

Diplomarbeit

EXPRESSION VON ENZYMATISCHEN ANTIOXIDANTIEN IN DER FRÜHEN PLAZENTA BEI TYP 1 DIABETES

eingereicht von:

Elisabeth Gutschi

Geb.Dat.: 16.08.1986

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

unter der Anleitung von

Ao. Univ.-Prof. Dr. phil. Gernot Desoye

Dr. rer. nat. Ursula Hiden

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe, und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

Unterschrift

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben.

Ich bedanke mich bei ...

... meinen Betreuern, Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. phil. Gernot Desoye und Frau Dr. rer. nat. Ursula Hiden, für die Bereitstellung des Themas, die kompetente Betreuung sowie für die zahlreichen Hilfestellungen im Labor und beim Verfassen dieser Arbeit.

... meiner Familie für die fortwährende Unterstützung in meiner gesamten Studienzeit.

... meinem Partner Christian für das Korrekturlesen, die motivierenden Worte und die schöne gemeinsame Zeit.

Zusammenfassung

Oxidativer Stress wird definiert als Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffradikalen (ROS) und Antioxidantien. Dabei kann die Zelle selbst Enzyme bilden, so genannte enzymatische Antioxidantien, die ROS neutralisieren. Speziell während des ersten Trimenons ist auch in einer normalen Schwangerschaft das Vorkommen an oxidativem Stress erhöht, wobei er aber eine physiologische Rolle in der Embryo- und Plazentaentwicklung spielt. Bei Schwangeren mit T1D wird eine erhöhte Konzentration an ROS angenommen, die zu Komplikationen wie Abort, Präeklampsie, fetalen Missbildungen und Störungen in der Plazentaentwicklung führen kann. Dabei spielen Hyperglykämie und veränderte Sauerstoffkonzentrationen in der Plazenta eine bedeutende Rolle.

In einigen Studien wurde gezeigt, dass in Terminplazenten von Schwangeren mit T1D vermehrt oxidativer Stress vorherrscht. In dieser Studie soll nun festgestellt werden, ob es bereits im ersten Trimenon einer diabetischen Schwangerschaft zur veränderten Expression von enzymatischen Antioxidantien im Vergleich zu gesunden Schwängern kommt. Außerdem wird überprüft, ob Hyperglykämie und unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen die Ursachen für die veränderte Produktion von enzymatischen Antioxidantien sind.

Für die Studie wurde Plazentagewebe aus dem ersten Trimenon von Frauen mit T1D und gesundes Kontrollgewebe verwendet. Nach Isolierung der RNA und Herstellung der cDNA wurden mittels quantitativer Real-Time PCR verschiedene antioxidante und ROS generierende Gene gemessen. Dieselben Gene wurden in den ACH-3P Zellen, einer Zelllinie fusioniert aus Trophoblast- und Chorionkarzinomzellen, die unter verschiedenen Glukose- und Sauerstoffkonzentrationen kultiviert war, überprüft.

Zwei der untersuchten antioxidanten Gene zeigten in den diabetischen Plazentaprobe eine geringere Expression als im gesunden Kontrollgewebe. Zu den Veränderungen kam es in beiden Fällen in den Schwangerschaftswochen 8-10. Generell war unter Hyperglykämie eine verminderte Genexpression zu beobachten, wogegen unter Hyperoxie (21 % O₂) ein Trend zur Hochregulierung der antioxidanten Enzyme zu sehen war.

Es existieren noch keine vergleichbaren Studien zu antioxidanten Genen in diabetischen Frühschwangerschaften. Diese Arbeit zeigt, dass enzymatische Antioxidantien in diabetischen Schwangerschaften dereguliert sind, sowie den möglichen Zusammenhang zwischen Hyperglykämie, Hyperoxie und der Fehlregulierung der untersuchten Gene.

Abstract

Oxidative Stress is defined as an imbalance between antioxidant defence and production of Reactive Oxygen Species (ROS). In order to prevent oxidative stress, cells express antioxidant enzymes. In a normal pregnancy, particularly in the first trimester, the incidence of oxidative stress is enhanced and is important in the development of the embryo and the placenta. Pregnancies affected by Type-1 diabetes mellitus are associated with a higher level of oxidative stress, leading to complications such as abortion, pre-eclampsia, fetal malformations and pathological development of the placenta. Hyperglycemia and modified oxygen concentrations are playing a crucial role in the generation of oxidative stress. Some studies demonstrate increased oxidative stress in term placentae of diabetic women. The aim of this study is to analyze the expression of antioxidant enzymes in first trimester placentae of women with Type-1 diabetes compared to healthy controls. Furthermore, I wanted to investigate, if hyperglycemia and different oxygen concentrations alter antioxidant enzyme expression in placental cells.

First trimester placental tissue from women with Type-1 diabetes and healthy controls was used to isolate RNA. Expression of antioxidant enzymes was measured by Real Time quantitative PCR. The same genes were analysed in the trophoblast cell line ACH-3P, a cell line formed by the fusion of human first trimester trophoblasts and choriocarcinoma cells, cultivated under different glucose and oxygen concentrations.

Two of the examined antioxidant enzymes were reduced in diabetic placental tissue compared to healthy controls. In the trophoblast cellline, the expression of antioxidant enzymes was lower under hyperglycemia, whereas hyperoxia (21 % oxygen) induced a trend to an upregulation of these enzymes.

There are no comparable studies analyzing oxidative stress in early gestation in pregnancies complicated by Type-1 diabetes. The study demonstrates that enzymatic antioxidants are deregulated in diabetic pregnancies. Furthermore, I identified the correlation between hyperglycemia, hyperoxie and abnormal regulation of the antioxidant enzymes.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	III
Zusammenfassung	IV
Abstract	VI
Inhaltsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Oxidativer Stress	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 ROS.....	1
1.1.3 Entstehung von ROS.....	2
1.1.4 ROS und seine Funktionen	4
1.2 Gegenmechanismen	5
1.2.1 Enzymatische Antioxidantien.....	6
1.2.2 Nicht-enzymatische Antioxidantien.....	7
1.3 Typ 1 Diabetes	9
1.4 Hyperglykämie und oxidativer Stress	11
1.5 Die Plazenta	14
1.5.1 Die normale Plazentaentwicklung.....	15
1.5.2 Sauerstoffpartialdruck in der Plazenta.....	17
1.6 Glukosemetabolismus in der Plazenta	20
1.7 Oxidativer Stress und Schwangerschaft	22
1.8 T1D und ROS in der Schwangerschaft	24
1.9 Hypothese und Fragestellungen	25
1.9.1 Fragestellungen.....	25
1.9.2 Strategie	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Plazentaprobe	26
2.1.1 Plazentaprobenaufstellung	26

2.2	ACH-3P Zelllinie	27
2.2.1	Probenaufstellung – ACH-3P Zellen.....	27
2.3	cDNA Synthese	28
2.4	Real time quantitative PCR	28
2.4.1	Taq-Man Prinzip	28
2.4.2	Housekeeping-Gene.....	29
2.5	Auswertung und Statistik.....	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Ergebnisse der Plazentaprobe.....	31
3.2	Ergebnisse der ACH-3P-Zelllinie	39
3.2.1	Hyperglykämie.....	40
3.2.2	Ergebnisse O ₂	45
4	Diskussion	49
5	Literaturverzeichnis	52

Abkürzungsverzeichnis

AGE	Advanced Glycation Endproducts
ATP	Adenosin Triphosphat
BMI	Body Mass Index
C	Celsius
Ca	Calcium
CAT	Katalase
cDNA	complimentary Desoxyribonukleinsäure
COX	Cyclooxygenase
Ct	Cycle treshhold
Cu	Kupfer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GDM	Gestationsdiabetes
GLUT	Glukosetransporter
GPX	Gluthationperoxidase
GSH	Gluthation
GSR	Gluthationreduktase
GSSG	oxidiertes Gluthation
GST	Gluthation S-Transferase
HbA1c	glykiertes Hämoglobin
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor
HPRT	Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase
HX	Hypoxanthin
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
IUGR	intrauterine Wachstumsretardierung
Mn	Mangan
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF-κB	Nuklear Faktor Kappa B
NOX	NADPH Oxidase
O₂	Sauerstoff
O₂^{·-}	Superoxid Anion

PCR	Polymerase Chain Reaction
PKC	Proteinkinase C
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
p53	Protein 53
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
RPL30	Ribosomales Protein L30
SOD	Superoxiddismutase
SSW	Schwangerschaftswoche
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
T1D	Diabetes Mellitus Typ 1
XDH	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Entstehung von oxidativem Stress.	1
Abbildung 2: Die Entstehung von ROS in der Zelle.	2
Abbildung 3: Funktionsweise der enzymatischen Antioxidantien in der Zelle.	6
Abbildung 4: Stoffwechselwege, die durch Hyperglykämie in der Zelle verursacht werden..	11
Abbildung 5: Makroskopischer Aufbau der Plazenta.	14
Abbildung 6: Intervillöse pO ₂ Messung <i>in vivo</i>	17
Abbildung 7: Die uterinen Spiralarterien im ersten Trimenon und im frühen zweiten Trimenon.	18
Abbildung 8: Mögliche Effekte von Hypoxie auf Apoptose und Autophagie in Tropho- blastzellen.	19
Abbildung 9: Glukosetransport in der Plazenta.	20
Abbildung 10: Der Effekt von oxidativem Stress auf die plazentäre Glukoseaufnahme. ..	21
Abbildung 11: Expression der antioxidanten bzw. ROS generierenden Gene.	32
Abbildung 12: Expression von GPX1 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) vergli- chen mit gesunden Kontrollen (K)	33
Abbildung 13: Expression von GPX4 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) vergli- chen mit gesunden Kontrollen (K).....	33
Abbildung 14: Expression von SOD1 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) vergli- chen mit gesunden Kontrollen (K).....	34
Abbildung 15: Expression von SOD3 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) vergli- chen mit gesunden Kontrollen (K).....	34
Abbildung 16: Expression von GSR in Plazenten von diabetischen Müttern (D) verglichen mit gesunden Kontrollen (K).....	35
Abbildung 17: Expression von CAT in Plazenten von diabetischen Müttern (D) verglichen mit gesunden Kontrollen (K).....	35
Abbildung 18: Expression von NOX4 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) vergli- chen mit gesunden Kontrollen (K).....	36
Abbildung 19: Expression von NOX5 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) vergli- chen mit gesunden Kontrollen (K).....	36
Abbildung 20: Expression von XDH in Plazenten von diabetischen Müttern (D) verglichen mit gesunden Kontrollen (K).....	37
Abbildung 21: Expression von GPX3 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) vergli- chen mit gesunden Kontrollen (K).....	37
Abbildung 22: Expression von SOD2 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) vergli- chen mit gesunden Kontrollen (K).....	38
Abbildung 23: Der Effekt von Hyperglykämie (17,5 mM) auf enzymatische Antioxidantien in den ACH-3P Zellen.	41

Abbildung 24: Die Expression von GPX3 unter Hyperglykämie.	41
Abbildung 25: Die Expression von SOD2 unter Hyperglykämie.	42
Abbildung 26: Die Expression von SOD1 unter Hyperglykämie.	42
Abbildung 27: Die Expression von SOD3 unter Hyperglykämie.	43
Abbildung 28: Die Expression von GPX1 unter Hyperglykämie.	43
Abbildung 29: Die Expression von CAT unter Hyperglykämie.	44
Abbildung 30: Die Expression von antioxidanten bzw. ROS generierenden Genen unter unterschiedlichen O ₂ Konzentrationen.	45
Abbildung 31: Die Expression von GPX3 unter unterschiedlichen O ₂ Konzentrationen	46
Abbildung 32: Die Expression von SOD2 unter unterschiedlichen O ₂ Konzentrationen ...	46
Abbildung 33: Die Expression von SOD1 unter unterschiedlichen O ₂ Konzentrationen ...	47
Abbildung 34: Die Expression von GPX4 unter unterschiedlichen O ₂ Konzentrationen ...	47
Abbildung 35: Die Expression von CAT unter unterschiedlichen O ₂ Konzentrationen	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufstellung der Plazentaprobe.....	26
Tabelle 2: Aufstellung der mit Glukose behandelten ACH-3P Zellproben.....	27
Tabelle 3: Aufstellung der mit O ₂ behandelten ACH-3P Zellen.....	27
Tabelle 4: Pipettierschema Realtime PCR	29
Tabelle 5: Überblick über die PCR und Statistikergebnisse.....	31
Tabelle 6: Übersicht über die Ergebnisse der ACH-3P Zelllinie.....	40

1 Einleitung

1.1 OXIDATIVER STRESS

1.1.1 Definition

Oxidativer Stress wird definiert als Ungleichgewicht in der Produktion von ROS und der Fähigkeit, diese reaktiven Sauerstoffverbindungen zu bekämpfen (1, 2). Oxidativer Stress kann die Folge einer vermehrten ROS Produktion, oder einer Abnahme der Kapazität an Antioxidantien sein (1).

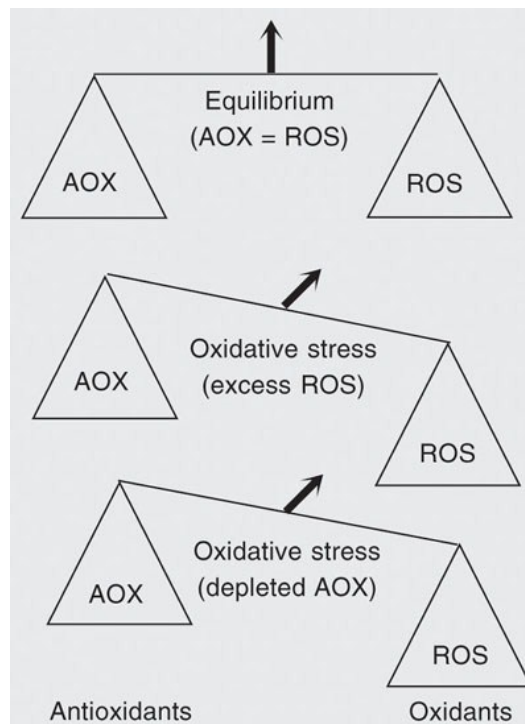


Abbildung 1: Die Entstehung von oxidativem Stress. AOX = Antioxidantien, ROS = Reactive Oxygen Species/Oxidativer Stress (3).

1.1.2 ROS

Die Abkürzung ROS steht für Reactive Oxygen Species. Das sind Sauerstoffverbindungen, die im Organismus zur Schädigung von Zellen, Lipiden und Proteinen

führen können und deshalb mit der Entstehung von zahlreichen Krankheiten in Verbindung gebracht werden (4).

Eine grundsätzliche Einteilung von ROS erfolgt in freie Radikale und in Nicht-Radikale. Freie Radikale sind Moleküle, die ein ungepaartes Elektron in ihrer Hülle enthalten und deshalb sehr reaktive Verbindungen sind (5).

Die häufigsten im menschlichen Organismus vorkommenden ROS sind: (4)

- Superoxid Anion O_2^-
- Hydroxyl Radikal OH^\cdot
- Wasserstoffperoxid H_2O_2

1.1.3 Entstehung von ROS

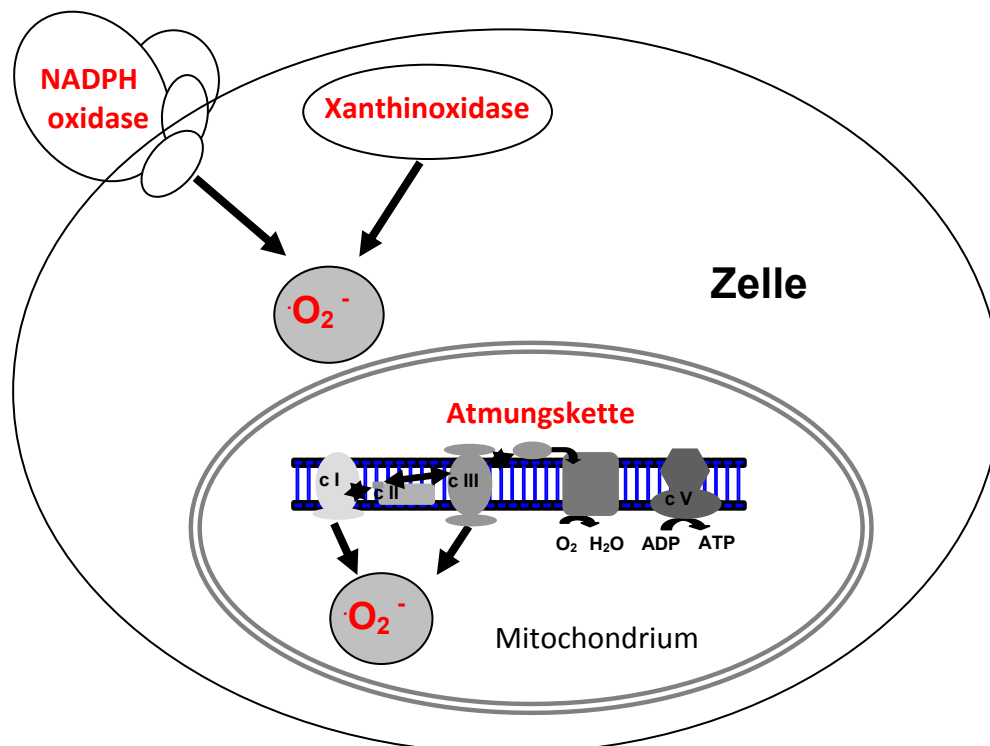


Abbildung 2: Die Entstehung von ROS in der Zelle. Der Hauptteil an ROS entsteht in der mitochondrialen Atmungskette. Im Zytosol wird ROS durch die NADPH Oxidase und die Xanthinoxidase generiert.

Atmungskette

ROS entstehen in den Mitochondrien im Zuge der Atmungskette. Sie gilt als Hauptquelle in der Bildung von oxidativem Stress. In der Atmungskette entsteht vorwiegend das freie Radikal O_2^- . Beim Elektronentransport zwischen den einzelnen Komplexen werden häufig Elektronen frei. Davon betroffen sind vor allem die Komplexe I und III. Die freien Elektronen reagieren mit O_2 , wodurch das Superoxid-anion O_2^- entsteht, welches als das am meisten vorkommende Radikal im menschlichen Organismus gilt (5).

Schätzungsweise treten ca. 2–3 % aller Elektronen aus der Atmungskette in den Mitochondrien aus, was für eine Frau mit ca. 60 kg Körpergewicht eine Superoxidproduktion von 320 mmol pro Tag ergibt (1).

Xanthin-Oxidoreduktase

Das Enzym Xanthin-Oxidoreduktase stammt aus dem Purinabbau und liegt in zwei verschiedenen Formen vor. Unter physiologischen Bedingungen findet man die NAD^+ abhängige Dehydrogenaseform XDH. Daneben existiert noch die O_2 abhängige Form XO (Xanthinoxidase). Die Xanthin-Oxidoreduktase wandelt Hypoxanthin in Xanthin um, in dem NAD zu $NADH$ reduziert wird. Aus Xanthin entsteht als Endprodukt im Purinabbau im nächsten Schritt Harnsäure. Unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. Hypoxie, kann das Enzym in seine O_2 abhängige Form XO umgewandelt werden. Bei der Produktion von Harnsäure aus Xanthin werden Superoxidradikale gebildet, da O_2 als Oxidants dient und zu O_2^- reduziert wird (1, 6).

