

**Untersuchungen
zur Bedeutung von
oxidativem Stress bei Präeklampsie**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von
FELOR AMRAEI DAVIJANI

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.05

Dekan: Professor Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Heinle

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Laufer

Für

Fereshteh

Kambiz

Bernd

in tiefer Dankbarkeit

Publikationen

F. Amraei Davijani, B. Schauf, H. Heinle: Preeclampsia as a risk factor of coronary heart disease: Involvement of oxidative stress? *Atherosclerosis supplements* 2004; 5: 102.

F. Amraei Davijani, B. Schauf, H. Heinle: Oxidativer Stress bei Präeklampsie: Vergleichende Messungen verschiedener oxidativer Stress-Indikatoren im Blut. *Perfusion* 2004; 17: 95.

H. Heinle, F. Amraei Davijani, W. Reimann, I. Germann, D. Weiser: Is the total antioxidative capacity of plasma a significant parameter characterizing oxidative stress? *Perfusion* 2004; 17: 95.

F. Amraei Davijani, B. Schauf, D. Weiser, H. Heinle: Die Bedeutung von oxidativem Stress bei Präeklampsie: Vergleichende Messungen von antioxidativer Gesamtkapazität, GSH- und ATP-Konzentration in Erythrozyten und Radikalbildung von Leukozyten. In: H. Heinle, H. Schulte und H. Hahmann (Hrsg.): *Besondere Aspekte der cerebrovaskulären und peripheren Arteriosklerose*. 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroserecherche 2003, Tübingen 2004; 227-33.

F. Amraei Davijani, B. Schauf, D. Weiser, H. Heinle: Die Bedeutung von oxidativem Stress bei Präeklampsie: Vergleichende Messungen von antioxidativer Gesamtkapazität, GSH- und ATP-Konzentration in Erythrozyten und Radikalbildung von Leukozyten. *Perfusion* 2003; 16:96.

F. Amraei Davijani, B. Schauf, H. Heinle: Oxidative Stress in Preeclampsia: Determinations of MDA, Nitrate/Nitrite and total free radical trapping potential in plasma. Poster in XIV Lipid Meeting Leipzig 2003.

D. Stevanovic, A. Blumenstein, A. Scheule, F. Amraei Davijani, I. Germann, G. Friedemann, D. Djuric, H. Heinle: Angiotensin II induced oxidative stress in arterial vessels: measurements by different methods and effects of AT₁-receptor antagonists. *Perfusion* 2003; 16: 91.

G. Luippold, A. Blumenstein, S. Schneider, A. Nürnberger, F. Amraei Davijani, U. Brehme, H. Heinle: Endothelial function and morphological characteristics of the aortic arch in rats with long-term diabetes mellitus. *Perfusion* 2004; 17: 94.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	1
1.2	Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress	3
1.2.1	Enzymatische Antioxidantien	4
1.2.2	Nicht-enzymatische Antioxidantien	5
1.3	Pathophysiologische Wirkungen der Sauerstoffradikale im Organismus.....	7
1.4	Die Bedeutung von oxidativem Stress für Präeklampsie.....	9
1.4.1	Allgemeine Beschreibung der Präeklampsie.....	9
1.4.2	Oxidativer Stress in der Pathogenese der Präeklampsie	11
1.5	Fragestellung	14
2	MATERIAL	15
2.1	Geräte	15
2.2	Chemikalien und Reagenzien	16
2.3	Lösungen	18
2.4	Blutproben der Patientinnen	22
2.5	Statistik.....	22
3	METHODEN	23
3.1	Gewinnung von Blut, Plasma, Erythrozyten und Hämolysat.....	23
3.2	Induktion von oxidativem Stress in vitro.....	24

3.2.1	Induktion mit H ₂ O ₂	24
3.2.2	Induktion mit KO ₂	24
3.2.3	Induktion mit Xanthin/Xanthinoxidase	25
3.2.4	Induktion mit t-Butylhydroperoxid.....	25
3.2.5	Induktion von oxidativem Stress in Vollblut	25
3.3	Bestimmung der gesamten antioxidativen Kapazität durch die AAPH-Reaktion	26
3.3.1	Prinzip der AAPH-Reaktion.....	26
3.3.2	Durchführung der Messungen.....	28
3.4	Bestimmung von GSH in Erythrozyten und des Thiol-Status im Blutplasma	31
3.4.1	Prinzip der Thiol-Bestimmung.....	31
3.4.2	GSH in Erythrozyten	32
3.4.3	Bestimmung des Thiol-Status in Plasma.....	33
3.5	Bestimmung von Malondialdehyd in Blutplasma und Erythrozytenmembranen	35
3.5.1	Prinzip der Messung	35
3.5.2	Gehalt an mit Thiobarbitursäure reagierenden Substanzen (TBARS) im Plasma	36
3.5.3	Bestimmung des MDA-Gehalts in Erythrozytenmembranen.....	37
3.6	Bestimmung von Nitrit/Nitrat.....	38
3.7	Bestimmung von Harnsäure (2,6,8-Trihydroxypurin).....	39
3.8	Bestimmung des ATP-Gehaltes in Erythrozyten	41
3.8.1	Prinzip der Lumineszenz-Reaktion.....	41
3.8.2	Durchführung der Messungen.....	42
3.9	Leukozytenaktivierung.....	44
3.10	Inkubationsversuche mit Vitamin C	45

3.11 Hämoglobin-Bestimmung	45
4 ERGEBNISSE	46
4.1 Induktion von oxidativem Stress in Plasma von gesunden Probanden in vitro	46
4.1.1 Wirkungen von H ₂ O ₂	46
4.1.2 Wirkungen von KO ₂	53
4.1.3 Wirkungen von Xanthin/Xanthinoxidase.....	56
4.1.4 Wirkungen von t-Butylhydroperoxid	60
4.2 Untersuchungen von Parametern des oxidativen Stresses bei normalen und präeklampsischen Schwangeren	64
4.2.1 Untersuchungen im Plasma	65
4.2.2 Untersuchungen an Erythrozyten.....	71
4.2.3 Bestimmung der Radikalbildung von Leukozyten im Vollblut	74
4.3 Untersuchungen der therapeutischen Wirkungen von Vitamin C auf verschiedene Parameter des oxidativen Stresses im Plasma von gesunden Probandinnen in vitro.....	75
4.3.1 Einfluss von Vitamin C auf den Zeitverlauf der AAPH-Reaktion mit Plasma	75
4.3.2 Einfluss von Vitamin C auf den Malondialdehyd-Gehalt im Plasma ...	77
4.3.3 Einfluss von Vitamin C auf den Malondialdehyd-Gehalt in der Erythrozytenmembran.....	78
4.3.4 Einfluss von Vitamin C auf den ATP-Gehalt in Erythrozyten.....	79
5 DISKUSSION	81
5.1 Bisherige Untersuchungen zur Bedeutung von oxidativem Stress bei Präeklampsie	81
5.2 Vergleich der eigenen Befunde mit den bisher publizierten Daten. 86	
5.2.1 Die gesamte antioxidative Kapazität (TRAP) von Plasma.....	86

