbinden, sogenannte Stammzotten, ermöglichen eine feste Anbindung der Frucht und seiner Fruchthüllen an das Endometrium.

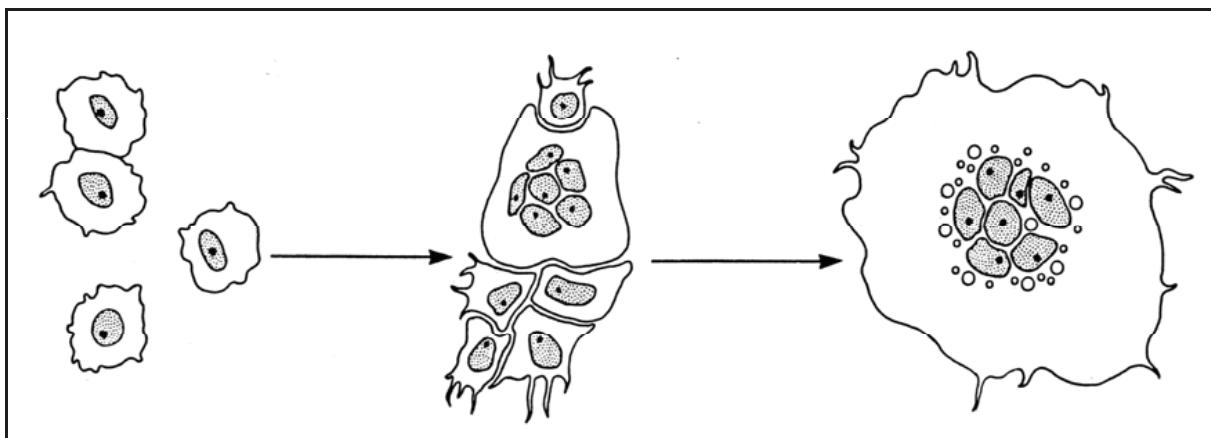
In den ersten Entwicklungswochen finden sich am gesamten Chorion Zotten. Später bilden sich diese am abembryonalen Pol zurück (Chorion laeve), am embryonalen Pol wachsen sie weiter (Chorion frondosum).

In den folgenden Monaten sprossen aus den Zottenstämmen weitere Zotten in die umgebenden laktären Räume aus. Dabei verschwinden zu Beginn des vierten Monats deren äußere Begrenzung aus Zytotrophoblastzellen und ein Teil der Mesodermzellen, sodass die Grenzschicht zwischen fetalem und maternalem Blutkreislauf aus Synzytium und maternalen Endothelzellen besteht.

Zu Beginn des vierten Schwangerschaftsmonats besteht die Plazenta aus einem fetalen Anteil, der vom Chorion frondosum gebildet wird, und einem maternalen Anteil, der Dezidua basalis. In der Marginalzone vermischen sich Trophoblast- und Deziduazellen.

Die Dezidua basalis bildet im vierten und fünften Schwangerschaftsmonat Plazentasepten aus, wodurch die Plazenta in mehrere Areale bzw. Kotyledonen unterteilt wird.

Das Größenwachstum der Plazenta entsteht durch die Verzweigung der bestehenden Zotten und entspricht circa 25 bis 30 Prozent der inneren Oberfläche des Uterus.



**Abbildung 2: Modell der Synzytiotrophoblastformation in vitro (Kliman et al. 1986)**

Entwicklung einzelner Trophoblastzellen über Zellaggregate zu Synzytiotrophoblasten.

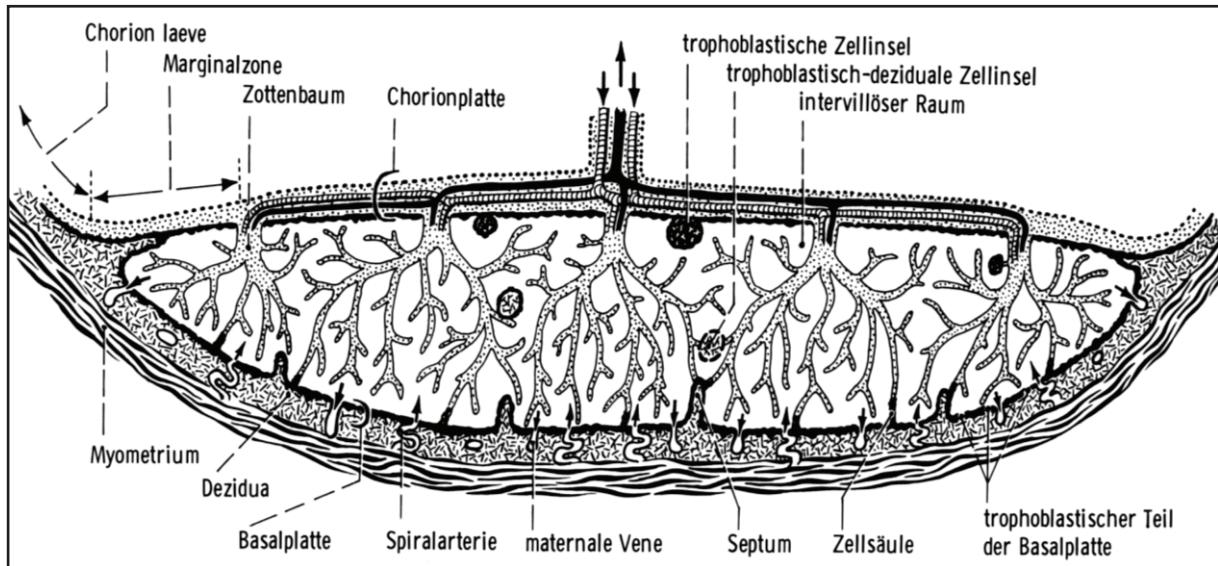
### 2.3.3. Aufbau der Plazenta

Die reife Plazenta wird durch eine diskoidale Form, einen Durchmesser von etwa 20 cm, einer Dicke von etwa 3 cm und einem durchschnittlichen Gewicht von 500 g charakterisiert.

Die dezentrale, maternale Seite wird durch die Basalplatte repräsentiert. Ihre Oberfläche entsteht durch die Trennung der Plazenta vom Uterus während der Geburt. Sie besteht aus fetalen extravillösen Trophoblastzellen, extrazellulärer Matrix, Fibrinoid, Blutgerinnseln und aus Zellen der Dezidua wie dezentrale Stromazellen, Natürliche Killerzellen, Makrophagen und andere Immunzellen. Die Basalplatte ist in zehn bis 40 leicht erhabene Areale, die sogenannten Kotyledonen, geteilt. Die Furchen zwischen den Kotyledonen entsprechen den Plazentasepten. Jeder Kotyledon (maternaler Lobus) enthält ein bis vier Zottenbäume (fetale Lobi). Die reife Plazenta besitzt somit 60 bis 70 Zottenbäume mit Ursprung in der Chorionplatte. Die Zottenbäume sind Ergebnis von baumartigen Aufzweigungen der plazentaren Arterien bis hin zu kleinsten Arteriolen und deren Vereinigungen.

Die fetale Oberfläche der Plazenta besteht aus der Chorionplatte, die wiederum von Amnion bedeckt ist. Das Amnion ist nur schwach an das Chorion gebunden und kann leicht von der geborenen Plazenta getrennt werden. Makroskopisch sind die im Chorion verlaufenden großen fetalen Gefäße erkennbar. Diese stehen mit den zwei Umbilikalarterien ( $\varnothing$  ca. 3 mm) und der Umbilikalvene ( $\varnothing$  ca. 5,5 – 6 mm) in Verbindung.

Die Nabelschnur inseriert in der Regel leicht exzentrisch in die Chorionplatte. Ihre Länge beträgt etwa 50 cm, ihr Durchmesser etwa 12 mm. Als besonderes Kennzeichen sind ihre bis zu 40 spiralförmigen Windungen zu erwähnen.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der reifen menschlichen Plazenta im Schnitt (modifiziert nach Schiebler und Kaufmann 1981)**

### 2.3.4. Trophoblast

Innerhalb des Trophoblasten werden zwei verschiedene Populationen unterschieden. Die Trophoblastzellen, die die Plazenta verlassen und sich im Uterusgewebe befinden um den maternalen Blutfluss in Richtung Plazenta zu optimieren, werden als extravillöse Trophoblastzellen bezeichnet. Die andere Trophoblastzellpopulation, die die Oberfläche der Plazentazotten bildet, wird als villöser Trophoblast bezeichnet (Huppertz, Borges 2008).

#### 2.3.4.1 Villöser Trophoblast

Der villöse Trophoblast besteht aus zwei Schichten, eine Schicht aus mononukleären Zytotrophoblastzellen, den sogenannten Langhans-Zellen, eine weitere aus den mit ihnen in Kontakt stehenden mehrkernigen Synzytiotrophoblastzellen.

Der Synzytiotrophoblast bildet kontinuierlich die äußere Oberfläche der Plazentazotten und steht somit direkt mit dem maternalem Blut in Kontakt. Es handelt sich um ein hochdifferenziertes, metabolisch aktives Gewebe, welches für den Transport von Sauerstoff, Nährstoffen und Abfallprodukten, für die Immuntoleranz, sowie für die Synthese von für die Fetalentwicklung notwendigen Hormonen verantwortlich ist

(Dudenhausen 2003), (Huppertz, Borges 2008). Das Zytoplasma des Synzytiums enthält reichlich Organellen, Ribosomen, Pinozytosevesikel und dense bodies. In den Synzytiotrophoblasten inkorporierte Zytotrophoblastzellkerne verdichten sich und stellen schließlich annuläre Chromatinaggregate dar, die in so genannten Synzytiatknoten von der Membran des Synzytium in den maternalen Blutkreislauf abgeschnürt werden (Mayhew et al. 1999). Die gesamte Oberfläche des Synzytiums ist durch die Ausstattung mit Mikrovilli bis zu siebenfach vergrößert. Unter der äußeren Synzytialmembran befindet sich ein dichtes Netzwerk aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Mikrofilamenten. Durch ständige Proliferation der Stammzellen des Zytotrophoblasten während der Schwangerschaft, kommt es zu einem Ansteigen der Zytotrophoblastzellzahl. Dadurch ist es der villösen Zytotrophoblastzellschicht möglich die Synzytiotrophoblastzellschicht, welche keine Fähigkeit zur Proliferation besitzt, aufrecht zu erhalten (Huppertz 2008). Tochterzellen der Langhans-Zellen fusionieren mit dem Synzytium. Die Mechanismen, die zur Fusion führen, sind teilweise bekannt. Nach Lyden et al. ist die Umverteilung des Phospholipids Phosphatidylserin von der inneren Seite der Zellmembran auf die äußere Seite Grundvoraussetzung für Synzytiumfusionen (Lyden et al. 1993). Des Weiteren sind Voraussetzung für die Fusion von Synzytiotrophoblast und Zytotrophoblast das Vorhandensein von bivalenten Kationen wie Magnesium und Calcium (Leventis et al. 1986) und Proteaseaktivität der Caspase 8 (Black et al. 2004).

Villöse Zytotrophoblastzellen sind ultrastrukturell weniger differenziert als Synzytiotrophoblasten. Sie synthetisieren und speichern regulatorische Peptide, Hormone, Glykoproteine und Zytokine (Dudenhausen 2003). Sie stehen mit ihrer basalen Oberfläche mit der Grundmembran und mit ihrer apikalen Oberfläche mit dem Synzytiotrophoblasten in Kontakt. Sobald sie diesen Kontakt verlieren, wandeln sie sich in extravillöse Trophoblastzellen.

### 2.3.4.2. Extravillöser Trophoblast

Der extravillöse Trophoblast stellt eine heterogene Population dar. Alle Trophoblastzellen stammen vom primären Zytotrophoblast der Blastozyste ab. Die extravillösen Trophoblastzellen differenzieren sich entsprechend ihrer Lage. Somit unterteilt sich der extravillöse Zytotrophoblast in folgende Typen: Zytotrophoblast

der Zellkolumnen und des Trophoblastenschildes, interstitieller Trophoblast, endovaskulärer Trophoblast, Trophoblast des Chorion laeve und deportierter Trophoblast. Ersterer sezerniert große Mengen extrazellulärer Matrix. Der endovaskuläre Trophoblast befindet sich in den Spiralarterien und in den Gefäßwänden. Der deportierte Trophoblast besteht aus multinukleären Synzytiotrophoblastzellen, diploiden Trophoblastzellen oder kernlosen Fragmenten, die durch villöse Abbrüche in den mütterlichen Blutkreislauf gelangen (Dudenhausen 2003).

#### **2.3.4.3. Hormonproduktion des Trophoblasten**

Die Synthese von Proteohormonen durch den Trophoblasten beginnt um den Zeitpunkt der Nidation.

HCG wird mit Entwicklung des Synzytiotrophoblasten zunehmend synthetisiert. Es ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 38.000 D und baut sich aus zwei verschiedenen Peptidketten, die nicht kovalent miteinander verbunden sind, auf. Die unspezifische  $\alpha$ -Untereinheit mit 82 Aminosäuren ist identisch mit Untereinheiten von FSH, LH und TSH. Die  $\beta$ -Untereinheit mit 145 Aminosäuren ist für die Hormonspezifität verantwortlich. HCG ähnelt dem hypophysären LH in seiner biologischen Aktivität. Es bindet an den LH-Rezeptor des Corpus luteum, wodurch es die Progesteronsekretion stimuliert, die Corpus-luteum-Zellen aber wiederum hCG-refraktär werden. Die daraus resultierende verminderte luteale Progesteronsynthese führt zur verstärkten plazentaren Progesteronsynthese. Diese Folgekette wird auch als luteoplazentarer Shift bezeichnet. Beim männlichen Feten fällt der Beginn der testikulären Testosteronbildung mit dem Maximum der hCG-Ausschüttung in der achten bis zehnten Entwicklungswoche zusammen. HCG stimuliert die Leydig-Zellen des fetalen Hodens und reguliert somit die Testosteronproduktion. Weiterhin stimuliert hCG die Nebennierenrinde, hemmt die Prostaglandinsynthese ( $\text{PGF}_2\alpha$ ) im Endometrium und hat thyreotrope Wirkung (Dudenhausen 2003).

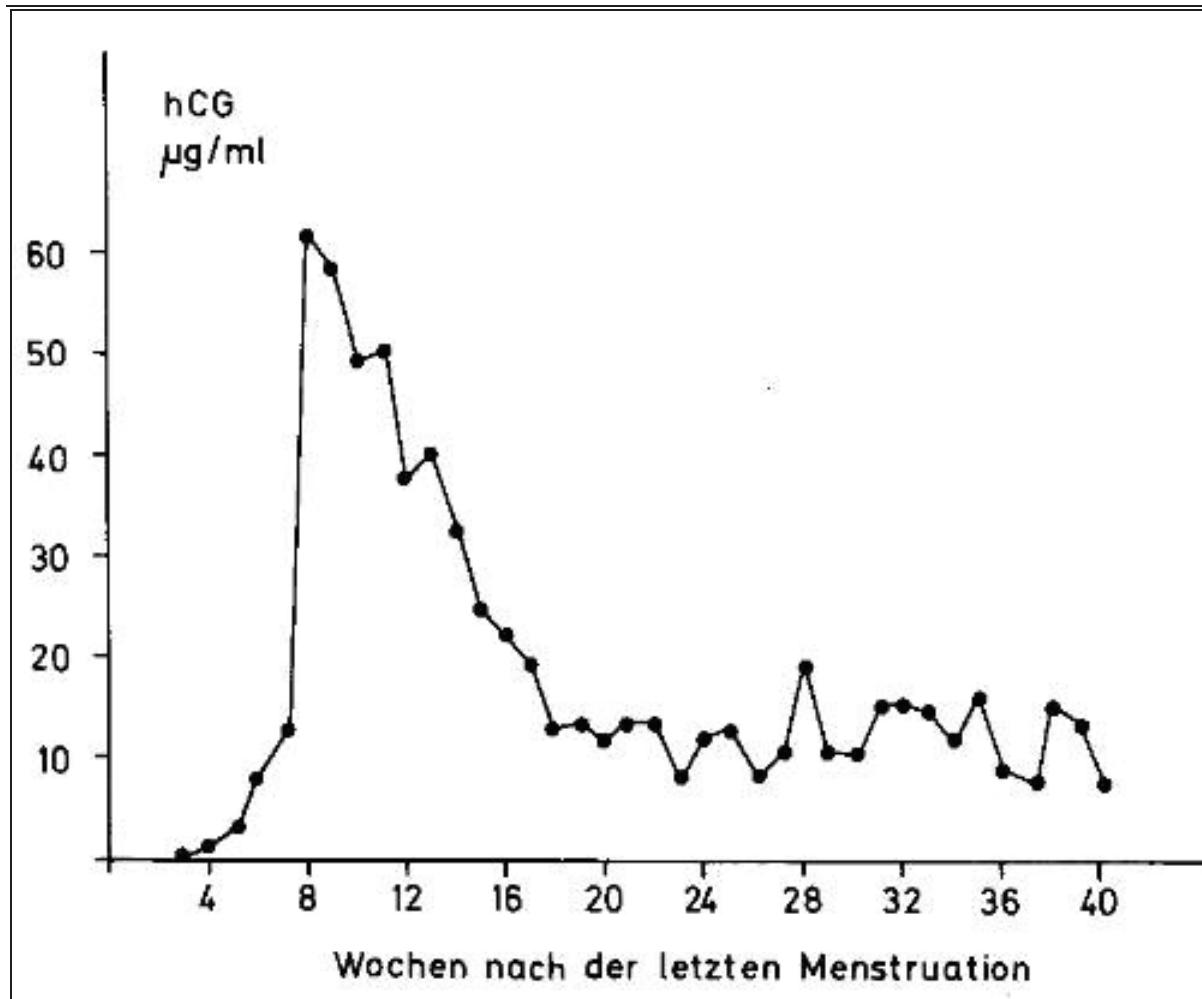
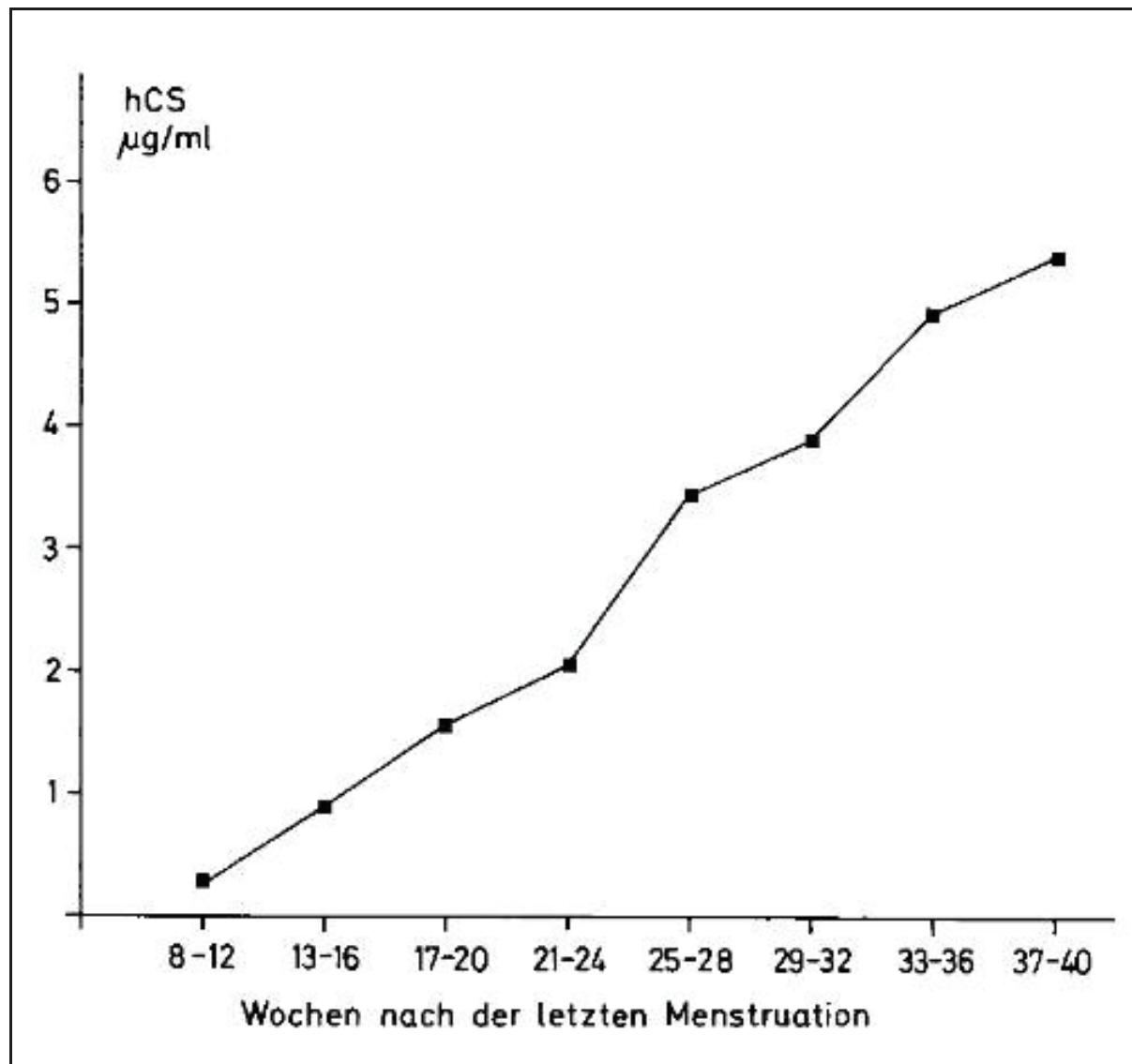


Abbildung 4: Mittelwerte der hCG-Plasmakonzentrationen im Verlauf der normalen Schwangerschaft. Methode: Radioimmunoassay. (Braunstein et al. 1976)

Humanes Plazentalaktogen (hPL) wird vom Syncytium des Trophoblasten synthetisiert und besitzt Prolactin- und Somatotropin-ähnliche Wirkung, wird deshalb auch humanes Choriosomatotropin (hCS) genannt. Sein Molekulargewicht beträgt 22.000 D. Es dient dem Erhalt des Corpus luteum und gilt als Parameter der Plazentafunktion, indem es weitgehend den Zuwachs der Masse des Syncytiotrophoblasten reflektiert (Kaplan et al. 1976). Weiterhin erhöht hPL die mütterliche Insulinresistenz.