NADPH Oxidase

Die NADPH Oxidase ist ein Enzymkomplex, der im Zytosol der Zellen vorliegt und durch Elektronentransport ROS produziert. Entdeckt wurde das Enzym in neutrophilen Granulozyten, wo es eine Rolle in der unspezifischen Abwehr spielt. Die NADPH Oxidase katalysiert den Elektronentransfer von $NADPH$ zu O_2 . Dadurch entsteht Superoxid (O_2^-) und H_2O_2 . Es existieren fünf Isoformen, diese werden NOX 1-5 genannt. Unter diabetischen Bedingungen kann die NADPH Oxidase durch AGE, Insulin und Angiotensin II stimuliert werden. Alle diese Stimuli können durch Hypoxie induziert werden (2). Im Kapitel 1.4 Hyperglykämie und oxidativer

Stress werden die molekularen Vorgänge in der Zelle, die unter Hyperglykämie zur vermehrten ROS Produktion führen, genauer erläutert.

1.1.4 ROS und seine Funktionen

In den Zellen des menschlichen Körpers werden ständig ROS produziert, da diese auch physiologische Funktionen erfüllen. Normalerweise wird durch verschiedene Abwehrmechanismen ein oxidatives Gleichgewicht gehalten. Erst wenn ein erhöhter Level an oxidativem Stress herrscht, kommt es zu schädlichen Vorgängen durch ROS (5).

Physiologische Funktionen

Unter homöostatischen Level ist es eine Aufgabe von ROS, redoxsensitive Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- κ B oder p53, regulieren die Expression von Zytokinen, die Differenzierung von Zellen, sowie auch die Apoptose. Normalerweise wird die Aktivität von NF- κ B durch eine inhibierende Untereinheit gehemmt. Unter vermehrten Stressbedingungen wird der Transkriptionsfaktor jedoch frei und führt zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie COX-2 oder TNF-alpha (5).

Eine weitere Aufgabe eines physiologischen ROS Spiegels ist die Aktivierung von Proteinkinasen. Je nachdem welche Gruppe von Proteinkinasen stimuliert wird, kann Zellproliferation, oder aber auch Apoptose die Folge sein (5).

Pathologische Funktionen

- Öffnen von Ionenkanälen

ROS sind in der Lage, Rezeptoren an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums zu aktivieren, die die Öffnung von Ionenkanälen stimulieren und zur Ausschüttung von Calcium führen. Die vermehrte intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration beeinflusst die Mitochondrienfunktion, die Membranpermeabilität und ist verantwortlich für viele pathologische Prozesse, wie z.B. der Proteinmodifikation (5).

- Lipidperoxidation

Hauptsächlich werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren von oxidativem Stress angegriffen. Es werden Peroxylradikale gebildet, in dem ein Hydroxylradikal ein Wasserstoffatom aus der Seitenkette von Fettsäuren abstrahiert. Diese Modifikation von Fettsäuren wird als Lipidperoxidation bezeichnet (5, 6).

- Proteinmodifikation

Aminosäuren, egal ob frei oder in Proteinen gebunden, sind ein Angriffspunkt für ROS. Die Aminosäuren Prolin, Arginin, Lysin und Threonin sind besonders gefährdet, von ROS modifiziert zu werden. Durch Oxidation der Seitenketten werden stabile Carbonylgruppen gebildet. Diese Aldehyde oder Ketone reagieren irreversibel mit demselben oder einem anderen Protein. Veränderungen in der Thiolgruppe der Aminosäure Cystein führen zur abnormen Proteinfaltung und somit zum Funktionsverlust, Ansammlung von Proteinen in der Zelle und in Folge zum Zelltod (5).

- DNA Veränderungen

Die Reaktion von ROS mit der Desoxyribose führt zu Strangbrüchen in der DNA. Weiters werden durch ROS Basen zerstört, was in Folge zu Mutationen und Fehlpaarungen führen kann (6).

1.2 GEGENMECHANISMEN

Der menschliche Körper verfügt über zahlreiche Vorgänge, die das oxidative Gleichgewicht erhalten. Antioxidantien stammen aus externen Quellen, z.B. aus Nahrungsmitteln, oder werden vom Körper selbst produziert.

Eine weitere Unterscheidung betrifft die Löslichkeit der antioxidanten Stoffe. Hydrophile Antioxidantien bekämpfen Radikale im Zytosol sowie im Blutplasma, wogegen fettlösliche die Zellmembran vor Schädigung schützen (2).

1.2.1 Enzymatische Antioxidantien

Enzymatische Antioxidantien sind in der Lage, reaktives Superoxid abzubauen. Im ersten Schritt wird durch das Enzym SOD Superoxid in H_2O_2 umgewandelt, das danach durch Katalasen und Peroxidasen zu O_2 und H_2O abgebaut wird (2).

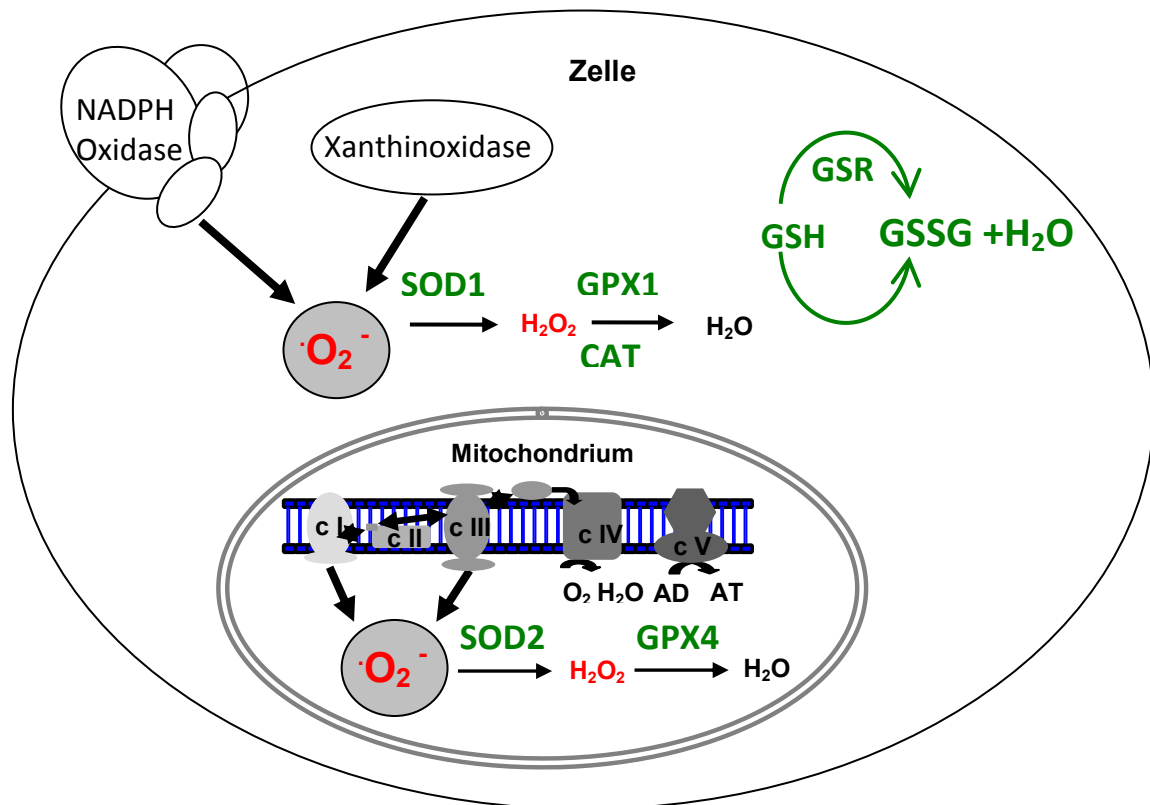


Abbildung 3: Funktionsweise der enzymatischen Antioxidantien in der Zelle. O_2^- wird durch SOD in H_2O_2 umgewandelt und durch CAT und GPX weiter zu H_2O abgebaut.

Superoxiddismutase

Wie bereits erwähnt, katalysiert das Enzym SOD die Reaktion von Superoxid zu H_2O_2 und O_2 . Es existieren drei Formen der SOD, die sich in ihrer Struktur und dem Vorkommen unterscheiden.

SOD1 enthält als Cofaktor Kupfer und Zink und wird deshalb auch häufig CuZnSOD genannt. Sie ist die cytosolische Isoform der SOD Familie, während SOD2 in den Mitochondrien lokalisiert ist. SOD2 benötigt für ihre Funktion Mangan, weshalb das Enzym auch MnSOD heißt (2).

Wie SOD1 benötigt auch SOD3 Kupfer und Zink als Cofaktor, wird aber auf Grund ihres extrazellulären Vorkommens EC-SOD genannt. SOD3 kommt in Plasma, Lymphe, Synovia und auch im Gewebe vor (7).

Unter physiologischen Bedingungen wird die Superoxid Produktion hauptsächlich durch die Enzyme SOD2 und SOD3 kontrolliert (2).

Katalase

Das Enzym CAT katalysiert den zweiten Schritt im Abbau von Sauerstoffradikalen. H_2O_2 wird dabei in H_2O und O_2 umgewandelt (2).

Glutathion System

Zum Glutathion System zählen die Enzyme GSR, GST und GPX. Im menschlichen Körper existieren mindestens vier GPX Isoenzyme, die Selen als Cofaktor benötigen. Die Funktion der GPX Enzyme liegt ebenso im Abbau von H_2O_2 . Am häufigsten ist GPX1, das auch die stärkste Aktivität im Abbau von H_2O_2 zeigt. Die Isoform GPX4 ist sehr effizient in der Elimination von Lipidperoxiden (2).

1.2.2 Nicht-enzymatische Antioxidantien

Der menschliche Organismus verfügt über zahlreiche nicht-enzymatische Antioxidantien. Zu den wichtigsten zählen folgende Stoffe:

Vitamin E

Vitamin E, auch Tocopherol genannt, gilt als fettlösliches Antioxidants. Von den chemischen Verbindungen gibt es verschiedene Untergruppen, wie z.B. Alpha-Tocopherol, das an der Zellmembran die ROS vermittelte Lipidperoxidation verhindert. Verringerte Vitamin E Spiegel wurden bei Schwangeren mit GDM nachgewiesen. Auch die Feten zeigten eine geringere Konzentration (2).

Vitamin C

Vitamin C, auch Ascorbinsäure genannt, schützt wie auch Vitamin E vor Lipidperoxidation indem Radikale wie Superoxid oder Hydroxyl reduziert werden. Auch hier wurden veränderte Konzentrationen in einer Studie mit GDM gefunden (2).

Gluthation

Gluthation gilt als das wichtigste intrazelluläre Antioxidants im menschlichen Organismus. Das Peptid, das aus den Aminosäuren Cystein, Glutamin und Glycin besteht, reagiert mit seiner Thiolgruppe leicht mit ROS und wirkt so reduzierend. Glutathion liegt als reduzierte (GSH) und oxidierte (GSSG) Form vor. Um GSSG wieder zu GSH zu reduzieren wird NADPH benötigt (2, 6).

In einigen Studien wurde der Gluthationspiegel von diabetischen mit gesunden Schwangeren verglichen. Die Ergebnisse waren kontrovers, da in einer Studie in der Diabetesgruppe verminderte GSH Werte gefunden wurden, in anderen Quellen aber von stark erhöhten GSH Werten gesprochen wird (2).

Harnsäure

In letzter Zeit werden auch der Harnsäure antioxidative Fähigkeiten zugeschrieben. Im letzten Schritt des Harnstoffzyklus wird aus Xanthin Harnsäure produziert. Das Enzym XO katalysiert diese Reaktion. So ist ein hoher Harnsäurelevel gleichzusetzen mit einer hohen ROS Konzentration, da die XO zu den ROS generierenden Enzymen zählt (2).

Übergangsmetalle

Selen, Zink und Kupfer gelten als antioxidative Nährstoffe, die zwar selbst keine antioxidanten Fähigkeiten besitzen, aber für viele andere Antioxidantien als Cofaktor benötigt werden (2).

1.3 TYP 1 DIABETES

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselkrankheit, ausgelöst durch einen Mangel an Insulin. Weniger als zehn Prozent der Erkrankten leiden an T1D. Bei dieser Form der Erkrankung werden die Beta-Zellen des Pankreas durch einen Autoimmunprozess zerstört. Dies geschieht meist im jugendlichen bis jungen Erwachsenenalter. Erst wenn ca. 80 % der Beta-Zellen zerstört sind, kommt es zur Hyperglykämie im Blut. Für T1D besteht eine genetische Prädisposition, wobei bestimmte HLA-Merkmale nachgewiesen werden konnten (8).

Merkmale des T1D: (8)

- Absoluter Insulinmangel
- Asthenischer Körperbau
- Meist rascher Beginn
- Junges Manifestationsalter
- Labile Stoffwechsellage
- Autoantikörper nachweisbar
- Zahl der Beta-Zellen stark vermindert
- Insulintherapie unbedingt erforderlich

Die andauernde Hyperglykämie führt zu schwerwiegenden Veränderungen im Körper. Durch Glykosylierung von Proteinen der Basalmembran in Gefäßen kommt es zu deren Verdickung und es entsteht eine Mikroangiopathie. Folgen dieser Mikroangiopathie sind die diabetische Nephropathie, die diabetische Retinopathie und die diabetische Neuropathie, welche auch für das diabetische Fußsyndrom verantwortlich ist. Durch die Veränderung der großen Gefäße, Makroangiopathie genannt, kommt es zum vorzeitigen Auftreten von Arteriosklerose, koronarer Herzkrankheit, Herzinfarkt, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und ischämischen Hirninfarkt bei Diabetikern (8).

Die diagnostischen Kriterien der American Diabetes Association zur Feststellung eines Diabetes Mellitus lauten: (8)

- Nüchtern Plasmaglukose: ≥ 126 mg/dl
- Gelegenheitsblutzucker: ≥ 200 mg/dl
- Oraler Glukose Toleranztest: 2 Stunden Wert ≥ 200 mg/dl

Laut einer Studie von Vargas et al. sind in den USA zwischen 0,2 % und 0,5 % aller Schwangeren pro Jahr von T1D betroffen. Es ist zwar nur ein geringer Prozentsatz, jedoch sind diese Schwangerschaften mit großen Risiken für Mutter und Kind verbunden. Nur eine optimale Insulintherapie und eine strenge Blutzuckerkontrolle können Komplikationen verhindern bzw. reduzieren. Bevor es eine adäquate Insulinsubstitution gab, war Unfruchtbarkeit eine sehr häufige Folge von T1D. Kam es trotzdem zu einer Schwangerschaft, lag die fetale Mortalität bei 60 % (9).

Viele Studien belegen den Zusammenhang zwischen T1D und Schwangerschaftskomplikationen. Al-Agha et al. zeigten, dass die Fehlgeburtsrate, die perinatale Sterblichkeit sowie das Auftreten von fetaler Makrosomie in T1D im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe deutlich erhöht ist (10).

Außerdem wurde auch die Struktur der Plazenta in T1D mit nicht diabetischen Kontrollen verglichen. Auch hier zeigten sich signifikante Unterschiede. Das Kapillarvolumen in der Plazenta war bei Müttern mit T1D deutlich erhöht (11).

Auch Nelson et al. untersuchten die Plazenta auf strukturelle Veränderungen bei T1D. Als Ergebnis zeigte sich ein vergrößertes intervillöses Volumen und anisomorphe Zotten. Außerdem konnte die Tendenz zu einem erhöhten Plazentagewicht bei T1D festgestellt werden (12).

1.4 HYPERGLYKÄMIE UND OXIDATIVER STRESS

Hyperglykämie verursacht durch zahlreiche Stoffwechselforgänge oxidativen Stress. Dazu zählen die AGE Bildung, der Polyolweg, die Aktivierung der Protein-kinase C, der Hexosaminweg, sowie die vermehrte ROS Produktion in den Mitochondrien.

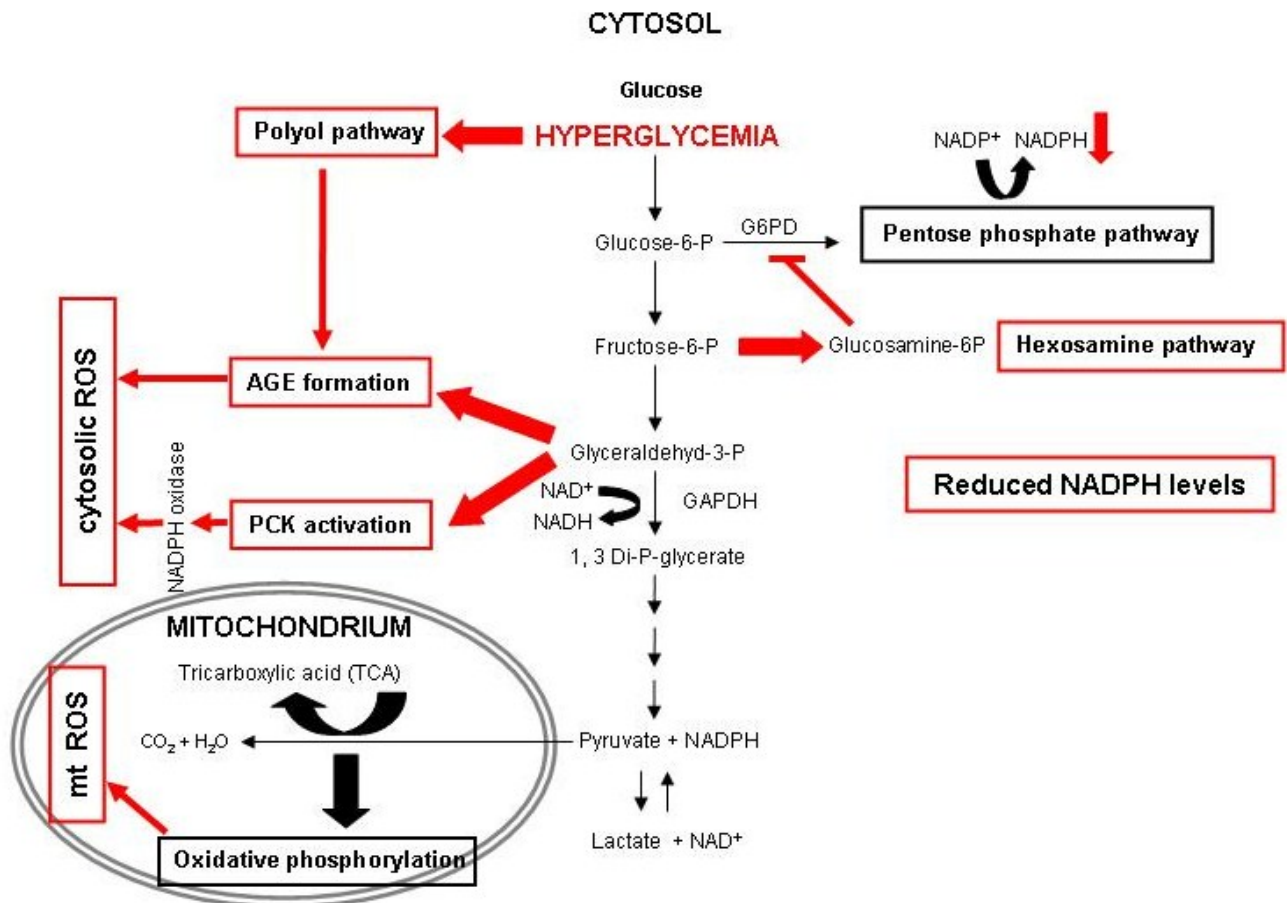


Abbildung 4: Stoffwechselwege, die durch Hyperglykämie in der Zelle verursacht werden (2).