5.2.2	Peakhöhe der AAPH-Reaktion von Plasma	89
5.2.3	Thiole im Plasma.....	92
5.2.4	MDA im Plasma	93
5.2.5	Nitrit/Nitrat	93
5.2.6	GSH in Erythrozyten	95
5.2.7	MDA in der Erythrozytenmembran.....	96
5.2.8	ATP im Erythrozyten	97
5.2.9	Aktivität der Leukozyten.....	98
5.3	Bewertung einzelner Parameter (in-vitro-Versuche)	100
5.3.1	Einfluss der Oxidantien auf die gesamte antioxidative Kapazität und die Peakhöhe der AAPH-Reaktion	100
5.3.2	Einfluss der Oxidantien auf die Thiole.....	101
5.3.3	Einfluss der Oxidantien auf den MDA-Spiegel im Plasma.....	101
5.3.4	Einfluss der Oxidantien auf den ATP-Gehalt.....	102
5.4	Überlegungen zur Therapie mit Vitamin C	102
5.4.1	Einfluss von Vitamin C auf die Parameter des oxidativen Stresses .	103
5.4.2	Vitamin C als Therapie bei oxidativem Stress in der Gynäkologie ...	104
6	ZUSAMMENFASSUNG	106
7	LITERATURVERZEICHNIS	110

Abkürzungsverzeichnis

AAPH	2,2'-Azo-bis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Cl _B	Basale Chemilumineszenz
Cl _S	Stimulierte Chemilumineszenz
cpm	Counts per minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
γ-GCS	γ-Glutamylcystein-Synthetase
GSH	Reduziertes Glutathion
GSH-Px	Glutathionperoxidase
GSH-S	Glutathion-Synthetase
GSSG	Oxidiertes Glutathion
GSSG-R	Glutathionreduktase
Hb	Hämoglobin
HDL	High Density Lipoprotein

VI Abkürzungsverzeichnis

KPP	Kaliumphosphatpuffer
LDL	Low Density Lipoprotein
LOOH	Lipidhydroperoxide
MDA	Malondialdehyd
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	Oxidativ modifiziertes LDL
PBS	Phosphate buffered saline
PGI ₂	Prostacyclin
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
Px	Peroxidase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygene species)
RT	Raumtemperatur
S.D.	Standardabweichung
SOD	Superoxiddismutase
SSW	Schwangerschaftswoche
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäurereaktive Substanzen
t-BHP	Tertiär-Butylhydroperoxid
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α

TOOS	N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylanilin
TRAP	Total peroxy radical-trapping capability of plasma
TXA	Thromboxan
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
XOD	Xanthinoxidase

1 Einleitung

1.1 Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Vor etwa drei Milliarden Jahren ereignete sich auf der Erde die wohl größte Umweltkatastrophe aller Zeiten: In der bis dahin anaeroben Welt entwickelten gewisse Bakterien die Photosynthese, in deren Verlauf durch Wasserspaltung elementarer Sauerstoff entstand. Dieser Sauerstoff jedoch bedeutete für den Rest der Lebewesen eine tödliche Herausforderung, als extrem aggressive Substanz griff er in den Stoffwechsel und die Aufbausubstanzen aller übrigen Bakterien ein und rottete den größten Teil der damaligen Lebewesen aus [Halliwell 1994a]. Einige wenige schafften es, den Sauerstoff nicht nur zu tolerieren, sondern auch das ungeheure Potential zu nutzen, das der Sauerstoff in energetischer Sicht bot. Durch Oxidation der Nährstoffe konnte viel mehr Energie gewonnen werden, als durch die bisher praktizierten Gärungsformen.

Die Bakterien sowie die später auftauchenden Eukaryonten lernten, mit dem Sauerstoff zu leben und ihn zu nutzen. Doch auch nach der drei Milliarden Jahre dauernden Evolution des aeroben Lebens gibt es nach wie vor Gefahren durch den Sauerstoff, insbesondere durch die so genannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die schon vor 60 Jahren als für aerobe Organismen schädlich erkannt wurden [Gerschman et al., 1954; Michaelis and Wollmann 1950].

Seither entwickelt sich großes Interesse in Biologie, Pathophysiologie und Medizin an den freien Radikalen und am oxidativen Stress, der als Störung des Gleichgewichts zwischen prooxidativen und antioxidativen Systemen im Organismus definiert wird [Sies and Cadenas 1985].

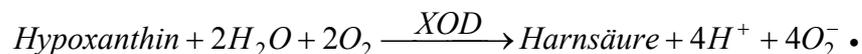
Tabelle 1-1 gibt einen Überblick über die wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies, die durch verschiedene Mechanismen erzeugt werden können.

Exogen durch:

- ionisierende Strahlung, insbesondere durch UV-Licht [Tyrrell 1991].
- bestimmte Chemikalien (wie z. B. Ozon, Lösungsmittel etc.) [von Sonntag 1984].

Endogen durch:

- die mitochondriale Atmungskette, bei der etwa 1 bis 3 % des verbrauchten Sauerstoffs in Superoxidradikale bzw. in Wasserstoffperoxid als Nebenprodukte umgewandelt werden [Halliwell 1994b]. Diese Superoxidradikale werden ständig freigesetzt. Insgesamt werden so pro Tag immerhin ca. 380 mmol dieser reaktiven Sauerstoffspezies erzeugt [Gutteridge and Quinlan 1985].
- den Abbau von Purinen durch die Xanthinoxidase [Harrison 2002; Siems et al., 1986], die Hypoxanthin in Harnsäure umwandelt und dabei das Superoxidradikal produziert:



- die Aktivität der neutrophilen Granulozyten, insbesondere beim so genannten „respiratory burst“. In der Membran dieser Zellen befindet sich eine NADPH-Oxidase, die direkt Superoxidanionen und andere reaktive Sauerstoffspezies erzeugt. Diese helfen dabei, Bakterien und andere Eindringlinge unschädlich zu machen. Die NADPH-Oxidase scheint auch bei vielen anderen aktivierten Zellen zur Produktion von $\text{O}_2^- \cdot$ beizutragen, so dass allgemein eine Entzündungsreaktion mit oxidativem Stress verbunden ist [Babior 1978; Chance et al., 1979; Siems 1998].
- den Metabolismus der Katecholamine, da beim Abbau des Adrenalins sowie des Noradrenalins sowohl über die Monoaminoxidase als auch über den Weg der Autooxidation freie Radikale entstehen [Misra and Fridovich 1972].

- die Enzyme Cyclooxygenase und Lipoxygenase, die im Metabolismus der Arachidonsäure vorkommen [Kontos 1987].
- Autoxidation von Fe^{2+} -haltigen Verbindungen, z. B. Hämoglobin zu Methämoglobin unter Bildung von $\text{O}_2^- \cdot$ [Siems 1998].

Tabelle 1-1: Die wichtigsten reaktiven Spezies [Pryor 1986].