**Abbildung 5: Mittelwerte der hPL-Serumkonzentrationen im Verlauf der normalen Schwangerschaft. Methode: Radioimmunoassay. (Kaplan et al. 1976)**

Die plazentare Östrogensynthese führt zur Bildung von Östradiol- $17\beta$ , Östron und Östriol. Voraussetzung für die Östrogensynthese ist das Vorhandensein von Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEAS), welches zunächst in der maternalen Nebenniere, später zum großen Teil in der fetalen Nebenniere gebildet wird (Martius et al. 1996). DHEAS wird in der fetalen Leber zu 16-OH-DHEAS hydroxyliert. In der Plazenta wird dieses über einen Aromatase-Enzym-Komplex zu Östriol metabolisiert. Östradiol und Östron werden zu etwa gleichen Teil aus maternalen und fetalen DHEAS synthetisiert, Östriol dagegen zu über 90 Prozent aus fetalem DHEAS (Siiteri, MacDonald 1966). Die gebildeten Östrogene führen zur Proliferati-

on der Endometriumzellen, steigern den uteroplazentaren Blutfluss und sind zusammen mit Progesteron verantwortlich für die Entwicklung der Brustdrüsen. Durch das Zusammenwirken von biochemischen Leistungen der maternalen, plazentaren und fetalen Anteile bei der Östrogensynthese stellen diese ein Maß für die uteroplazentare Einheit dar.

In der sechsten bis achten Schwangerschaftswoche erhöht sich die plazentare Progesteronproduktion aufgrund der abnehmenden lutealen Progesteronsynthese. Die plazentare Progesteronkonzentration nimmt bis zum Partus kontinuierlich zu (Dawood 1976). In der Plazenta wird in den Mitochondrien Cholesterol zu Pregnenolon über die CYP11A1 metabolisiert. Pregnenolon wird weiterhin über die 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu Progesteron konvertiert. Plazentazellen können nur limitiert Cholesterol bilden, sodass LDL (Winkel et al. 1980) und VLDL (Wittmaack et al. 1995) als Substrate für die Progesteronsynthese genutzt werden. LDL- und VLDL-Plasmakonzentrationen nehmen im zweiten und dritten Trimester der Schwangerschaft zu, sodass die zunehmende Cholesterollnachfrage gewährleistet wird (Knopp et al. 1986). Progesteron unterstützt die Ruhigstellung der Uterusmuskulatur zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, wirkt den weheninduzierenden Effekten durch Östrogene, Prostaglandine und Oxytocin entgegen und supprimiert das maternale Immunsystem gegen fetale Antigene (Pepe, Albrecht 1995). Bekannt ist ein klarer Zusammenhang zwischen maternalen Progesteronkonzentrationen und Abortwahrscheinlichkeit. So berichteten Hahlin et al. über eine Assoziation von Spontanaborten mit maternen Serumkonzentrationen unter einer kritischen Schwelle von 30 nM (Hahlin et al. 1990).

### 2.3.5. Stofftransport

Der Stoffaustausch an der materno-fetalen Grenzschicht wird über Diffusion, Filtration und aktiven Transport gewährleistet.

Der plazentare Gasaustausch vollzieht sich über freie Diffusion von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> in Abhängigkeit vom Druckgradienten. Dabei wird der O<sub>2</sub>-Druckgradient durch die hohe fetale Hämoglobinkonzentration von 17 g Prozent, die hohe Affinität des fetalen Hämoglobins (HbF) für Sauerstoff und den Bohr-Effekt gewährleistet. Der Bohr-

Effekt besteht in einer erhöhten O<sub>2</sub>-Affinität des HbF und verminderter O<sub>2</sub>-Affinität des maternalen Hb bei CO<sub>2</sub>-Akkumulation.

Steroidhormone und Stoffe mit einer Molekülgröße bis 500 D wie Harnstoff und Wasser passieren die Plazentaschranke durch einfache Diffusion.

Aminosäuren werden über drei separate Systeme aktiv transportiert. Dabei sind ein Alanin-bevorzugtes, ein Leucin-bevorzugtes und ein Alanin-Serin-bevorzugtes System zu unterscheiden (Dudenhausen 2003).

Spurenelemente wie Kupfer, Chrom und Zink gelangen in den fetalen Blutkreislauf über aktiven Transport.

80 Prozent der fetalen Fettsäuren werden vom Feten synthetisiert. Weitere 20 Prozent erhält der Fetus über die Plazenta von der Mutter. Dabei passieren langkettige Fettsäuren die Plazenta via passive Diffusion oder über Transport- und Bindungsproteine (Duttaroy 2009). HPL verhindert den plazentaren Transfer von Fettsäuren, um den Eigenbedarf der Mutter an freien Fettsäuren zu gewährleisten (Dudenhausen 2003).

Der Glucosetransport erfolgt über erleichterte Diffusion mittels Glucosetransporter (GLUT). Die Isoform GLUT-1 ist hauptverantwortlich für den Glucosetransport im Synzytiotrophoblasten (Jansson et al. 1993). Die insulinabhängigen Isoformen GLUT-4 und GLUT-12, sowie die insulinunabhängige Isoform GLUT-3 werden nur in der Frühschwangerschaft im Synzytium exprimiert (Gude et al. 2003; Ericsson et al. 2005). In der Spätschwangerschaft ist die GLUT-4-Expression auf intravillöse Stromazellen (Xing et al. 1998), die GLUT-3-Expression auf Endothelzellen der fetalen Gefäße (Hauguel-de Mouzon et al. 1997) begrenzt.

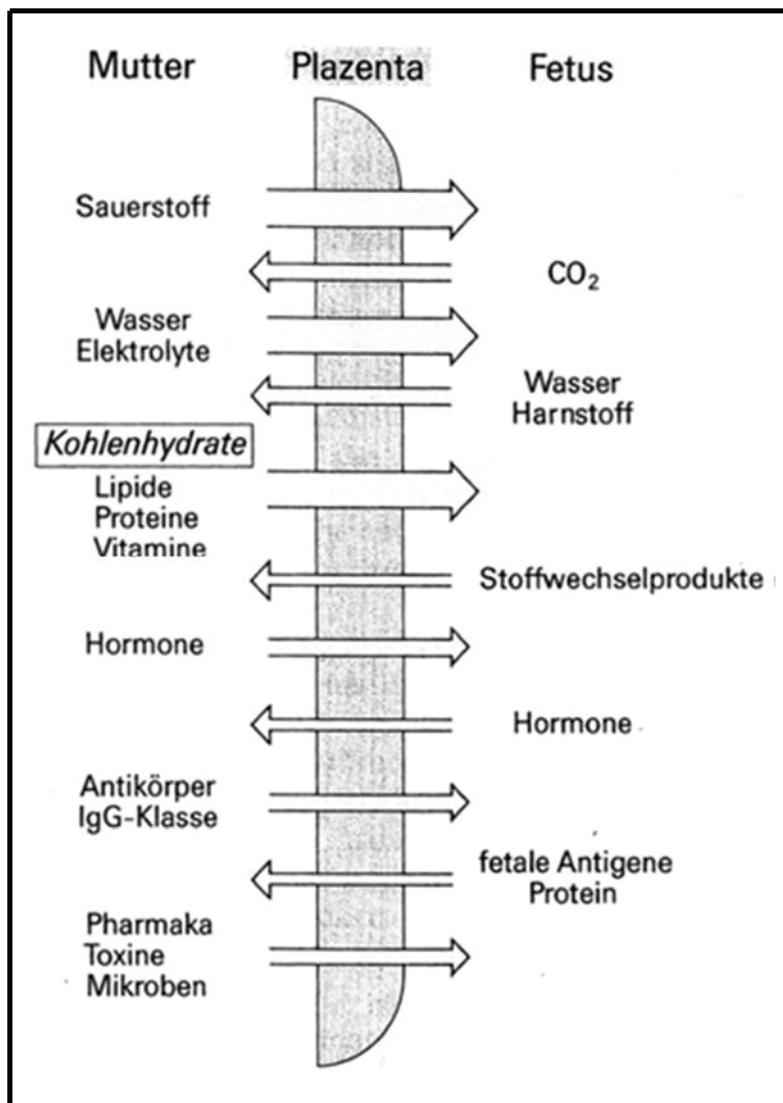


Abbildung 6: Stoffaustausch über die Plazenta (Dudenhausen 2003)

## 2.4. Fragestellung

Wie schon beschrieben kann es unter einem unbehandelten Diabetes mellitus während der Schwangerschaft zu Fetopathien und Aborten kommen.

Darüber hinaus wird vermutet, dass hyperglykämische Entgleisungen Einfluss auf die Plazentafunktion besitzen. Auf zellulärer Ebene sind Zytotrophoblastzellen als erste fetale Berührungszone mit maternalen Hyperglykämien anzusehen. Es ist anzunehmen, dass schon auf dieser Ebene hohe Glucosekonzentrationen auf den Zellstoffwechsel wirken.

Funktionelle Parameter für die Plazentaleistung sind die Hormone Progesteron,  $\beta$ -hCG und Östradiol. Uns stellt sich die Frage, ob es anhand einer experimentellen

Studie möglich ist, die gennanten funktionellen Parameter durch verschiedene hohe Glucosekonzentrationen zu beeinflussen. Insbesondere wäre es bemerkenswert, wenn ansteigende Glucosekonzentrationen die Plazentafunktion beeinträchtigen würden. Im Detail sind folgende Untersuchungen vorgesehen:

- Bestimmung der Parameter Progesteron,  $\beta$ -hCG, Östradiol in primären Trophoblastzellkulturen zum Rückschluss auf die Plazentafunktion
- Zugabe unterschiedlich hoher Glucosekonzentrationen als Einflussgröße auf die Hormonexpression
- Durchführung eines Zytotoxizitätstest
- Lichtmikroskopische Dokumentation der Trophoblastentwicklung

### 2.5. Hypothesen

1. Hohe Glucosekonzentrationen beeinflussen die Hormonexpression humaner Trophoblastzellen.
2. Hohe Glucosekonzentrationen führen zu einer verminderten Progesteronexpression humaner Trophoblastzellen.
3. Hohe Glucosekonzentrationen führen zu einer verminderten  $\beta$ -hCG-Expression humaner Trophoblastzellen.
4. Hohe Glucosekonzentrationen führen zu einer verminderten Östradiolexpression humaner Trophoblastzellen.
5. Hohe Glucosekonzentrationen führen zu einer erhöhten Zytotoxizität humaner Trophoblastzellen.
6. Sowohl unter normoglykämischen als auch unter hyperglykämischen Glucosekonzentrationen kommt es zur Synzytiumbildung humaner Trophoblastzellen in der primären Zellkultur.

### 2.6. Klinischer Teil der Studie

Das Verwenden humaner Plazenten und das experimentelle Arbeiten mit primären Trophoblastzellkulturen erfordert sowohl das Einverständnis der Ethikkommission

als auch Einverständnis und ausführliche Aufklärung der betroffenen Patientinnen, die ihre Plazenten zu unseren Forschungszwecken zur Verfügung stellen.

Vor Beginn der experimentellen Arbeiten wurde hierzu das Forschungsprojekt der Ethikkommission der Universität Rostock unter Vorsitz von Prof. Dr. R. Wegener vorgestellt und eine Zustimmung dieser eingeholt.

Alle Frauen, die ihre Plazenten zur Verfügung gestellt haben, waren Patientinnen in der Universitätsfrauenklinik Rostock im Zeitraum von April 2008 bis März 2009.

Wie unter 3.2. erläutert wurden diese bestimmten Auswahlkriterien unterzogen.

Wiesen sie folgende Kriterien nicht auf, so wurden sie bei Einwilligung in die Studie mit einbezogen: Hypertonus, schwangerschaftsinduzierte Hypertonie, Präeklampsie, Eklampsie, Diabetes mellitus, Gestationsdiabetes, Harnwegsinfektionen, genitale Infektionen, Plazentainsuffizienz, Hydramnion, Adipositas (BMI > 30).

Die Patientinnen wurden über die Studie und den Verwendungszweck ihrer Plazenten aufgeklärt. Dabei wurde ihnen ein Informationsblatt ausgehändigt und eine schriftliche Einwilligung eingeholt. Die jeweiligen Formblätter der Patientinnenaufklärung und –einwilligung sind dem Anhang zugefügt.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Modellentwicklung

Als Kulturmedium für humane Trophoblastzellen eignet sich DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), angereichert mit 10 Prozent FKS (fetales Kälberserum), 2,0 ml Penicillin/Streptomycin und 2,5 ml Amphotericin B auf einen Liter DMEM. Dabei sind verschiedene Glucosekonzentrationen zu unterscheiden. Für die Versuche werden DMEM high glucose mit 4,5 g/l (25 mmol/l) Glucose und DMEM low glucose mit 1 g/l (5,56 mmol/l) Glucose verwendet. In der ersten Versuchsreihe à fünf Plazenten kommt ausschließlich DMEM high glucose zur Anwendung, in der zweiten Versuchsreihe à vier Plazenten ausschließlich DMEM low glucose.

Zusätzlich soll als variabler Faktor die Glucosekonzentration innerhalb eines Trophoblastzellansatzes, das heißt zwischen den Trophoblastzellkulturen, die aus derselben Plazenta gewonnen werden, verändert werden. Dafür wird DMEM mit zehn prozentiger Glucoselösung (600 mmol/l) angereichert. Fünf unterschiedliche DMEM-Lösungen werden angesetzt, wobei der Eigengehalt an Glucose im DMEM vernachlässigt wird: DMEM ohne Glucose-Zusatz (0 mmol/l Glucose) als Kontrolle, DMEM mit 5 mmol/l Glucose, DMEM mit 10 mmol/l Glucose, DMEM mit 25 mmol/l Glucose und DMEM mit 50 mmol/l Glucose.

Am ersten Tag werden die gewonnenen Trophoblastzellen in DMEM suspendiert und jeweils 3 ml der Zellsuspension in je ein well einer 6 well-Platte gegeben. Zu diesem Zeitpunkt enthält jedes well die gleiche Glucosekonzentration. Unmittelbar danach werden jeweils 300 µl der unterschiedlichen Glucose-DMEM-Lösungen zu je einem well gegeben, sodass fünf wells unterschiedlicher Glucosekonzentration vorliegen. Dieser Zeitpunkt gilt als Stunde Null.

Die Zellen werden in einem Brutschrank (37 °C; 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert.

Nach 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden werden von jedem well 1 ml entnommen. Davon werden 500 µl zur Bestimmung der Glucose- und Hormonkonzentration (Progesteron, β-hCG und Östradiol) verwendet, die weiteren

500 ml werden kryokonserviert, um eventuelle Nachbestimmungen vornehmen zu können. Die fünf wells werden mit je 1 ml ihrer entsprechenden Glucose-DMEM-Lösung resuspendiert.

Es zeigte sich nach einigen Versuchen, dass die Hormonkonzentrationen innerhalb der wells mit 0 mmol/l, 5 mmol/l und 10 mmol/l Glucosezusatz minimale bis keine Unterschiede aufweisen. Aus diesem Grund und auch aus finanzieller Sicht, wurde der Versuch auf drei wells mit 0 mmol/l, 25 mmol/l und 50 mmol/l Glucosezusatz reduziert.

Die Trophoblastzellkonzentration wurde in den ersten Versuchen auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml festgelegt (Jensen et al. 2009). Die hohe Zellmasse und die zunehmende Anzahl absterbender Zellen über den Versuchsablauf führten mikroskopisch betrachtet zur Behinderung der Synzytiumbildung der Trophoblastzellen. Um die Voraussetzungen der Synzytiotrophoblastbildung zu verbessern, wurde die Trophoblastzellkonzentration in den folgenden Ansätzen auf 500.000 bis 750.000 Zellen/ml reduziert.

Nach mehreren Trophoblastzellansätzen, die Kontaminationen mit Pilzen oder Bakterien aufwiesen, wurden ausschließlich Plazenten von Sectiones verwendet, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren. Daraufhin zeigten sich nur noch vereinzelt Verunreinigungen der Trophoblastzellkulturen.

Zum Ausschluss einer zytotoxischen Wirkung von Glucose auf die Trophoblastzellen wird nach 120 Stunden ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Dafür ist ein zusätzliches well notwendig, das wie das Kontroll-well mit 0 mmol/l Glucosezusatz geführt wird. Dieses well dient nach 120 Stunden als Positivkontrolle.

Zur Entwicklungsbeobachtung werden die Trophoblastzellkulturen ab Stunde Null alle 24 Stunden bis Stunde 96 mit einer Fotokamera (AxioCam MRc; Zeiss) dokumentiert.

#### 3.2. Ein- und Ausschlusskriterien

Voraussetzung der Untersuchung humaner Trophoblastzellen und deren Reaktion auf unterschiedlich hohe Glucosekonzentrationen ist eine voll funktionsfähige, nicht vorgeschädigte Plazenta. Damit soll sichergestellt werden, dass nur die in-vitro-Bedingungen Einfluss auf die Funktion der Trophoblastzellen nehmen und diese nicht schon in vivo durch vorherige Anpassungsvorgänge der Trophoblastzellen an hyperglykämische oder sogar hypoxische Zustände modifiziert ist. Demnach liegt ein besonderer Aspekt der Auswahl der zu verwendenden Plazenten in der Pathologie der Plazenta und Gesundheit der Patientin.

Nicht nur Patientinnen mit Diabetes mellitus, Hypertonus und vaginalen/genitalen Infektionen sollen ausgeschlossen werden, sondern auch diejenigen, die ein erhöhtes Risiko einen Gestationsdiabetes zu entwickeln, aufweisen.

Es ergeben sich folgende Ausschlusskriterien: Hypertonus, schwangerschaftsinduzierter Hypertonus, Präeklampsie, Eklampsie, Diabetes mellitus, Gestationsdiabetes, Harnwegsinfektionen, genitale Infektionen, Plazentainsuffizienz, Hydramnion, Adipositas (BMI > 30).

#### 3.3. Trophoblastzellkultur

##### 3.3.1. Gewinnung von Trophoblastzellen

Die Isolierung der Trophoblastzellen erfolgt nach den Methoden von Kliman et al. (Kliman et al. 1986), modifiziert von Jeschke et al. (1996; 2002). Dabei wird die Plazenta grob präpariert und ein Trypsin-DNAse-Verdau mit einer Percoll-Gradientenzentrifugation kombiniert.

#### Aufbewahrung und Transport der Plazenta

Ein Glaszylinder mit einem Liter 0,9-prozentiger steriler NaCl-Lösung, 10 ml Heparin-Natrium (250.000 IE/ml), 10 ml Penicillin/Streptomycin (100 x), Penicillin G 1 Mega, Metronidazol 50 mg in 100 ml Infusionslösung, 10 ml Amphotericin B (250 µg/ml) dient als Aufbewahrungs- und Transportmittel der frisch entwickelten

Plazenta. Dabei kann diese sowohl von Spontangeburten als auch Sectiones stammen.

#### Präparation

Das sterile Präparieren der Plazenta, als auch alle folgenden Schritte erfolgen unter einer Vertikalstrombank. Es werden mehrere Kotyledonen von der maternalen Seite her vom fibrösen Untergrund mit einer Schere abgetrennt und in 0,9-prozentiger steriler NaCl-Lösung gespült. In einer Petrischale wird die Dezidua mit einer Skalpell-Klinge von der Oberfläche der Gewebsstücke abgetrennt und Blutgefäße beziehungsweise Bindegewebsteile entfernt. Insgesamt sollten etwa 50 ml Gewebe für die Trypsinverdauung gewonnen werden.

#### Trypsinverdauungsschritte (TVS)

**TVS 1a:** 142,4 mg Trypsin und 5,0 mg DNase I werden in 112,5 ml HBSS-Hepes-Puffer gelöst und zusammen mit 50 ml des präparierten Gewebes in eine 500 ml Glasflasche gegeben. Dieser Ansatz wird für zehn Minuten unter Drehen (Drehvorrichtung; Heraeus Instruments) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

**TVS 1b:** Weitere 5,0 mg DNase werden zum Ansatz hinzugegeben. Dieser wird für weitere zehn Minuten unter Drehen im Brutschrank inkubiert. Nach dem Sedimentieren des Zellgewebes werden 2 x 35,0 ml des Gewebeüberstandes abpipettiert und durch sterile Gaze (Porengröße 10 µm) in je ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (ZR) filtriert. Zum Abstoppen des enzymatischen Verdauungsvorgangs werden jeweils 3,25 ml steriles NBCS (Neonatales Kälberserum) mit Hilfe einer 5 ml Spritze und einer langen Einmal-Injektions-Kanüle (0,8 x 120 mm, BRAUN) unterschichtet. Die Proben verbleiben bis zur weiteren Aufarbeitung im Kühlschrank bei 4 °C.

**TVS 2:** 94,95 mg Trypsin und 5,0 mg DNase I werden in 75,0 ml HBSS-Hepes-Puffer gelöst und in die 500 ml Glasflasche zu dem Gewebssediment gegeben. Das Gewebe wird nun für 20 Minuten unter Drehen im Brutschrank inkubiert. Es werden wiederholt 2 x 35,0 ml des Gewebeüberstandes abpipettiert, filtriert und in 50 ml ZR

gegeben. Die Abstopfung des Trypsin-Verdaus erfolgt wie in TVS 1b mit jeweils 3,25 ml NBCS. Die Proben werden zu den ersten beiden ZR in den Kühlschrank gestellt.

**TVS 3:** 75,0 mg Trypsin und 5,0 mg DNase I werden in 47,5 ml HBSS-Hepes-Puffer gelöst und in die 500 ml Flasche Glasflasche zu dem Gewebssediment gegeben. Das weitere Verfahren ist identisch mit TVS 2.

Die sechs Röhrchen werden für zehn Minuten bei 2500 U/min ohne Bremse und bei Raumtemperatur zentrifugiert (Hettich Universal 30RF). Die Überstände werden dekantiert, können wahlweise auch abpipettiert werden.

#### **Hämolyse der Erythrozyten**

Jeweils 20 ml steriles eisgekühltes Aqua bidest. wird zu den Zellsedimenten der sechs ZR gegeben. Fünf Minuten liegen die sechs ZR auf einer Dreh- und Schwenkvorrichtung (RM5, Assistent 348). Währenddessen kommt es zur osmotischen Lyse der Erythrozyten. Zur Wiederherstellung des physiologischen Salzgehaltes werden je 10 ml sterile 2,7-prozentige NaCl-Lösung in die ZR gegeben (Verhältnis 2:1). Anschließend kommt es zur Zentrifugation der ZR für fünf Minuten bei 2500 U/min (ohne Bremse, Raumtemperatur). Die Überstände werden dekantiert. Die Erythrozytenlyse muss so oft wiederholt werden bis das Pellet fast weiß ist (drei- bis viermal).

Von einer zuvor angefertigten HBSS-Hepes-DNAse I-Lösung (6,0 mg DNAse I in 60 ml HBSS-Hepes-Puffer) werden 8,75 ml zu jedem der sechs ZR gegeben. Die beiden Zellsuspensionen der einzelnen Verdauungsschritte (erstes und zweites, drittes und vierter, fünftes und sechstes ZR) werden vereinigt und für zehn Minuten bei 1800 U/min (ohne Bremse, Raumtemperatur) zentrifugiert. Die Überstände werden abpipettiert und die Pellets der drei Röhrchen mit insgesamt 3,0 ml HBSS-Hepes-Puffer resuspendiert und vereinigt.