AGE Bildung

Durch Interaktion von Glukose mit Proteinen entstehen die so genannten Advanced Glycation Endproducts (AGE). Sie sind eine bedeutende Quelle von freien Radikalen. AGE werden durch nicht enzymatische Anlagerung von Zucker an Proteinen, Lipiden und Nucleinsäuren gebildet. Dieser Vorgang passiert bei Diabetes

mellitus durch die erhöhte Konzentration von Glukosestoffwechselprodukten aus der Glykolyse und dem Zitratzyklus. Die Interaktion von Aldehydgruppen der Glukose mit Aminogruppen auf Proteinen führt zur Bildung einer Schiff'schen Base. Durch weitere komplexe Umlagerungsreaktionen entstehen über Amadori Produkte reaktive Carbonylverbindungen, die direkt mit Aminogruppen von intra- und extrazellulären Proteinen reagieren und so zur Produktion von AGE führen. AGE stimulieren die NOX Enzyme und sind somit verantwortlich für eine erhöhte ROS Bildung. Es gibt bereits zahlreiche Beweise, dass AGE und deren Rezeptor (RAGE) bei Diabetikern akkumulieren und zu den Folgen der Erkrankung beitragen. Auch in der Plazenta konnte ein erhöhter AGE Spiegel nachgewiesen werden (2).

Polyolweg

Unter hyperglykämischen Bedingungen wird durch das Enzym Aldose Reduktase in der Zelle aus Glukose vermehrt Sorbitol gebildet. Da der Polyalkohol Sorbitol die Zellmembran nicht passieren kann, akkumuliert er in der Zelle. Die vermehrte intrazelluläre Sorbitolkonzentration führt zu Zellschädigung. Außerdem wird bei dieser Reaktion der Cofaktor NADPH verbraucht, der für die Produktion der Antioxidantien wie z.B. Glutathion benötigt wird. Somit werden vermehrt ROS gebildet. Sorbitol kann weiters durch das Enzym Sorbitoldehydrogenase zu Fruktose oxidiert werden. Fruktose führt zu stärkerer Glykierung von Proteinen als Glukose, so werden wiederum vermehrt AGE gebildet (2).

Hexosaminweg

Durch Hyperglykämie wird Glukose vermehrt in den Hexosaminweg eingeschleust. Dieser Glukosestoffwechselweg nimmt Fruktose-6-Phosphat aus der Glykolyse um Glukosamin-6-Phosphat zu metabolisieren. Dieser gebildete Zucker hemmt ein essentielles Enzym des Pentosephosphatweges, einem alternativen Weg der Glykolyse, welcher die Hauptquelle für NADPH in Zellen darstellt. NADPH wird für die Aufrechterhaltung des Redox Gleichgewichtes benötigt, in dem GSSG zu GSH reduziert wird. Eine verminderte Konzentration an GSH bedeutet also ein Ansteigen der ROS-Produktion. Das Endprodukt des Hexosaminweges, UDP-N-Acetylglucosamin, führt zu einer Veränderung von zahlreichen

Transkriptionsfaktoren. Die durch Hyperglykämie verursachte Aktivierung des Hexosaminweges kann also zu Veränderungen in der Genexpression und Proteinfunktionen führen (2).

Proteinkinase C Aktivierung

Die Familie der PKC besteht aus vielen verschiedenen Isoformen, wobei einige durch Glukose aktivierbar sind, z.B. die Isoform PKC β . Aktivierte PKC Isoformen sind im Stande, eine Vielzahl an biologischen Prozessen zu induzieren. Dazu zählen Zellproliferation und –differenzierung, transmembranärer Ionentransport, Glukose- und Lipidstoffwechsel, oder auch Genexpression. PKC verstärkt die Aktivität der NADPH Oxidase, was wiederum über einen reduzierten Gluthationlevel zu erhöhtem oxidativen Stress führt (2).

ROS Produktion in den Mitochondrien

Wie bereits erwähnt, sind die Mitochondrien die Hauptquelle von ROS. In der Glykolyse wird Glukose zu Pyruvat umgewandelt und in die Mitochondrien transportiert. Unter hyperglykämischen Bedingungen findet diese Reaktion vermehrt statt. Anschließend wird es im Citratzyklus und der Atmungskette weiter verarbeitet, um schließlich ATP zu gewinnen. Durch frei werdende Elektronen kann das Superoxid Radikal in der Atmungskette entstehen (2).

1.5 DIE PLAZENTA

Die Plazenta ist ein scheibenförmiges Organ, das den Stoff- und Nährstoffaustausch zwischen Mutter und Fetus gewährleistet. Normalerweise ist sie ca. 2 cm dick und misst 20 cm im Durchmesser. Eine reife Plazenta hat ein Gewicht von ca. 500 g. (13, 14)

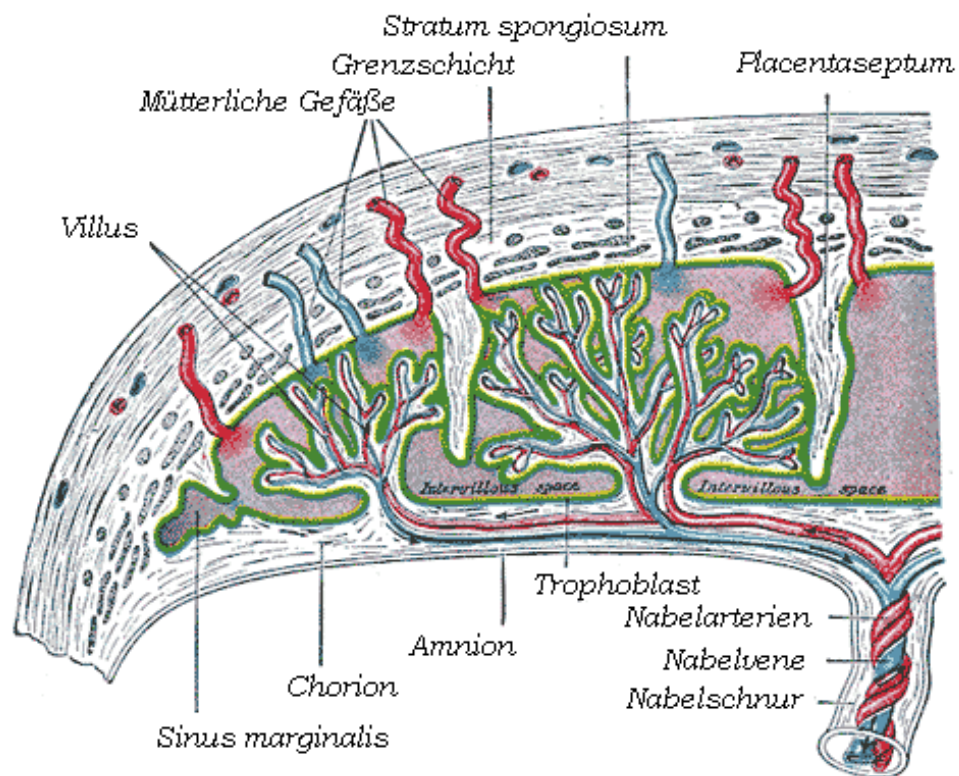


Abbildung 5: Makroskopischer Aufbau der Plazenta (15).

Fetale Seite

Die Chorionplatte repräsentiert die fetale Seite der Plazenta. Sie ist überzogen mit Amnion, welches aus einschichtigem Epithel und Mesenchym besteht. Die Nabelschnur inseriert meist in der Mitte der Chorionplatte (16).

Maternale Seite

Die mütterliche Oberfläche wird durch die Basalplatte gebildet. Sie besteht aus einer Mischung von extravillösen Trophoblastzellen und vielen verschiedenen Zellen aus der Dezidua, sowie aus Immunzellen, Makrophagen und Stromazellen (16).

Die wichtigsten Funktionen der Plazenta sind: (14)

- Erhaltung der biologischen Individualität des Fetus durch Trennung von der Mutter
- Gas- und Nährstoffaustausch durch Verbindung der fetalen Zottengefäße mit dem intervillösen Raum
- Nestschutz in den ersten Lebenswochen des Kindes durch das plazentagängige IgG
- Hormonproduktion: Humanes Choriongonadotropin (hCG), Progesteron, Östrogene und Humanes Placenta-Lactogen (HPL)
- Entgiftung

1.5.1 Die normale Plazentaentwicklung

Präimplantationsstadium

Am Tag 6-7 *post conceptionem* kommt es zum ersten Kontakt der Blastocyste mit dem Uterusepithel. Hier beginnt nun die Entwicklung der Plazenta (16).

Prälakunäres Stadium

Sobald die Blastozyste in das uterine Epithel eingedrungen ist, beginnt die Differenzierung von Trophoblastzellen zu multinukleären Syncytiotrophoblastzellen. Nur durch diese Zellen kann die Blastozyste das Uterusepithel durchwandern. Außerdem wird der Embryo von einem Mantel aus Syncytiotrophoblast umgeben und kann sich im Deziduastroma einbetten. In der zweiten Reihe und ohne Kontakt

zum mütterlichen Gewebe, finden sich nun die einzelligen Trophoblastzellen. Sie werden Cytotrophoblast genannt und können als Stammzellen fungieren (16).

Lakunäres Stadium

Acht Tage nach der Befruchtung bilden sich Hohlräume im Syncytiotrophoblast, die bald zu größeren Lakunen zusammenfließen. In diesem intervillösen Raum findet später der Stoffaustausch zwischen mütterlichem und fetalem Blut statt. Aus den verbleibenden Syncytiotrophoblastzellen entsteht später der Zottenbaum. Ab der Entwicklung der Lakunen werden drei Zonen in der Plazenta unterschieden (16):

1. Die Chorionplatte, die mit dem Embryo in Berührung ist.
2. Das Lakunensystem und der trabekuläre Syncytiotrophoblast, woraus der intervillöse Raum und der Zottenbaum entstehen.
3. Die Basalplatte, die mit dem Endometrium in Kontakt steht (16).

In diesem Stadium finden sich die ersten mütterlichen Blutzellen in den Lakunen. Mit der Invasion des Syncytiotrophoblasten im Endometrium kommt es zum Kontakt mit mütterlichen Kapillaren und dem oberflächlichen venösen Plexus. Durch Erosion dieser Gefäße kommt es zum Austritt des mütterlichen Blutes in die Lakunen. Um den 12. Tag *post conceptionem* gilt der Embryo als komplett in das Endometrium implantiert (16).

Villöses Stadium

Am 13. Tag beginnt sich der Zottenbaum zu entwickeln. Die ersten Primärzotten entstehen durch Einwachsung der Cytotrophoblastzellen in den Syncytiotrophoblast in Richtung Dezidua. Kurz darauf wächst auch das embryonale Mesenchym aus der Chorionplatte in die Trabekel ein und bildet den Kern der nun entstandenen Sekundärzotten (16).

Um den 20. Tag entwickeln sich, ausgehend vom Mesenchym, in den Teritärzotten die ersten plazentaren Blutgefäße. Tertiärzotten sind in der Lage, sich in Zottentypen mit verschiedenen Funktionen zu differenzieren (16).

1.5.2 Sauerstoffpartialdruck in der Plazenta

O₂ ist einer der entscheidenden Faktoren in der Trophoblastdifferenzierung und nur eine geringe Sauerstoffkonzentration gewährleistet die erfolgreiche Entwicklung des Embryos und der Plazenta (17).

Im ersten Trimenon beträgt der pO₂ im intervillösen Raum der Plazenta ca. 20 mmHg. Dieses hypoxische Milieu ist notwendig für Zellproliferation, Angiogenese und die embryonale Organentwicklung. Außerdem wird dadurch die Zahl von ROS und somit das Risiko von DNA Schäden verringert (18,19).

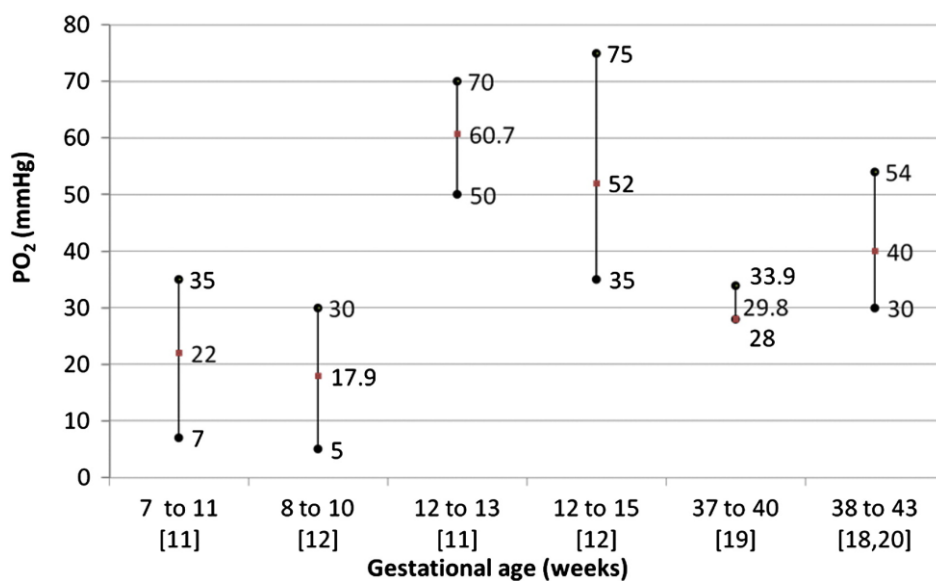


Abbildung 6: Intervillöse pO₂ Messung *in vivo*. Der pO₂ im intervillösen Raum wird als Minimum, Maximum und Mittelwert in den verschiedenen Schwangerschaftswochen zusammengefasst aus fünf *in vivo* Studien dargestellt (19).

Im oben beschriebenen lakunärem Stadium differenzieren sich extravillöse Trophoblastzellen zu einer endovaskulären und einer interstitiellen Zelllinie. Die endovaskulären Trophoblastzellen dringen in die uterinen Spiralarterien ein, prolifrieren und verschließen so das Endteil der Gefäße. Die Ernährung des Embryos erfolgt zu dieser Zeit histiotroph durch Sekretion der Endometriumdrüsen. Währenddessen wächst der interstitielle Zelltyp von außen in die Wand der Spiralarterien ein und macht die Gefäßwände inelastisch. Durch diese Vorgänge wird der Blutfluss in der frühen Plazenta reduziert. Der Gefäßumbau ist am stärksten im

Zentrum der Plazenta, somit setzt der Blutfluss zuerst in den terminalen Zonen ein (18,19).

Um die 11. Schwangerschaftswoche kommt es zum Untergang der endovaskulären Trophoblastzellen. Die Spiralarterien öffnen sich und mütterliches Blut fließt in den intervillösen Raum. Der pO_2 steigt plötzlich auf durchschnittlich 60 mmHg. Die Ernährung des Fetus erfolgt ab jetzt hämatotroph durch das mütterliche Blut. Mit dem erhöhten Blutfluss in der Plazenta steigt auch die Menge an oxidativem Stress (18).

Um die Plazenta- und Embryozellen optimal an die vorhandenen O_2 -Konzentrationen anzupassen, wird im ersten Trimenon vermehrt der Transkriptionsfaktor HIF-1 α gebildet. Damit sich die Zellen dem niedrigen Sauerstoffmilieu anpassen können, wird durch HIF-1 α die dafür notwendige Genexpression geregelt. Weiters ist der Transkriptionsfaktor für Zellproliferation und Apoptose zuständig, indem Gene wie z.B. p53 reguliert werden (19).

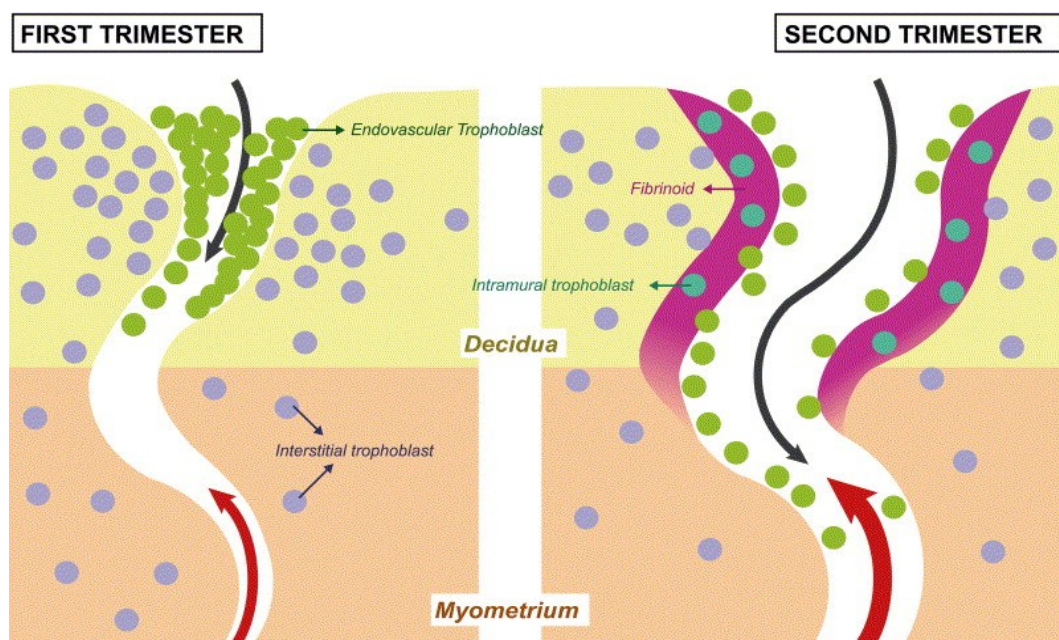


Abbildung 7: Die uterinen Spiralarterien im ersten Trimenon (links) und im frühen zweiten Trimenon (rechts). Der rote Pfeil zeigt die Richtung des Blutflusses, der schwarze Pfeil die Invasion der extravillösen Trophoblastzellen (20).

Um die problemlose Entwicklung des Embryos und der Plazenta zu garantieren, ist stets ein der Schwangerschaftswoche entsprechender pO_2 notwendig.

Tuuli et al. haben die wichtigsten Reaktionen der Plazenta und des Embryos auf veränderte O_2 Konzentrationen aus aktuellen *in vitro* Studien zusammengefasst (19).

- Hypoxie, Hyperoxie sowie auch Hypoxie-Reoxygenierung sind verknüpft mit Trophoblastveränderungen und Zelltod.
- Hypoxie führt zur gesteigerten Proliferation, aber zu verminderter Differenzierung im ersten Trimenon.
- Plazentazellen von Schwangeren mit Präeklampsie und Wachstumsretardierung reagierten verstärkt auf Hypoxie.
- Phänotypische Veränderungen der Plazentazotten auf Hypoxie und Hypoxie-Reoxygenierung können in Zusammenhang mit Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie gebracht werden.

Auch Apoptose und Autophagie sind Antworten des Trophoblasten auf Hypoxie (19, 21).

Eine gesteigerte Apoptose kann als Reaktion auf Hypoxie und oxidativen Stress gesehen werden (2, 21).