Hydroxylradikal	$\text{OH} \cdot$
Superoxidanion	$\text{O}_2^- \cdot$
Wasserstoffperoxid	H_2O_2
Perhydroxylradikal	$\text{HO}_2 \cdot$
Alkoxyradikal	$\text{LO} \cdot$
Peroxyradikal	$\text{LOO} \cdot$
Lipidhydroperoxid	LOOH
Lipidradikal	$\text{L} \cdot$
Hypochlorit	$^- \text{OCl}$
Nitrosylradikal	$\text{NO} \cdot$
Peroxynitritradikal	$\text{ONOO} \cdot$

1.2 Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress

Die Evolution rüstete die Organismen gegen solche schädlichen Angriffe von Radikalen mit verschiedenen Schutzmechanismen aus, um die Entstehung der Sauerstoffspezies zu verhindern, ihre Zwischenprodukte abzubauen oder die angerichteten Schäden zu reparieren.

1.2.1 Enzymatische Antioxidantien

Superoxiddismutase (SOD)

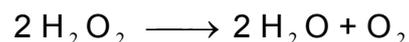
Die Funktion der Superoxiddismutase, die die Dismutation des Superoxidanions zum Wasserstoffperoxid und Sauerstoff katalysiert, wurde zum ersten Mal 1969 beschrieben [McCord and Fridovich 1969].



Es gibt drei verschiedenen Isoformen von SOD: CuZnSOD im Cytosol der Eukaryonten, MnSOD in Mitochondrien der Eukaryonten sowie in Prokaryonten und FeSOD nur in Prokaryonten.

Katalase

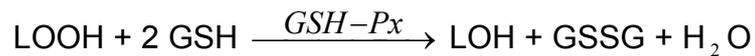
Durch dieses Enzym wird das im Stoffwechsel oder durch die SOD entstandene toxische Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff abgebaut [Chance et al., 1979].



Das Enzym befindet sich mit der höchsten Aktivität in den Peroxisomen, ist aber auch im Cytosol als sehr aktives Enzym vorhanden.

Glutathionperoxidase (GSH-Px)

Glutathionperoxidase befindet sich im Cytoplasma und in den Mitochondrien aller Zellen. Es enthält ein Selenatom in Form von Selenocystein im katalytischen Zentrum. Das Enzym katalysiert die Reduktion von Lipidhydroperoxiden und Wasserstoffperoxid unter Verwendung von Glutathion (GSH) als Reduktionsmittel.



bzw.



Dabei wird das gebildete Glutathiondisulfid (GSSG) unter Verbrauch von Coenzym NADPH/H⁺ aus dem Pentosephosphatweg durch das Enzym Glutathionreduktase (GSSG-R) zu Glutathion regeneriert.



1.2.2 Nicht-enzymatische Antioxidantien

Vitamin E (α -Tocopherol)

Vitamin E ist eines der wichtigsten lipidlöslichen Antioxidantien, das vorwiegend in der Zellmembran wirkt und die durch Lipidperoxidation entstandenen Peroxyl- und Alkoxy-Radikale abfängt. Dadurch trägt dieses Vitamin zum Abbruch radikalischer Kettenreaktionen bei.

Vitamin C (Ascorbinsäure)

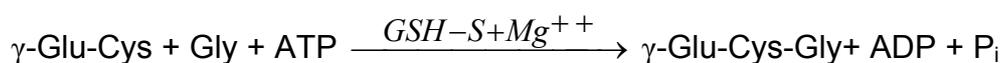
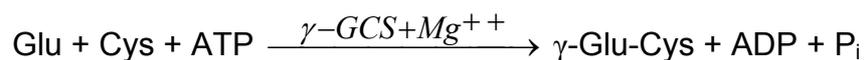
Vitamin C gehört wie Vitamin E zu den wichtigsten Antioxidantien. Im Unterschied zu Vitamin E ist es wasserlöslich. Neben dem direkten Abfangen der Sauerstoffradikale ist eine seiner Hauptaufgaben die Regenerierung von anderen Antioxidantien wie Vitamin E oder Glutathion in ihre reduzierten, aktiven Formen [Kojo 2004]. Vitamin C wird dabei durch Enzyme (Semidehydroascorbatreduktase und Dehydroascorbatreduktase) wieder in seine reduzierte Form überführt.

Vitamin C spielt auch als Kofaktor für mehrere enzymatische Reaktionen eine große Rolle.

Glutathion (GSH)

Das Tripeptid Glutathion befindet sich in praktisch allen lebenden Zellen in Konzentrationen von 0,5 bis 10 mM, dabei in der Leber in der höchsten, im Muskel in der geringsten Konzentration [Jocelyn 1972]. Der größte Teil des intrazellulären Glutathion liegt in der reduzierten Form (GSH) vor und ist mit seiner reaktiven Sulfhydrylgruppe der Cysteinyl-Seitenkette eines der wichtigsten Antioxidantien im menschlichen Körper. Dabei übernimmt es einerseits als direktes Antioxidans, andererseits als Cosubstrat der GSH-Peroxidase wichtige Funktionen bei verschiedenen Entgiftungsmechanismen.

Die Biosynthese von Glutathion wurde 1953 zum ersten Mal beschrieben [Snoke et al., 1953]. Glutathion wird durch zwei Enzyme, γ -Glutamylcystein – Synthetase und Glutathion-Synthetase, aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin unter Verbrauch von ATP und mit Magnesium als Cofaktor synthetisiert.



1.3 Pathophysiologische Wirkungen der Sauerstoffradikale im Organismus

Bei einem Überwiegen der Bildung gegenüber dem Abbau von ROS kommt es zu oxidativem Stress, bei dem die reaktiven Sauerstoffspezies im Organismus verschiedene Angriffsmöglichkeiten haben. Am besten untersucht ist hierbei die Reaktion der Sauerstoffradikale mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA), z. B. in den Membranlipiden oder in Lipoproteinen.

Abb. 1-1 zeigt die durch Angriff eines initialen Radikals I^\bullet auf eine solche ungesättigte Fettsäure entstehende Kettenreaktion, in deren Verlauf eine Reihe weiterer Radikale, wie Alkyl- und Peroxyl-Radikale, auftreten. Der gesamte Prozess wird Lipidperoxidation genannt. Die Hydroperoxide von langkettigen Fettsäuren zerfallen in kleinere Moleküle, darunter hauptsächlich Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (HNE) [Esterbauer et al., 1991], die selbst wiederum viele schädliche Reaktionen in der Zelle ausführen [Draper et al., 1986]. Diese Moleküle werden häufig als Indikatoren für das Ausmaß an oxidativem Stress im Organismus gewertet. Allerdings kann MDA auch aus dem Arachidonsäure-Stoffwechsel durch Cyclooxygenase gebildet werden [Smith 1989].

Durch die Lipidperoxidation können große Membranbereiche erfasst und die Zellen dadurch nachhaltig geschädigt werden, da die Permeabilität der Membran erhöht, ihre Fluidität aber erniedrigt wird [Chance et al., 1979].

Lipidperoxidation findet sich aber auch bei den Low Density Lipoproteinen (LDL) im Plasma, wodurch diese modifiziert werden. Makrophagen nehmen das modifizierte bzw. oxidierte LDL ungebremst auf und entwickeln sich zu sogenannten Schaumzellen, die sich als ein wichtiger Bestandteil der arteriosklerotischen Plaque herausgestellt haben. Daher spielen die Oxidationsprodukte von LDL eine große Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose [Heinle 1999].