### Percoll-Gradienten-Zentrifugation

Für die Zentrifuge wird ein 50 ml ZR verwendet. Das Einschichten beginnt mit 4 ml der Percoll-Lösung der geringsten Dichte (20-prozentig) mit Hilfe einer 5 ml Spritze und einer langen Einmal-Injektions-Kanüle. Dann wird jeweils die Lösung der nächsthöheren Dichte (30-prozentig, 40-prozentig, 50-prozentig, 60-prozentig, 70-prozentig) langsam unterschichtet.

Die Zellsuspension wird vorsichtig über den Percoll-Gradienten geschichtet.

Es folgt die Zentrifugation des Percoll-Gradienten für 20 Minuten bei 3000 U/min (ohne Bremse, Raumtemperatur).

Gemäß ihrer Dichte konzentrieren sich die unterschiedlichen Zelltypen in jenen Bereichen des Gradienten, die ihrer Dichte entsprechen. Trophoblastzellen befinden sich zwischen der dritten und vierten Bande, in einer Dichte von 1,048 bis 1,062 g/ml. Sie werden vorsichtig mit der Einmal-Injektions-Kanüle abgezogen.

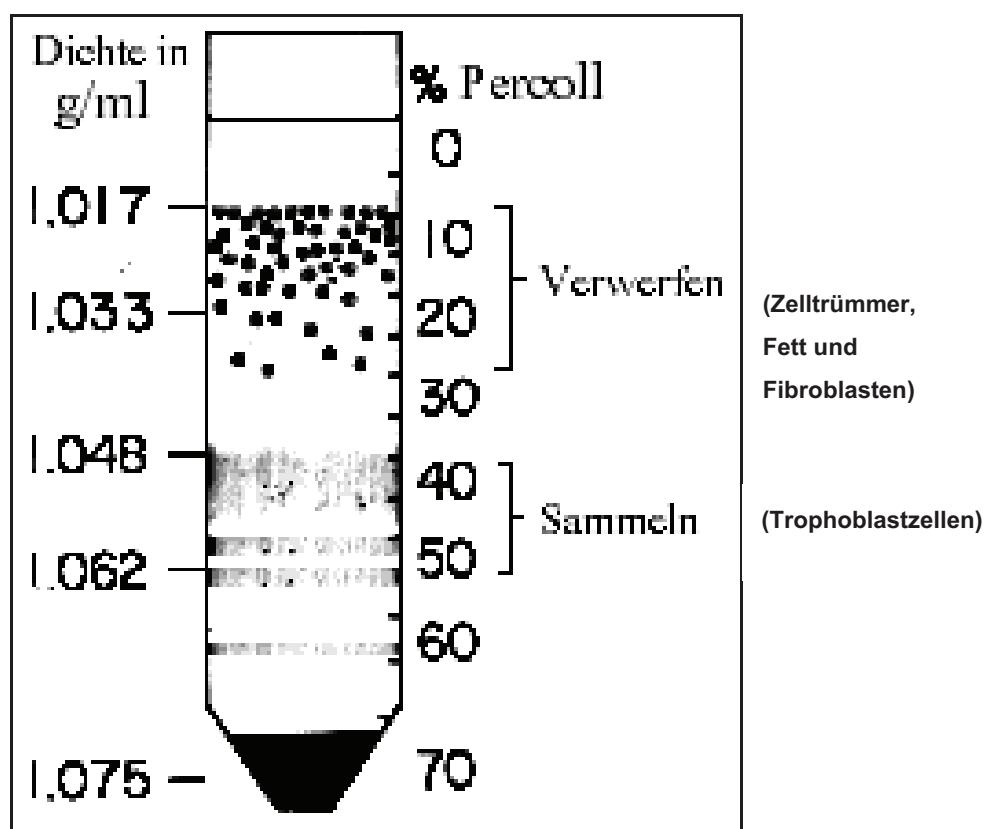


Abbildung 7: Bandenverteilung nach Percoll-Gradienten-Zentrifugation (modifiziert nach Kliman 1999)



**Abbildung 8: Percoll-Gradient nach Zentrifugation**

#### **Zellzählung und Ermittlung der Zellkonzentration**

Zur Zellzählung werden 20 µl der erhaltenen Zellsuspension, 20 µl Trypanblau und 360 µl DMEM in ein Eppendorfgefäß pipettiert, um eine Verhältnis von 1 : 20 zu erhalten. Trypanblau bindet an zytosolische Proteine, ist aber nicht membrangängig, sodass der Farbstoff nur in tote Zellen mit defekter Zellmembran eindringt und sie blau anfärbt. Bei der Verwendung einer Bürker-Zählkammer werden 25 kleine Quadrate ausgezählt. Die ermittelte Zellzahl entspricht  $X \times 10^4$  Zellen/ml x Verdünnung (1 : 20).

Werden beispielsweise in den ersten 25 Quadranten 16 Trophoblastzellen und in den weiteren 25 Quadranten 20 Trophoblastzellen gezählt, ergibt sich eine Summe von 36 Zellen und ein Mittelwert von 18 Zellen (X). Daraus ergibt sich folgende Gleichung:  $18 \times 10^4 \times 20 = 3.600.000 = 3,6$  Millionen.

Es befinden sich somit 3,6 Millionen Zellen/ml in der Zellsuspension.

Die Gesamtzahl hängt vom Volumen der Zellsuspension ab. Liegen 3 ml Zellsuspension vor, so ergibt sich dem obigen Beispiel nach eine Gesamtzahl von 10,8 Mio. Zellen.

Nach Bestimmung der Zellzahl wird die Zellsuspension von HBSS-Hepes-Puffer und Percoll-Lösung gereinigt, indem dieser ein etwa gleiches Volumen DMEM (angereichert mit 10 Prozent FKS, 2 ml Penicillin/Streptomycin, 2,5 ml Amphotericin B) hinzugefügt und anschließend für fünf Minuten bei 1000 U/min (ohne Bremse, Raumtemperatur) zentrifugiert wird.

Der Zellüberstand wird abpipettiert.

Abhängig von der gewonnenen Anzahl an Trophoblastzellen wird eine Zellkonzentration von 500.000 bis 750.000 Zellen/ml angestrebt. Für die Zellkultur sind 4 x 3 ml à 500.000 bzw. 750.000 Zellen/ml nötig, sodass sich ein Gesamtvolumen von mindestens 12 ml ergibt.

Wird das Zellpellett aus dem Beispiel nun mit 16,2 ml DMEM verdünnt, ergibt sich eine Zellkonzentration von 750.000 Zellen/ml.

#### **Ansatz der Zellkulturplatte**

Je 3 ml der Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von 500.000 Zellen/ml oder 750.000/ml werden in vier wells einer sechs well Platte gegeben. Zu diesem Zeitpunkt enthält jedes well die gleiche Glucosekonzentration. Unmittelbar danach werden jeweils 300 µl der unterschiedlichen Glucose-DMEM-Lösungen (0 mmol/l, 25 mmol/l, 50 mmol/l) zu drei wells gegeben, sodass drei wells unterschiedlicher Glucosekonzentration (0 mmol/L, 25 mmol/L, 50 mmol/L) vorliegen. Zum vierten well, das im Zytotoxizitätstest als Positivkontrolle dienen soll, werden 300 µl DMEM ohne Glucosezusatz gegeben. Dieses well entspricht in seiner Konzentration dem Kontroll-well mit 0 mmol/l Glucosezusatz. Dieser Zeitpunkt gilt als Stunde Null. Die Zellen werden in einem Brutschrank (37 °C; 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert.

#### 3.3.2. Zeitlicher Ablauf der Probenentnahme und Glucosezugabe

Nach 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden werden von jedem well 1 ml entnommen. Davon werden 500 ml zur Bestimmung der Konzentrationen an Glucose, Progesteron,  $\beta$ -hCG und Östradiol verwendet. Die weiteren 500 ml werden kryokonserviert, um eventuelle Nachbestimmungen vornehmen zu können. Die vier wells werden mit je 1 ml ihrer spezifischen Glucose-DMEM-Lösung (2 x 0 mmol/l, 1 x 25 mmol/l, 1 x 50 mmol/l) resuspendiert.

#### 3.3.3. Bestimmung der Glucose- und Hormonkonzentrationen

Die Bestimmung der Glucose- und Hormonkonzentrationen erfolgt im Medizinischen Labor Dr. Matić und Partner (Fachärzte für Laboratoriumsmedizin, Transfusionsmedizin und Mikrobiologie) im Klinikum Süd Rostock.

Die Glucosekonzentrationen werden fotometrisch nach der Glucose-Dehydrogenase-Methode mit dem Multi-Test-Analysensystem Olympus AU2700 ermittelt. Die Glucose-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von Glucose nach folgender Gleichung:



Die Menge des gebildeten NADH ist der Glucosekonzentration proportional.

Die Bestimmung der Hormonkonzentrationen erfolgt an den Access Immunoassay-Systemen (Beckman Coulter).

Der Access Progesterone-Assay ist ein Chemilumineszenz-Immunoassay mit paramagnetischen Partikeln. Eine Probe wird zusammen mit einem Antiserum vom Kaninchen gegen Progesteron, einem Progesteron-alkalische-Phosphatase-Konjugat sowie paramagnetischen Partikeln, die mit einem Ziege-anti-Kaninchenantikörper gekoppelt sind, in ein Reaktionsgefäß gegeben. Das Progesteron aus der Probe konkurriert mit dem Progesteron-alkalische-Phosphatase-

Konjugat um die Bindungsstellen des in limitierter Menge vorhandenen spezifischen Anti-Progesteronantikörpers. Antikörperkomplexe binden an den Antikörper an der Festphase und werden in einem Magnetfeld festgehalten. Ungebundene Stoffe werden durch Waschen entfernt. Lumi-Phos 530, ein chemilumineszentes Substrat, wird hinzugegeben. Die bei der Reaktion gebildete Lichtmenge ist der Progesteronkonzentration in der Probe umgekehrt proportional.

Der Access Estradiol-Assay ist ebenfalls ein Chemilumineszenz-Immunoassay mit paramagnetischen Partikeln. Eine Probe wird in ein Reaktionsgefäß mit paramagnetischen Partikeln (beschichtet mit einem Konjugat aus Ziege-anti-Kaninchen und Kaninchen-anti-Östradiol) und einer Proteinlösung mit Tris-Puffer gegeben. Nach 20 Minuten wird ein Konjugat aus Östradiol und alkalischer Phosphatase hinzugegeben. Das in der Probe vorhandene Östradiol konkurriert mit dem Östradiol-alkalische-Phosphatase-Konjugat um die Bindungsstellen des in begrenzter Menge vorhandenen Östradiol-spezifischen Kaninchenantikörpers. Die resultierenden Östradiol-Antikörperkomplexe verbinden sich mit dem partikelständigen Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper und werden in einem Magnetfeld festgehalten. Ungebundene Stoffe werden durch Waschen entfernt. Lumi-Phos 530 wird hinzugegeben. Die bei der Reaktion gebildete Lichtmenge ist der Östradiolkonzentration in der Probe umgekehrt proportional.

Der Access Total  $\beta$ hCG-Assay ist ein Chemilumineszenz-Immunoassay mit paramagnetischen Partikeln. Im Gegensatz zu dem Access Progesterone-Assay und dem Access Estradiol-Assay, die kompetitive Assays darstellen, handelt es sich beim Access Total  $\beta$ hCG-Assay um ein „Sandwich-Assay“. Eine Probe wird zusammen mit einem Kaninchen-anti- $\beta$ hCG-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase markiert ist, sowie mit paramagnetischen Partikeln, an die Komplexe aus Ziege-anti-Maus: Maus-anti- $\beta$ hCG monoklonalen Antikörpern gekoppelt sind, in ein Reaktionsgefäß gegeben. Das hCG/ $\beta$ hCG in der Probe bindet an die festphasenimmobilisierten anti- $\beta$ hCG-Antikörper. Der Kaninchen-anti- $\beta$ hCG-Antikörper reagiert mit anderen antigenen Determinanten am hCG/ $\beta$ hCG aus der Probe. Die an die Festphase gebundenen Stoffe werden in einem Magnetfeld gehalten, während die ungebundenen Stoffe durch Waschen entfernt werden. Lumi-Phos 530 wird hin-

zugegeben. Die bei der Reaktion gebildete Lichtmenge ist der  $\beta$ hCG-Konzentration in der Probe direkt proportional.

#### 3.3.4. Zellkulturdokumentation

Zur Stunde 0, 24, 48, 72 und 96 erfolgt lichtmikroskopisch (Axiovert 40, Zeiss) eine Mediumkontrolle und Verlaufsbeobachtung der Zellentwicklung. Diese werden mittels einer Fotokamera (AxioCam MRc; Zeiss) bei einer 32-fachen Vergrößerung dokumentiert.

#### 3.3.5. LDH – Zytotoxizitätstest

##### Prinzip

Die Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym mit Vorkommen in allen Zellen. Bei Schädigung der Zellmembran, welche besonders durch den Zelltod auftritt, wird LDH schnell in die Umgebung abgegeben. Die Anzahl der lysierten Zellen ist proportional zur Höhe der Enzymaktivität. Der LDH-Zytotoxizitätstest erlaubt eine quantitative Bestimmung der Zelllyse.

LDH katalysiert in vivo die Oxidation von Laktat zu Pyruvat bei gleichzeitiger Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Mit der verwendeten Reaktionsmixtur (Cytotoxicity Detection Kit (LDH); Roche Applied Science), bestehend aus Diaphorase und Tetrazoliumsalz INT (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid), kann die LDH-Aktivität in einer zweiten Reaktion gemessen werden. Die Diaphorase katalysiert die Reduktion des gelben INT zu rotem Formazan bei gleichzeitiger Oxidation von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$ . Das Formazan zeigt ein weites Absorptionsmaximum bei 500 nm und kann aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit photometrisch quantitativ erfasst werden.

Ein Ansteigen der Anzahl der toten Zellen oder zellmembrangeschädigten Zellen korreliert direkt mit dem Ansteigen der LDH-Aktivität im Zellkulturmedium. Diese ist proportional der Menge an gebildetem Formazan.

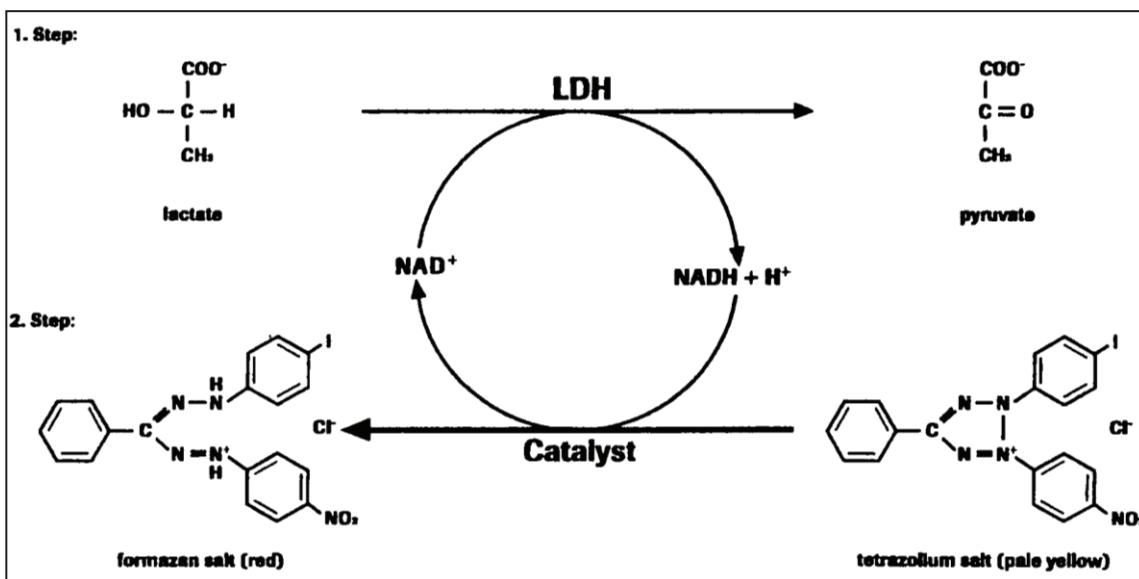


Abbildung 9: Prinzip des LDH-Zytotoxizitätstest

## Durchführung

Am sechsten Tag (120 h) wird der LDH-Zytotoxizitätstest durchgeführt. 24 Stunden vorher werden von den wells jeweils 2 ml abpipettiert. 1 ml dient zur Hormon- und Glucosebestimmung sowie Kryokonservierung, der Rest wird verworfen. Die wells werden mit jeweils 2 ml DMEM + FKS 1 Prozent mit der entsprechenden Glucosekonzentration (0 mmol/l, 25 mmol/l, 50 mmol/l) resuspendiert.

Zur Bestimmung der maximalen LDH-Aktivität dient die Positivkontrolle (High control). Dazu werden 30  $\mu\text{l}$  Triton (Triton-X-100 solution) zu 2 ml DMEM + FKS 1 Prozent gegeben, gevortext und anschließend in das well, das zur Positivkontrolle mitgeführt wird, pipettiert. Dieses well enthält nun eine einprozentige Triton-Verdünnung. Triton führt zum Absterben aller Zellen.

Das Medium mit 0 mmol/l Glucose dient als Negativkontrolle (Low control). Die Negativkontrolle liefert Informationen über die Zellen, die im Versuch nicht mit Glucose stimuliert worden sind, und somit über die spontane LDH-Sekretion.

Background control ist das Kulturmedium ohne Zellen, folglich DMEM + FKS 1 Prozent. Die LDH-Aktivität im reinen Kulturmedium muss später bei den Berechnungen der Zytotoxizität von allen anderen Werten abgezogen werden.

Nach 120 Stunden wird die sechs well Kulturplatte für eine Minute bei 1000 U/min (Raumtemperatur, ohne Bremse) zentrifugiert um die nicht adhärenten Trophoblastzellen an den Plattenboden abzusetzen und die abzupipettierenden Zellüberstände möglichst zellfrei zu gestalten. Je 4 x 100 µl der Zellüberstände (4-fach-Bestimmung) werden in eine 96 well Kulturplatte pipettiert: 4 x 100 µl des Mediums mit 0 mmol/l Glucosezusatz, 4 x 100 µl des Mediums mit 25 mmol/l Glucosezusatz, 4 x 100 µl des Mediums mit 50 mmol/l Glucosezusatz und 4 x 100 µl der Positivkontrolle. Als Background control werden weitere 4 x 100 µl des Kulturmediums DMEM + FKS 1 Prozent in die Kulturplatte pipettiert.

Diaphorase (Katalysator) und Tetrazoliumsalz INT (Färbelösung) werden als frisch hergestellte Reaktionsmixtur zu den Zellüberständen gegeben. Für 25 Tests werden 62,5 µl Katalysator und 2,8125 ml Färbelösung benötigt. Jeweils 100 µl dieser Mixtur werden den Proben hinzugefügt.

Die Platte wird für bis zu 30 Minuten dunkel gestellt.

Nach der Inkubationszeit wird die Reaktion mit je 50 µl 1 N HCl-Lösung abgestoppt. Die Messung der Extinktion bei 490 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm erfolgt mit einem Microplate Reader von Biorad.

Mit der folgenden Formel wird der prozentuale Anteil toter oder geschädigter Zellen berechnet:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Extinktion Probe} - \text{Extinktion Negativkontrolle}}{\text{Extinktion Positivkontrolle} - \text{Extinktion Negativkontrolle}} \times 100$$

#### 3.3.6. Nachweis der Trophoblastzellen

**Prinzip:** Der Nachweis der Trophoblastzellen wird immunhistochemisch durchgeführt. Dafür wird ein Substratkit für Peroxidase (LinRed IHC; KatNr E201PK; HISTOPRIME®) verwendet. Die LinRed-Lösung ergibt mit Peroxidase ein rotes Reaktionsprodukt, welches lichtmikroskopisch (AxioCam MRc; Zeiss) bestätigt wird.

**Durchführung:** Am ersten Tag werden von den gewonnenen Trophoblastzellen 3 ml à 250.000 Zellen/ml entnommen. Je 1 ml wird in ein well einer 24 well Platte pipettiert. Zwei wells dienen dem Nachweis der Trophoblastzellen (Doppelbestimmung), das dritte well zur Kontrolle.

Am zweiten Tag wird die Zellkulturplatte zunächst bei 1000 U/min für eine Minute zentrifugiert (Raumtemperatur, ohne Bremse), um die nicht adhärenen Zellen am Plattenboden zu fixieren. Die Zellüberstände werden vorsichtig abpipettiert. Zum Spülen und Beseitigen von Rückständen des Mediums werden pro well 1 – 2 ml PBS (Phosphat gepufferte NaCl-Lösung, ohne NaHCO<sub>3</sub>) zugegeben. Die Zellkulturplatte wird wie zuvor zentrifugiert, der Überstand wird abpipettiert.

Im nächsten Schritt werden die Zellen mit Formafix 4 Prozent für 20 Minuten inkubiert und dieses im Anschluss wieder entfernt.

Es folgt ein Spülen mit PBS mit anschließender Entfernung mittels Pipette. Zwei bis vier Tropfen Horse-Serum werden zu jedem well gegeben und für 20 Minuten einwirken gelassen. Das Horse-Serum der beiden wells, die zum Nachweis dienen, wird nach der Inkubationszeit abpipettiert. Diesen wird anschließend je 100 µl Antikörper zugesetzt.

Die Zellkulturplatte verbleibt bis zum nächsten Tag im Kühlschrank.

Am dritten Tag werden die Zellüberstände zunächst abpipettiert und die wells dreimal mit PBS gespült.

Zwei bis vier Tropfen sekundärer Antikörper (lila Peroxidase ImpressReagent) werden zu den drei wells gegeben und für 30 bis 45 Minuten inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gespült.

Es werden pro well drei bis fünf Tropfen LinRed hinzugefügt. Die Platte wird lichtgeschützt gestellt. Die Einwirkzeitzeit beträgt fünf bis 30 Minuten.

Die Färbereaktion wird mit Leitungswasser abgestoppt.

Die angefärbten Trophoblastzellen werden unter dem Lichtmikroskop nachgewiesen. Sowohl diese, als auch die Kontrolle werden fotodokumentiert.