Studien zeigten, dass ROS zu vermehrten Konzentrationen an pro-apoptotischem p53 führt. Anti-apoptotische Gene waren jedoch nicht vermehrt exprimiert (21).

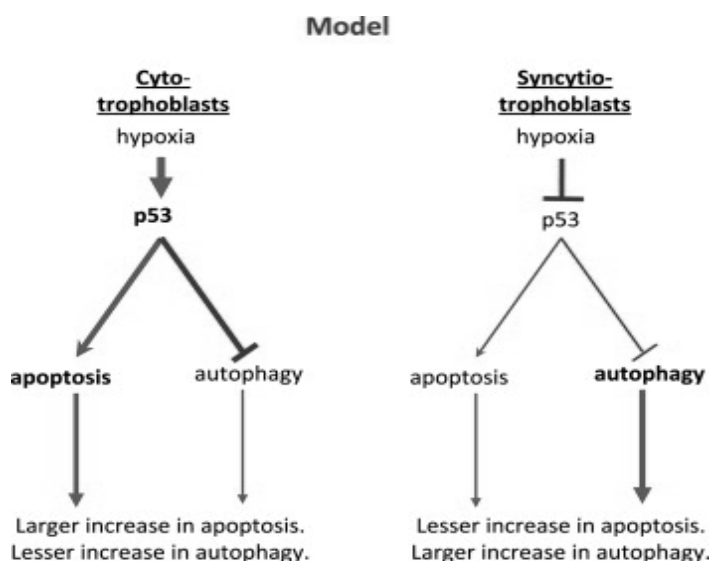


Abbildung 8: Mögliche Effekte von Hypoxie auf Apoptose und Autophagie in Trophoblastzellen (19).

1.6 GLUKOSEMETABOLISMUS IN DER PLAZENTA

Glukose ist die Hauptenergiequelle für Fetus und Plazenta und muss deshalb rasch verfügbar sein. Das erste Trimenon ist durch eine erhöhte Insulinsensitivität gekennzeichnet. Durch die anabolen Effekte des Insulins werden ausreichend Energie und Nährstoffe für das zweite und dritte Trimenon gespeichert. In der zweiten Hälfte der Schwangerschaft kommt es zunehmend zu einer Insulinresistenz mit verminderter Glukoseaufnahme im insulinsensitiven Gewebe der Mutter. So wird ein transplazentärer Glukosetransport zum Fetus garantiert, welcher täglich 30-50 g beträgt. Die Plazenta, als hoch stoffwechselaktives Organ, metabolisiert ungefähr die Hälfte der aus dem maternalen Blut gelieferten Glukose selbst. Nur 40-50 % werden dem Fetus geliefert. Um in den fetalen Kreislauf zu gelangen, muss die Glukose die Syncytiotrophoblastzellschicht passieren, die zwischen Plazentazotten und fetalen Kapillaren liegt. Durch spezielle Transportproteine, genannt GLUTs, kann die Aufnahme von Glukose ins Gewebe bewerkstelligt werden. Dieser Prozess geschieht mittels Diffusion auf Grund eines Konzentrationsunterschiedes. Es existieren viele GLUT Isoformen, wobei im trans-plazentären Glukosemetabolismus GLUT-1 eine wichtige Rolle spielt und in allen Zelltypen der Plazenta vorhanden ist (2). GLUT-1 ist, neben GLUT-3, ein insulinunabhängiger Glukosetransporter und somit verantwortlich für die Glukosebereitstellung in Zellen, die wesentlich auf Glukose angewiesen sind, um ihre Funktion zu erfüllen. Dazu zählen neben der Plazenta vor allem das ZNS und die Erythrozyten (22).

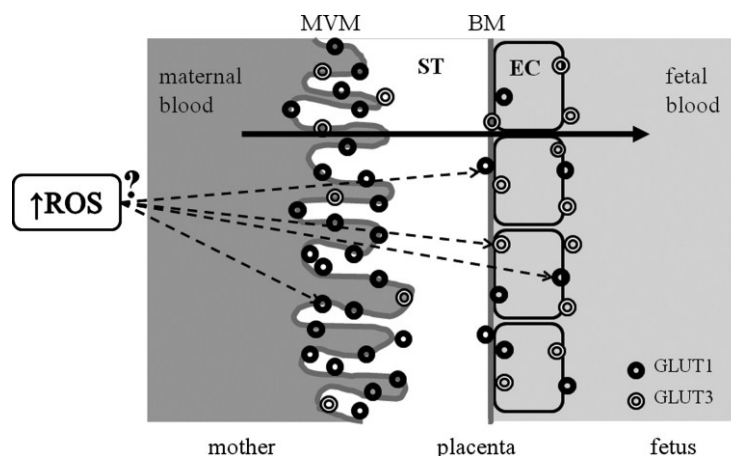


Abbildung 9: Glukosetransport in der Plazenta. Die Syncytiotrophoblastzellen stellen die Barriere zwischen fetalen Endothelzellen (EC) und der maternalen Seite dar. An der Mikrovillimembran (MVM) und an der Basalmembran (BM) befinden sich GLUT1 Transporter. GLUT3

sind vor allem an den EC lokalisiert. Erhöhte ROS könnten eine wichtige Rolle in der Regulation der GLUT Expression spielen, welche sich an der maternalen und fetalen Grenzfläche befinden (2).

Der Effekt von oxidativem Stress auf den Glukosemetabolismus in der Plazenta ist noch nicht genau geklärt. Es gibt aber zahlreiche Beweise, dass oxidativer Stress im nicht schwangeren Gewebe GLUT-1 und GLUT-3 abhängige Glukoseaufnahme beeinflusst. Deshalb wird angenommen, dass dieser Effekt auch in der Plazenta auftritt und somit die zum Fetus transportierte Glukosemenge verändert (2).

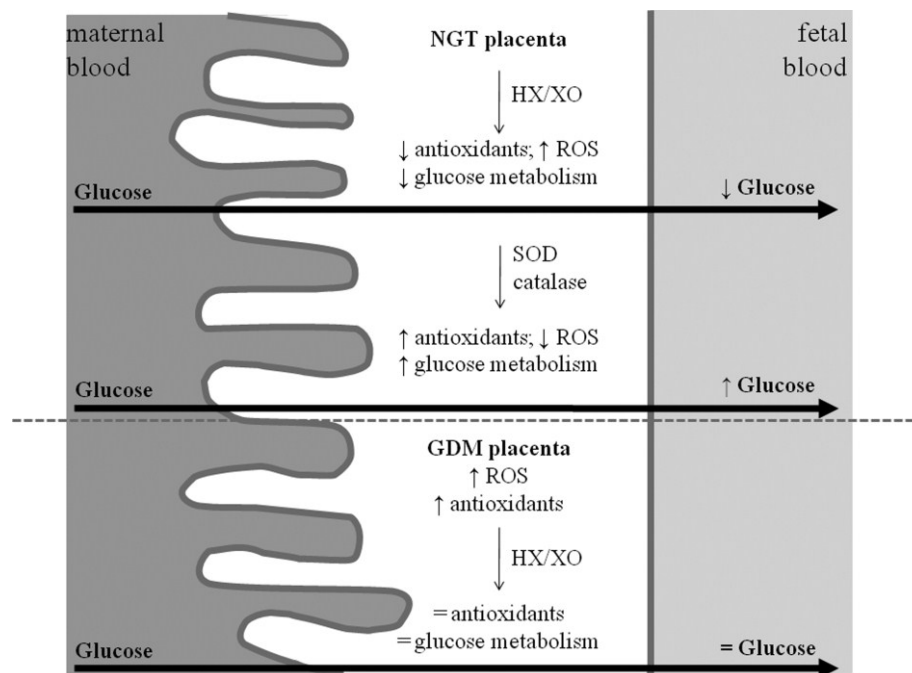


Abbildung 10: Der Effekt von oxidativem Stress auf die placentäre Glukoseaufnahme. In der nicht-diabetischen Plazenta führt HX/XO zu einer Verminderung an Antioxidantien, während die ROS Konzentration steigt. Auch der Glukosetransport zum Fetus ist verringert. Bei GDM zeigt HX/XO keinen Effekt auf ROS und den Glukosemetabolismus, was der vermehrten Expression an Antioxidantien zuschreibbar ist. In der Gegenwart von HX/XO bleibt der Glukosetransport zum Fetus unverändert (2).

1.7 OXIDATIVER STRESS UND SCHWANGERSCHAFT

Oxidativer Stress ist bereits ab Beginn der Schwangerschaft in der Plazenta und dem Fetus vorhanden. Er spielt eine Rolle bei der normalen Plazentaentwicklung, aber auch in vielen pathologischen Vorgängen. Außerdem findet im dritten Trimenon einer Schwangerschaft eine systemische Vermehrung von inflammatorischen Zellen wie Granulozyten und Monozyten statt. Diese Zellen sind alle in der Lage oxidativen Stress zu bilden (5).

Abort

Bei Fehlgeburten beginnt die Durchblutung der Plazenta bereits in einem früheren Stadium und erfolgt nicht nur in den Randbezirken. Der Grund dafür ist eine nur oberflächliche Invasion der extravillösen Trophoblastzellen in die Spiralarterien und ein unzureichender Verschluss. Im Serum und im Plazentagewebe von Frauen mit Fehlgeburten wurden vermehrt Lipidperoxide und modifizierte Proteine gefunden. Auch DNA Schäden konnten nachgewiesen werden. Vermehrte ROS Produktion sowie auch verminderte oder fehlerhafte ROS Abwehr bringen ein höheres Risiko von Fehlgeburten mit sich. Als weiterer Risikofaktor wird ein Mangel an Selen beschrieben, das für die Funktion der Glutathionperoxidase notwendig ist (5).

Präeklampsie

Viele Studien zeigen bereits den Zusammenhang zwischen Präeklampsie und erhöhtem oxidativen Stress. Als Ursache wird eine vaskuläre Komponente vermutet, da die Early-Onset-Präeklampsie mit einer fehlerhaften Spiralarterienkonversion in Zusammenhang gebracht wird. Es wird beschrieben, dass wiederholte Episoden von Ischämie, gefolgt von Reperfusion, mehr oxidativen Stress verursachen, als Hypoxie allein. Eine andere Quelle von ROS bei Präeklampsie sind Autoantikörper gegen den Angiotensin AT1 Rezeptor, welche die NADPH Oxidase stimulieren und so zur vermehrten ROS Bildung führen (5).

IUGR

IUGR (intrauterine Wachstumsretardierung) ist ein häufig auftretendes Problem in der Schwangerschaft und ist oft die Folge von Infektionen oder genetischen Defekten. Können diese Ursachen jedoch ausgeschlossen werden, muss die mütterliche Plazentazirkulation in Betracht gezogen werden. Wie bereits bei der Präeklampsie beschrieben, kann die physiologische Umwandlung der uterinen Spiralarterien durch oxidativen Stress gefährdet sein und somit zu einer Unterversorgung des Feten mit anschließender IUGR führen (5).

Membraninstabilität

Oxidativer Stress wird auch mit proteolytischem Abbau von Kollagenfasern in Zusammenhang gebracht. Die Folge davon ist eine vorzeitige Ruptur von Chorion- und Amniongewebe (5).

Organogenese

Lappas et al. beschreiben den Zusammenhang von oxidativem Stress und der embryonalen Organogenese. Die Regulation der Apoptose zur richtigen Zeit und an der richtigen Stelle kann durch ROS gestört sein (2).

Fetale Missbildungen

Eine erhöhte Konzentration an ROS, sowie verminderte Mengen an Antioxidantien, werden auch mit fetalen Missbildungen in Beziehung gebracht. Wie bereits beschrieben, ist für die Organogenese ein korrekter Ablauf der Apoptose notwendig. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass ROS zu vermehrter Apoptose führen kann. Fetale Missbildungen werden vor allem bei vorbestehendem Diabetes beobachtet, betrifft also oft Frauen mit T1D. In Experimenten waren Herzfehler und Neuralrohrdefekte die am häufigsten auftretenden Missbildungen (2).

Endotheliale und vaskuläre Dysfunktion

Zur normalen Entwicklung der Plazenta gehört eine stark gesteigerte Angiogenese und Vasodilatation, um den vermehrten Blutfluss in der Schwangerschaft zu gewährleisten, der für das fetale Wachstum notwendig ist. ROS sind in der Lage, die

Angiogenese und die Gefäßreaktivität zu beeinflussen. In Schwangerschaften mit diabetischen Bedingungen wurden in den Plazenta- und Nabelschnurgefäßen strukturelle Veränderungen nachgewiesen, die gemeinsam mit anderen metabolischen Veränderungen bei Diabetes zu Veränderungen in der Ernährung und Sauerstoffversorgung des Feten führen können (2).

1.8 T1D UND ROS IN DER SCHWANGERSCHAFT

Einige Studien beweisen eine Veränderung in der Konzentration von antioxidanten Enzymen in Plazenten des dritten Trimenons mit diabetischen Bedingungen. Diese Enzyme sind dabei entweder hochreguliert, um die vermehrten ROS abzufangen, oder auch downreguliert, durch die überschießende ROS Produktion.

Kinalski et al. untersuchten die Menge an antioxidanten Enzymen und Lipidperoxidationsprodukten im Nabelschnurblut und in den Terminplazenten von schwangeren Frauen mit T1D und Gestationsdiabetes im Vergleich zu gesunden Schwangeren. In der T1D Gruppe wurde eine signifikante Abnahme von SOD1 festgestellt, sowie ein Anstieg von Glutathion (23,24).

In einer anderen Studie zu oxidativen Stress in der Schwangerschaft wurde eine erhöhte Expression von SOD2 im späten Plazentagewebe von diabetischen Müttern als mögliche Antwort auf eine vermehrte ROS Produktion gefunden (25).

1.9 HYPOTHESE UND FRAGESTELLUNGEN

Wie bereits beschrieben, belegen einige Studien, dass bei mütterlichem T1D am Ende der Schwangerschaft unterschiedliche Konzentrationen an antioxidanten Enzymen vorliegen, im Vergleich zu nichtdiabetischen Müttern.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob es bereits im ersten Trimenon zu einer veränderten Genexpression kommt.

Als nächstes soll die mögliche Ursache für die veränderte Expression der untersuchten Gene identifiziert werden, wobei eine Trophoblastzelllinie erhöhten Glukose- und Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt wird und die Auswirkungen auf die oben genannten Gene untersucht wird.

1.9.1 Fragestellungen

- Kommt es in der Plazenta von Frauen mit T1D bereits im ersten Trimenon zu einem erhöhten Level an oxidativen Stress?
- In welcher Schwangerschaftswoche kann ein Unterschied im Vergleich zu gesunden Frauen festgestellt werden?
- Liegt die Ursache für die vermehrte ROS Produktion in einer veränderten Konzentration von O₂ oder Glukose?

1.9.2 Strategie

Mittels Real-Time PCR wurden 8 antioxidante Gene (SOD1, SOD2, SOD3, GPX1, GPX3, GPX4, CAT, GSR) und 4 ROS generierende Gene (XDH, NOX1, NOX4, NOX5) im Plazentagewebe des ersten Trimenons von diabetischen Frauen mit gesunden Kontrollen verglichen. Diese Gene wurden wieder mittels Real-Time PCR in der mit O₂ und Glukose kultivierten ACH-3P Zelllinie weiter untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 PLAZENTAPROBEN

Die Plazentaprobe aus dem ersten Trimenon wurden von der Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Medizinischen Universität Graz zur Verfügung gestellt. Für diese Arbeit wurden 14 Proben von Frauen mit T1D und 12 Proben von gesunden Frauen verwendet. Die Plazentaprobe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, die total RNA mittels Trizol isoliert und anschließend 2 µg der isolierten RNA für die cDNA Synthese verwendet.

Um festzustellen, in welcher Schwangerschaftswoche es zu Veränderungen in der Expression der antioxidanten bzw. ROS generierenden Gene bei Müttern mit T1D im Vergleich zu den gesunden Kontrollen kommt, wurden die Proben in die zwei Gruppen SSW 6-7 und SSW 8-10 geteilt.

2.1.1 Plazentaprobenaufstellung

Tabelle 1: Aufstellung und Charakterisierung der Plazentaprobe.

Kriterien	T1D	Kontrollen
Schwangerschaftswoche 6-7	n=5	n=4
Schwangerschaftswoche 8-10	n=9	n=7
HbA1c	7,25 ± 0,70	≤6
Mütterlicher BMI [kg/m ²]	23,2 ± 1,9	24,5 ± 2,3
Mütterliches Alter	22 – 38	21 – 40

2.2 ACH-3P ZELLINIE

Im zweiten Versuch sollen Hyperglykämie und Hypoxie bzw. Hyperoxie als mögliche Ursache für die veränderte Expression der antioxidanten und ROS generierenden Gene untersucht werden.

Dafür wurde die Trophoblastzelllinie ACH-3P verwendet. Diese wurde durch Fusion von Trophoblastzellen aus dem ersten Trimenon und einer Chorionkarzinomzelllinie (AC1-1) generiert. Die ACH-3P Zellen wurden für sechs Tage unter verschiedenen Sauerstoff- und Glukosekonzentrationen kultiviert und danach total RNA mittels Trizol isoliert. Die Glukosekonzentrationen betragen 10 mM (Kontrollgruppe), 17,5 mM und 25 mM, die O₂ Konzentrationen 2,5 %, 5 %, 8 %, 12 % und 21 % (26). 2 µg dieser bereits vorbereiteten RNA wurden für die cDNA Synthese verwendet.

2.2.1 Probenaufstellung – ACH-3P Zellen

Tabelle 2: Aufstellung der mit Glukose behandelten ACH-3P Zellen. (K) = Kontrollgruppe.

Glukosekonzentration	Anzahl
10 mM (K)	n=3
17,5 mM	n=3
25 mM	n=3

Tabelle 3: Aufstellung der mit O₂ behandelten ACH-3P Zellen.

O ₂ Konzentration	Anzahl
2,5 %	n=2
5 %	n=3
8 %	n=2
12 %	n=7
21 %	n=5

2.3 cDNA SYNTHESE

Als Ausgangsmaterial für die Real-Time PCR wird cDNA (complimentary DNA) benötigt. Dabei wird mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

Von jeder Probe wurden 2 µg cDNA hergestellt. Dafür musste zuerst die Konzentration jeder RNA photometrisch bestimmt und anschließend 2 µg RNA mit H₂O auf insgesamt 20 µl aufgefüllt werden. Als nächster Schritt wurde der Master Mix I hergestellt. Dieser besteht aus 2 µl Random Hexamer Primer (Fermentas, Germany) und 2 µl dNTP (Qiagen Hilden, Germany) für jede Probe. Davon wurden zu jedem Ansatz 4 µl gegeben. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 65° C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Danach wurden zu jeder Probe 14 µl Mastermix II pipettiert, welcher 8 µl First Strand Buffer (Invitrogen, CA, USA), 4 µl DTT (Invitrogen, CA, USA) und 2 µl RNase Inhibitor (Invitrogen, CA, USA) enthält. Dieses Reaktionsgemisch wurde für zwei Minuten bei 25° C inkubiert. Zu jedem Ansatz wurden anschließend 2 µl SuperScript II (Invitrogen, CA, USA) gegeben. Das Gesamtvolumen jeder Probe betrug nun 40 µl. Als letzter Schritt wurde der Reaktionsansatz für zehn Minuten bei 25° C und für 50 Minuten bei 42° C inkubiert. Bei diesem Schritt wurde die cDNA synthetisiert.