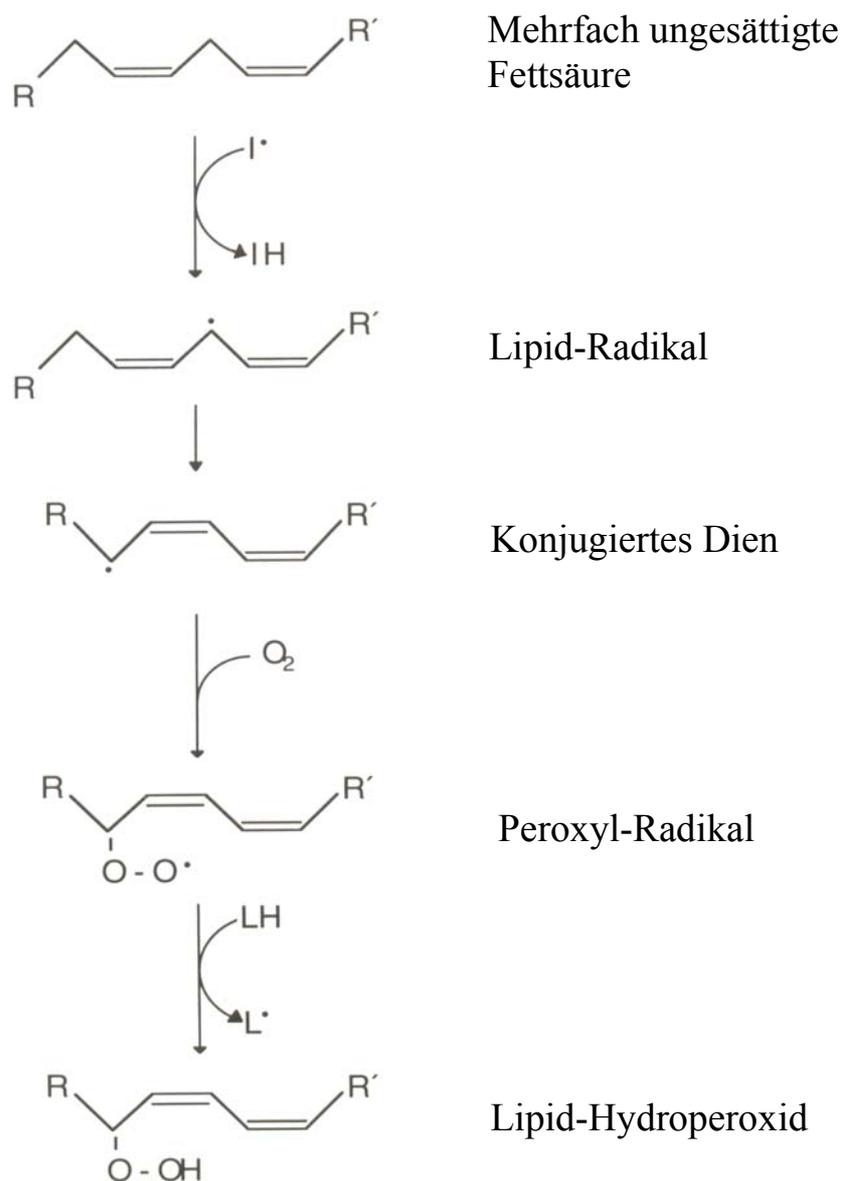


Abb. 1-1: Schema der Lipidperoxidation. I· ist das die Radikalreaktion initiierende Radikal, LH ist eine weitere Fettsäure, die durch die Reaktion mit dem Peroxy-Radikal selbst wieder zu einem Radikal (L·) wird, das die Kettenreaktion weiter antreibt [Peltola 1995].

Auch Proteine werden durch Sauerstoffradikale angegriffen und geschädigt. Die reaktiven Sauerstoffspezies können zur Oxidation der Seitenkette der Aminosäuren, zur intra- und intermolekularen Vernetzung der Aminosäureketten oder sogar durch Oxidation des Proteinrückgrats zur Protein-Fragmentierung führen [Berlett and Stadtman 1997]. Die Funktionen von

Proteinen bzw. Enzymen können durch diese oxidativen Veränderungen beeinträchtigt werden, dies kann dazu führen, dass sich die solcherart geschädigten Proteine zu einem Aggregat zusammenballen. Diese Proteinaggregate sind meistens unlöslich und können sehr stark in den zellulären Stoffwechsel eingreifen, Entzündungen hervorrufen und schließlich zum Zelltod führen. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Morbus Huntington sowie Amyotrophe Lateralsklerose sind neurodegenerative Erkrankungen, die durch Kumulation von solchen oxidativ modifizierten Proteinen entstehen [Ullrich and Grune 2004].

Ebenfalls schwere Schädigungen können DNA-Moleküle durch freie Radikale, insbesondere durch Hydroxylradikale, erfahren. Es kommt zur Hydroxylierung der Basen und zur Oxidation der Desoxyribose, was zu Basenfehlpaarungen und DNA-Strangbrüchen führen kann. Wenn diese Schäden nicht durch DNA-Reparaturenzyme beseitigt werden, kann es zu Mutationen kommen. Mehrere Studien konnten den Einfluss von oxidativem Stress auf das genetische Material und einen dadurch beschleunigten Alterungsprozess zeigen. Durch die Kumulation solcher DNA-Schädigungen kann auch die Entstehung von Krebs begünstigt werden [Ames and Saul 1986; Halliwell and Whiteman 2004].

1.4 Die Bedeutung von oxidativem Stress für Präeklampsie

1.4.1 Allgemeine Beschreibung der Präeklampsie

Präeklampsie ist eine der häufigsten schwerwiegenden Schwangerschafts-Komplikationen, deren Pathogenese nach wie vor weitgehend unklar ist. Sie tritt weltweit auf, besonders dramatisch ist ihre Rolle in der dritten Welt: Dort stellt sie die dritthäufigste Ursache der mütterlichen Morbidität [Rosenfield and

Fatalla 1990]. Aber auch in Deutschland gehen ca. 5 % der Schwangerschaften mit Präeklampsie einher.

Die Präeklampsie ist eine Multisystem-Erkrankung, die zu Funktionsstörungen mehrerer Organe führen kann und sich daher in vielfältigen Symptomen äußert. Das Krankheitsbild und der Verlauf dieser Krankheit sind sehr variabel. Die perinatale Morbidität liegt bei 20-25%, hervorgerufen durch eine erhöhte Frühgeburtenrate, eine vorzeitige Plazentaablösung sowie eine intrauterine Wachstumsretardierung [Ounsted 1988; Visser et al., 1986].

Präeklampsie ist im Rahmen der Schwangerschaftshypertonie zu sehen, die immerhin bei 20 bis 50 % aller Schwangerschaften zu finden ist [Grospietsch 2000; Walker 2000]. Diese hypertensive Erkrankung kommt in verschiedenen Formen vor, ihre Differenzierung ist für die Diagnose der Krankheit natürlich sehr wichtig. Entscheidend dabei ist das Vorkommen weiterer Symptome, wie z. B. der Proteinurie [Heilmann and Rath 2002].