### 3.3.7 Verwendete Materialien und Chemikalien

Die verwendeten Materialien und Chemikalien sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien**

Allgemeine Bezeichnung	Genaue Typbezeichnung	Hersteller
Penicillin	G1 Mega I.E.	Jenapharm
Penicillin/Streptomycin	10.000 units Penicillin und 10 mg Streptomycin in 100 ml 0,9%iger NaCl	Sigma-Aldrich CO LTD., Irvine
Amphotericin B	250 µl/ml	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Metronidazol	Lösung zur intravenösen Infusion 100 ml	Braun
Heparin-Natrium	Heparin-Natrium-250.000-ratiopharm; Injektionslösung 250.000 I.E./10 ml	Ratiopharm
Trypsin from bovine pancreas	8,750 units/mg solid; 5 g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Deoxyribonuclease I from bovine pancreas	Typ IV; protein ≥ 80 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NBCS	Neonatales Kälberserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HBSS 10 x	Inkl. CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub> ; 500 ml	Invitrogen, Paisley UK
HEPES	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S; M 238,30 g/mol; 100 g	Ferak Laborat GmbH, Berlin
HBSS-HEPES	HANK's Salt Solution, w/o Phenol red	Biochrom AG

DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium, D5648 (Glucose 4,5 g/l)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium, E15-808 (Glucose 1 g/l)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Percoll	100 %; Dichte 1,130 g/ml; 250 ml	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala
Trypan Blue Solution	0,4 % in 0,81 % NaCl und 0,06 % Bleiphosphat; 20 ml	Sigma-Aldrich
Aqua bidest.	(zweifach destilliertes Wasser)	
0,9 % NaCl-Lösung	0,9 % Natriumchlorid-Lösung	
2,7 % NaCl-Lösung	2,7 % Natriumchlorid-Lösung	
FKS	Fetales Kälberserum	Biochrom AG

**Tabelle 4: Verwendete Materialien**

Allgemeine Bezeichnung	
Zellkultur Testplatte 6, 12, 96	Biochrom AG
Reaktionsgefäß 50 ml	Grüner bio-one Cellstar
Pipetten	Eppendorf
Sterilbox	Heraeus

Zentrifuge	Hettrich
Brutschrank (37 °C; 5 % CO <sub>2</sub> )	Heraeus
Kühltruhe (-80 °C)	Heraeus
Kühlschrank (5 °C)	Liebherr Premium
Dreh- und Schwenkvorrichtung (RM5, 220 V, 50 Hz)	Assistent 348
Lichtmikroskop Axiovert 40	Zeiss
Fotokamera AxioCam MRc	Zeiss
Microplate Reader, Model 680	Biorad
Einmal-Injektions-Kanüle	Braun
Kryoröhrchen, TPP	Biochrom AG
Glaszylinder, Bechergläser, Petrischalen	
Skalpell-Klinge	Präzisa; Dahlhausen

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Lichtmikroskopie

Die Zellsuspensionen der Trophoblastzellansätze wurden zur Stunde 0, 24, 48, 72 und 96 lichtmikroskopisch untersucht.

Zur Stunde 0 zeigten sich die Zytotrophoblastzellen überwiegend gleichmäßig verteilt ohne Zellaggregatbildung. Phänotypisch ließen sie sich über ihre kugelförmige Gestalt mit zahlreichen Zytoplasmatausläufern identifizieren.

Nach 24 Stunden bildeten sich erste Zellaggregate aus, die über Plasmabrücken miteinander verbunden waren.

Die Mobilisationsfähigkeit und damit die Bildung von Aggregaten zeigten sich abhängig von der Anzahl degenerierter Zellen und anderer Zelltypen im Medium. Eine hohe Zellanzahl und degenerierte Zellen schienen die Aggregatbildung zu behindern, sodass in diesem Fall nach 48 Stunden bis 72 Stunden nur zwei- bis dreizellige Aggregate vorzufinden waren. Bei sehr reinen Zellmedien waren Zellaggregate aus bis zu über 15 Zellen zu beobachten.

Bis zur Stunde 96 kam es zu einer unterschiedlichen Entwicklung der Trophoblastzellen. Einerseits kam es zur weiteren Fusion der Zytotrophoblastzellen, die schließlich über einen gemeinsamen Zytoplasmasaum mehrkernige Synzytiotrophoblastzellen ausbildeten. Andererseits blieben die Zellaggregate bestehen, vergrößerten sich teilweise durch Anschluss weiterer Trophoblastzellen und bildeten weitere Zytoplasmabrücken aus. Bei ihnen kam es jedoch nicht oder nur teilweise zur Bildung von mehrkernigen Riesenzellen.

Weiterhin ließ sich eine Zunahme der Zelldegeneration über die Kultivierungszeit beobachten. Die Zellmigration nahm über den Versuchszeitraum ab.

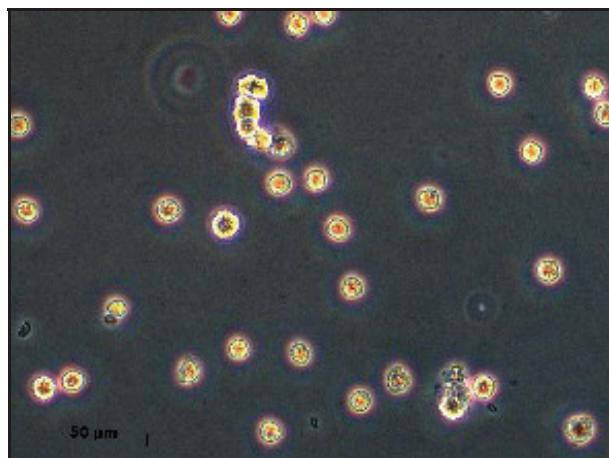


Abbildung 10: Trophoblastzellkultur 0 Stunden, Vergrößerung 32-fach

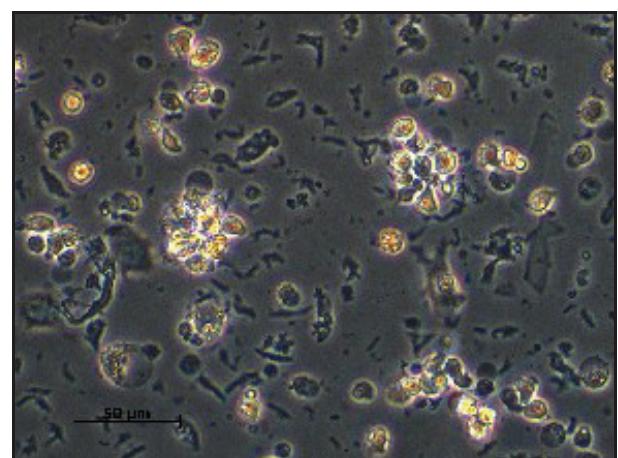


Abbildung 11: Trophoblastzellkultur 24 Stunden, Vergrößerung 32-fach

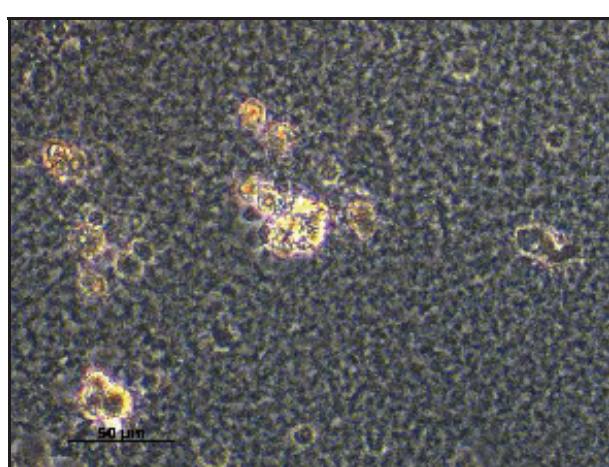


Abbildung 12: Trophoblastzellkultur 48 Stunden, Vergrößerung 32-fach

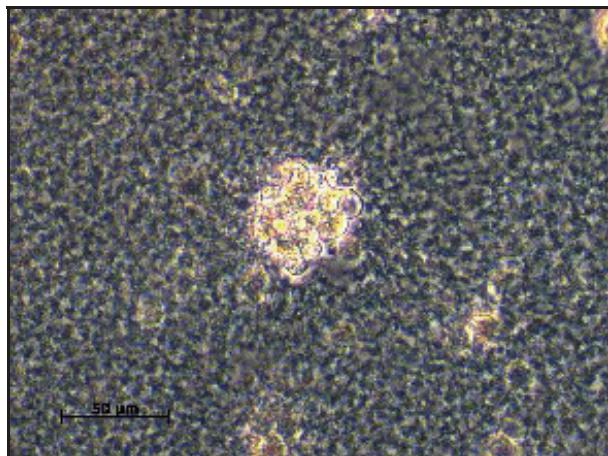


Abbildung 13: Trophoblastzellkultur 72 Stunden, Vergrößerung 32-fach

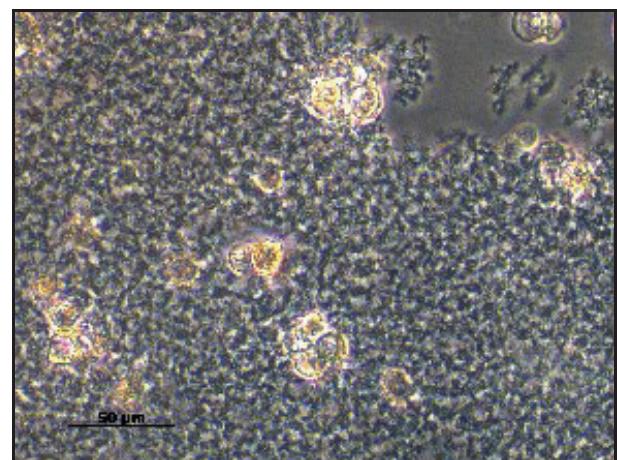


Abbildung 14: Trophoblastzellkultur 96 Stunden, Vergrößerung 32-fach

## 4.2. Glucose- und Hormonkonzentrationen

### 4.2.1. Glucose- und Hormonkonzentrationen im Low-Glucose-Medium (1 g/l Glucose)

Die folgenden Konzentrationen entsprechen den jeweiligen Mittelwerten der erhobenen Konzentrationen der vier Trophoblastzellansätze im Low-Glucose-Medium. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test und Wilcoxon-Test für nichtparametrische Tests unter Nutzung des Statistikprogramms SPSS.  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant deklariert.

Die Glucosekonzentrationen weisen innerhalb der Proben mit 25 mmol/l und 50 mmol/l Glucosezusatz einen kontinuierlichen Anstieg über den Versuchszeitraum auf (25 mmol/l: 7,78 mmol/l nach 24 Stunden auf 28,16 mmol/l nach 96 Stunden; 50 mmol/l: 10,20 mmol/l nach 24 Stunden auf 49,58 mmol/l nach 96 Stunden). Dabei steigen die Glucosekonzentrationen signifikant über den Versuchszeitraum von 24 Stunden bis 96 Stunden innerhalb der Glucosezusätze von 25 mmol/l ( $p=0,007$ ) und 50 mmol/l ( $p=0,007$ ) an. Die Glucosekonzentration im Medium ohne Glucosezusatz bleibt über den Versuchszeitraum auf einem konstanten Niveau von 5,36 mmol/l bis 5,62 mmol/l.

Weiterhin unterscheiden sich die Glucosekonzentrationen signifikant zwischen den unterschiedlich hohen Glucosezusätzen von 0 mmol/l, 25 mmol/l, 50 mmol/l zu den Zeitpunkten 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden ( $p=0,007$ ).

Die Progesteronkonzentrationen fallen während der 96 Stunden innerhalb der drei verschiedenen Glucosezusätze kontinuierlich ab (0 mmol/l: 9,29 nmol/l nach 24 Stunden auf 6,53 nmol/l nach 96 Stunden; 25 mmol/l: 8,25 nmol/l auf 5,70 nmol/l; 50 mmol/l: 8,82 nmol/l auf 5,94 nmol/l). Dabei sinken die Progesteronkonzentrationen innerhalb des Glucosezusatzes von 50 mmol/l signifikant ( $p=0,026$ ) über den Versuchszeitraum von 24 Stunden bis 96 Stunden. Innerhalb der Glucosezusätze von 0 mmol/l und 25 mmol/l kommt es zu keinen signifikanten Unterschieden. Zwischen den unterschiedlich hohen Glucosezusätzen zu den Zeitpunkten 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden unterscheiden sich die Progesteronkonzentrationen nicht signifikant.

Die  $\beta$ -hCG-Konzentrationen weisen über den Versuchszeitraum einen Anstieg bei den Glucosezusätzen von 0 mmol/l (0,92 mIU/ml nach 24 Stunden auf 4,07 mIU/ml nach 96 Stunden) und 25 mmol/l (0,80 mIU/ml auf 2,64 mIU/ml) auf. Beim Glucosezusatz von 50 mmol/l kommt es zum Anstieg der Werte bis zum Zeitpunkt 72 Stunden (0,78 mIU/ml auf 2,56 mIU/ml) und zum Abfall der Werte zum Zeitpunkt 96 Stunden (1,82 mIU/ml). Es handelt sich jedoch nicht um signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden innerhalb der Glucosezusätze von 0 mmol/l, 25 mmol/l und 50 mmol/l. Auch zwischen den unterschiedlich hohen Glucosezusätzen von 0 mmol/l, 25 mmol/l, 50

mmol/l zu den Zeitpunkten 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden sind keine signifikanten Konzentrationsunterschiede gegeben.

Die Östradiolkonzentrationen innerhalb der Glucosezusätze von 0 mmol/l und 50 mmol/l weisen einen Anstieg ihrer Werte bis zum Zeitpunkt 72 Stunden (0 mmol/l: 3532,00 pmol/l nach 0 Stunden auf 4830,75 pmol/l nach 72 Stunden; 50 mmol/l: 4046,75 pmol/l auf 4617,75 pmol/l) auf und darauf folgend eine Abnahme ihrer Werte (0 mmol/l: 4160,50 pmol/l nach 96 Stunden; 50 mmol/l: 4362,00 pmol/l). Die Konzentrationen innerhalb des 25 mmol/l Glucosezusatzes steigen über den Versuchszeitraum an (3731,50 pmol/l nach 24 Stunden auf 4415,50 pmol/l nach 96 Stunden). Weder über den Versuchszeitraum innerhalb der Glucosezusätze von 0 mmol/l, 25 mmol/l und 50 mmol/l, noch zwischen den unterschiedlich hohen Glucosezusätzen von 0 mmol/l, 25 mmol/l, 50 mmol/l über den Versuchszeitraum kommt es zu signifikanten Konzentrationsunterschieden.

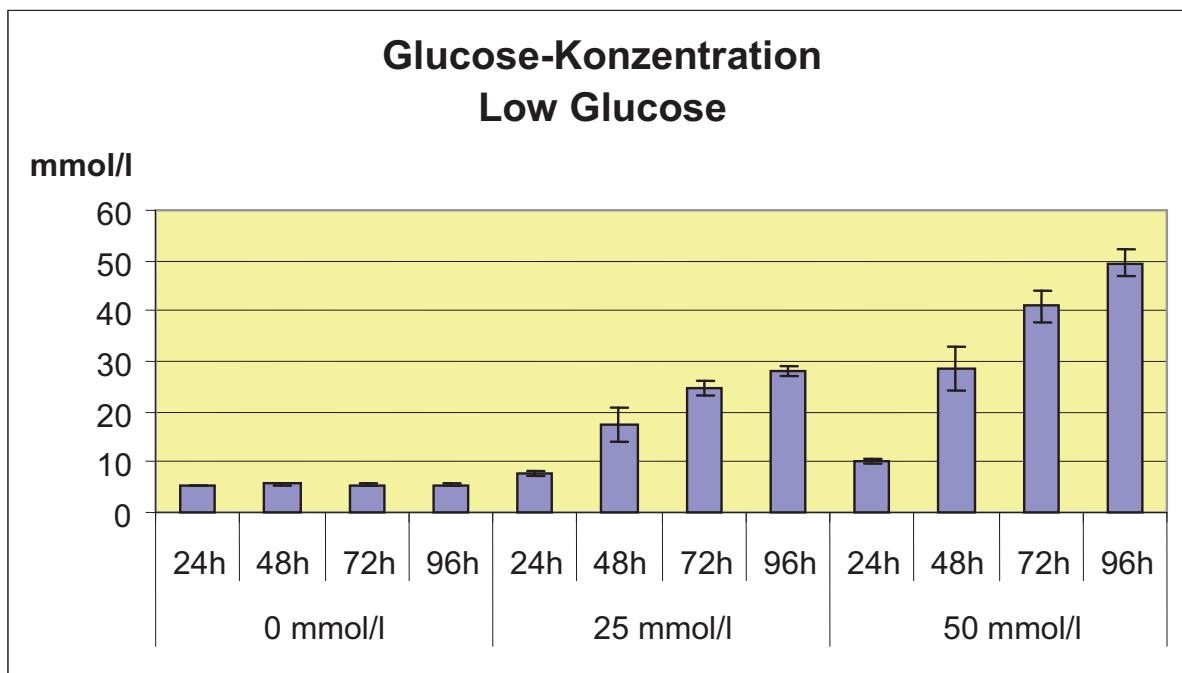
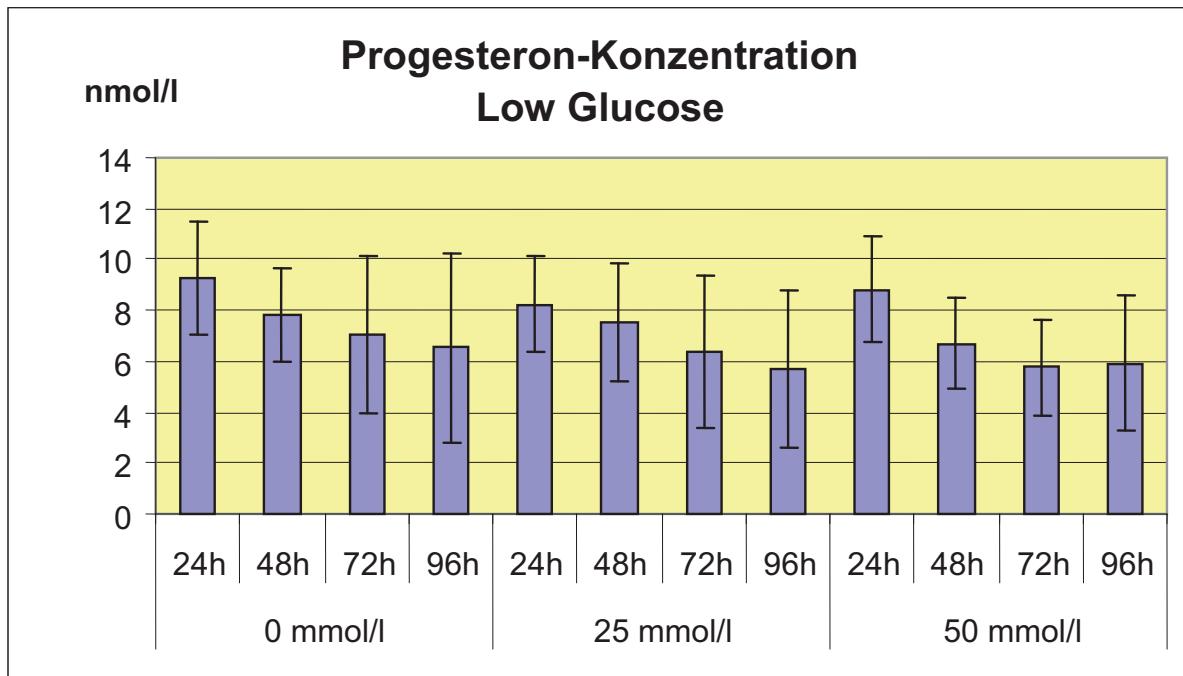


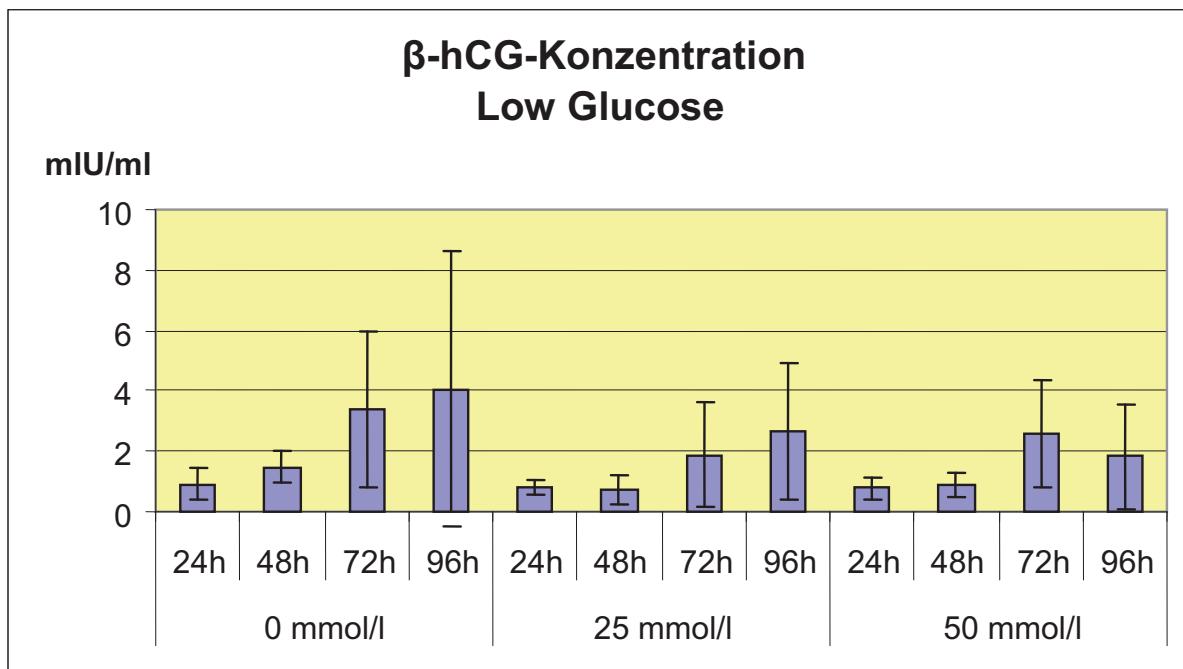
Abbildung 15: Glucosekonzentrationen im Low-Glucose-Ansatz

Glucosekonzentrationen im Low-Glucose-Ansatz (1 g/l Glucose) mit Glucosezusatz (25 mmol/l; 50 mmol/l) und ohne Glucosezusatz (0 mmol/l) über den Versuchszeitraum. Die Werte (Mittelwert  $\pm$  SA) repräsentieren die Glucosekonzentrationen in den entnommenen Proben zu den aufgewiesenen Zeiten, n = 4 für jede Gruppe.