2.4 REAL-TIME QUANTITATIVE PCR

Die Real-Time PCR funktioniert nach dem Prinzip der klassischen PCR, jedoch kann dabei durch die Messung von Fluoreszenzfarbstoffen während eines Zyklus neben der Vervielfältigung der DNA auch eine Quantifizierung erfolgen. Man erhält relative Werte, die auf ein Housekeeping Gen normalisiert werden (27).

2.4.1 Taq-Man Prinzip

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurden Taq-Man Sonden verwendet. Dabei befindet sich am 5'Ende der Reporter und am 3'Ende der Quencher. Kommt es zur Verlängerung des Stranges durch die Polymerase, werden Reporter und Quencher getrennt, sind nicht mehr in unmittelbarer Nähe und der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das gemessen wird.

2.4.2 Housekeeping Gene

Zur Normierung der Expression der antioxidanten bzw. ROS generierenden Gene wurden die Housekeeping Gene RPL30 und HPRT verwendet. Housekeeping Gene sind nicht regulierte und konstant in jeder Zelle exprimierte Gene.

RPL30 codiert für ein ribosomales Protein der 60S Untereinheit der Ribosomen (28), während HPRT (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase) eine zentrale Rolle im Purinstoffwechsel spielt (29).

Die Ansätze für die Real-Time PCR wurden nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

Tabelle 4: Pipettierschema Real-Time PCR.

	Einzelansatz	Duplikatansatz	Gesamt + 10%
TaqMan Universal Mastermix (Applied Biosystems, CA, USA)	10 µl	20 µl	22 µl
Aqua dest. (Ambion, TX, USA)	4 µl	8 µl	8,8 µl
Taq Man Gen Expressions Assay (Applied Biosystems, CA, USA)	1 µl	2 µl	2,2 µl
cDNA	5 µl	10 µl	11 µl
Gesamtvolumen	20 µl	40 µl	44 µl

Die Ansätze wurden für jedes Gen in Duplikaten angesetzt und zusätzlich 10 % berechnet. Weiters wurde eine Non Template Control mit H₂O angesetzt, um Verunreinigungen durch DNA auszuschließen. Für jede Probe wurden pro Ansatz 20 µl des Reaktionsgemisches in eine 96 Well Platte pipettiert.

Die Real-Time quantitative PCR wurde am Thermocycler AB7900 Syllabus am Zentrum für Medizinische Forschung Graz durchgeführt. Für jeden Lauf wurden folgende Einstellungen gewählt:

- 1. Phase:** 2 Minuten bei 50° C
- 2. Phase:** 10 Minuten bei 95° C
- 3. Phase:** 40 Zyklen für je 15 Sekunden bei 95° C und 1 Minute bei 60° C

Das Ergebnis jedes PCR-Laufes ist der so genannte Ct-Wert. Ct steht für Cycle Treshold und beschreibt, nach wie vielen Zyklen sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt. Diese Zykluszahl liegt im exponentiellen Bereich der Vermehrung. Je mehr DNA in der Probe vorhanden ist, desto niedriger ist der Ct-Wert.

2.5 AUSWERTUNG UND STATISTIK

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der $\Delta\Delta$ Ct Methode. Damit kann die Genexpression im Verhältnis zum Referenzgen mit Formeln berechnet werden. Als Ausgangswert der Berechnungen dient der Ct Wert, der am Ende jedes Real-Time PCR Laufes durch die Software automatisch ermittelt wird. Zur Berechnung wurde Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA) verwendet.

Zuerst wurde der Mittelwert der Ct-Werte aus beiden Ansätzen jeder Probe berechnet. Als nächstes wurde der Δ Ct-Wert ermittelt, indem die Differenz der Ct-Werte aus Ziel- und Housekeeping Gen gebildet wurde. Durch Subtraktion des Δ Ct-Wertes der Kontrollgruppe vom Δ Ct-Wert der Zielgruppe erhält man den $\Delta\Delta$ Ct-Wert. Aus diesem Wert wurde durch die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ der Foldchange-Wert zur einfacheren Darstellung berechnet. Bei einem Foldchange >1 , ist mehr Zielgen in der Probe vorhanden als in der Kontrollgruppe.

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc. Chicago, USA) erstellt. Dafür wurden die Δ Ct Werte verwendet. Zur graphischen Darstellung der Δ Ct- und Foldchange-Werte wurden Boxplots erstellt, um die Streuung der Daten übersichtlich zu zeigen. Die Ergebnisse der Plazentaprobe wurden mit einem Two-Way-Anova Test verglichen, gefolgt von der Holm-Sidak Methode als Post-Hoc Test. Mittels T-Test wurden die mit 10mM und 17,5 mM Glukose kultivierten ACH-3P Zellen miteinander verglichen, während ein One-Way-Anova Test für die mit O_2 behandelten Zellen herangezogen wurde. Die Ergebnisse sind statistisch signifikant wenn $p \leq 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 ERGEBNISSE DER PLAZENTAPROBEN

Im ersten Versuch wurde Plazentagewebe von Schwangeren mit T1D (n=14) mit gesunden Kontrollen (n=11) verglichen. Die Proben wurden für die Auswertung in die zwei Gruppen SSW 6-7 und SSW 8-10 geteilt.

Tabelle 5: Überblick über die PCR und Statistikergebnisse. Die Spalte Expression zeigt, ob das Gen mittels Real-Time PCR detektierbar war. Die dritte Spalte gibt einen Überblick über die statistische Signifikanz der Ergebnisse.

Gen	Expression	Signifikanz SSW 6-7	Signifikanz SSW 8-10
GPX1	+	-	-
GPX3	+	-	+
GPX4	+	-	-
SOD1	+	-	-
SOD2	+	-	+
SOD3	+	-	-
GSR	+	-	-
CAT	+	-	-
XDH	+	-	-
NOX1	-	-	-
NOX4	+	-	-
NOX5	+	-	-

Bis auf das ROS generierende Gen NOX1 waren alle Gene mittels Real-Time PCR detektierbar. Da das Housekeeping Gen RPL30 nicht in allen Proben messbar war, wurden alle Ergebnisse auf das Housekeeping Gen HPRT normiert.

Statistisch signifikant waren unter den antioxidanten Genen GPX3 ($p = 0,030$) und SOD2 ($p = 0,023$). Die Veränderung in der Genexpression zwischen der diabetischen Gruppe und den Kontrollen war bei beiden Genen in den SSW 8-10 zu messen.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Expression aller untersuchten Gene im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den SSW 8-10 kommt es zu einer verminderten Expression von GPX3. Auch für SOD2 konnte in dieser Zeit eine deutlich reduzierte Konzentration festgestellt werden.

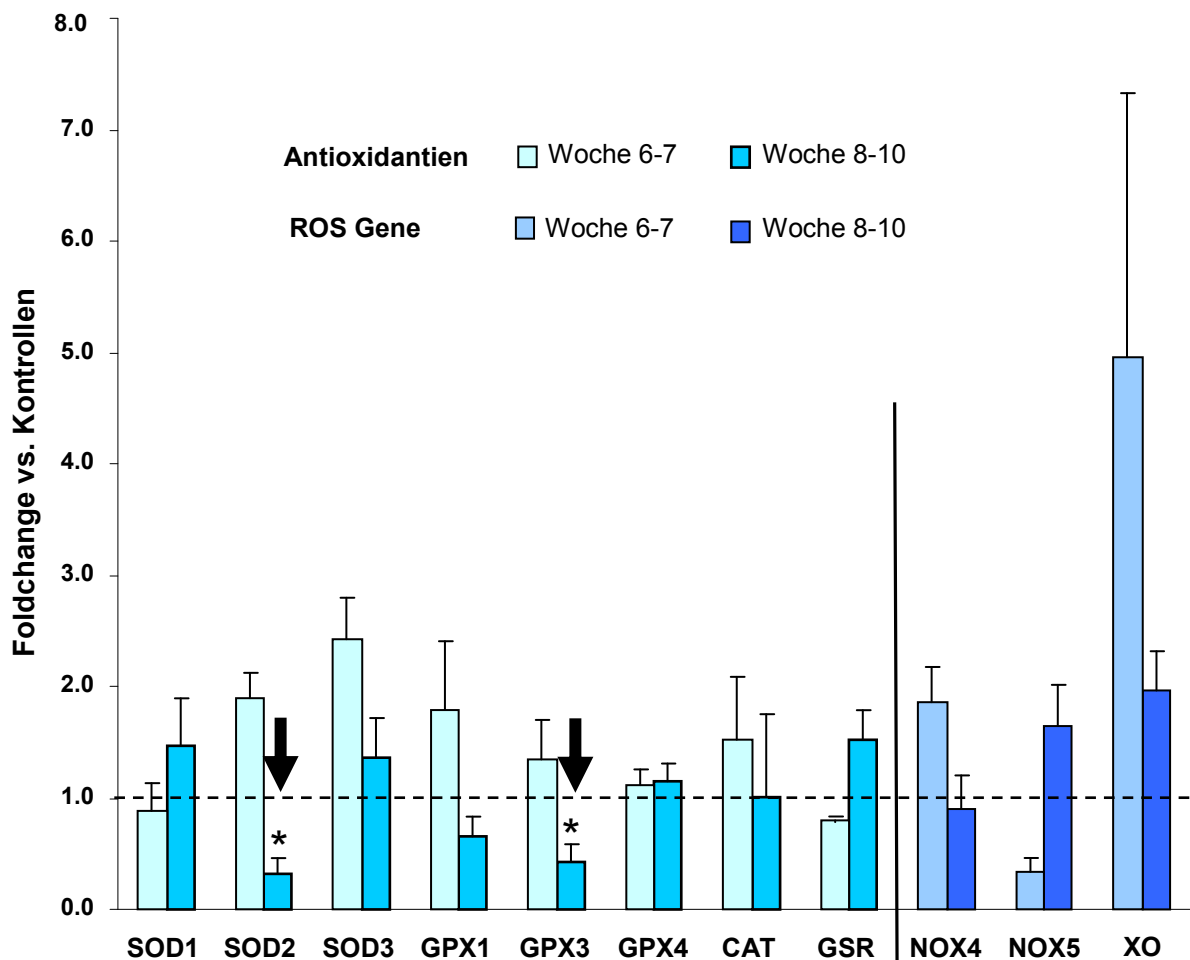


Abbildung 11: Expression der antioxidanten bzw. ROS generierenden Gene in den SSW 6-7 und 8-10. Die Kontrollen wurden auf 1 gesetzt.

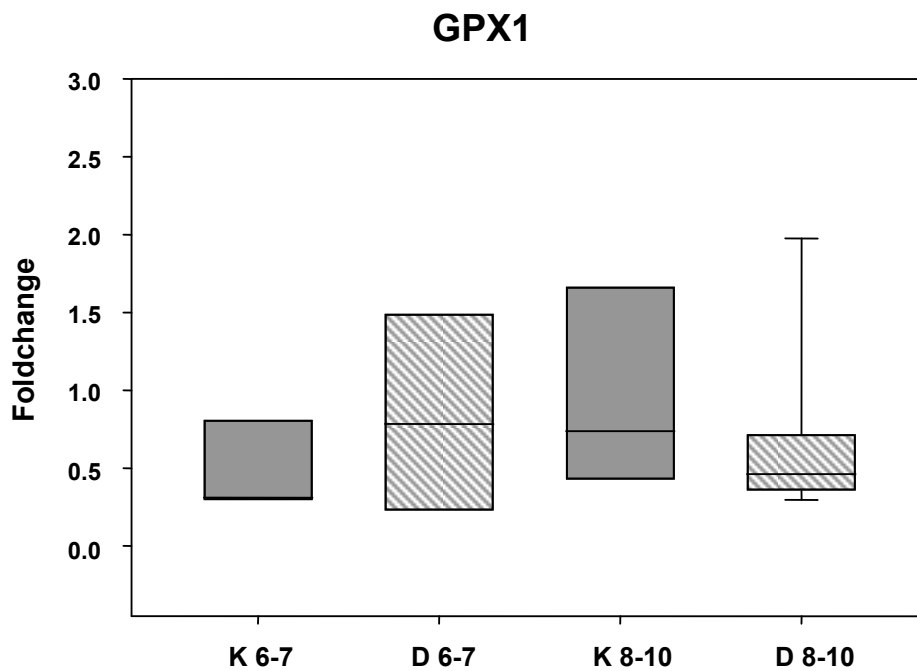


Abbildung 12: Expression von GPX1 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) verglichen mit gesunden Kontrollen (K) in den SSW 6-7 und 8-10. Der Mittelwert der Kontrollen aus der 8.-10. SSW (K 8-10) wurde auf 1 gesetzt.

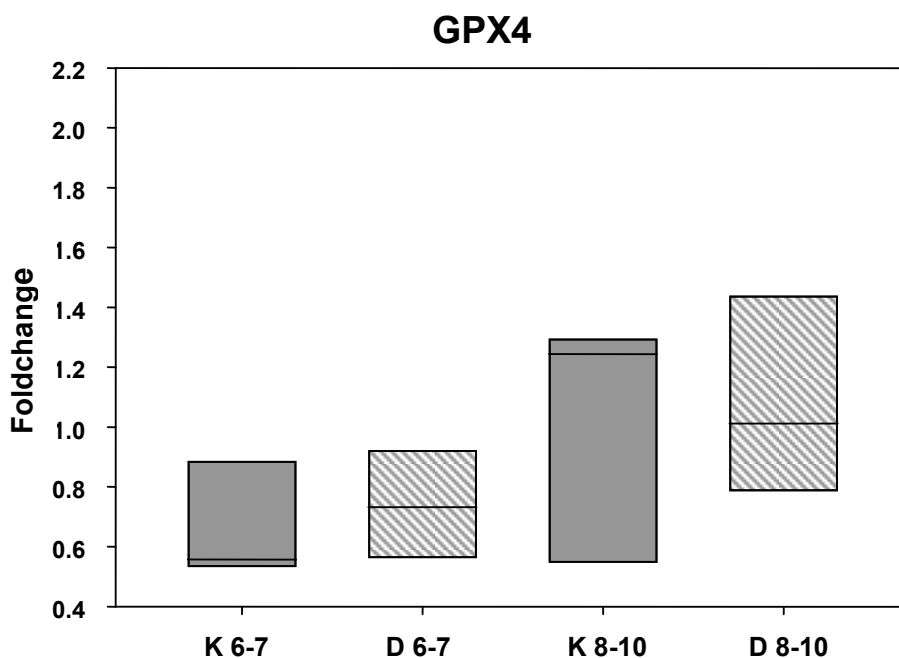


Abbildung 13: Expression von GPX4 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) verglichen mit gesunden Kontrollen (K) in den SSW 6-7 und 8-10. Der Mittelwert der Kontrollen aus der 8.-10. SSW (K 8-10) wurde auf 1 gesetzt.

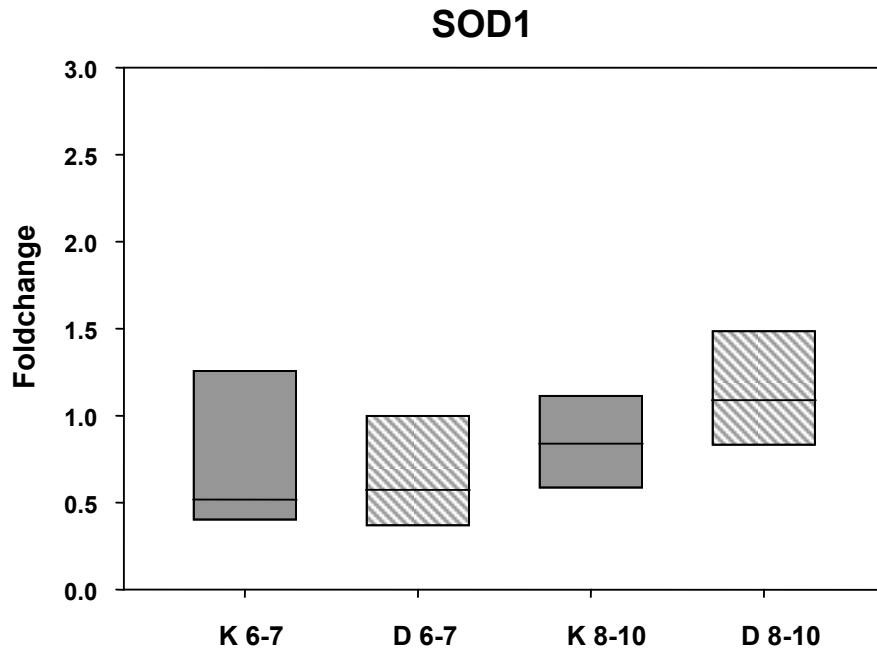


Abbildung 14: Expression von SOD1 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) verglichen mit gesunden Kontrollen (K) in den SSW 6-7 und 8-10. Der Mittelwert der Kontrollen aus der 8.-10. SSW (K 8-10) wurde auf 1 gesetzt.

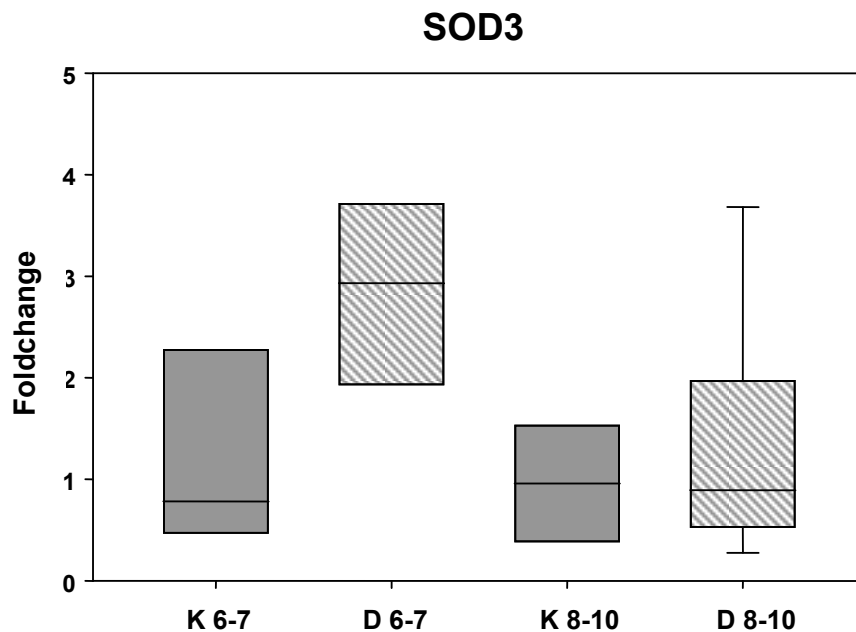


Abbildung 15: Expression von SOD3 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) verglichen mit gesunden Kontrollen (K) in den SSW 6-7 und 8-10. Der Mittelwert der Kontrollen aus der 8.-10. SSW (K 8-10) wurde auf 1 gesetzt.