Es werden unterschieden:

- Präeklampsie (=Gestose, proteinurische Gestationshypertonie, preeclampsia): Hier liegt die Hypertonie zusammen mit einer Proteinurie vor (5-6 % aller Schwangerschaften). Definitionsgemäß darf die Hypertonie nicht vor der 20. SSW auftreten. Aus der Präeklampsie können sich zwei schwere Verlaufsformen entwickeln, zum einen die Eklampsie, bei der tonisch-klonische Krampfanfälle auftreten, die an epileptische Anfälle erinnern, außerdem Zyanose, Apnoe und Bewusstlosigkeit, zum anderen das sogenannte HELLP-Syndrom, bei dem Schädigungen der Erythrozyten und der Leber sowie eine Erniedrigung der Thrombozyten-Zahl auftreten.
- (Einfache) schwangerschaftsinduzierte Hypertonie (SIH): In diesen Fällen ist die Hypertonie nicht mit einer Proteinurie kombiniert (6-7% aller Schwangerschaften). Für die Diagnose ist auch hier wichtig, dass die

Hypertonie nicht vor der 20. Schwangerschaftswoche (SSW) besteht und auch nicht länger als sechs Wochen nach der Geburt anhält.

- Chronisch vorbestehende Hypertonie: Hier steht die Hypertonie nicht primär im Zusammenhang mit der Schwangerschaft, sondern besteht bereits vor dem Eintritt der Schwangerschaft, mindestens vor der 20. SSW, und dauert über die Schwangerschaft hinaus an (3-5 % aller Schwangerschaften).
- Wenn zu einer chronischen Hypertonie noch eine Hypertonie durch Präeklampsie dazukommt, spricht man von einer Propfpräeklampsie (bei 25 % aller Schwangerschaften mit chronischer Hypertonie).
- Sonstige hypertensive Komplikationen: Durch andere Erkrankungen erzeugte Hypertonie wie z. B. bei Hyperthyreose.

Die Blutdruckwerte liegen bei den leichten Formen zwischen 140/90 mmHg und 160/110 mmHg, bei den schweren Formen über 160/110 mmHg.

1.4.2 Oxidativer Stress in der Pathogenese der Präeklampsie

Ursache und Entstehung der Präeklampsie sind bis heute immer noch nicht klar. Seit langer Zeit schon wurde vermutet, dass die Plazenta eine zentrale Schlüsselstellung für die Pathogenese und Pathophysiologie der Präeklampsie einnimmt [Brosens et al., 1972].

Dabei haben die Trophoblasten eine wichtige Funktion, deren endovaskuläre Invasion in die Spiralarterien bei der Präeklampsie mangelhaft erfolgt. Diese Prozesse sind mit einer gesteigerten Produktion von vasokonstriktorisches Substanzen und Cytokinen durch die Trophoblastzellen verbunden. Die Folge ist einerseits eine Minderdurchblutung der Plazenta mit entsprechender Hypoxie, andererseits wird durch die Freisetzung von Cytokinen im mütterlichen Organismus eine Inflammationsreaktion induziert, die mit der Ausbildung von

oxidativem Stress verbunden ist [Benyo et al., 1997; Many et al., 2000; Wang and Walsh 1996].

Die durch den oxidativen Stress erzeugten freien Radikale können die Funktionen des vaskulären Endothels beeinträchtigen, die vor allem in der Regulation des arteriellen Blutdrucks und der lokalen Organdurchblutung bestehen. Reaktive Spezies können in diese Mechanismen durch Verstärkung der Vasokonstriktion eingreifen, indem sie einerseits den endothelialen Vasodilatator NO inaktivieren oder direkt die arterielle glatte Muskulatur stimulieren [Davidge 1998; Heinle 1999]. Die in der Präeklampsie beobachtete periphere Vasokonstriktion mit Anstieg des arteriellen Blutdrucks und die verschlechterte Perfusion der Plazenta und der mütterlichen Organe können daher zwanglos mit der Wirkung des oxidativen Stresses erklärt werden.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass die durch die Sauerstoffradikale entstehenden Lipidperoxide ihrerseits die Cyclooxygenase zur Produktion von Prostacyclinen und Thromboxanen stimulieren [Walsh et al., 1993], während andererseits die PGI_2 -Synthetase durch Lipidperoxide gehemmt wird [Warso and Lands 1983]. Dadurch wird insgesamt das Gleichgewicht zwischen PGI_2 und TXA_2 zu Gunsten des Vasokonstriktors TXA_2 gestört, wodurch ebenso die maternale Hypertonie und die Zunahme der Thrombozytenaggregation erklärt werden können. Die erhöhte Aktivität der Cyclooxygenase führt selbst wieder zu vermehrter Produktion von freien Radikalen [Kukreja et al., 1986].

Ness & Roberts stellten 1996 ein Zwei-Stadien-Modell der Präeklampsie vor, das in Abb. 1-2 dargestellt wird. Hierbei wird für die Pathogenese der Präeklampsie einerseits von einer schlecht durchbluteten Plazenta ausgegangen, andererseits von verschiedenen mütterlichen Faktoren, die u. a. in genetischer Disposition, Ethnizität, Alter, Multigravidität, sozialen Umständen, Ernährung und Lebensweise bestehen. Die darin bedingten Konstellationen sollen zu oxidativem Stress führen, der dann in einem zweiten Stadium die Präeklampsie auslösen soll [Ness and Roberts 1996; Roberts and Hubel 1999b].