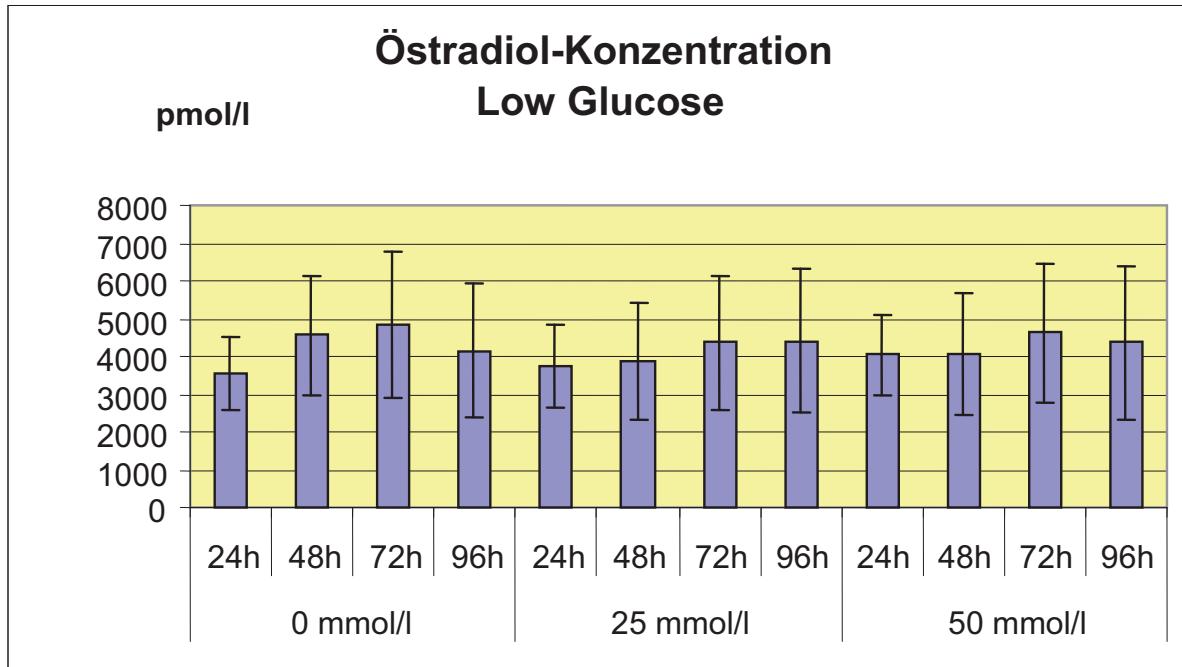
**Abbildung 16: Progesteronkonzentrationen im Low-Glucose-Ansatz**

Glucoseeffekt auf die Progesteronexpression humaner Trophoblastzellen in vitro. Die Werte (Mittelwert  $\pm$  SA) repräsentieren die Progesteronkonzentrationen in den entnommenen Proben zu den aufgewiesenen Zeiten,  $n = 4$  für jede Gruppe. Signifikanter Progesteronabfall im Medium mit 50 mmol/l Glucosezusatz von 24 h bis 96 h ( $p=0,026$ ).



**Abbildung 17: β-hCG-Konzentrationen im Low-Glucose-Ansatz**

Glucoseeffekt auf die  $\beta$ -hCG-Expression humaner Trophoblastzellen in vitro. Die Werte (Mittelwert  $\pm$  SA) repräsentieren die  $\beta$ -hCG-Konzentrationen in den entnommenen Proben zu den aufgewiesenen Zeiten,  $n = 4$  für jede Gruppe.



**Abbildung 18: Östradiolkonzentrationen im Low-Glucose-Ansatz**

Glucoseeffekt auf die Östradiolexpression humaner Trophoblastzellen in vitro. Die Werte (Mittelwert  $\pm$  SA) repräsentieren die Östradiolkonzentrationen in den entnommenen Proben zu den aufgewiesenen Zeiten,  $n = 4$  für jede Gruppe.

#### 4.2.2. Glucose- und Hormonkonzentrationen im High-Glucose-Medium (4,5 g/l Glucose)

Die folgenden Konzentrationen entsprechen den jeweiligen Mittelwerten der erhöhten Konzentrationen der fünf Trophoblastzellansätze im High-Glucose-Medium. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman-Test und Wilcoxon-Test für nichtparametrische Tests unter Nutzung des Statistikprogramms SPSS.  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant deklariert.

Die Glucosekonzentrationen steigen signifikant innerhalb der Proben mit 25 mmol/l ( $p=0,004$ ) und 50 mmol/l ( $p=0,002$ ) Glucosezusatz kontinuierlich über den Versuchszeitraum an (25 mmol/l: 24,15 mmol/l auf 42,61 mmol/l; 50 mmol/l:

26,28 mmol/l auf 63,32 mmol/l). Die Glucosekonzentration im Medium ohne Glucosezusatz weist über den Versuchszeitraum einen minimalen Anstieg von 21,66 mmol/l auf 23,38 mmol/l auf.

Die Glucosekonzentrationen unterscheiden sich signifikant zwischen den unterschiedlich hohen Glucosezusätzen von 0 mmol/l, 25 mmol/l, 50 mmol/l zu den Zeitpunkten 48 Stunden ( $p=0,002$ ), 72 Stunden ( $p=0,002$ ) und 96 Stunden ( $p=0,002$ ). Zum Zeitpunkt 24 Stunden gibt es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Glucosekonzentrationen.

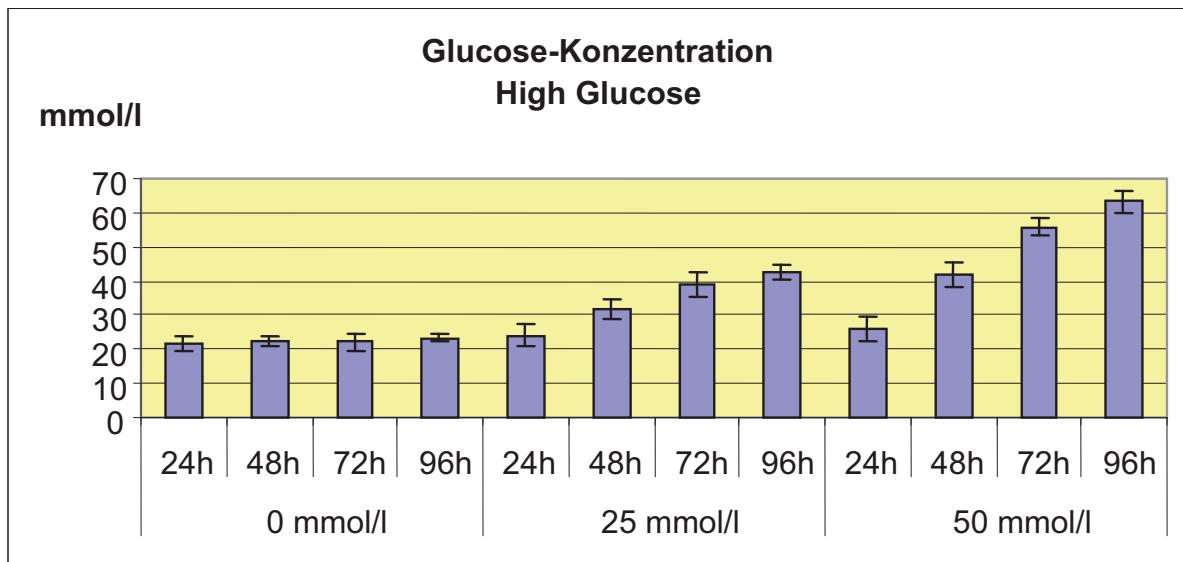
Die Progesteronkonzentrationen fallen während der 96 Stunden innerhalb der Glucosezusätze 0 mmol/l, 25 mmol/l und 50 mmol/l kontinuierlich ab (0 mmol/l: 9,83 nmol/l auf 5,16 nmol/l; 25 mmol/l: 9,04 nmol/l auf 3,15 nmol/l; 50 mmol/l: 10,60 nmol/l auf 3,87 nmol/l). Dabei sinken sie signifikant über den Versuchszeitraum innerhalb aller Glucosezusätze (0 mmol/l:  $p=0,005$ ; 25 mmol/l:  $p=0,002$ ; 50 mmol/l:  $p=0,003$ ).

Zwischen den unterschiedlich hohen Glucosezusätzen von 0 mmol/l, 25 mmol/l, 50 mmol/l zu den Zeitpunkten 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden kommt es zu keinen signifikanten Konzentrationsunterschieden.

Die  $\beta$ -hCG-Konzentrationen weisen über den Versuchszeitraum einen Abfall bei allen Glucosezusätzen auf (0 mmol/l: 4,88 mIU/ml auf 1,34 mIU/ml; 25 mmol/l: 4,99 mIU/ml auf 1,14 mIU/ml; 50 mmol/l: 4,38 mIU/ml auf 1,54 mIU/ml). Der Konzentrationsunterschied über den Versuchszeitraum ist hierbei signifikant (0 mmol/l:  $p=0,007$ ; 25 mmol/l:  $p=0,003$ ; 50 mmol/l:  $p=0,007$ ). Zwischen den unterschiedlich hohen Glucosezusätzen von 0 mmol/l, 25 mmol/l, 50 mmol/l zu den Zeitpunkten 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden sind keine signifikanten Konzentrationsunterschiede gegeben.

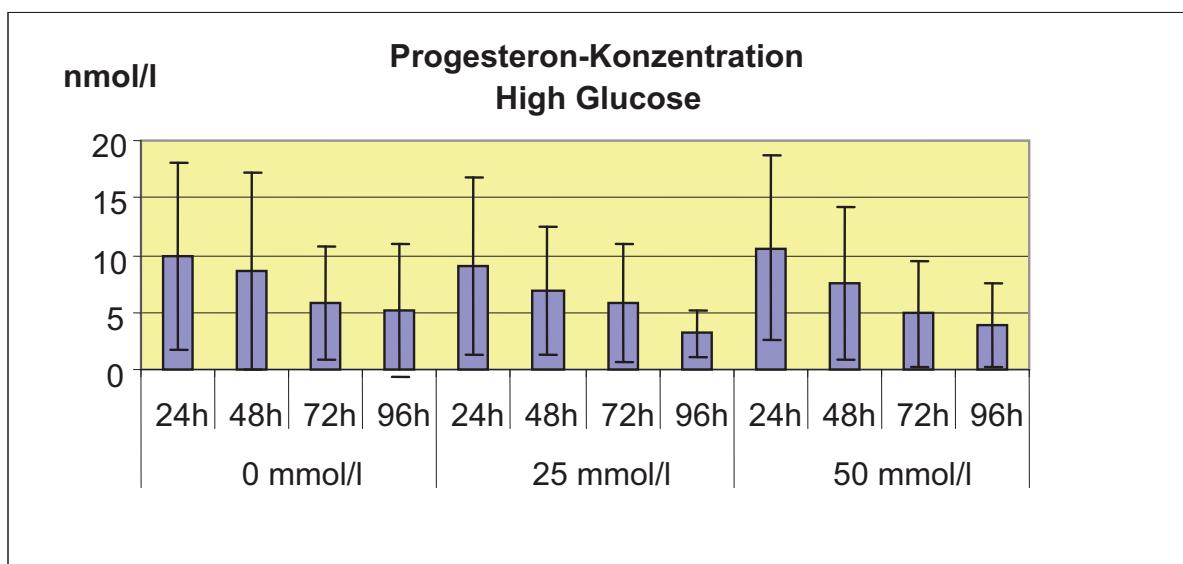
Die Östradiolkonzentrationen weisen über den Versuchszeitraum einen Anstieg ihrer Werte auf (0 mmol/l: 711,0 pmol/l auf 889,0 pmol/l; 25 mmol/l: 685,0 pmol/l auf 1030,6 pmol/l; 50 mmol/l: 747,4 pmol/l auf 880,4 pmol/l). Jedoch kommt es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Zeitpunkten 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden innerhalb der Glucosezusätze von 0 mmol/l, 25

mmol/l und 50 mmol/l. Auch bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlich hohen Glucosezusätzen von 0 mmol/l, 25 mmol/l, 50 mmol/l zu den Zeitpunkten 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden.



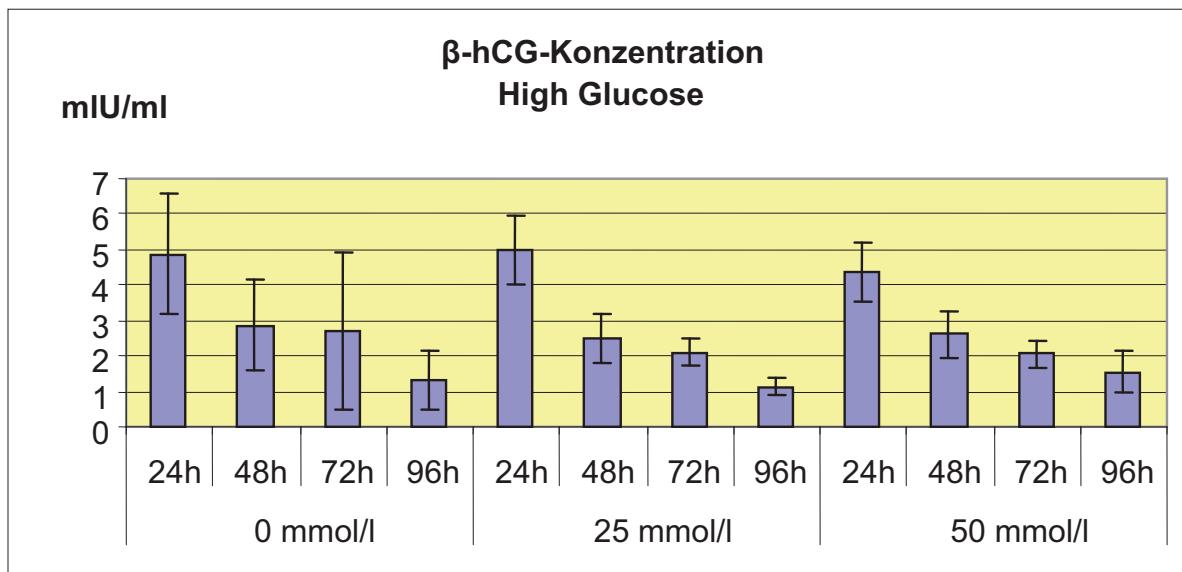
**Abbildung 19: Glucosekonzentrationen im High-Glucose-Ansatz**

Glucosekonzentrationen im High-Glucose-Ansatz (4,5 g/l Glucose) mit Glucosezusatz (25 mmol/l; 50 mmol/l) und ohne Glucosezusatz (0 mmol/l) über den Versuchszeitraum. Die Werte (Mittelwert  $\pm$  SA) repräsentieren die Glucosekonzentrationen in den entnommenen Proben zu den aufgewiesenen Zeiten, n = 5 für jede Gruppe.



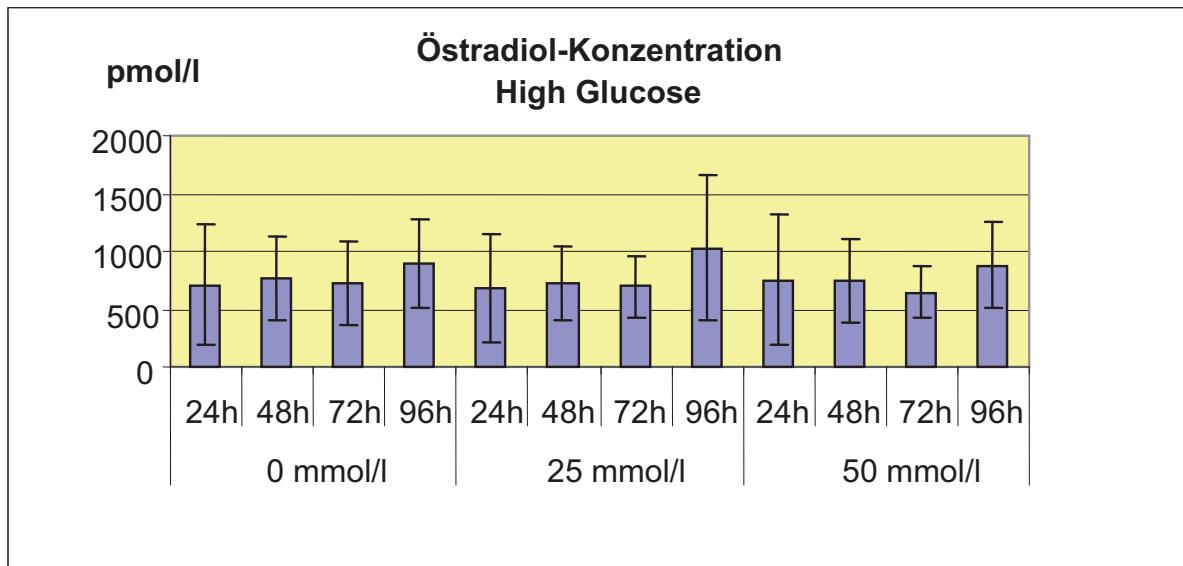
**Abbildung 20: Progesteronkonzentrationen im High-Glucose-Ansatz**

Glucoseeffekt auf die Progesteronexpression humaner Trophoblastzellen in vitro. Die Werte (Mittelwert  $\pm$  SA) repräsentieren die Progesteronkonzentrationen in den entnommenen Proben zu den aufgewiesenen Zeiten, n = 5 für jede Gruppe. Signifikanter Progesteronabfall im Medium mit 0 mmol/l, 25 mmol/l und 50 mmol/l Glucosezusatz von 24 h bis 96 h (0 mmol/l: p=0,005; 25 mmol/l: p=0,002; 50 mmol/l: p=0,003).



**Abbildung 21: β-hCG-Konzentrationen im High-Glucose-Ansatz**

Glucoseeffekt auf die β-hCG-Expression humaner Trophoblastzellen in vitro. Die Werte (Mittelwert  $\pm$  SA) repräsentieren die β-hCG-Konzentrationen in den entnommenen Proben zu den aufgewiesenen Zeiten, n = 5 für jede Gruppe. Signifikanter β-hCG-Abfall im Medium mit 0 mmol/l, 25 mmol/l und 50 mmol/l Glucosezusatz von 24 h bis 96 h (0 mmol/l: p=0,007; 25 mmol/l: p=0,003; 50 mmol/l: p=0,007).



**Abbildung 22: Östradiolkonzentrationen im High-Glucose-Ansatz**

Glucoseeffekt auf die Östradiolexpression humaner Trophoblastzellen in vitro. Die Werte (Mittelwert  $\pm$  SA) repräsentieren die Östradiolkonzentrationen in den entnommenen Proben zu den aufgewiesenen Zeiten, n = 5 für jede Gruppe.

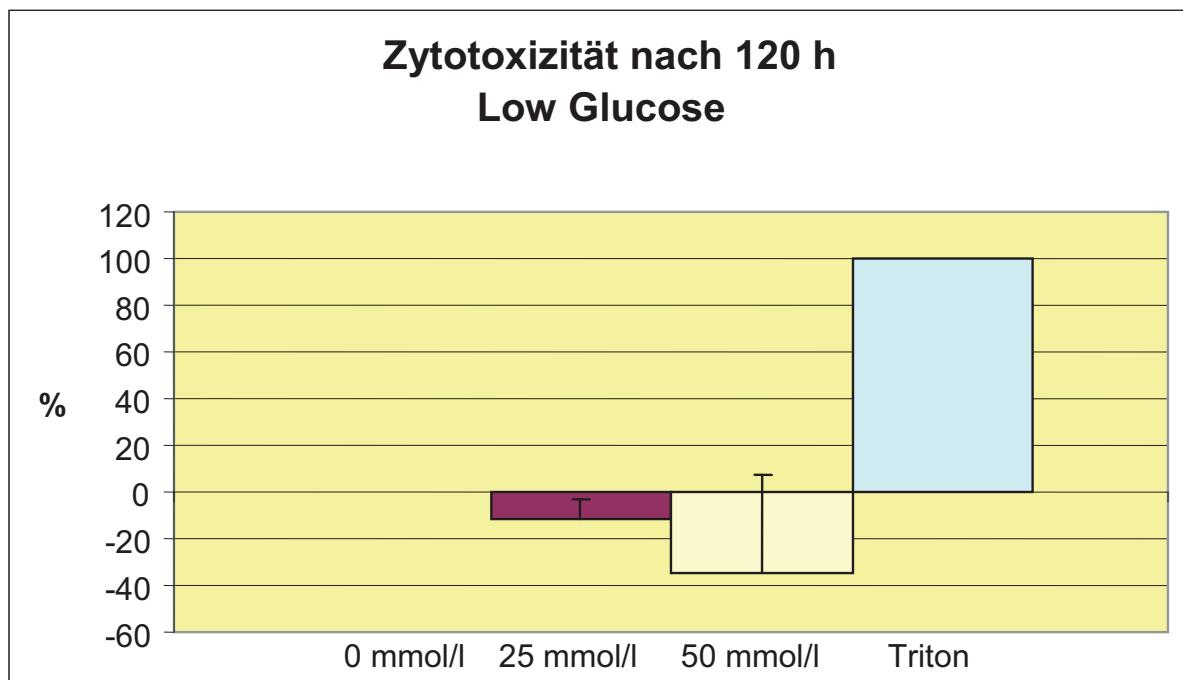
#### 4.3. LDH – Zytotoxizitätstest

Der LDH – Zytotoxizitätstest dient zum Nachweis einer Zytotoxizität im Kulturmedium. Für die Berechnungen der Zytotoxizitäten wurden jeweils Mittelwerte der Extinktionswerte verwendet. Für die Low-Glucose-Versuchsreihe wurden Extinktionswerte von drei Trophoblastzellkulturansätzen herangezogen, für die High-Glucose-Versuchsreihe Extinktionswerte von vier Trophoblastzellkulturansätzen. Die Extinktionswerte von zwei Versuchsreihen wurden verworfen, da sich aus ihnen sehr hohe negative und damit zweifelhafte Zytotoxizitäten berechneten. Der Formel nach ergibt sich eine Zytotoxizität von 100 Prozent im Zellkulturansatz mit Tritonzufluss. Für den Ansatz ohne Glucosezusatz errechnet sich eine Zytotoxizität von 0 Prozent, welche für die spontane LDH-Sekretion im Kulturmedium steht.