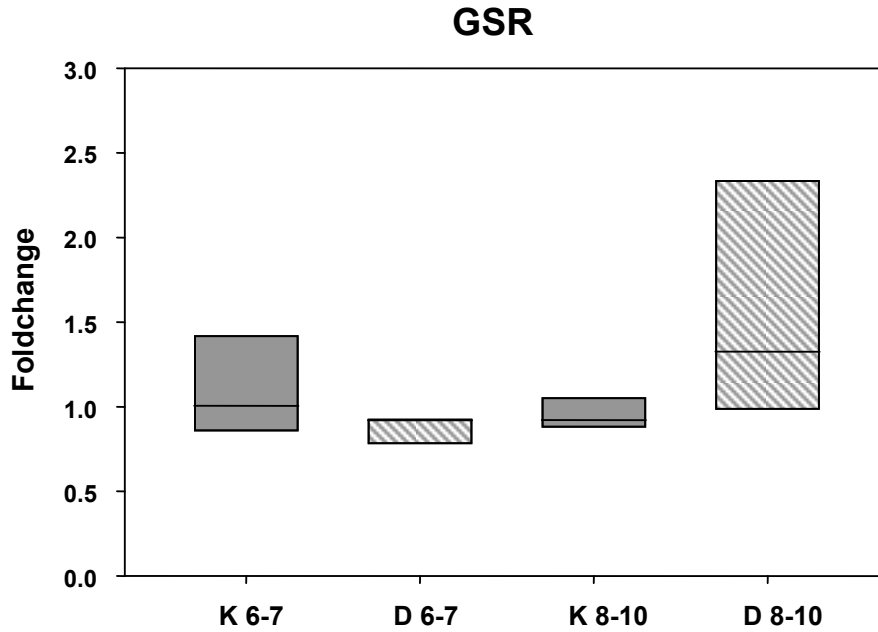


Abbildung 16: Expression von GSR in Plazenten von diabetischen Müttern (D) verglichen mit gesunden Kontrollen (K) in den SSW 6-7 und 8-10. Der Mittelwert der Kontrollen aus der 8.-10. SSW (K 8-10) wurde auf 1 gesetzt.

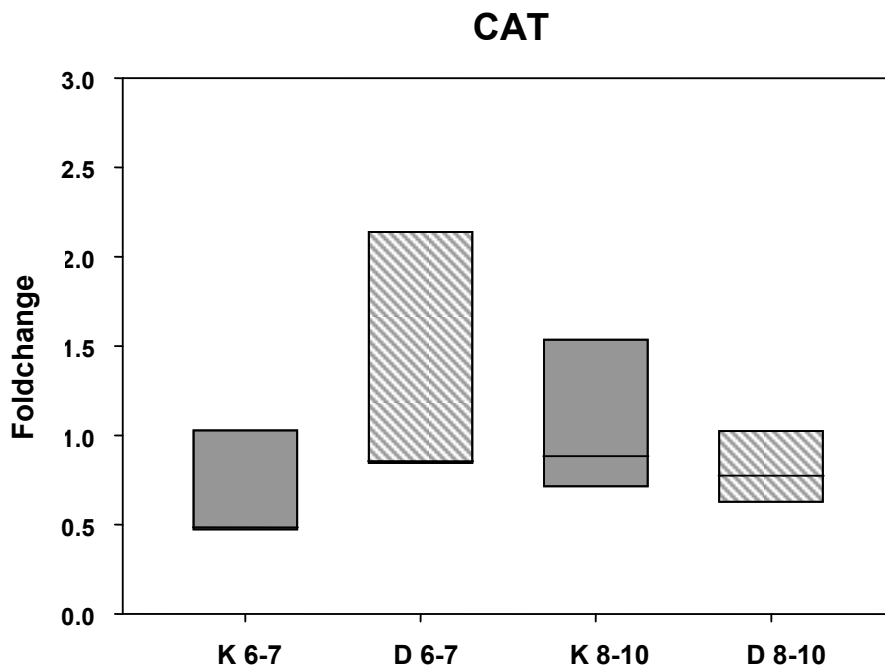


Abbildung 17: Expression von CAT in Plazenten von diabetischen Müttern (D) verglichen mit gesunden Kontrollen (K) in den SSW 6-7 und 8-10. Der Mittelwert der Kontrollen aus der 8.-10. SSW (K 8-10) wurde auf 1 gesetzt.

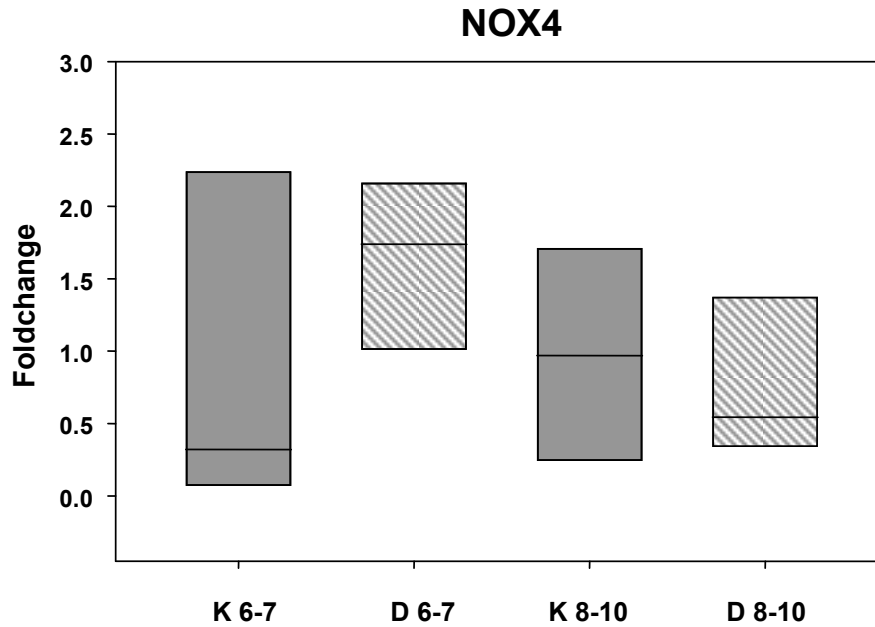


Abbildung 18: Expression von NOX4 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) verglichen mit gesunden Kontrollen (K) in den SSW 6-7 und 8-10. Der Mittelwert der Kontrollen aus der 8.-10. SSW (K 8-10) wurde auf 1 gesetzt.

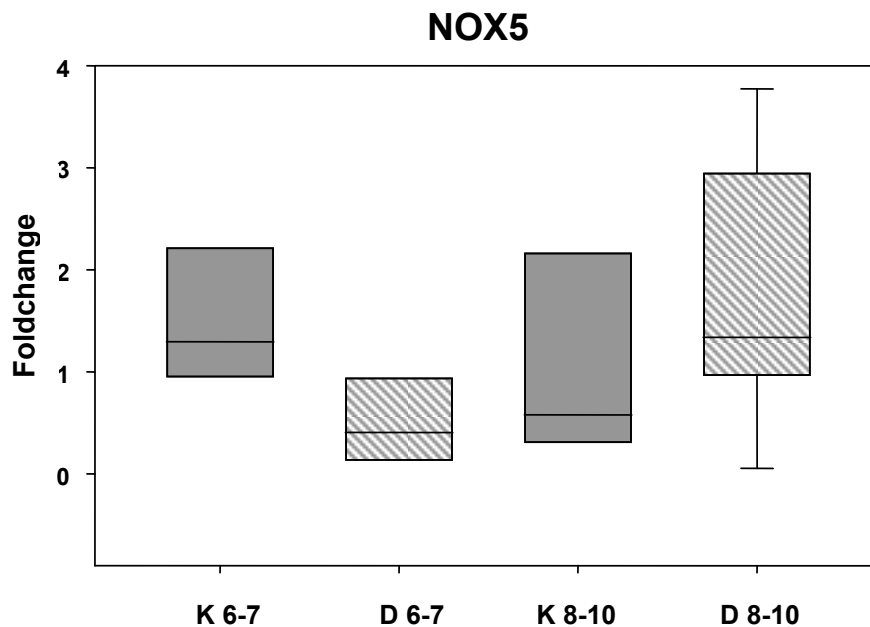


Abbildung 19: Expression von NOX5 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) verglichen mit gesunden Kontrollen (K) in den SSW 6-7 und 8-10. Der Mittelwert der Kontrollen aus der 8.-10. SSW (K 8-10) wurde auf 1 gesetzt.

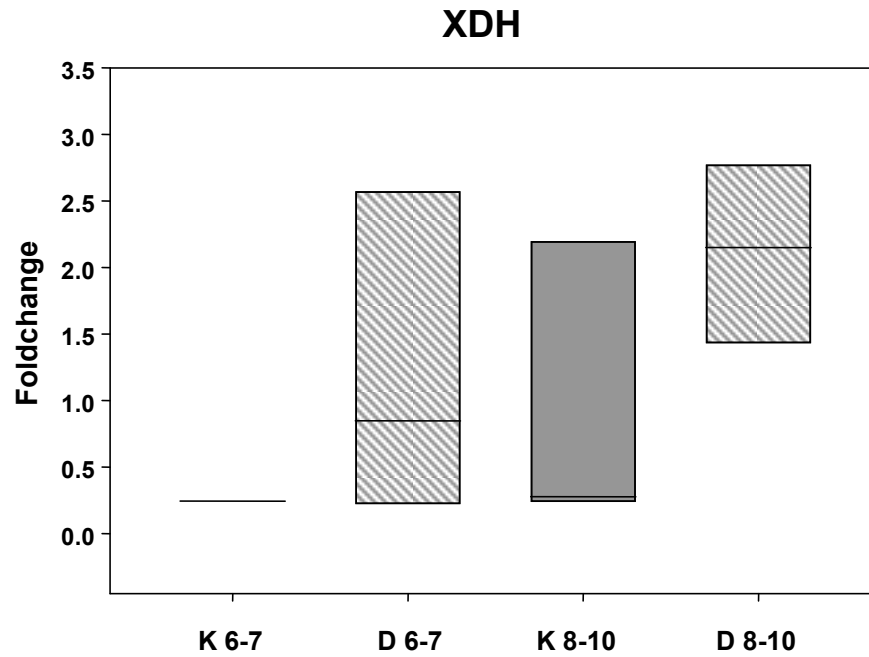


Abbildung 20: Expression von XDH in Plazenten von diabetischen Müttern (D) verglichen mit gesunden Kontrollen (K) in den SSW 6-7 und 8-10. Der Mittelwert der Kontrollen aus der 8.-10. SSW (K 8-10) wurde auf 1 gesetzt.

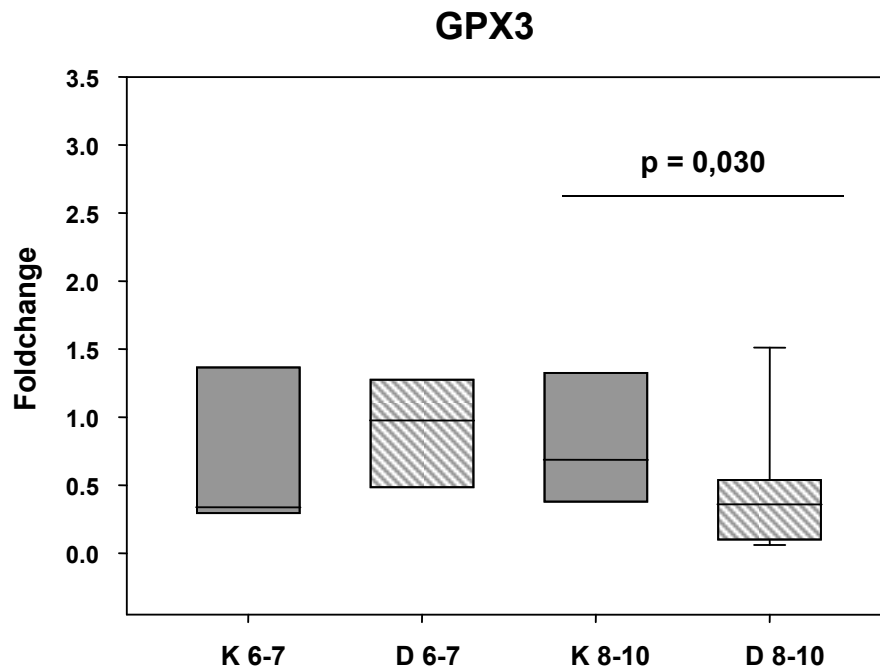


Abbildung 21: Expression von GPX3 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) verglichen mit gesunden Kontrollen (K) in den SSW 6-7 und 8-10. Der Mittelwert der Kontrollen aus der 8.-10. SSW (K 8-10) wurde auf 1 gesetzt.

SOD2

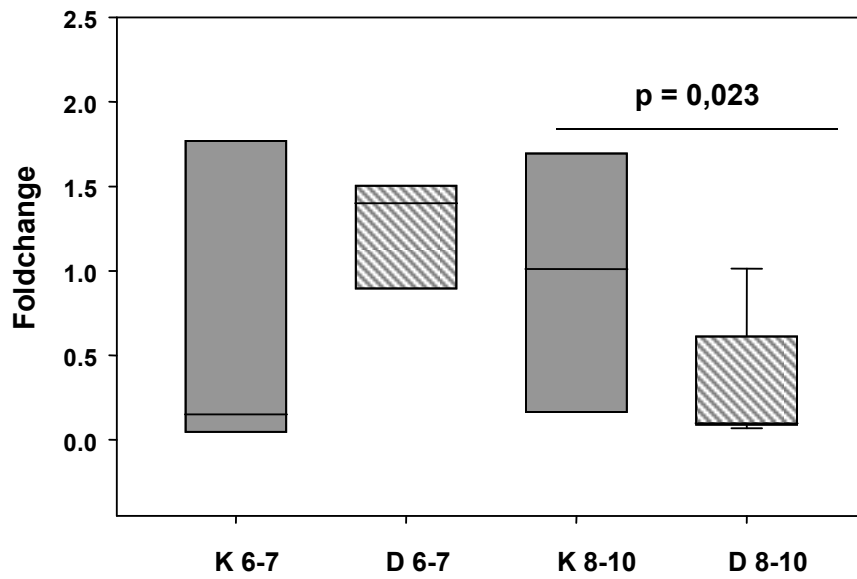


Abbildung 22: Expression von SOD2 in Plazenten von diabetischen Müttern (D) verglichen mit gesunden Kontrollen (K) in den SSW 6-7 und 8-10. Der Mittelwert der Kontrollen aus der 8.-10. SSW (K 8-10) wurde auf 1 gesetzt.

3.2 ERGEBNISSE DER ACH-3P ZELLINIE

Im zweiten Teil wurde nach der Ursache für die veränderte Expression der antioxidanten bzw. ROS generierenden Gene gesucht. Da bei Müttern mit T1D ein hyperglykämisches Milieu vorherrscht, könnte dies als Ursache für die veränderte ROS Produktion gesehen werden. Auch hypoxische bzw. hyperoxische Bedingungen könnten ein Grund dafür sein, da es in der Plazenta des ersten Trimenons zu einem starken Anstieg des pO₂ kommt.

Als Proben wurden die ACH-3P Zellen, eine Trophoblastzelllinie fusioniert mit einer Chorionkarzinomzelllinie, verwendet. Diese Zellen wurden für sechs Tage unter hyperglykämischen und unterschiedlichen O₂ Bedingungen kultiviert. Die Glukosekonzentrationen der unter Hyperglykämie kultivierten Zellen betragen 10 mM (Kontrollgruppe), 17,5 mM und 25 mM. Unter physiologischen Bedingungen *in vivo* beträgt die Glukosekonzentration ca. 5,5 mM, für die ACH-3P Zellen ist jedoch eine Konzentration von 10 mM notwendig, da diese Zellen sehr schnell proliferieren. Die O₂ Konzentrationen waren 2,5 %, 5 %, 8 %, 12 % und 21 %.

Untersucht wurden alle in Tabelle 6 dargestellten Gene. Besonderes Augenmerk wurde aber auf die zuvor in den Plazentaprobe gemessenen Gene gelegt, die bei Müttern mit T1D eine Veränderung in der Expression verglichen mit der Kontrollgruppe zeigten. In den Plazentaprobe konnte in der Expression von GPX3 und SOD2 eine Veränderung bei Müttern mit T1D im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gemessen werden, die beiden Gene werden in den SSW 8-10 vermindert gebildet.

Alle untersuchten Gene konnten in den ACH-3P Zellen mittels Real-Time PCR gemessen werden. Die Ergebnisse wurden wieder auf das Housekeeping Gen HPRT normiert, da RPL30 nicht in allen Proben detektierbar war.

Tabelle 6: Übersicht über die Ergebnisse der ACH-3P Zelllinie

Gen	Expression	Signifikanz Hyperglykämie	Signifikanz O ₂
GPX1	+	+	-
GPX3	+	-	-
GPX4	+	-	+
SOD1	+	+	+
SOD2	+	+	+
SOD3	+	+	-
GSR	+	-	-
CAT	+	+	+
XDH	+	-	-

3.2.1 Hyperglykämie

In den mit Hyperglykämie behandelten Zellen kam es zu folgendem Ergebnis, wenn die Glukosekonzentration der Kontrollen (10 mM) mit einer leichten Hyperglykämie von 17,5 mM verglichen wurde:

- SOD2: $p = 0,031$
- GPX3: $p = > 0,05$

Somit konnte ein signifikantes Ergebnis nur bei dem antioxidanten Gen SOD2 festgestellt werden.

Unter den Genen, die in den Plazentaprobe keine Veränderung in der Expression zwischen T1D und der Kontrollgruppe zeigten, waren in den ACH-3P Zellen unter hyperglykämischen Bedingungen die folgenden vier Gene signifikant reguliert.

- SOD1: $p = < 0,001$
- SOD3: $p = 0,025$
- GPX1: $p = 0,015$
- CAT: $p = < 0,001$

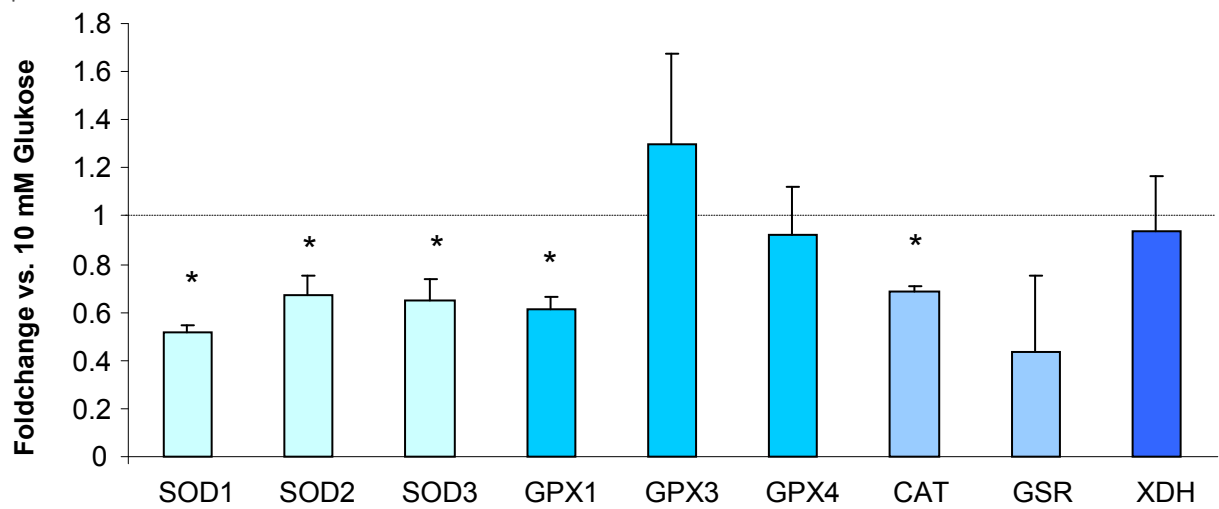


Abbildung 23: Der Effekt von Hyperglykämie (17,5 mM) auf enzymatische Antioxidantien in den ACH-3P Zellen. Die Kontrollgruppe 10 mM Glukose wurde auf 1 gesetzt.