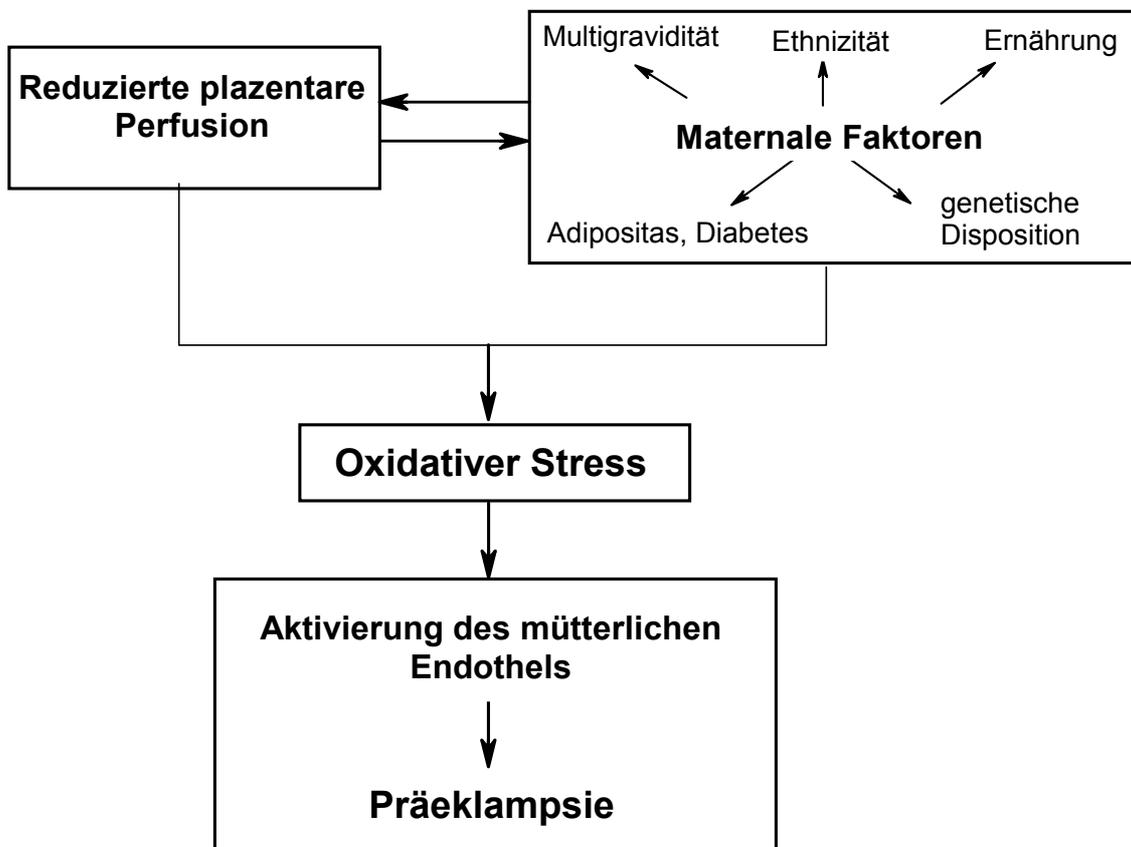


Abb. 1-2: Das Zwei-Stadien-Modell der Präeklampsie. Abbildung modifiziert nach Roberts [Roberts and Hubel 1999a].

Unabhängig davon, welches Modell zu Grunde gelegt wird, steht oxidativer Stress an zentraler Stelle in der Pathogenese der Präeklampsie. Seine Bedeutung für die Entstehung und den Verlauf dieser Erkrankung kann daher kaum überschätzt werden. In der vorliegenden Arbeit wird dies weiter bestätigt und unterstrichen.

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollten weitere Untersuchungen zur Bedeutung von oxidativem Stress bei Präeklampsie durchgeführt werden.

Dazu sollten zunächst unter Verwendung von Blutproben gesunder Probandinnen Indikatoren bzw. Marker charakterisiert werden, die geeignet sind, durch in-vitro-Inkubation mit Peroxiden erzeugten oxidativen Stress anzuzeigen.

Als eine wichtige neue Methode sollte hier die Bestimmung der mittels Chemilumineszenz messbaren Radikalbildungsreaktion eingesetzt werden, an der verschiedene Parameter ausgewertet werden können.

Zusätzlich sollte das Methodenspektrum aber auch durch die Bestimmungen des Thiol-Status, des Malondialdehydgehalts im Plasma und in der Erythrozytenmembran, des erythrozytären ATP-Gehalts, des Harnsäure- und Nitrit/Nitrat-Spiegels im Plasma sowie der Aktivierbarkeit von Blutleukozyten ergänzt werden, um Blutproben von gesunden und präeklampsischen Schwangeren zu untersuchen.

Zuletzt sollte als möglicher Therapieversuch untersucht werden, inwieweit eine Inkubation mit Vitamin C Einfluß auf diese Parameter hat.

2 Material

2.1 Geräte

Beckman Microfuge E™, Beckman, Palo Alto, Californien

Biolumat LB 9500 (1-Kanal), Berthold, Bad Wildbad

Biolumat LB 9505 C (6-Kanal), Berthold, Bad Wildbad

Digital PH-Meter Typ 643-1, Knick, Berlin

Magnetrührer IKA-Werk, Janke & Kunkel, Staufen

Metallblockthermostat DRI-Block® DB-3D, Techne, England

Rotilabo-Block-Heater H 250, Roth, Karlsruhe

Spectrophotometer U 2000, Hitachi, Tokyo, Japan

Ultraschallbad Sonorex 1RK100, Bandelin Electronic, Berlin

Victor 1420 Multilabel Counter, Wallac, Turku, Finnland

Vitatron, Refrigerated Centrifuge, Düsseldorf

Vortex-Genie, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

Zentrifuge Hettich EBA 3S, Hettich, Tuttlingen

Verbrauchsmaterial:

Biolumat-Meßröhrchen Typ 09777, Berthold, Wildbad

ELISA-Test-Platte, 2x8-Strip, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Küvetten, Sarstedt, Nümbrecht

Monovetten zur Blutentnahme, Sarstedt, Nümbrecht

2.2 Chemikalien und Reagenzien

AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid, Polysciences, Warrington, USA

ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II, Boehringer Mannheim, Roche Diagnostics, Mannheim

n-Butanol, Merck, Darmstadt

Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$), Roth, Karlsruhe

Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), Merck, Darmstadt

DTNB (5.5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure), Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Glucose, Roth, Karlsruhe

Glutathion reduziert, Sigma, Deisenhofen

Hämoglobin Kit, Ecoline, DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim

HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure), Roth, Karlsruhe

Kaliumborhydrid (KBH_4), Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid (KCl), Roth, Karlsruhe

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Merck, Darmstadt

Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3), Merck, Darmstadt

Kaliumnitrat (KNO_3), Fluka, Buchs, Schweiz

Kaliumsuperoxid (KO_2), Sigma, Deisenhofen

Luminol (5-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazin-1,4-dion), Merck, Darmstadt

Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), Roth, Karlsruhe

Malondialdehyd, Sigma, Deisenhofen

Natriumchlorid (NaCl), Merck, Darmstadt

Natriumchloridtabletten 0,9 g (NaCl), Fresenius, Bad Homburg

Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), Roth, Karlsruhe

Natrium-Urat, Sigma, Deisenhofen

Natriumhydroxid (NaOH), Merck, Darmstadt und Roth, Karlsruhe

Nitrit/Nitrat, Farbtest, Roche, Mannheim

Perchlorsäure (HClO_4), Merck, Darmstadt

o-Phosphorsäure (H_3PO_4) 85 %, Merck, Darmstadt

Salzsäure (HCl) 25 %, Merck, Darmstadt

2-Thiobarbitursäure, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Trolox[®] (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure), Fluka, Buchs,
Schweiz

Vitamin C (Ascorbinsäure), Universitätsapotheke Tübingen

Wasserstoffperoxid 30 % (H_2O_2), Sigma, Deisenhofen

Xanthin (2,6-Dihydroxypurin), Sigma, Deisenhofen

Xanthinoxidase, Sigma, Deisenhofen

2.3 Lösungen

Puffer :

Normal-Tyrode pH 7,4 für 1 Liter		
NaCl	6,896 g	118 mM
KCl	0,373 g	5,0 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,293 g	1,19 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,213 g	1,54 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,368 g	2,5 mM
HEPES	2,383 g	10,0 mM
Glucose	1,0 g	5,0 mM
Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.		

PBS-Puffer pH 7,4 für 1 Liter		
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,442 g	8,1 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,102 g	0,74 mM
NaCl	8,182 g	140 mM
KCl	0,201 g	2,7 mM
Die Lösung wurde mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.		

Phosphat-Puffer pH 7,0 für 1 Liter		
KH ₂ PO ₄	13,609 g	100 mM
Die Lösung wurde mit KOH auf pH 7,0 eingestellt.		

Phosphat-Puffer pH 7,0 für 1 Liter		
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	13,799 g	100 mM
Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt.		