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Extinktion Probe} - \text{Extinktion Negativkontrolle}}{\text{Extinktion Positivkontrolle} - \text{Extinktion Negativkontrolle}} \times 100$$

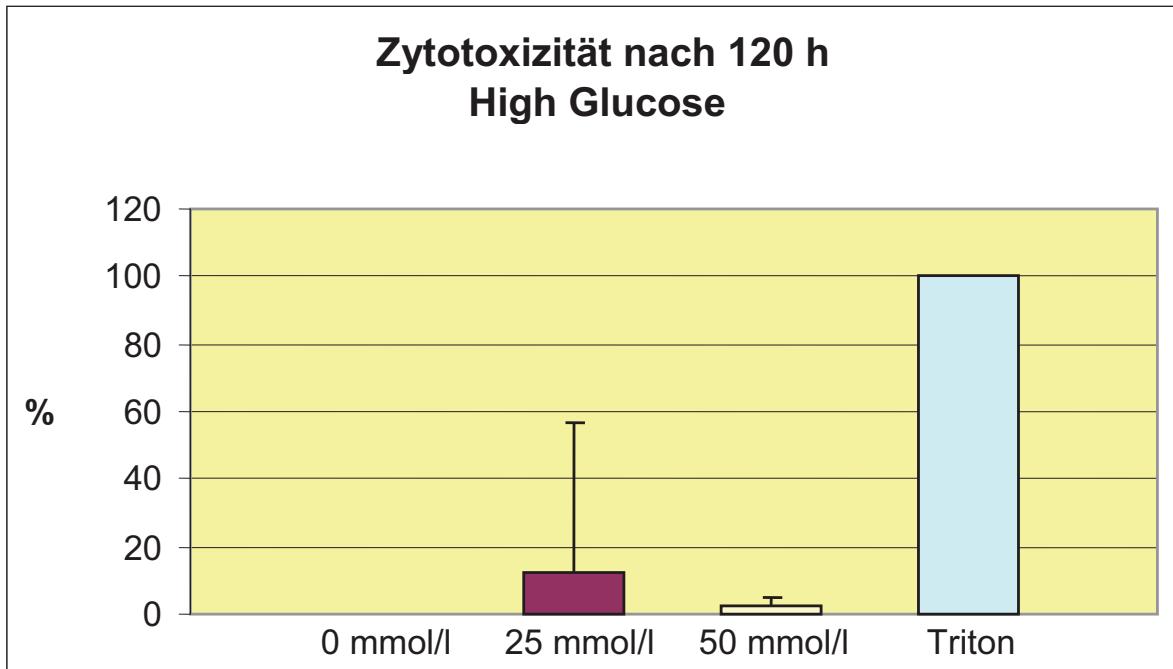
Vergleichend zur spontanen LDH-Sekretion zeigte sich in den Low-Glucose-Medien mit Glucosezusatz eine niedrigere Zytotoxizität, somit unter der Zytotoxizität der Medien ohne Glucosezusatz liegt. In den Low-Glucose-Medien mit 25 mmol/l Glucosezusatz lag die Zytotoxizität bei -11,86 Prozent (SA 8,52). In den Low-Glucose-Medien mit 50 mmol/l Glucosezusatz ergab sich eine Zytotoxizität von -35,18 Prozent (SA 42,53). Die Zytotoxizität der High-Glucose-Medien mit Glucosezusatz beträgt 12,12 Prozent (SA 44,97) mit 25 mmol/l Glucosezusatz und 2,41 Prozent (SA 3,41) mit 50 mmol/l Glucosezusatz.

Alle ermittelten Zytotoxizitäten der Medien mit Glucosezusatz, das heißt sowohl im High-Glucose- als auch im Low-Glucose-Medium, lagen signifikant unter der Zytotoxizität der Positivkontrolle.



**Abbildung 23: Zytotoxizität nach 120 h im Low-Glucose-Ansatz**

Einfluss von Glucose auf die Zytotoxizität humaner Trophoblastzellen in vitro. Die Werte (Mittelwert  $\pm$  SA) entsprechen den aus den Extinktionswerten berechneten Zytotoxizitäten,  $n = 3$  für jede Gruppe. Die Zytotoxizitäten in den Medien mit 0 mmol/l, 25 mmol/l und 50 mmol/l Glucosezusatz liegen signifikant unter der Positivkontrolle.



**Abbildung 24: Zytotoxizität nach 120 h im High-Glucose-Ansatz**

Einfluss von Glucose auf die Zytotoxizität humaner Trophoblastzellen in vitro. Die Werte (Mittelwert  $\pm$  SA) entsprechen den aus den Extinktionswerten berechneten Zytotoxizitäten,  $n = 4$  für jede Gruppe. Die Zytotoxizitäten in den Medien mit 0 mmol/l, 25 mmol/l und 50 mmol/l Glucosezusatz liegen signifikant unter der Positivkontrolle.

#### 4.4. Nachweis der Trophoblastzellen

Der Nachweis der humanen Trophoblastzellen erfolgte anhand der Färbemethode nach LinRed IHC von Histoprime.

Lichtmikroskopisch zeigte sich eine rötliche Anfärbung der Trophoblastzellen, womit der immunhistochemische Nachweis der Trophoblastzellen demonstriert ist.

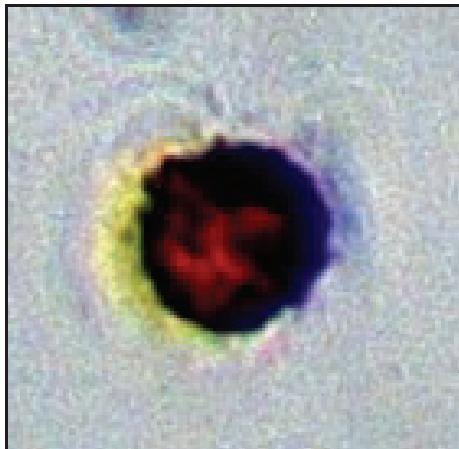


Abbildung 25: Trophoblastzelle, Färbemethode LinRed IHC



Abbildung 26: Trophoblastzellen, Färbemethode LinRed IHC

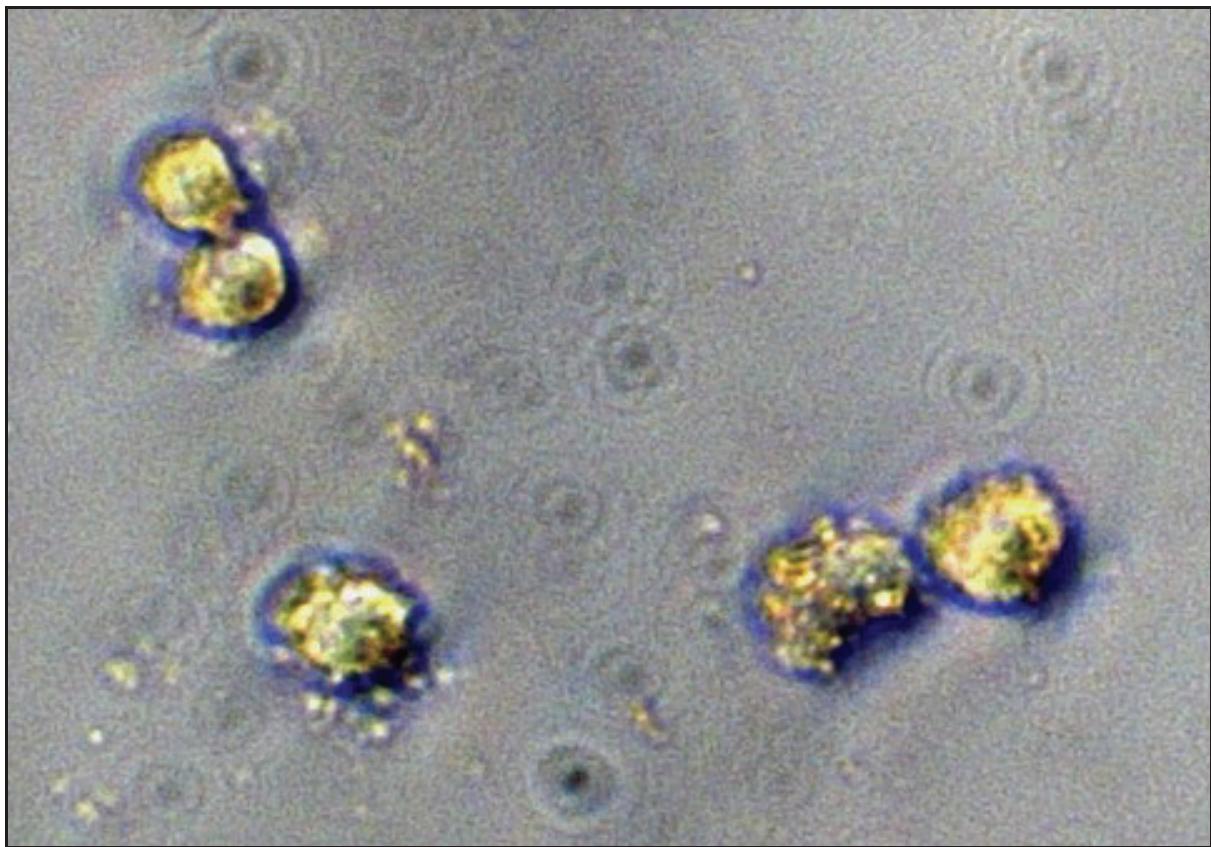


Abbildung 27: Trophoblastzellen, Färbemethode LinRed IHC

## 5. Diskussion

### 5.1. Einfluss von Glucose auf die Hormonexpression

In vorliegender Studie wurde die Glucosewirkung auf die Hormonexpression humarer Trophoblastzellen untersucht. Über den Versuchszeitraum eines Kulturansatzes, das heißt über 96 Stunden, wurde den Kulturmedien Proben zur Glucose- und Hormonbestimmung entnommen. Den Ergebnissen nach kommt es innerhalb dieses Zeitraumes in den Medien mit 25 mmol/l und 50 mmol/l Glucosezusatz zu einer signifikanten Glucosezunahme. Diese Zunahme ist durch den 24-stündlichen Mediumwechsel mit Glucosezusatz zu erklären.

Im High-Glucose-Medium nehmen die Progesteron- und  $\beta$ -hCG-Konzentrationen in allen Glucoseansätzen signifikant über 96 Stunden ab. Im Vergleich dazu trifft dies im Low-Glucose-Medium nur auf die Progesteronkonzentrationen innerhalb des 50 mmol/l Glucosezusatzes zu. Hier lässt sich die Hypothese aufstellen, dass hohe Glucosekonzentrationen die Progesteron- und  $\beta$ -hCG-Expression humarer Trophoblasten minimieren, da es unter normoglykämischen Bedingungen zu keinen signifikanten Konzentrationsabfällen der betroffenen Hormone kommt.

Im Gegensatz zu Progesteron und  $\beta$ -hCG weist Östradiol weder im Low-Glucose-, noch im High-Glucose-Medium signifikante Konzentrationsabnahmen auf. Hier zeigt sich bei allen Glucosezusätzen im Low-Glucose- und High-Glucose-Medium eine Konzentrationszunahme innerhalb des dritten bis vierten Tages. Dieser Zunahme mangelt es an Signifikanz, jedoch erlaubt sie Rückschlüsse auf die Hormonexpression über 96 Stunden. Voraussetzung einer Konzentrationszunahme ist das Vorhandensein produktiver und lebensfähiger Zellen. Die Zunahme der Östradiolkonzentration demonstriert, dass es sich nach 96 Stunden im Medium um noch lebensfähige und funktionsfähige Zellen handelt. Weiterhin ist zu vermuten, dass die Östradiolexpression durch ein hyperglykämisches Milieu nicht beeinträchtigt wird.

Die Annahme, dass die abnehmenden Progesteron- und  $\beta$ -hCG-Konzentrationen auf die 24-stündlichen Medienwechsel mit Abnahme von jeweils 1 ml Medium zurückzuführen sei, ist wiederum durch die zunehmenden Östradiolkonzentrationen zu widerlegen.

Eine Glucose induzierte Verminderung der Hormonexpression wurde schon von Patel et al. demonstriert. Trophoblastzellen aus Termplazenten wurden in Minimum Essential Medium ohne Glucose (MEM) und mit 4,5 g/l Glucose (G-MEM) kultiviert. Die Sekretion von Plazentarem Wachstumshormon (PGH) beschrieb in MEM einen kontinuierlichen Anstieg über den Versuchszeitraum, in G-MEM blieb die Sekretion auf niedrigen Levels. Bei Trophoblastzellen, die nach drei Tagen Kultivierung in G-MEM in Glucose freies Medium überführt wurden, ließ sich ein signifikanter Anstieg der PGH-Konzentration beobachten (Patel et al. 1995).

Nicht nur unter hyperglykämischen Bedingungen, sondern auch unter Hypoxämie kommt es zur verminderten Hormonexpression humaner Trophoblastzellen. So demonstrierten Esterman et al. eine auf unter fünf Prozent verminderte Östradiol-, Progesteron- und  $\beta$ -hCG-Sekretion nach 48 Stunden Kultur unter hypoxämischen Bedingungen ( $PO_2$  12-14 mmHg) in Bezug auf normoxische Kulturbedingungen ( $PO_2$  120-130 mmHg) (Esterman et al. 1996).

Unter hypoxischen Bedingungen (2 %  $O_2$ ) beobachteten Hoang et al. an Trophoblastzellen des ersten Trimesters eine zweifache Verminderung des Antioxidanz MnSOD und eine dreifache Verminderung des Antioxidanz 1-Cys Peroxyredoxin (Hoang et al. 2001). Eine Verminderung an Antioxidanzien bewirkt ein Überwiegen der Wirkung von ROS. Wie im folgenden Abschnitt 5.2. beschrieben, führt auch Hyperglykämie zu einer vermehrten ROS-Bildung. Pathogenetisch kann vermutet werden, dass sowohl Hyperglykämie als auch Hypoxie zu einem Missverhältnis von Antioxidanzien und ROS führt, wodurch es zur verminderten Hormonsekretion humaner Trophoblastzellen kommen kann.

In einer Studie von Hahn et al. über die Wirkung von Glucose auf humane Trophoblastzellen zeigte sich die Hormonexpression ( $\beta$ -hCG und hPL) unabhängig von hyperglykämischen Kulturbedingungen. Auch sie wählten ein Low-Glucose- (5,5 mmol/l) und ein High-Glucose-Medium (25 mmol/l) zu ihren Studienzwecken. Interessanterweise kam es zu einer Down-Regulation des GLUT-1 im High-Glucose-Medium. Dies weist auf Autoregulationsmechanismen humaner Trophoblastzellen unter hyperglykämischen beziehungsweise diabetischen Bedingungen hin (Hahn et al. 1998).

Kato und Braunstein verglichen in einer Studie die Hormonexpression humaner Trophoblastzellen des ersten und dritten Trimesters (38. bis 40. SSW). Dabei kultivierten sie die Trophoblastzellen in DMEM mit 4,5 g/l Glucose, welches unseren Kontrollansatz im High-Glucose-Medium darstellt. Die  $\beta$ -hCG-Konzentrationen der Trophoblastzellen des dritten Trimesters wiesen einen kontinuierlichen Anstieg über 96 Stunden auf. Die Progesteronkonzentrationen des dritten Trimesters stiegen bis 72 Stunden an, um dann bis Stunde 96 wieder leicht abzufallen (Kato, Braunstein 1990). Im Vergleich zu unseren Ergebnissen verhalten sich die  $\beta$ -hCG-Konzentrationen gegensätzlich, da es in unserem Kontrollansatz im High-Glucose-Medium zu einem signifikanten Abfall kommt. Ebenfalls verzeichneten wir einen signifikanten Abfall der Progesteronkonzentrationen. Die unterschiedlichen Studienergebnisse sind nicht zweifelsfrei zu erklären. Die Signifikanz unserer Werte demonstriert jedoch die Aussagekraft unserer Ergebnisse. Zu beachten sind aber auch die niedrigen Fallzahlen beider Studien mit vier bis fünf Termplazenten aus denen die humanen Trophoblastzellen kultiviert wurden. Sowohl in unserer Versuchsreihe, als auch bei Kato und Braunstein waren deutliche Konzentrationsunterschiede der Hormonexpression zwischen den Kulturen der einzelnen Plazenten zu beobachten. So könnte einerseits von einer individuellen basalen Hormonexpression humaner Trophoblastzellen ausgegangen werden, andererseits auch eine natürliche Schwankung der Hormonexpression in vitro überlegt werden.

Daoud et al. beschrieben in ihrer Studie über Trophoblastdifferenzierung ebenfalls den Aspekt, dass es abhängig von der Gestationswoche (35. bis 41. SSW) zu unterschiedlich hohen  $\beta$ -hCG und hPL-Konzentrationen in den Trophoblastzellkulturen kam (Daoud et al. 2005).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Hyperglykämie die Hormonexpression humaner Trophoblastzellen beeinflusst. Unseren Ergebnissen nach kommt es unter diabetischen Glucosekonzentrationen zu einer Suppression der  $\beta$ -hCG- und Progesteronkonzentration.

Die Schwelle der Glucosekonzentration, die zur signifikanten verminderten  $\beta$ -hCG- und Progesteronexpression führt, liegt hierbei in einem Bereich zwischen 20 mmol/l und 30 mmol/l. Eine exakte Bestimmung der Schwellenkonzentration ist unserem Studienaufbau nach nicht möglich und erfordert weitere Studien mit konstanten Glucosekonzentrationen im Zellmedium.

## 5.2. Einfluss von Glucose auf die Zytotoxizität

Hyperglykämie korreliert in der Regel mit einem erhöhten oxidativen Stress. Sie führt zur Steigerung des Hexosamin-Stoffwechselwegs und des Polyol-Stoffwechselwegs, zur Erhöhung an Advanced Glycation End Products (AGEs) und zur Aktivierung von Proteinkinase-C-Isoformen (Rolo, Palmeira 2006). Über den Polyol-Stoffwechselweg wird Sorbitol aus Glucose gebildet, welches wiederum eine Verminderung der Antioxidanzien NADPH und Glutathion bewirkt. Weiterhin löst Hyperglykämie in Mitochondrien der Atmungskette eine vermehrte Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxidradikale ( $O_2^-$ ), Hydroxylradikale ( $OH^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) aus. Rolo et al. demonstrieren, dass ROS und die aufgeführten Stoffwechselwege Ursache von diabetischen Komplikationen und Gewebeschädigungen sind.

In einer Studie von Wentzel et al. wurde gezeigt, dass Rattenembryos von diabetischen Ratten, die für zwei Tage in einem High-Glucose-Medium (30 mmol/l; 5,4 g/l) kultiviert wurden im Gegensatz zu jenen, die im Low-Glucose-Medium (10 mmol/l; 1,8 g/l) kultiviert wurden, eine signifikante Abnahme an GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphatase Dehydrogenase) und schwere Dysmorphogenesen aufwiesen (Wentzel et al. 2003). ROS bewirken eine Abnahme an GAPDH. Durch Inhibierung von GAPDH kommt es zur Anreicherung von Glykolyseprodukten, die vermehrt über den Polyolweg und Hexosamin-Stoffwechselweg abgebaut werden, sowie zur vermehrten Bildung von AGEs. Diese Studie weist einen Zusammenhang zwischen Hyperglykämie, Bildung von ROS und Abnahme von GAPDH auf.

Weiterhin demonstrierten Radaelli et al. eine signifikant erhöhte Expression an stressaktivierenden und entzündungsbeantwortenden Genen in den Plazenten von Gestationsdiabetikerinnen im Vergleich zu Frauen mit einer normalen Glucosetoleranz. Signifikant erhöht waren dadurch Interleukine, Leptin und TNF- $\alpha$  (Radaelli et al. 2003).

Pal et al. untersuchten an Neuronen, die GnRH sezernieren (GT1-1 Neuronen), die Wirkung von Glucose mittels DMEM high glucose mit 4,5 g/l Glucose und DMEM low glucose mit 1 g/l Glucose. Nach 48 Stunden und 72 Stunden im Kulturmedium zeigten die GT1-1 Neuronen im High-Glucose-Medium gegenüber dem Low-

Glucose-Medium einen statistisch signifikanten Prozentsatz an nicht lebensfähigen Zellen. Sie demonstrierten eine Glucose induzierte Zelltoxizität (Pal et al. 2007). Die generelle Annahme, dass Glucose inflammatorisch und zytotoxisch wirkt, wird durch andere Studien teilweise widerlegt. So findet sich bei Hinck et al. über einen Versuchszeitraum von 12 Tagen keine vermehrte Apoptose unter Glucosezufuhr bei Rcho-1 Zelllinien (Chorionkarzinomzellen von Ratten zur Studie der Trophoblastzelldifferenzierung). Bei den untersuchten Rcho-1 Zelllinien im High-Glucose-Medium mit 28 mmol/l (5,05 g/l) D-Glucose und den Rcho-1 Zelllinien im Low-Glucose-Medium mit 6 mmol/l (1,08 g/l) D-Glucose zeigte sich lediglich eine Chromatindegradation unter einem Prozent und Nucleusfragmentation unter zwei Prozent, welche beweisend für fehlende Apoptose stehen (Hinck et al. 2003). Bedeutend ist hierbei, dass es über die artifizielle Hyperglykämie zu keiner Apoptoseinduktion kommt. Zu beachten ist aber generell, dass es sich hierbei um Chorionkarzinomzellen handelt. Karzinomzellen besitzen eine intrinsische oder erworbene Apoptoseresistenz, die zu Tumorprogression und Therapieresistenz führen kann. In einem Review wurde verdeutlicht, dass insbesondere zellulärer Stress antiapoptotische Mechanismen triggert. Molekulare Mechanismen an den Todesrezeptoren (CD 95, TRAIL-Rezeptoren, TNF-Rezeptor 1), an den Mitochondrien (Familie der Bcl-2-Proteine) und postmitochondrial über aberrante Expression von IAP-Proteinen (Inhibitor of Apoptosis) führen zu einer Blockade des Zelltods (Fulda 2010).

Chorionkarzinomzellen werden in der Forschung häufiger verwendet, da mit ihnen Trophoblastzelleigenschaften und –differenzierungen untersucht werden können ohne von Trophoblastzellgewinnung aus menschlichen Plazenten abhängig zu sein. BeWo-, JAR- und JEG-3-Chorionkarzinomzellen dienen als Model für humane Trophoblastzellen des ersten Trimesters. Weiss et al. kultivierten diese in einem Low-Glucose-Medium mit 5,5 mmol/l (0,99 g/l) D-Glucose und einem High-Glucose-Medium mit 25 mmol/l (4,51 g/l) D-Glucose (Weiss et al. 2001). Sie beobachteten eine Hyperglykämie induzierte Abnahme der Zellzahl, Proteine und Nukleinsäuren bei den BeWo-Zellen. Die JAR-Zellen dagegen wiesen keine Änderung der Zellzahl lebensfähiger Zellen unter Hyperglykämie auf. Die JEG-3 Zellen zeigten nach 24 Stunden eine reduzierte Zellzahl an lebensfähigen Zellen unter Hyperglykämie,

nach 48 Stunden dagegen war dieser Effekt wieder aufgehoben. Weiss et al. vermuten dabei einen Anpassungsmechanismus.