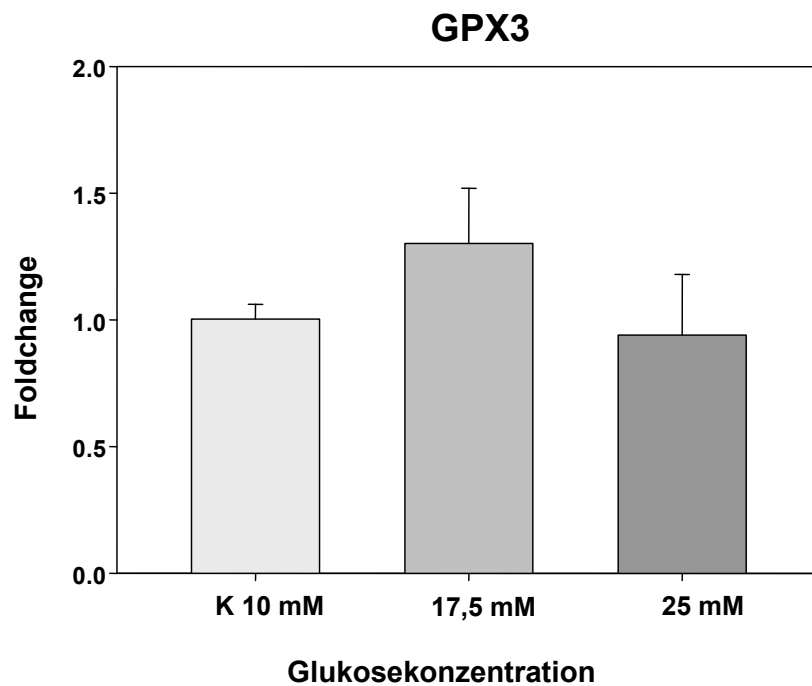


Abbildung 24: Die Expression von GPX3 unter Hyperglykämie. K 10 mM = Kontrollgruppe.

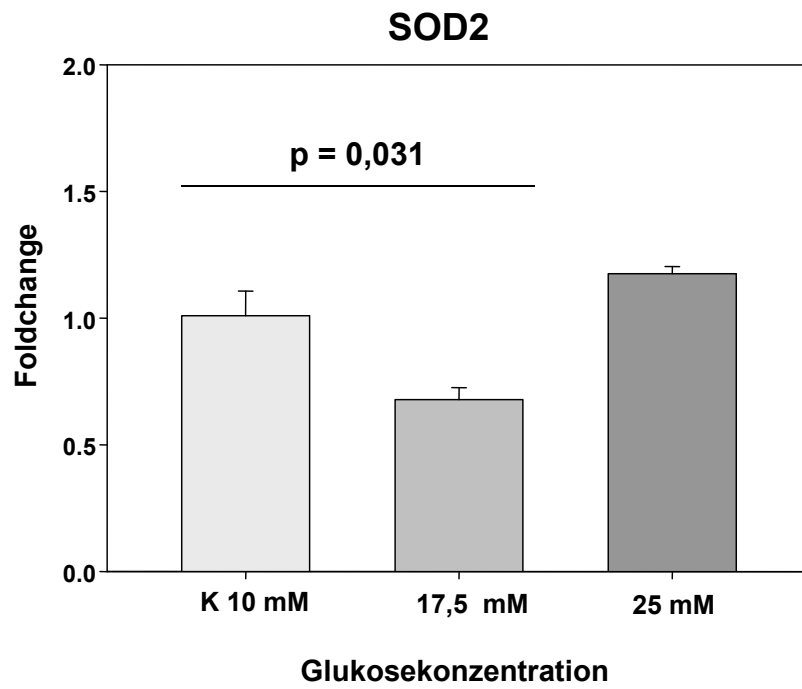


Abbildung 25: Die Expression von SOD2 unter Hyperglykämie. K 10 mM = Kontrollgruppe.

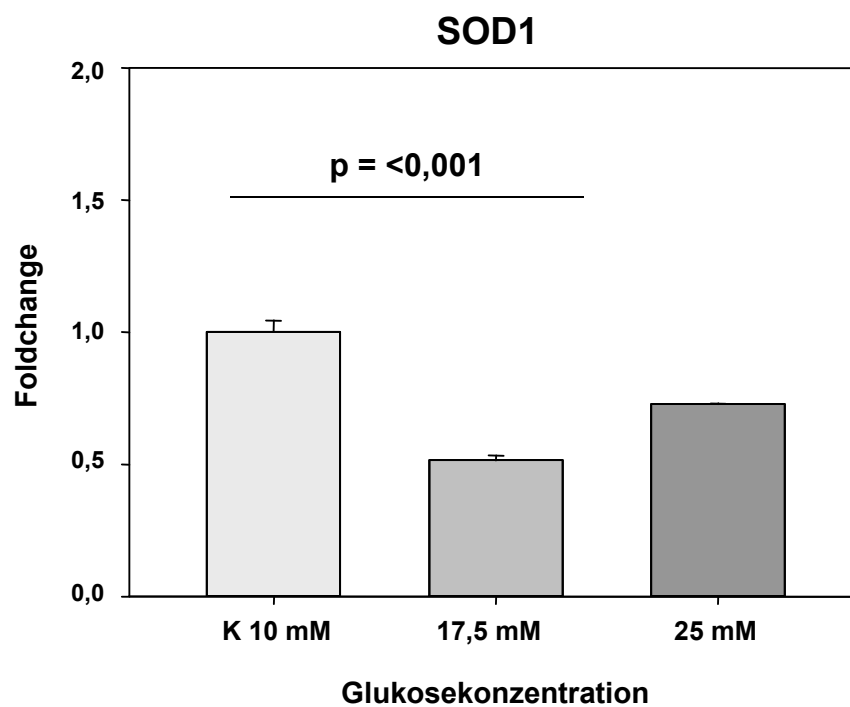


Abbildung 26: Die Expression von SOD1 unter Hyperglykämie. K 10 mM = Kontrollgruppe.

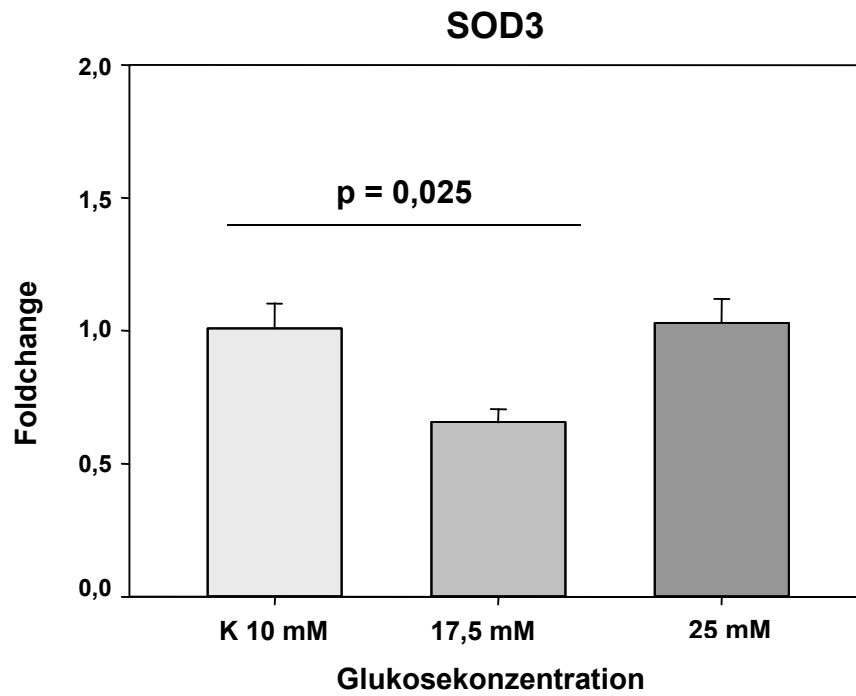


Abbildung 27: Die Expression von SOD3 unter Hyperglykämie. K 10 mM = Kontrollgruppe.

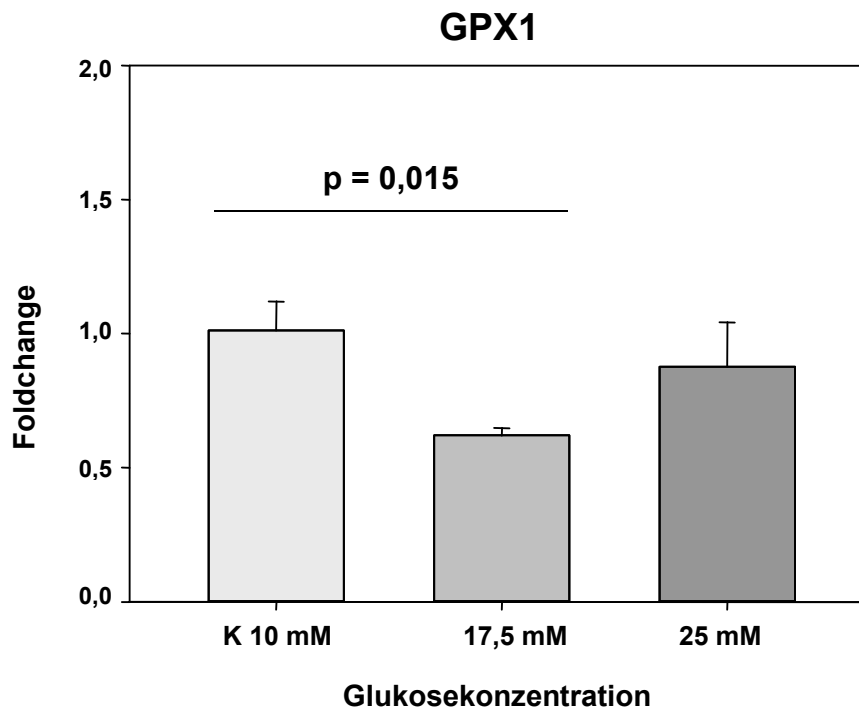


Abbildung 28: Die Expression von GPX1 unter Hyperglykämie. K 10 mM = Kontrollgruppe.

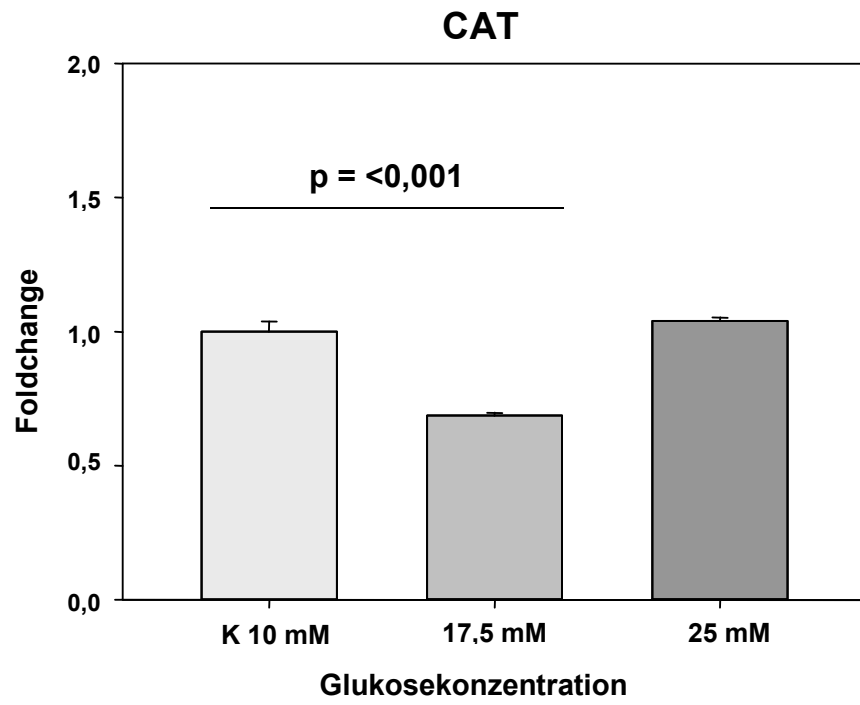


Abbildung 29: Die Expression von CAT unter Hyperglykämie. K 10 mM = Kontrollgruppe.

3.2.2 Ergebnisse O₂

In den unter verschiedenen O₂ Konzentrationen (2,5 %, 5 %, 8 %, 12 % und 21 % O₂) kultivierten ACH-3P Zellen waren die in den Plazentaprobe deregulierten Gene mit folgender Signifikanz verändert:

- SOD2: $p = 0,018$
- GPX3: $p = > 0,05$

Außerdem konnte eine statistisch signifikante Veränderung noch in der Expression der Gene CAT ($p = 0,009$), GPX4 ($p = 0,049$) und SOD1 ($p = 0,011$) festgestellt werden.

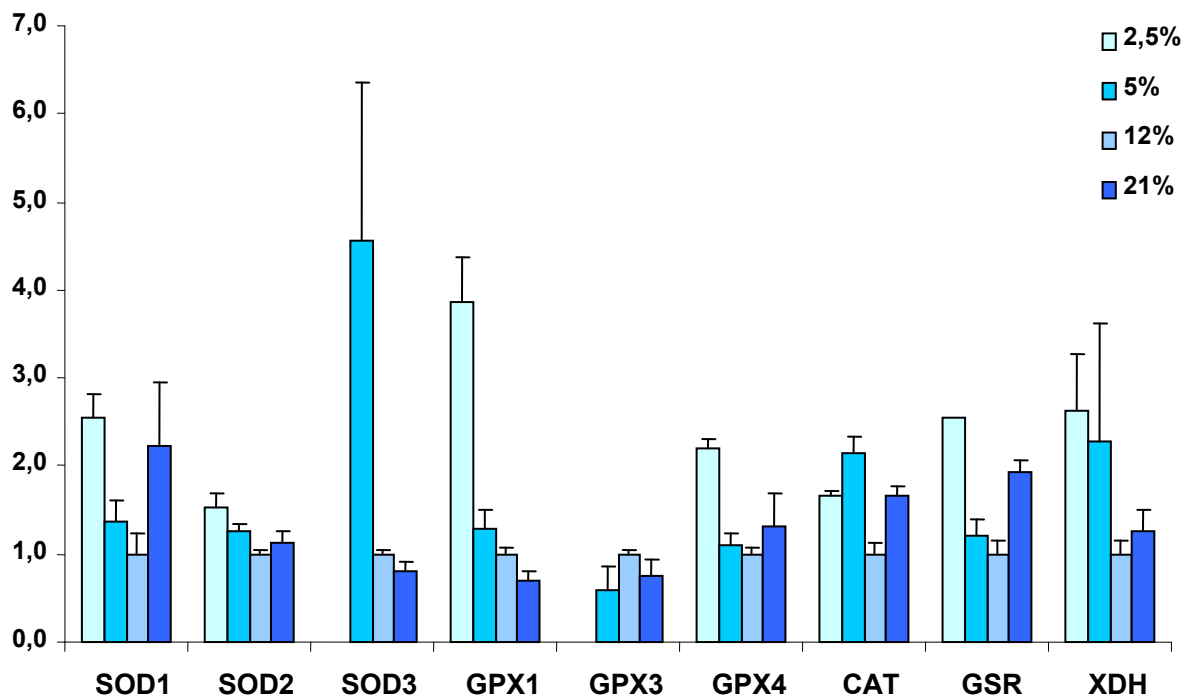


Abbildung 30: Die Expression von antioxidanten bzw. ROS generierenden Genen unter unterschiedlichen O₂ Konzentrationen (2,5 %, 5%, 12 % und 21 %).

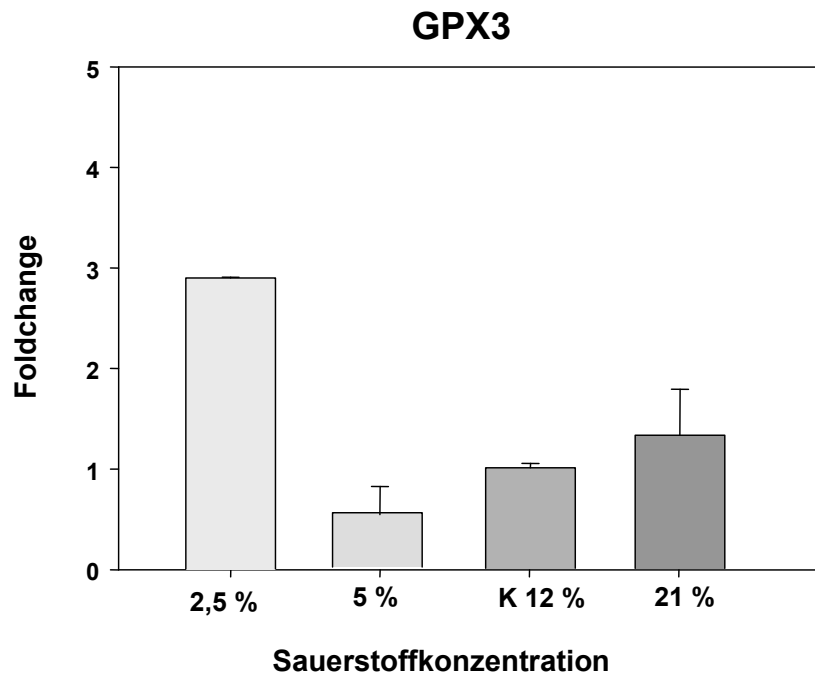


Abbildung 31: Die Expression von GPX3 unter unterschiedlichen O₂ Konzentrationen (2,5 %, 5%, 8 %, 12 % und 21 %)

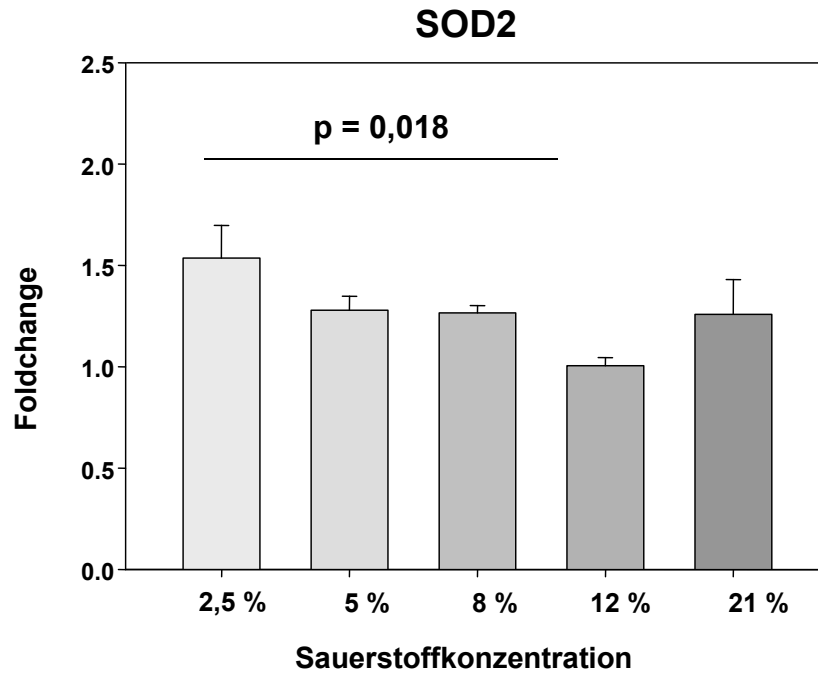


Abbildung 32: Die Expression von SOD2 unter unterschiedlichen O₂ Konzentrationen (2,5 %, 5%, 8 %, 12 % und 21 %).