Reagenzien:AAPH-Lösung:

M_r (AAPH): 271,2; (1 M = 271,2 mg/ml)

Eine 500 mM AAPH-Lösung wurde mit destilliertem Wasser hergestellt. Die Lösung wurde frisch vor jeder Messung hergestellt und anschließend im Dunkeln auf Eis aufbewahrt.

ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II:

1) Luciferase/Luciferin-Reagenz, lyophilisiert: Das Enzym-Reagenz wurde mit 10 ml bidest. H_2O gelöst und im Kühlschrank im Dunkeln für 2-3 Stunden vor der Messung aufbewahrt. Zur Lagerung wurden Portionen zu 1 ml im Röhrchen bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

2) ATP Standard 10 mg, lyophilisiert (10 mg/ml entspricht einer 16.5 mM ATP-Lösung): Der ATP-Flasche wurde bidestilliertes H_2O zugesetzt, um eine Konzentration von 5 mg/ml zu erhalten.

DTNB-Lösung (1,5 mM):

Dem abgewogenen DTNB (5,95 mg/10 ml) wurde dest. H_2O zugegeben und mit Hilfe des Ultraschallbades dispergiert, anschließend im heißen Wasserbad (ca. $90\text{ }^\circ\text{C}$) gelöst.

Hämoglobin Kit, Ecoline[®] (=Transformationslösung):

K₃[Fe(CN)₆] 0,6 mM

KCN 0,1 mM

Phosphatpuffer pH 7,2 2,5 mM

Detergens

Harnsäure-Kit (UA Plus):

1) Reagenzlösung: Phosphatpuffer (0,05 M, pH 7,8), TOOS (7 mM), Ascorbatoxidase ≥ 5 U/ml, Detergenz: 48 g/l

2) Enzym/p-Aminophenazon (Startreagenz): Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,8), Kaliumhexacyanoferrat (II) 300 µM, 4-Aminophenazon: 5 mM, Peroxidase: ≥ 1,0 U/ml, Uricase: ≥ 0,5 U/ml

Luminol-Lösung (2 mg/ml):

20 mg Luminol wurden in 10 ml DMSO im Dunkeln gelöst und in Aliquots von 100 µl bei -20 °C aufbewahrt.

Nitrit/Nitrat, Farbttest (Roche):

Test-Kombination enthält:

- 1: 22 ml Lösung, zusammengesetzt aus Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 und Stabilisatoren
- 2: Sieben Tabletten, jede enthält 0,5 mg NADPH und Stabilisatoren
- 3: mit je 4 U lyophilisierter Nitrat-Reduktase

- 4: mit je 8 ml Farbreagenz I, zusammengesetzt aus Sulfanilamid und Stabilisatoren
- 5: mit je 8 ml Farbreagenz II, zusammengesetzt aus N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid und Stabilisatoren

Reaktionsgemisch 2: Eine Tablette aus Flasche 2 wurde in 3 ml Kaliumphosphatpuffer aus Flasche 1 gelöst.

Opsonisiertes Zymosan:

Die Aktivierung der Phagozyten erfolgte mit opsonisiertem Zymosan (OZ). Dabei wurden 200 mg Zymosan in 20 ml NaCl-Lösung (0,9 %) suspendiert und über Nacht gerührt. Die Suspension wurde 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand entfernt. Zum Niederschlag wurden 5 ml frisches Citratplasma gegeben, das Gemisch wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert, der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde mit NaCl-Lösung (0,9 %) dreimal gewaschen, danach in 4 ml NaCl-Lösung (0,9 %) resuspendiert und homogenisiert. Die Suspension wurde in Aliquots zu 200 µl bei -20 °C aufbewahrt.

Trolox[®]-Stammlösungen:

Eine 100 mM (25,8 mg/ml) Trolox-Lösung wurde mit Methanol als Lösungsmittel hergestellt. Für die weiteren Verdünnungen aus der Trolox-Stammlösung wurde dest. Wasser verwendet.

Xanthinlösung 2,4 mM:

Es wurde 36,5 mg Xanthin in 1 ml 1 M-NaOH gelöst und anschließend mit dest. H₂O 1:100 verdünnt. Die Lösung wurde im Dunkeln aufbewahrt.

2.4 Blutproben der Patientinnen

Die Blutproben von gesunden und präeklampsischen Schwangeren wurden in der Universitäts-Frauenklinik Tübingen abgenommen und im Institut für Physiologie untersucht. Insgesamt wurden 86 Probandinnen für die Studie herangezogen, davon 49 mit normaler Schwangerschaft und 37 mit Präeklampsie.

In der Gruppe der normalen Schwangeren hatten vier Patientinnen Asthma, eine Patientin Sneddon-Syndrom, eine Skoliose, eine Diabetes Mellitus und eine Adipositas, in der Gruppe der präeklampsischen Schwangeren hatten zwei Patientinnen Asthma, eine Patientin HELLP-Syndrom und zehn weitere Adipositas, die alle in die Studie eingeschlossen wurden. 11 Patientinnen mit Präeklampsie waren schon vor der stationären Aufnahme bzw. vor der Blutentnahme unter antihypertensiver Behandlung (drei dieser Patientinnen hatten Diabetes mellitus). Über 50 der Schwangeren (davon 32 gesunde und 18 mit Präeklampsie) haben während ihrer Schwangerschaft Vitamine und Magnesium eingenommen.

Die Untersuchungen mit humanem Material wurden durch die Ethik-Kommission der Universität Tübingen mit der Projektnummer 301/99 genehmigt. Die Blutproben der Schwangeren wurden zwischen 2002 und 2004 abgenommen und untersucht.

2.5 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden die folgenden Programme verwendet:

- WinSTAT für Excel
- GraphPad Software, InStat version 3, USA.

3 Methoden

3.1 Gewinnung von Blut, Plasma, Erythrozyten und Hämolysat

Venöses, mit Lithium-Heparin antikoaguliertes Vollblut von Schwangeren und gesunden Nichtschwangeren wurde bei 2000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Dann wurde das Blutplasma von den Zellen getrennt.

Frisches Plasma wurde nativ und nach Induktion von oxidativem Stress zur Messung der gesamten antioxidativen Kapazität und der Peakhöhe mittels AAPH-Reaktion und zur Bestimmung des Thiol-Status verwendet. Für die Bestimmung des Malondialdehyds, der Harnsäure und des Nitrit/Nitrats wurde das restliche Plasma eingefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

Die sedimentierten Zellen wurden geteilt: Ein Aliquot wurde mit dest. H₂O hämolysiert (Verdünnungsfaktor 2,4), davon wurden 200 µl für die Hämoglobin-Bestimmung bei -20 °C aufbewahrt. Der Rest des Hämolysats wurde für die Bestimmung des intrazellulären GSH- und ATP-Gehalts verwendet. Ein anderer Teil der Blutzellen wurde für die Untersuchung des Malondialdehyd-Gehalts in der Erythrozytenmembran bei -20 °C aufbewahrt. Der MDA-Gehalt wurde nach einer Lagerzeit von bis zu fünf Monaten im Plasma und von bis zu acht Monaten in der Erythrozytenmembran gemessen. Dabei wurden Proben von gesunden Probandinnen und Patientinnen nach vergleichbarer Lagerzeit analysiert.