Grundsätzlich ist zu sagen, dass Hyperglykämie inflammatorisch wirkt und zu einem erhöhten oxidativen Stress führt. Auch eine verminderte Anzahl an lebensfähigen Zellen ist demnach plausibel und anzunehmen. Eine Hyperglykämie induzierte Apoptose ist wie schon aufgeführt in mehreren Studien nachgewiesen worden. In unserer Studie ist eine Glucose induzierte erhöhte Zytotoxizität angenommen worden. Es zeigte sich jedoch keine signifikant erhöhte Zytotoxizität in Abhängigkeit von Glucose. Im Low-Glucose-Medium wurde eine niedrigere Zytotoxizität bei Glucosezusatz im Vergleich zum Kontrollmedium, im High-Glucose-Medium eine wenig erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zum Kontrollmedium beobachtet.

Wie schon Weiss et al. von einem eventuellem Anpassungsmechanismus ausgegangen sind, kann eine gewisse Adaptation auch in diesem Fall von Bedeutung sein. Bekannt sind Mn- und Cu/Zn-Superoxid-Dismutase, Katalase, Thioredoxin, Glutathion, Glutathion-Peroxidase, Glutathion-S-Transferase, Thiol-/Disulfid-Oxidoreduktase, Vitamin C und E (Myatt, Cui 2004) als antioxidative Systeme in der Plazenta. Schon Tanaka et al. berichteten von einer Induktion an Thioredoxin durch oxidativen Stress (Tanaka et al. 1997). Das intrazelluläre 12 kDa Thioredoxin scheint als freier Radikalfänger die Trophoblastzellen vor Schäden durch oxidativen Stress zu schützen, das extrazelluläre Thioredoxin könnte weitestgehend in der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft und bei der Integration des Zytokin-Netzwerkes mitwirken (Di Trapani et al. 1998).

Es stellt sich die Frage inwieweit die kultivierten Trophoblastzellen in der Lage sind oxidativen Stress durch Glucose über Antioxidanzien auszugleichen.

Gestationsdiabetes führt zu einer Erhöhung an Antioxidanzien in der Plazenta. Coughlan et al. fanden heraus, dass in Plazenten von Gestationsdiabetikerinnen das Antioxidanz CuZn-Superoxiddismutase bei gleichzeitiger signifikanter Erhöhung der Biomarker 8-Isoprostan und Carbonylprotein, welche oxidativen Stress anzeigen, signifikant erhöht ist (Coughlan et al. 2004). Weiterhin fand sich hier kein signifikanter Unterschied der LDH-Exprimierung nach 24 Stunden bei den kultivierten Trophoblastzellen von Gestationsdiabetikerinnen und Frauen mit normaler Glucosetoleranz.

Die Studie von Coughlan et al. unterstützt unsere Hypothese, dass humane Trophoblastzellen Schutzmechanismen zum oxidativen Stressabbau besitzen. Wahrscheinlich ist eine Hyperglykämie induzierte Antioxidanzexprimierung. Zu überlegen ist weiterhin, wie aussagekräftig die LDH-Messung nach 120 Stunden zur Bestimmung der Zytotoxizität ist. Falls nach 120 Stunden schon ein natürlicher Zelltod der Trophoblastzellen unter optimalen Kulturbedingungen eingetreten ist, so ist der Vergleich der quantitativen Zytotoxizität zwischen Glucose induzierter Zytotoxizität und natürlichem, kulturbedingtem Zelltod nicht mehr aussagekräftig. Da jedoch die Tritonkontrolle eine signifikant höhere Zytotoxizität ergibt, ist anzunehmen, dass im Zellmedium nach 120 Stunden ohne Tritonzugabe noch ausreichend lebende Zellen vorhanden sind. Auch lichtmikroskopisch ließen sich nach 120 Stunden noch Trophoblastzellen beziehungsweise Synzytiotrophoblasten nachweisen.

In einem Review von Myatt et Cui wird die verbreitete Annahme geäußert, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) das Resultat eines prolongierten Zeitraums unter Hyperglykämie sind (Myatt, Cui 2004). Diese Annahme wird wiederum durch unsere Beobachtung, dass die nach einem kürzeren Zeitraum von 120 Stunden ermittelte Zytotoxizität im High-Glucose-Medium signifikant unter der Positivkontrolle liegt, bestätigt.

### 5.3. Methodenkritik

Zur Untersuchung der Hormonexpression humaner Trophoblastzellen ist der Einflussfaktor Glucose in unterschiedlich hohen Konzentrationen gewählt worden. Neben diesem steuerbaren Einflussfaktor sind Störfaktoren anzunehmen. Das verwendete Medium DMEM (Sigma-Aldrich) enthält neben Aminosäuren, Vitaminen, anorganischen Salzen und Glucose Phenolrot (15,9 mg/l). Phenolrot ist ein Triphenylmethanfarbstoff, ähnelt auf molekularer Ebene nichtsteroidalen Östrogenen und dient als pH-Indikator.

Berthois et al. wiesen schon 1986 an humanen Brustkrebszellen MCF-7 nach, dass Phenolrot über die Bindung an Östrogenrezeptoren Östrogenaktivität besitzt (Berthois et al. 1986). Unter den üblichen Phenolrotzusätzen von 15 – 45 µM (5 –

15 mg/l) kam es zur signifikanten Stimulation der Zellproliferation und zur dreifachen Erhöhung der Konzentration an östrogenstimulierten Progesteronrezeptoren. Darüber hinaus ist die Östrogenaktivität des Phenolrots jedoch abhängig von der jeweiligen Zellart im Kulturmedium und seiner Sensitivität auf Phenolrot (Welshons et al. 1988).

Es stellt sich die Frage inwieweit das verwendete Medium mit Phenolrot die Hormonexpression beeinflusst haben könnte.

Eine Studie mit den Phytoöstrogenen Genistein und Daidzein an humanen Trophoblastzellen von Termplazenten wies einen Zusammenhang zwischen der Konzentration an Phytoöstrogenen und Östrogen- und Progesteronexpression nach (Richter et al. 2009). Beide Phytoöstrogene inhibierten die Progesteronexpression und stimulierten signifikant die Östrogenexpression der Trophoblastzellen. Es wird vermutet, dass es über Blockade der Östrogenrezeptoren durch Phytoöstrogene zur kompensatorischen Erhöhung der Östrogenexpression kommt.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass nicht auszuschließen ist, dass Phenolrot Einfluss auf die Hormonexpression hat. Bezuglich der Studie von Richter et al. gehen der stimulierende Einfluss auf die Östrogenproduktion und der hemmende Einfluss auf die Progesteronproduktion mit unseren Ergebnissen einher. Es ist jedoch zu bezweifeln, dass unsere Ergebnisse durch den Phenolrotzusatz bedingt sind, da sich eine signifikante Abnahme der Progesteronkonzentration erst ab erhöhten Glucosekonzentrationen zeigt und somit eine Abhängigkeit zur Glucosekonzentration. Um den Einfluss der Östrogenaktivität durch Phenolrot auszuschließen empfiehlt sich Phenolrot freies Medium.

In unserer Studie wurden Plazenten der 37. – 42. Schwangerschaftswoche verwendet. Die verminderten Progesteron- und  $\beta$ -hCG-Konzentrationen unter hyperglykämischen Stoffwechselsituationen erlauben jedoch nur Rückschlüsse auf diese Schwangerschaftsperiode. Über funktionelle Störungen während der Wachstumsphase (28. – 36. Schwangerschaftswoche) und des 1. Trimenons können wir keine Aussagen machen. Dies erfordert weitere Untersuchungen.

#### 5.4. Schussfolgerung und Ausblick

Unsere Studie weist eine signifikante  $\beta$ -hCG- und Progesteronabnahme unter hyperglykämischen Bedingungen, jedoch keine signifikant erhöhte Zytotoxizität gegenüber normoglykämischen Bedingungen auf.

Wir kommen zu dem Ergebnis, dass hyperglykämische Stoffwechselsituationen mit Werten über 20 mmol/l in einem Zeitraum von bis zu 120 Stunden zu Hormonsekretionsstörungen, jedoch zu keiner signifikant erhöhten Zytotoxizität führen.

Progesteron als wichtiges schwangerschaftserhaltendes Hormon wird während der Schwangerschaft in den Nebennieren, Gelbkörper, Gehirn und in der Plazenta gebildet. Stamatelou et al. bestimmten in einem Kollektiv, bestehend aus 35 gesunden schwangeren Frauen in der 28. bis 34. SSW, Progesteronkonzentrationen im venösen Blut. Bei den Frauen (10 von 35), die in der Folge eine Frühgeburt ( $\leq$  37. SSW) hatten, zeigte sich eine signifikant erniedrigte Progesteronkonzentration von 30 Prozent gegenüber den Frauen, die zeitgerecht entbanden (Stamatelou et al. 2009). Progesteron scheint somit ein prognostischer Faktor für Frühgeburtlichkeit zu sein. Wird die in unserer Studie beobachtete Glucose induzierte Progesteronabnahme mit diesem prognostischen Faktor zu einer These formuliert, so könnte behauptet werden, dass Glucose und somit auch ein schlecht oder nicht eingestellter Diabetes zu signifikant erniedrigten Progesteronkonzentrationen und demzufolge Frühgeburtlichkeit und in früheren Schwangerschaftswochen zu Abortneigung führt. Dies ist an dieser Stelle spekulativ, jedoch ist diese These nicht uninteressant für weitere Studien. So könnte in einer prospektiven klinischen Studie der Frage nachgegangen werden, ob ein Zusammenhang zwischen gestörter Glucosetoleranz, verminderter Progesteronkonzentrationen im maternalen Blut und Frühgeburtlichkeit besteht.

## 6. Thesen

1. Diabetes mellitus ist die am häufigsten auftretende Komplikation in der Schwangerschaft.
2. Diabetes mellitus in der Schwangerschaft wird in Diabetes mellitus Typ 1, Diabetes mellitus Typ 2, Diabetesformen anderer Ursachen und Gestationsdiabetes klassifiziert.
3. Zwei bis fünf Prozent aller Schwangeren sind an Diabetes mellitus erkrankt, 90 Prozent entsprechen einem Gestationsdiabetes.
4. Eine insuffiziente Blutzuckereinstellung bei Diabetes mellitus führen einerseits zur Erhöhung des Risikos für fetale Fehlbildungen, intrauterinen Fruchttod, Frühgeburt, Organunreife, Makrosomie und damit verbundene perinatale Morbidität und Mortalität, andererseits zu Plazentopathologien.
5. Wesentliche Untersuchungen zu Hyperglykämie und Plazentopathologien erfolgen mittels primärer Trophoblastzellkulturen.
6. Unsere Aufgabe besteht in dem Nachweis einer eventuell modifizierten Hormonexpression humaner Trophoblastzellen und gegebenenfalls erhöhter Zytotoxizität durch hohe Glucosekonzentrationen.
7. Als funktionelle Parameter für die Plazentaleistung werden die Hormone Progesteron,  $\beta$ -hCG und Östradiol gewählt.
8. Für die Untersuchungen werden neun Plazenten von Termingeschädigten verwendet. Fünf Plazenten werden in einem High-Glucose-Medium (4,5 g/l Glucose), 4 Plazenten in einem Low-Glucose-Medium (1 g/l Glucose) kultiviert. Zusätzlich werden die Zellkulturen im Vergleich zur Kultur in reinem Medium mit 25 mmol/l Glucose und 50 mmol/l Glucose stimuliert.
9. Nach 120 Stunden wird ein LDH - Zytotoxizitätstest zur quantitativen Bestimmung der Zellyse durchgeführt.
10. Es wird nachgewiesen, dass hohe Glucosekonzentrationen ( $> 20$  mmol/l) die Hormonexpression humaner Trophoblastzellen in vitro beeinflussen.
11. Hohe Glucosekonzentrationen ( $> 20$  mmol/l) führen in vitro zu einer verminderten Progesteronexpression humaner Trophoblastzellen.

12. Hohe Glucosekonzentrationen (> 20 mmol/l) führen in vitro zu einer verminder-ten  $\beta$ -hCG-Expression humaner Trophoblastzellen.
13. Hohe Glucosekonzentrationen führen in vitro zu keiner verminderten Östradiolexpression humaner Trophoblastzellen. Sie scheinen keinen Einfluss zu haben.
14. Hohe Glucosekonzentrationen induzieren in vitro in einem Zeitraum von bis zu 120 Stunden keine erhöhte Zelllyse humaner Trophoblastzellen.
15. Sowohl unter normoglykämischen als auch unter hyperglykämischen Glucosekonzentrationen kommt es zur Synzytiumbildung humaner Trophoblastzellen in der primären Zellkultur.

## 7. Literaturverzeichnis

Erstellung des Literaturverzeichnisses (n = 71) mit Citavi 2.5, Literaturverwaltung und Wissensorganisation.

- Aerts, L.; Sodoyez-Goffaux, F.; Sodoyez, J. C.; Malaisse, W. J.; van Assche, F. A. (1988): The diabetic intrauterine milieu has a long-lasting effect on insulin secretion by B cells and on insulin uptake by target tissues. In: American journal of obstetrics and gynecology, Jg. 159, H. 5, S. 1287–1292.
- Allan, D. S.; Colonna, M.; Lanier, L. L.; Churakova, T. D.; Abrams, J. S.; Ellis, S. A. et al. (1999): Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. In: The Journal of experimental medicine, Jg. 189, H. 7, S. 1149–1156.
- Aplin, J. D. (2000): The cell biological basis of human implantation. In: Baillière's best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology, Jg. 14, H. 5, S. 757–764.
- Berthois, Y.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S. (1986): Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 83, H. 8, S. 2496–2500.
- Bibergel, H., Dässler, C. G. (1972): Nebennierenrinde. In Kyank, H. M. Gützow: Erkrankungen während der Schwangerschaft. Thieme, Leipzig, S. 50.

- Black, S.; Kadyrov, M.; Kaufmann, P.; Ugele, B.; Emans, N.; Huppertz, B. (2004): Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. In: Cell death and differentiation, Jg. 11, H. 1, S. 90–98.
- Bollmann, I. (2006): Microsoft Word - EBL-Update\_Klassifikation\_11\_2004\_neues Lay-Out.doc. Online verfügbar unter [http://www.deutsche-diabetes-schafft.de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/EBL\\_Klassifikation\\_Update\\_2004.pdf](http://www.deutsche-diabetes-schafft.de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/EBL_Klassifikation_Update_2004.pdf) zuletzt aktualisiert am 03.07.2006
- Braunstein, G. D.; Rasor, J.; Danzer, H.; Adler, D.; Wade, M. E. (1976): Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy. In: American journal of obstetrics and gynecology, Jg. 126, H. 6, S. 678–681.
- Coughlan, M. T.; Vervaart, P. P.; Permezel, M.; Georgiou, H. M.; Rice, G. E. (2004): Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. In: Placenta, Jg. 25, H. 1, S. 78–84.
- Daoud, G.; Amyot, M.; Rassart, E.; Masse, A.; Simoneau, L.; Lafond, J. (2005): ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. In: The Journal of physiology, Jg. 566, H. Pt 2, S. 409–423.
- Dawood, M. Y. (1976): Circulating maternal serum progesterone in high-risk pregnancies. In: American journal of obstetrics and gynecology, Jg. 125, H. 6, S. 832–840.
- Deniz, G.; Christmas, S. E.; Brew, R.; Johnson, P. M. (1994): Phenotypic and functional cellular differences between human CD3- decidual and peripheral blood leukocytes. In: Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), Jg. 152, H. 9, S. 4255–4261.
- Di Trapani, G.; Perkins, A.; Clarke, F. (1998): Production and secretion of thioredoxin from transformed human trophoblast cells. In: Molecular human reproduction, Jg. 4, H. 4, S. 369–375.
- Dudenhausen, J. W. (Hg.) (2003): Frauenheilkunde und Geburtshilfe. 2. Aufl. Unter Mitarbeit von V. Briese. Berlin: de Gruyter (de-Gruyter-Lehrbuch).
- Duttaroy, A. K. (2009): Transport of fatty acids across the human placenta: a review. In: Progress in lipid research, Jg. 48, H. 1, S. 52–61.
- Ericsson, A.; Hamark, B.; Jansson, N.; Johansson, B. R.; Powell, T. L.; Jansson, T. (2005): Hormonal regulation of glucose and system A amino acid transport in first trimester placental villous fragments. In: American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, Jg. 288, H. 3, S. R656-62.
- Esterman, A.; Finlay, T. H.; Dancis, J. (1996): The effect of hypoxia on term trophoblast: hormone synthesis and release. In: Placenta, Jg. 17, H. 4, S. 217–222.

- Fulda, S. (2010): Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. In: International journal of cell biology, Jg. 2010, S. 370835.
- Gude, N. M.; Stevenson, J. L.; Rogers, S.; Best, J. D.; Kalionis, B.; Huisman, M. A. et al. (2003): GLUT12 expression in human placenta in first trimester and term. In: Placenta, Jg. 24, H. 5, S. 566–570.
- Hahlin, M.; Wallin, A.; Sjöblom, P.; Lindblom, B. (1990): Single progesterone assay for early recognition of abnormal pregnancy. In: Human reproduction (Oxford, England), Jg. 5, H. 5, S. 622–626.
- Hahn, T.; Barth, S.; Weiss, U.; Mosgoeller, W.; Desoye, G. (1998): Sustained hyperglycemia in vitro down-regulates the GLUT1 glucose transport system of cultured human term placental trophoblast: a mechanism to protect fetal development? In: The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, Jg. 12, H. 12, S. 1221–1231.
- Hauguel-de Mouzon, S.; Challier, J. C.; Kacemi, A.; Caüzac, M.; Malek, A.; Girard, J. (1997): The GLUT3 glucose transporter isoform is differentially expressed within human placental cell types. In: The Journal of clinical endocrinology and metabolism, Jg. 82, H. 8, S. 2689–2694.
- Hinck, L.; Thissen, J. P.; Pampfer, S.; Hertogh, R. de (2003): Effect of high concentrations of glucose on differentiation of rat trophoblast cells in vitro. In: Diabetologia, Jg. 46, H. 2, S. 276–283.
- Hoang, V. M.; Foulk, R.; Clauser, K.; Burlingame, A.; Gibson, B. W.; Fisher, S. J. (2001): Functional proteomics: examining the effects of hypoxia on the cytotrophoblast protein repertoire. In: Biochemistry, Jg. 40, H. 13, S. 4077–4086.
- Hopp, H.; Vollert, W.; Ebert, A.; Weitzel, H.; Glöckner, E.; Jährig, D. (1995): [Diabetic retinopathy and nephropathy--complications in pregnancy and labor]. In: Geburtshilfe und Frauenheilkunde, Jg. 55, H. 5, S. 275–279.
- Huppertz, B. (2008): The anatomy of the normal placenta. In: Journal of clinical pathology, Jg. 61, H. 12, S. 1296–1302.
- Huppertz, B.; Borges, M. (2008): Placenta trophoblast fusion. In: Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), Jg. 475, S. 135–147.
- Jansson, T.; Wennergren, M.; Illsley, N. P. (1993): Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. In: The Journal of clinical endocrinology and metabolism, Jg. 77, H. 6, S. 1554–1562.
- Jensen, D. M.; Korsholm, L.; Ovesen, P.; Beck-Nielsen, H.; Moelsted-Pedersen, L.; Westergaard, J. G. et al. (2009): Peri-conceptional A1C and risk of serious adverse pregnancy outcome in 933 women with type 1 diabetes. In: Diabetes care, Jg. 32, H. 6, S. 1046–1048.

- Jeschke, U.; Briese, V.; Richter, D.-U.; Kunkel, S. (1996): Stimulierungsversuche von Trophoblasten in vitro mit Hilfe von PP14. In: *Z Geburtshilfe Neonatol.*, Jg. 200, H. 5, S. 199–201
- Jeschke, U.; Richter, D.-U.; Hammer, A.; Briese, V.; Friese, K.; Karsten, U. (2002): Expression of the Thomsen-Friedenreich antigen and of its putative carrier protein mucin 1 in the human placenta and in trophoblast cells in vitro. In: *Histochem. Cell Biol.*, Jg. 117; H. 3, S. 219–226
- Jovanovic, L. (2009): Treatment and course of gestational diabetes mellitus. In: [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com). Online verfügbar unter: <http://utdol.com/online/content/topic.do?topicKey=pregcomp/27083&view>
- Kalkhoff, R. K.; Jacobson, M.; Lemper, D. (1970): Progesterone, pregnancy and the augmented plasma insulin response. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Jg. 31, H. 1, S. 24–28.
- Kaplan, S. L.; Grumbach, M. M. (1964): Studies of a human and simian placental hormone with growth hormone-like and prolactin-like. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Jg. 24, S. 80–100.
- Kaplan, S. L.; Grumbach, M. M.; Aubert, M. L. (1976): The ontogenesis of pituitary hormones and hypothalamic factors in the human fetus: maturation of central nervous system regulation of anterior pituitary function. In: *Recent progress in hormone research*, Jg. 32, S. 161–243.
- Kato, Y.; Braunstein, G. D. (1990): Purified first and third trimester placental trophoblasts differ in in vitro hormone secretion. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Jg. 70, H. 4, S. 1187–1192.
- Kliman, H. J.; Nestler, J. E.; Sermasi, E.; Sanger, J. M.; Strauss, J. F. (1986): Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. In: *Endocrinology*, Jg. 118, H. 4, S. 1567–1582.
- Kliman, H., M. PhDD (1999): Kliman Cytotrophoblast Purification Method. Online verfügbar unter [http://info.med.yale.edu/obgyn/kliman/placenta/Research\\_Methods/Methods/Cytotrophoblast%20Purif.pdf](http://info.med.yale.edu/obgyn/kliman/placenta/Research_Methods/Methods/Cytotrophoblast%20Purif.pdf), zuletzt aktualisiert am 09.12.1999
- Knopp, R. H.; Warth, M. R.; Charles, D.; Childs, M.; Li, J. R.; Mabuchi, H.; van Allen, M. I. (1986): Lipoprotein metabolism in pregnancy, fat transport to the fetus, and the effects of diabetes. In: *Biology of the neonate*, Jg. 50, H. 6, S. 297–317.
- Lang, U.; Künzel, W. (1990): [Maternal blood glucose as screening method for carbohydrate intolerance disorders in pregnancy]. In: *Der Gynäkologe*, Jg. 23, H. 5, S. 303–306.