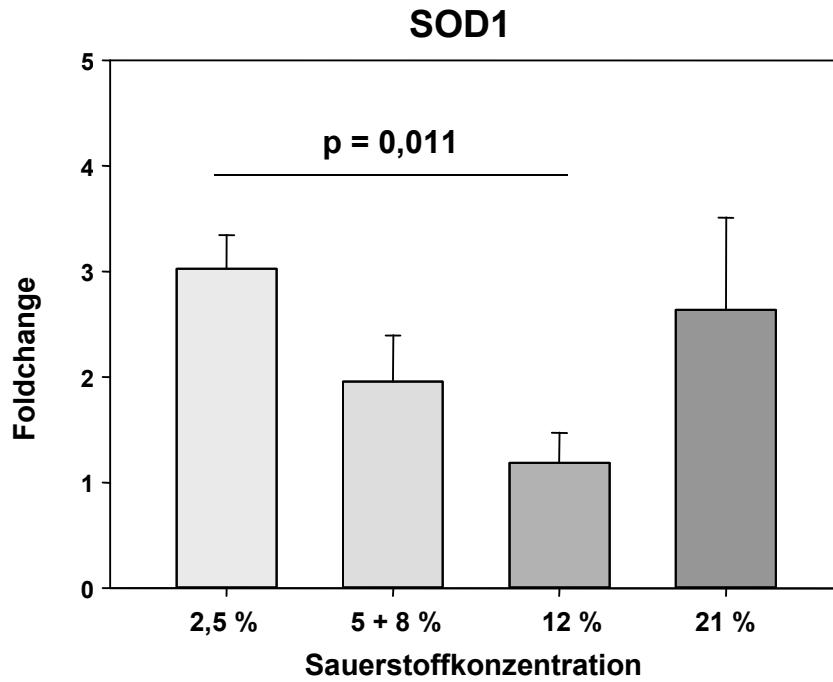


Abbildung 33: Die Expression von SOD1 unter unterschiedlichen O₂ Konzentrationen (2,5 %, 5%, 8 %, 12 % und 21 %).

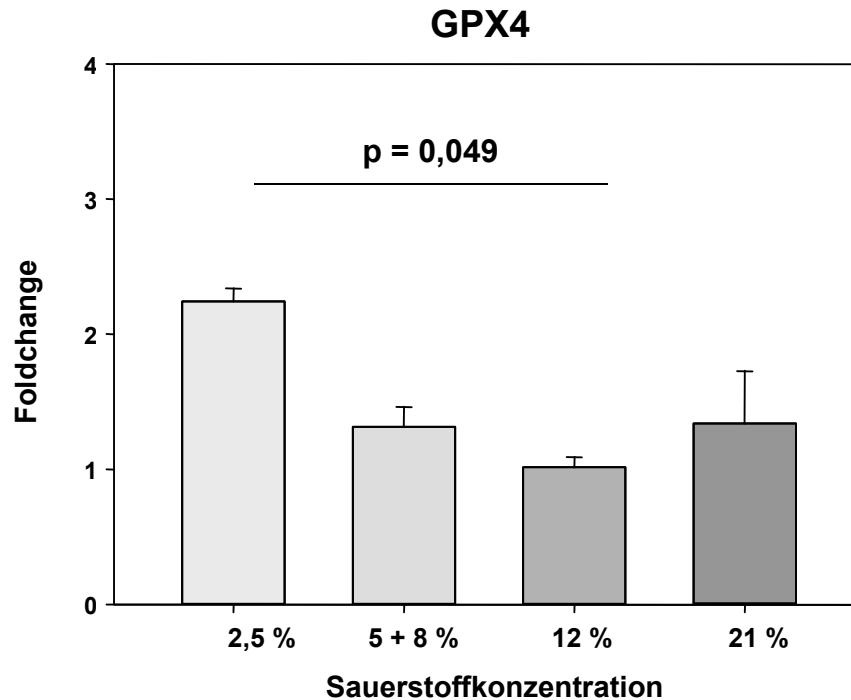


Abbildung 34: Die Expression von GPX4 unter unterschiedlichen O₂ Konzentrationen (2,5 %, 5%, 8 %, 12 % und 21 %).

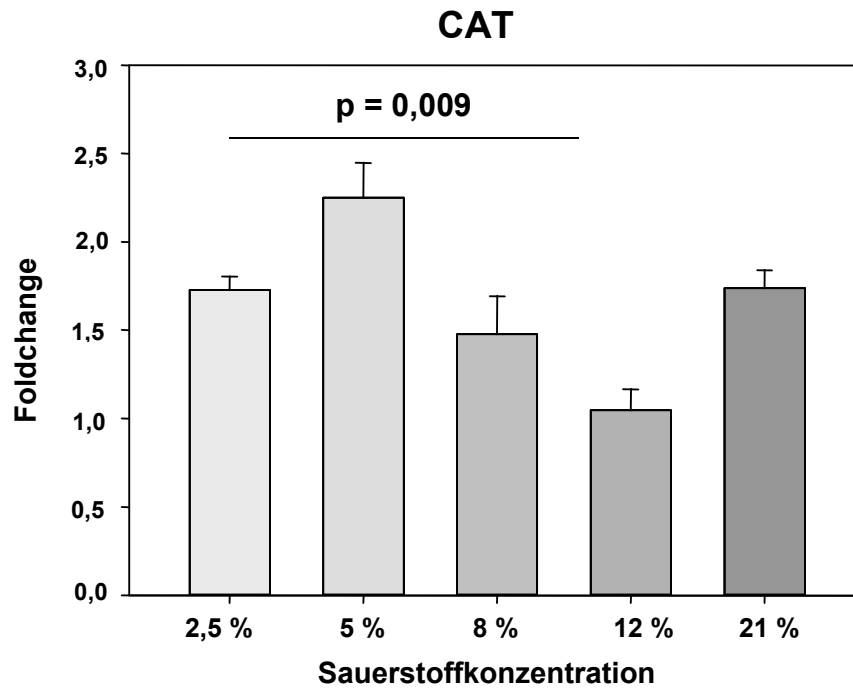


Abbildung 35: Die Expression von CAT unter unterschiedlichen O₂ Konzentrationen (2,5 %, 5%, 8 %, 12 % und 21 %).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Plazentaprobe des ersten Trimenons von Müttern mit T1D (n = 14) mit gesunden Kontrollen (n = 12), hinsichtlich der Expression von antioxidanten bzw. ROS generierenden Gene, verglichen.

Die antioxidanten Gene SOD2 und GPX3 zeigten eine statistisch signifikante Verringerung in den SSW 8-10.

Im zweiten Teil wurde untersucht, ob es durch Hyperglykämie und unterschiedliche O₂ Konzentrationen zu einer Veränderung in der Expression dieser Gene kommt. Die dafür verwendete ACH-3P Zelllinie wurde sechs Tage unter verschiedenen Glukose- und O₂ Konzentrationen kultiviert. Die Glukosekonzentrationen betragen 10 mM, 17,5 mM und 25 mM. Unter physiologischen Bedingungen *in vivo* liegt die Glukosekonzentration bei ca. 5,5 mM, für die ACH-3P Zellen ist jedoch eine Konzentration von 10 mM notwendig, da diese Zellen sehr schnell proliferieren. Da 25 mM Glukose eine *in vivo* zu hohe Konzentration darstellt, wurde in den Ergebnissen lediglich auf 10 mM und 17,5 mM eingegangen.

Die O₂ Konzentrationen, unter denen die ACH-3P Zelllinie kultiviert war, betragen 2,5 %, 5 %, 8 %, 12 % und 21 %.

Überraschenderweise war die Genexpression der antioxidanten Enzyme unter Bedingungen, die generell zu oxidativem Stress führen (Diabetes, Hyperglykämie), vermindert. Dies könnte eine spezielle Reaktion der frühen Plazenta sein, um den physiologischen Anstieg des pO₂ um die 11.SSW, der in der Embryonal- und Plazentaentwicklung eine wichtige physiologische Rolle spielt, nicht zu kompensieren und durch vermehrten Abbau der ROS zu verhindern. Bei Schwangeren mit T1D könnte eine solche Negativregulation der antioxidanten Enzyme, durch den hier vermehrt auftretenden oxidativen Stress, zu einer nicht mehr physiologischen, sondern pathologischen Konzentration an ROS führen.

Ein Ziel dieser Studie war es, zu vergleichen, ob oxidativer Stress bei Müttern mit T1D bereits im ersten Trimenon vermehrt auftritt. In Studien von Kinalski et al. wurde eine Downregulation von SOD1 in Terminplazenten von Frauen mit T1D festgestellt. Diese Gruppe enthielt jedoch auch Plazentaprobe von Müttern mit

GDM (23, 24). In meiner Arbeit konnte keine Veränderung in der Expression von SOD1 in diabetischen Plazenten des ersten Trimenons im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden.

In einer anderen Studie über oxidativen Stress in Terminplazenten von Frauen mit T1D wurde eine Hochregulierung von SOD2 gefunden (25). Auch in meinem Versuch konnte ein signifikanter Unterschied in der Expression von SOD2 in diabetischen Plazenten des ersten Trimenons im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt werden, jedoch liegt eine Downregulation des antioxidanten Gens vor. In den SSW 8-10 wird in diabetischen Plazenten weniger SOD2 gebildet, als in Plazenten von gesunden Frauen. Auch GPX3 zeigte dasselbe Resultat. Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass in den Plazentaprobe von Müttern mit T1D weniger oxidativer Stress vorherrscht, und somit das antioxidante Enzym downreguliert wird. Diese Hypothese ist aber unwahrscheinlich, da es als generelles Dogma gilt, dass durch hyperglykämische Bedingungen vermehrt oxidativer Stress gebildet wird, wie es auch in Kapitel 1.4 beschrieben ist. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass es durch Hyperglykämie in der Plazenta zu einer Fehlregulation in der Expression von antioxidanten Genen kommt. Dadurch verschlimmern sich die Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Plazenta und den Fetus, da einerseits durch Hyperglykämie vermehrt ROS gebildet wird und andererseits durch die Downregulation der antioxidanten Gene noch weniger ROS abgefangen werden können.

Da auch bei GDM hyperglykämische Bedingungen in der Plazenta vorliegen, kann es hier ebenfalls zur vermehrten Bildung von ROS kommen. Mit einer Prävalenz von 1 % bis 14 % ist GDM die am häufigsten vorkommende Diabetesform in der Schwangerschaft (2). Gerade deshalb gibt es bereits zahlreiche Studien über das Auftreten von oxidativem Stress in der Plazenta bei Müttern mit GDM. Bei Schwangeren mit GDM konnte häufig eine erhöhte Aktivität des ROS verursachenden Gens XO nachgewiesen werden (2, 30, 31). CAT zeigte vermehrt eine Downregulierung in GDM (2, 30). Sowohl für SOD als auch für GPx gibt es gegensätzliche Ergebnisse. Diese Enzyme wurden in vermehrter und verminderter Konzentration gemessen (2, 32). Da die Hyperglykämie bei Müttern mit GDM meist milder ausgeprägt ist als bei Typ 1 Diabetikerinnen, können die Ergebnisse jedoch nicht eins zu eins verglichen werden.

Im ersten Trimenon einer Schwangerschaft ist Hypoxie physiologisch und notwendig für die Entwicklung des Embryos und der Plazenta. Außerdem schützt ein niedriger pO_2 vor den Schäden verursacht durch oxidativen Stress, der mit dem Öffnen der Spiralarterien in der Plazenta vermehrt auftritt. Die Plazenta reagiert darauf mit einer erhöhten Bildung von antioxidanten Enzymen (17-20, 33).

In dieser Studie zeigten die statistisch signifikant regulierten Gene SOD1, SOD2, GPX4 und CAT eine höhere Expression bei einer O_2 Konzentration von 21 %. Tuuli et al. beschreiben eine erhöhte Expression genau dieser Enzyme ab dem Einsetzen des intervillösen Blutflusses in der Plazenta (19), was des physiologischen Schutzmechanismus auf den steigenden oxidativen Stress in der Plazenta, verursacht durch Hyperoxie, bedeutet (34).

Die Ergebnisse dieser Studie wurden limitiert durch die geringe Anzahl an Plazentaprobe von Frauen mit T1D, da es auf Grund der geringen Rate an diabetischen Schwangerschaften schwierig ist, Plazentagewebe aus abgebrochenen Frühschwangerschaften zu gewinnen.

Aufgrund optimierter Insulintherapien ist die Zahl an schwangeren Typ 1 Diabetikerinnen in den letzten Jahren jedoch gestiegen. Gerade deshalb ist eine strenge Therapieführung mit intensiven Blutzuckerkontrollen notwendig, um Folgen für den Fetus und die Mutter zu reduzieren (9).

Es gibt noch keine vergleichbaren Studien, die antioxidante und ROS generierende Gene in der Plazenta des ersten Trimenons bei Schwangeren mit T1D untersuchen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass diese Arbeit einen Überblick über die wichtigsten antioxidanten Gene in der Plazenta gibt und die Bedeutung von oxidativem Stress in diabetischen Schwangerschaften beweist, auch wenn sich das erwartete Ergebnis einer Hochregulierung dieser Gene nicht bewahrheitete. Außerdem konnte der Zusammenhang zwischen Hyperglykämie, Hyperoxie und der Fehlregulation einiger untersuchter Gene aufgezeigt werden.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004 Oct;122(4):369-382.
- (2) Lappas M, Hiden U, Desoye G, Froehlich J, Hauguel-de Mouzon S, Javerbaum A. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 2011 Dec 15;15(12):3061-3100.
- (3) Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 2005 Jul;38(7):995-1014.
- (4) Poston L, Rajmakers MT. Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome--a review. *Placenta* 2004 Apr;25 Suppl A:S72-8.
- (5) Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011 Jun;25(3):287-299.
- (6) Löffler G editor. *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. völlig neu bearbeitete Auflage ed. Berlin Heidelberg: Springer; 2007.
- (7) Superoxid Dismutase 3. 2005; Available at: <http://omim.org/entry/185490>. Accessed 12/27, 2011.
- (8) Herold G editor. *Innere Medizin*. Köln; 2009.
- (9) Vargas R, Repke JT, Ural SH. Type 1 diabetes mellitus and pregnancy. *Rev Obstet Gynecol* 2010 Summer;3(3):92-100.
- (10) Al-Agha R, Firth RG, Byrne M, Murray S, Daly S, Foley M, et al. Outcome of pregnancy in type 1 diabetes mellitus (T1DMP): results from combined diabetes-obstetrical clinics in Dublin in three university teaching hospitals (1995-2006). *Ir J Med Sci* 2011 Nov 5.
- (11) Higgins M, Felle P, Mooney EE, Bannigan J, McAuliffe FM. Stereology of the placenta in type 1 and type 2 diabetes. *Placenta* 2011 Aug;32(8):564-569.
- (12) Nelson SM, Coan PM, Burton GJ, Lindsay RS. Placental structure in type 1 diabetes: relation to fetal insulin, leptin, and IGF-I. *Diabetes* 2009 Nov;58(11):2634-2641.
- (13) Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfeleiderer A,. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 5. überarbeitete und aktualisierte Auflage, ed. Stuttgart: Thieme; 2007.
- (14) Petru E . *Geburtshilfe*. 6. Auflage ed. Graz; 2007.

- (15) Datei:Plazenta.png. Available at:
<http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Plazenta.png>. Accessed 12/27, 2011.
- (16) Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol* 2008 Dec;61(12):1296-1302.
- (17) Huppertz B, Gauster M, Orendi K, Konig J, Moser G. Oxygen as modulator of trophoblast invasion. *J Anat* 2009 Jul;215(1):14-20.
- (18) Schneider H. Oxygenation of the placental-fetal unit in humans. *Respir Physiol Neurobiol* 2011 Aug 31;178(1):51-58.
- (19) Tuuli MG, Longtine MS, Nelson DM. Review: Oxygen and trophoblast biology--a source of controversy. *Placenta* 2011 Mar;32 Suppl 2:S109-18.
- (20) Pijnenborg R, Vercruyssen L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006 Sep-Oct;27(9-10):939-958.
- (21) Sugino N, Takiguchi S, Umekawa T, Heazell A, Caniggia I. Oxidative stress and pregnancy outcome: a workshop report. *Placenta* 2007 Apr;28 Suppl A:S48-50.
- (22) Horn F. *Biochemie des Menschen*. 4. aktualisierte und erweiterte Auflage ed. Stuttgart: Thieme; 2009.
- (23) Kinalski M, Sledziewski A, Telejko B, Kowalska I, Kretowski A, Kinalska I. Evaluation of lipid peroxidation and acid-base status in cord blood of newborns after diabetes in pregnancy. *Przegl Lek* 2001;58(3):120-123.
- (24) Kinalski M, Telejko B, Kowalska I, Urban J, Kinalska I. The evaluation of lipid peroxidation products and antioxidative enzymes activity in cord blood and placental homogenates of pregnant diabetic women. *Ginekol Pol* 1999 Feb;70(2):57-61.
- (25) Lyall F, Gibson JL, Greer IA, Brockman DE, Eis AL, Myatt L. Increased nitrotyrosine in the diabetic placenta: evidence for oxidative stress. *Diabetes Care* 1998 Oct;21(10):1753-1758.
- (26) Hiden U, Wadsack C, Prutsch N, Gauster M, Weiss U, Frank HG, et al. The first trimester human trophoblast cell line ACH-3P: a novel tool to study auto-crine/paracrine regulatory loops of human trophoblast subpopulations--TNF-alpha stimulates MMP15 expression. *BMC Dev Biol* 2007 Dec 19;7:137.
- (27) Wikipedia - die freie Enzyklopädie. Available at:
http://de.wikipedia.org/wiki/Real_time_quantitative_PCR. Accessed 09/15, 2011.
- (28) RPL30 ribosomal protein L30. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6156>. Accessed 01/03, 2012.

(29) HYPOXANTHINE GUANINE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE 1, HPRT1. Available at: <http://omim.org/entry/308000>. Accessed 01/03, 2012.

(30) Biri A, Onan A, Devrim E, Babacan F, Kavutcu M, Durak I. Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta* 2006 Feb-Mar;27(2-3):327-332.

(31) Lappas M, Mitton A, Permezel M. In response to oxidative stress, the expression of inflammatory cytokines and antioxidant enzymes are impaired in placenta, but not adipose tissue, of women with gestational diabetes. *J Endocrinol* 2010 Jan;204(1):75-84.

(32) Coughlan MT, Vervaart PP, Permezel M, Georgiou HM, Rice GE. Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta* 2004 Jan;25(1):78-84.

(33) Jauniaux E, Watson A, Burton G. Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2001 Apr;184(5):998-1003.

(34) Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol* 2003 Jan;162(1):115-125.

-