- Leventis, R.; Gagné, J.; Fuller, N.; Rand, R. P.; Silvius, J. R. (1986): Divalent cation induced fusion and lipid lateral segregation in phosphatidylcholine-phosphatidic acid vesicles. In: *Biochemistry*, Jg. 25, H. 22, S. 6978–6987.
- Lyden, T. W.; Ng, A. K.; Rote, N. S. (1993): Modulation of phosphatidylserine epitope expression by BeWo cells during forskolin treatment. In: *Placenta*, Jg. 14, H. 2, S. 177–186.
- Martius, G.; Breckwoldt, M. (Hg.) (1996): *Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe*. 83 Tabellen. 2., verb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Mayhew, T. M.; Leach, L.; McGee, R.; Ismail, W. W.; Myklebust, R.; Lammiman, M. J. (1999): Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13–41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes). In: *Placenta*, Jg. 20, H. 5-6, S. 407–422.
- Metzger, B. E.; Lowe, L. P.; Dyer, A. R.; Trimble, E. R.; Chaovarindr, U.; Coustan, D. R. et al. (2008): Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. In: *The New England journal of medicine*, Jg. 358, H. 19, S. 1991–2002.
- Myatt, L.; Cui, X. (2004): Oxidative stress in the placenta. In: *Histochemistry and cell biology*, Jg. 122, H. 4, S. 369–382.
- Oberdisse, K.; Schwiegk, H.; Mohr, L. (1975): *Handbuch der inneren Medizin*. 5., völlig neu bearb. u. erw. Aufl. Berlin: Springer.
- Pal, L.; Chu, H.-P.; Shu, J.; Topalli, I.; Santoro, N.; Karkanias, G. (2007): In vitro evidence of glucose-induced toxicity in GnRH secreting neurons: high glucose concentrations influence GnRH secretion, impair cell viability, and induce apoptosis in the GT1-1 neuronal cell line. In: *Fertility and sterility*, Jg. 88, H. 4 Suppl, S. 1143–1149.
- Patel, N.; Alsat, E.; Igout, A.; Baron, F.; Hennen, G.; Porquet, D.; Evain-Brion, D. (1995): Glucose inhibits human placental GH secretion, in vitro. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Jg. 80, H. 5, S. 1743–1746.
- Pepe, G. J.; Albrecht, E. D. (1995): Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. In: *Endocrine reviews*, Jg. 16, H. 5, S. 608–648.
- Puavilai, G.; Drobny, E. C.; Domont, L. A.; Baumann, G. (1982): Insulin receptors and insulin resistance in human pregnancy: evidence for a postreceptor defect in insulin action. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Jg. 54, H. 2, S. 247–253.
- Radaelli, T.; Varastehpour, A.; Catalano, P.; Hauguel-de Mouzon, S. (2003): Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. In: *Diabetes*, Jg. 52, H. 12, S. 2951–2958.

- Redman, C. W. (1983): HLA-DR antigen on human trophoblast: a review. In: American journal of reproductive immunology : AJRI : official journal of the American Society for the Immunology of Reproduction and the International Coordination Committee for Immunology of Reproduction, Jg. 3, H. 4, S. 175–177.
- Richter, D.-U.; Mylonas, I.; Toth, B.; Scholz, C.; Briese, V.; Friese, K.; Jeschke, U. (2009): Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on progesterone and estrogen (estradiol) production of human term trophoblast cells in vitro. In: Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology, Jg. 25, H. 1, S. 32–38.
- Rolo, A. P.; Palmeira, C. M. (2006): Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. In: Toxicology and applied pharmacology, Jg. 212, H. 2, S. 167–178.
- Ryan, E. A. (2003): Hormones and insulin resistance during pregnancy. In: Lancet, Jg. 362, H. 9398, S. 1777–1778.
- Saydah, S. H.; Chandra, A.; Eberhardt, M. S. (2005): Pregnancy experience among women with and without gestational diabetes in the U.S., 1995 National Survey Of Family Growth. In: Diabetes care, Jg. 28, H. 5, S. 1035–1040.
- Scherbaum, W. A. (2008): [Diabetes in pregnancy]. In: Deutsche medizinische Wochenschrift (1946), Jg. 133, H. 11, S. 535–540.
- Schiebler T. H., Kaufmann P. (1981) „Reife Plazenta“. Die Plazenta des Menschen; Becker V, Schiebler TH, Kubli F; Georg Thieme Verlag Stuttgart; S. 51-100.
- Sepe, S. J.; Connell, F. A.; Geiss, L. S.; Teutsch, S. M. (1985): Gestational diabetes. Incidence, maternal characteristics, and perinatal outcome. In: Diabetes, Jg. 34 Suppl 2, S. 13–16.
- Siiteri, P. K.; MacDonald, P. C. (1966): Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. In: The Journal of clinical endocrinology and metabolism, Jg. 26, H. 7, S. 751–761.
- Smith, B. T.; Giroud, C. J.; Robert, M.; Avery, M. E. (1975): Insulin antagonism of cortisol action on lechithin synthesis by cultured fetal lung cells. In: The Journal of pediatrics, Jg. 87, H. 6 Pt 1, S. 953–955.
- Stamatelou, F.; Deligeoroglou, E.; Farmakides, G.; Creatsas, G. (2009): Abnormal progesterone and corticotropin releasing hormone levels are associated with preterm labour. In: Annals of the Academy of Medicine, Singapore, Jg. 38, H. 11, S. 1011–1016.
- Tanaka, T.; Nishiyama, Y.; Okada, K.; Hirota, K.; Matsui, M.; Yodoi, J. et al. (1997): Induction and nuclear translocation of thioredoxin by oxidative damage in the mouse kidney: independence of tubular necrosis and sulphhydryl depletion. In: Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, Jg. 77, H. 2, S. 145–155.

- Weiss, U.; Cervar, M.; Puerstner, P.; Schmut, O.; Haas, J.; Mauschitz, R. et al. (2001): Hyperglycaemia in vitro alters the proliferation and mitochondrial activity of the choriocarcinoma cell lines BeWo, JAR and JEG-3 as models for human first-trimester trophoblast. In: *Diabetologia*, Jg. 44, H. 2, S. 209–219.
- Welshons, W. V.; Wolf, M. F.; Murphy, C. S.; Jordan, V. C. (1988): Estrogenic activity of phenol red. In: *Molecular and cellular endocrinology*, Jg. 57, H. 3, S. 169–178.
- Wentzel, P.; Ejdesjö, A.; Eriksson, U. J. (2003): Maternal diabetes in vivo and high glucose in vitro diminish GAPDH activity in rat embryos. In: *Diabetes*, Jg. 52, H. 5, S. 1222–1228.
- Winkel, C. A.; Snyder, J. M.; MacDonald, P. C.; Simpson, E. R. (1980): Regulation of cholesterol and progesterone synthesis in human placental cells in culture by serum lipoproteins. In: *Endocrinology*, Jg. 106, H. 4, S. 1054–1060.
- Wittmaack, F. M.; Gåfvels, M. E.; Bronner, M.; Matsuo, H.; McCrae, K. R.; Tomaszewski, J. E. et al. (1995): Localization and regulation of the human very low density lipoprotein/apolipoprotein-E receptor: trophoblast expression predicts a role for the receptor in placental lipid transport. In: *Endocrinology*, Jg. 136, H. 1, S. 340–348.
- Xing, A. Y.; Challier, J. C.; Lepercq, J.; Caüzac, M.; Charron, M. J.; Girard, J.; Hau-guel-de Mouzon, S. (1998): Unexpected expression of glucose transporter 4 in villous stromal cells of human placenta. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, Jg. 83, H. 11, S. 4097–4101.
- Xiong, X.; Saunders, L. D.; Wang, F. L.; Demianczuk, N. N. (2001): Gestational diabetes mellitus: prevalence, risk factors, maternal and infant outcomes. In: *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, Jg. 75, H. 3, S. 221–228.

## 8. Anhang

**Anhang A:** Formblatt der Patientinneninformation

**Anhang B:** Formblatt der Patientinneneinwilligung

**Anhang C:** Poster „Hyperglykämie und Hormonexpression humaner Trophoblastzellen anlässlich der 125. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe am 5./6. Juni 2009

**Anhang D:** Urkunde Posterpreis - 1. Platz und Posterpreis in der Postersitzung „Geburtshilfe 1“ anlässlich der 125. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe am 5./6. Juni 2009

**Anhang E:** Lebenslauf Maria Petereit

## Anhang A: Formblatt der Patientinneninformation

**KLINIKUM SÜDSTADT ROSTOCK**  
Akademisches Lehrkrankenhaus der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Hansestadt Rostock  
Der Oberbürgermeister



### Patientinneninformation

„Untersuchungen zur Funktion von humanen Trophoblastzellen in Abhängigkeit von in-vitro Glukosekonzentrationen als in-vitro Modell Gestationsdiabetes“

Sehr geehrte Patientin,

Der Schwangerschaftsdiabetes (Gestationsdiabetes) ist jede erstmals in der Schwangerschaft auftretende oder diagnostizierte Glukosetoleranzstörung. In Deutschland tritt bei 2-5 % aller Schwangerschaften eine Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus) auf, 90% davon entsprechen einem Gestationsdiabetes. Der Schwangerschaftsdiabetes ist die dritthäufigste Ursache eines Absterbens der Leibesfrucht in der 2. Schwangerschaftshälfte.

**Das Forschungsvorhaben, an dem sie teilnehmen, hat das Ziel, die Auswirkungen des Gestationsdiabetes auf das ungeborene Kind und dessen Mechanismen auf zellulärer Ebene besser zu verstehen und damit neue Therapieansätze der Vorsorge von fetalen Krankheiten möglich zu machen.**

Für diese Forschungsarbeit werden Trophoblastzellen (Zellen aus der Schranke zwischen mütterlichem und fetalem Blut) aus ihrer Nachgeburt benötigt. Diese werden nach der Geburt Ihres Kindes im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik am Klinikum Südstadt aus der Nachgeburt isoliert und mit unterschiedlich hohen Glukosekonzentrationen kultiviert. Die Zellen sind dadurch diabetesähnlichen Bedingungen ausgesetzt. Die Trophoblastzellen produzieren Hormone, die normalerweise in ihrem Körper die Schwangerschaft aufrechterhalten. Die Konzentrationen dieser Hormone werden gemessen, um Aussagen über den Einfluss von Glukose auf die Hormonproduktion zu machen.

**Für Sie und Ihr Kind bestehen keine Risiken.**  
**Es sind keine weiteren Untersuchungen und Befragungen nötig.**  
Die Teilnahme an diesem Forschungsvorhaben ist freiwillig. Sie können jederzeit und ohne Angaben von Gründen ihre Teilnahme widerrufen. Ihre personenbezogenen Daten werden vertraulich und anonymisiert behandelt und nicht an Dritte weitergegeben.

Ort, Datum

Unterschrift des Arztes

Unterschrift der Patientin

**Bankverbindungen**  
Deutsche Kreditbank AG · BLZ 120 300 00 · KTO 133 934  
Bayer. Hypo- und Vereinsbank AG · BLZ 200 300 00 · KTO 195 647 24  
IBAN DE 92 2003 0000 0019 5647 24

St.-Nr. 079/149/01922  
USt-Id-Nr.: DE 137 385 469  
Amtsgericht Rostock HRA 1854

[www.kliniksued-rostock.de](http://www.kliniksued-rostock.de)  
Tel. +49(0)381 4401-0  
Fax +49(0)381 4401-7799

## Anhang B: Formblatt der Patientinneneinwilligung

### KLINIKUM SÜDSTADT ROSTOCK

Akademisches Lehrkrankenhaus der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Hansestadt Rostock  
Der Oberbürgermeister



### Patientinneneinwilligung

„Untersuchungen zur Funktion von humanen Trophoblastzellen in Abhängigkeit von in-vitro Glukosekonzentrationen als in-vitro Modell Gestationsdiabetes“

Ich wurde über Wesen, Bedeutung und Tragweite des wissenschaftlichen Vorhabens mit dem o.g. Titel aufgeklärt. Ich habe den Aufklärungstext gelesen und verstanden. Ich hatte die Möglichkeit, Fragen zu stellen, und habe die Antworten verstanden und akzeptiere sie. Ebenfalls wurde ich über die Teilnahme an dem Forschungsvorhaben verbundenen Risiken und den möglichen Nutzen informiert. Ich bin des Weiteren darüber informiert worden, dass ich über die Ergebnisse der Untersuchungen (Grundlagenforschung ohne direkten Patientennutzen) in aller Regel nicht informiert werde. Ich hatte ausreichend Zeit, mich zur Teilnahme an diesem Forschungsvorhaben zu entscheiden und weiß, dass die Teilnahme freiwillig ist. Ich weiß, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen diese Zustimmung widerrufen kann.

#### Datenschutzrechtliche Patienteneinwilligung (§40 Abs.1, Satz 2 und Abs.2, AMG 1998)

Mir ist bekannt, dass meine persönlichen Daten in verschlüsselter (anonymisierter) Form gespeichert werden. Mir wurde versichert, dass dabei die Grundsätze des Datenschutzes beachtet werden, d.h. meine personenbezogenen Daten vertraulich behandelt und nicht an Dritte weitergegeben werden.

Ich erkläre auch mein Einverständnis für die wissenschaftliche Veröffentlichung der Forschungsergebnisse unter Beachtung der datenschutzrechtlichen Bestimmungen.

Ich habe eine Kopie der Patientinneninformation und dieser Einwilligungserklärung erhalten.  
Ich erkläre hiermit meine freiwillige Teilnahme an diesem Forschungsvorhaben.

Ort, Datum

Unterschrift der Patientin

Ort, Datum

Unterschrift des Arztes

#### Bankverbindungen

Deutsche Kreditbank AG · BLZ 120 300 00 · KTO 133 934  
Bayer, Hypo- und Vereinsbank AG · BLZ 200 300 00 · KTO 195 647 24  
IBAN DE 92 2003 0000 0019 5647 24

St.-Nr. 079/149/01922  
USt-Id-Nr.: DE 137 385 469  
Amtsgericht Rostock HRA 1654

[www.kliniksued-rostock.de](http://www.kliniksued-rostock.de)  
Tel. +49(0)381 4401-0  
Fax +49(0)381 4401-7799

**Anhang C: Poster „Hyperglykämie und Hormonexpression humaner Trophoblastzellen“ anlässlich der 125. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe am 5./6. Juni 2009**

# Hyperglykämie und Hormonexpression humaner Trophoblastzellen

Petereit, M.; Gerber, B.; Richter, D.-U.; Briese, V.  
Universitäts-Frauenklinik Rostock, Südring 81, 18059 Rostock

**Einleitung & Fragestellung**

Hyperglykämie führt in der Schwangerschaft zu Plazentopathologien und einen gestörten fetalen Stoffwechsel. Die Mechanismen, die dazu führen, sind Bestandteil aktueller Forschung. Uns stellt sich die Frage welche direkte Wirkung hohe Glukosekonzentrationen auf die Funktion humaner Trophoblastzellen im Kulturmedium als in-vitro-Modell „Diabetes mellitus“ haben.

**Material & Methoden**

Die Untersuchungen erfolgten anhand von primären Trophoblastzellkulturen. Es wurden 9 Plazenten von Termingeschäften (37. - 42. SSW) verwendet. 5 Plazenten wurden im High-Glucose-Medium (DMEM; 4,5 g/l Glukose), 4 Plazenten im Low-Glucose-Medium (DMEM; 1 g/l Glukose) kultiviert.

Stimulationsversuche: Zugabe von DMEM mit oder ohne Glukosezusatz (0 mmol/l, 25 mmol/l und 50 mmol/l) nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h.

Messung: Glukose, Estradiol (E<sub>2</sub>), Progesteron und β-hCG nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h

Nach 120 h wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt.

**Ergebnisse**

Weder im High-Glucose-Medium, noch im Low-Glucose-Medium kommt es zwischen dem Kontrollmedium ohne Glukosezusatz und den Trophoblastkulturen mit 25 mmol/l- und 50 mmol/l-Glukosezusatz bei den untersuchten Hormonen Estradiol, Progesteron und β-hCG zu signifikanten Unterschieden.

Im Versuchstraum 24 h - 96 h zeigt lediglich die Progesteronkonzentration im High-Glucose-Medium mit 50 mmol/l Glukosezusatz und im Low-Glucose-Medium ohne Glukosezusatz (Kontrolle), mit 25 mmol/l und 50 mmol/l Glukosezusatz einen signifikanten Abfall.

Die Zytotoxizität der High-Glucose-Medien mit Glukosezusatz beträgt 2,41% mit 50 mmol/l Glukosezusatz und 12,12% mit 25 mmol/l Glukosezusatz. Die Zytotoxizität der Low-Glucose-Medien mit Glukosezusatz liegen unter der Zytotoxizität der Medien ohne Glukosezusatz.

Es wird eine zytotoxische Wirkung durch Glukose ausgeschlossen.

**Diskussion**

Entgegen unserer Hypothese, dass Hyperglykämie zur verminderten Hormonexpression führt, scheinen hohe Glukosekonzentrationen weder einen direkten Einfluss auf die Hormonexpression der humanen Trophoblastzellen zu haben, noch zytotoxisch auf diese zu wirken.

Es stellt sich die Frage, ob und inwieweit humane Trophoblastzellen Schutzmechanismen bilden, die in der Lage sind, oxidativen Stress abzuwenden.

**Literaturverweise**

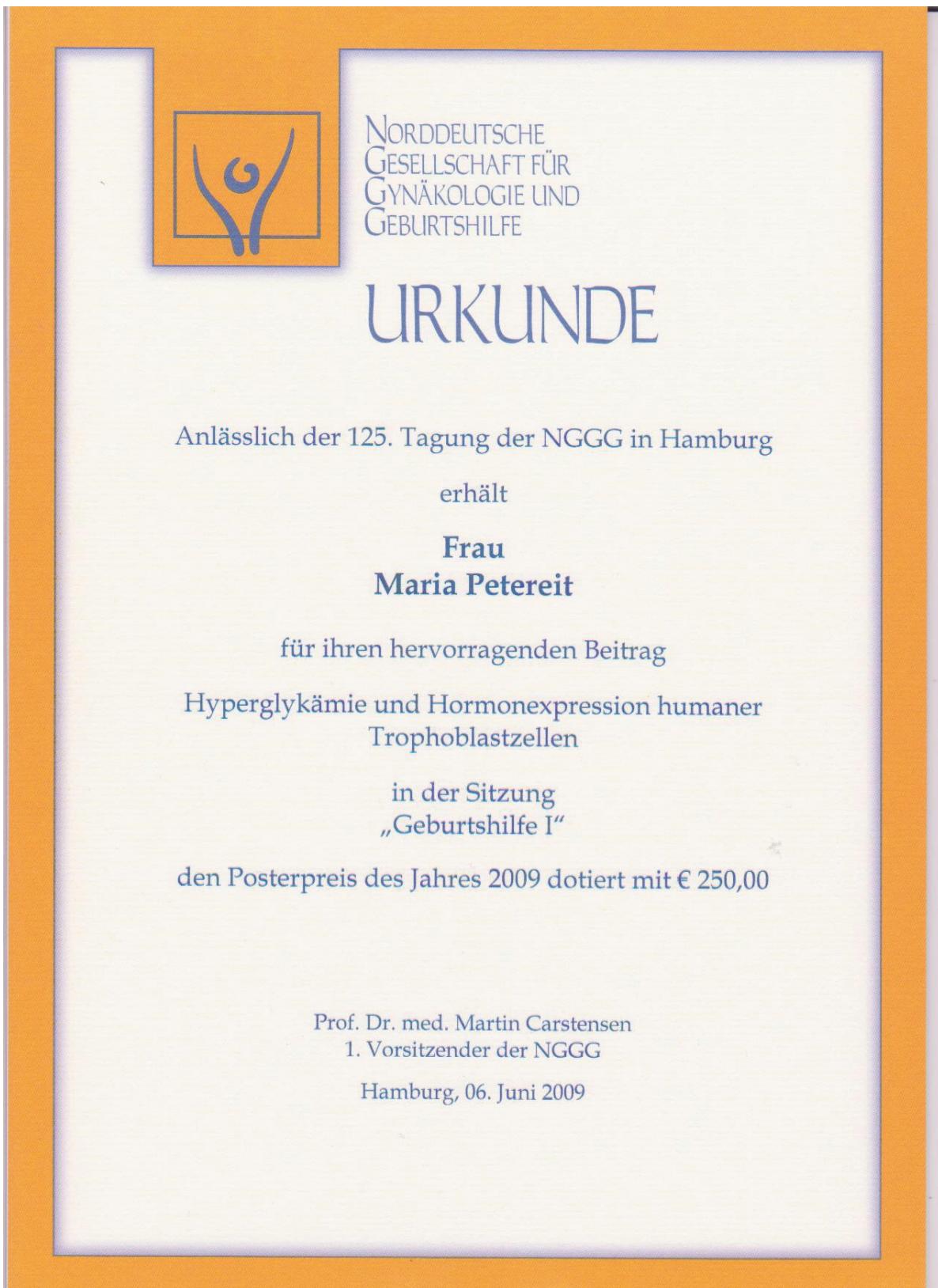
Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress, Review  
Toxicology and Applied Pharmacology (2006), 212, 167 - 178

Altered Placental Oxidative Stress Status in Gestational Diabetes Mellitus  
Placenta (2004), 25, 78 - 84

Overexpression of Thioredoxin-1 Reduces Oxidative Stress in the Placenta of Transgenic Mice and Promotes Fetal Growth via Glucose Metabolism  
Endocrinology (2008), 149(8), 3980 - 3988

88

**Anhang D: Urkunde Posterpreis**



**Anhang E: Lebenslauf Maria Petereit**

## **Curriculum Vitae: Maria Petereit**

Geboren am: 30.08.1983  
Geburtsort: Neustrelitz  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### **Studium**

Seit 10/2003	Medizinstudium an der Universität Rostock Abschluss der Vorklinik mit Physikum
10/2006 – 08/2007	Medizinstudium an der Università degli Studi di Udine, Udine/Italien
11/2010	Abschluss des Medizinstudiums 2. Staatsexamen, Universität Rostock

## Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. V. Briese für die Bereitstellung des Themas, konstruktive Kritik und den regen Meinungsaustausch.

Weiterhin geht ein herzlicher Dank an Frau Dr. D.-U. Richter, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und so manche Regenwolke verschwinden lassen hat. Auch beim ganzen Team des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik mit Frau Greschkowitz, Frau Szewczyk, Dr. J. Stubert und Frau Beckmann möchte ich mich für Tipps und Tricks bedanken.

Ich danke dem Klinikpersonal für seine Geduld und Auskünfte.

Auch ohne die Beratung und Unterstützung von Frau Dipl.-Math. Helga Krentz vom Institut für Medizinische Informatik und Biometrie Rostock wäre die Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank.

Ein warmer, herzlicher Dank geht an meine Familie, besonders an meine kleine Italienerin, die mich bis heute immer wieder in dieser Arbeit bestärkt und motiviert hat.

Ich danke ganz innig Frank Shottinger, der schwarze Löcher zu Sonnenstrahlen wandeln kann.

Ein weiterer Dank geht an Corinna, die die Buchstaben auf ihrer Seite hat.

Und auch möchte ich allen danken, die direkt und indirekt an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Die hier vorgelegte Dissertation wurde nicht in gleicher oder ähnlicher Form an anderer Stelle eingereicht.

Rostock,

Maria Petereit