Die Bestimmung von intrazellulärem GSH und ATP wurde noch am Tag der Blutabnahme durchgeführt. Dem Hämolysat (500 µl) wurde 5%ige Perchlorsäure (250 µl) zur Proteindenaturierung zugegeben, gemischt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand

wurde mit gesättigter Kaliumhydrogenkarbonat-Lösung tropfenweise unter Kontrolle mit Indikatorpapier neutralisiert. Nach 10 Minuten auf Eis wurde bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand für die weiteren Analysen verwendet.

Für die Untersuchung der Aktivierbarkeit der Leukozyten wurde EDTA-Blut verwendet. Diese Messung wurde nur bei Blutproben von gesunden und präeklampsischen Schwangeren durchgeführt.

3.2 Induktion von oxidativem Stress in vitro

3.2.1 Induktion mit H₂O₂

Zur Simulation von oxidativem Stress im Plasma wurde eine H₂O₂-Endkonzentration von 5 mM verwendet, da sich diese in Vorversuchen mit Kaninchensera als optimal herausgestellt hatte [Reimann 2003].

Von einer 105 mM H₂O₂-Stammlösung wurden 40 µl zu 800 µl Plasma von gesunden, nichtschwangeren Probandinnen zugegeben und gemischt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert.

3.2.2 Induktion mit KO₂

Eine KO₂-Stammlösung mit einer Konzentration von 105 mM wurde mit dest. H₂O hergestellt, davon wurden 40 µl zu 800 µl Plasma von gesunden, nichtschwangeren Probandinnen zugegeben (Endkonzentration 5 mM). Da sich KO₂ sehr schnell zersetzt, wurde es unverzüglich nach dem Lösen zum Plasma pipettiert und für 30 Minuten bei RT inkubiert.

3.2.3 Induktion mit Xanthin/Xanthinoxidase

Es wurde eine Xanthinlösung mit einer Konzentration von 2,4 mM hergestellt, wobei Xanthin zuerst mit NaOH gelöst und weiter mit dest. H₂O verdünnt wurde. Die Lösung wurde im Dunkeln aufbewahrt.

Die Xanthinoxidase-Stammlösung wurde mit einer Aktivität von 0,435 mU/μl hergestellt. Die Lösung wurde im Dunkeln auf Eis aufbewahrt. Zur Induktion des oxidativen Stresses wurden zu 750 μl Plasma 30 μl Enzym-Lösung und 30 μl Xanthinlösung pipettiert und bei 37 °C für 10 Minuten inkubiert. Zur Kontrolle dienten Ansätze, die ohne Enzym inkubiert wurden.

3.2.4 Induktion mit t-Butylhydroperoxid

Dabei wurden t-BHP-Stammlösungen mit Konzentrationen von 67,5 mM und 100 mM in dest. H₂O hergestellt. Davon wurden 40 μl der 67,5 mM-Lösung und 89 μl bzw. 220 μl der 100 mM-Lösung zu 500 μl Plasma pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Endkonzentrationen der Ansätze waren dann 5, 15 bzw. 30 mM.

3.2.5 Induktion von oxidativem Stress in Vollblut

Speziell für die ATP-Bestimmung in Erythrozyten unter oxidativem Stress wurde frisch abgenommenes Heparinblut auf drei Röhrchen verteilt und mit H₂O₂ und t-BHP bzw. Tyrode bei 37 °C inkubiert (Endkonzentration der Oxidantien jeweils 5 mM).

3.3 Bestimmung der gesamten antioxidativen Kapazität durch die AAPH-Reaktion

3.3.1 Prinzip der AAPH-Reaktion

Die Messung der gesamten antioxidativen Kapazität von Plasma wurde mittels Luminol-vermittelter Chemilumineszenz der AAPH-Reaktion durchgeführt [Lissi et al., 1992]. Dabei wurde der Azoradikalbildner 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid verwendet, der spontan in zwei Radikale zerfällt, die mit Luminol (3-Aminophthalsäure-hydrazid) unter Photonenbildung reagieren. In Abb. 3-1 ist die Reaktion dargestellt.

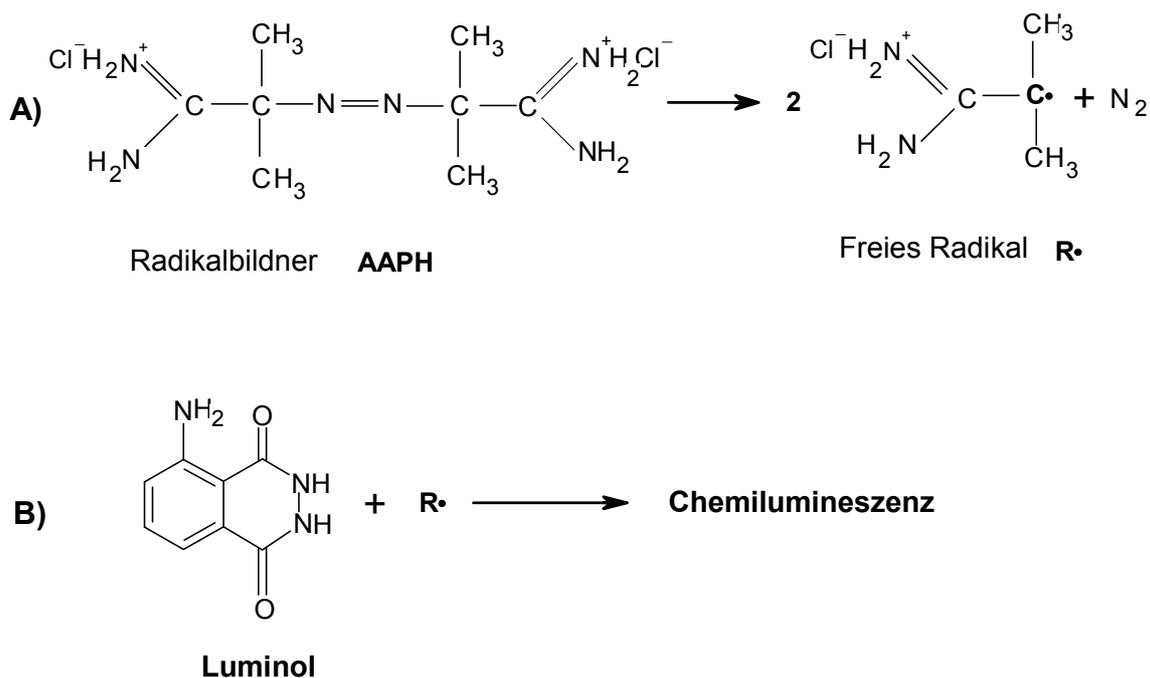


Abb. 3-1: **A)** Zerfallsreaktion von AAPH in zwei kationische freie Radikale.
B) Reaktion des Radikals mit Luminol unter Emission von Licht.

Abb. 3-2 zeigt den Verlauf der Chemilumineszenz der AAPH-Reaktion einer Plasma-Probe im Vergleich mit einer Trolox-Eichlösung. Zunächst wurde nur Puffer mit Luminol und AAPH gemessen, die Radikalbildung läuft langsam an. Ohne weiteren Zusatz erreichte die Lichtintensität nach etwa 15 Minuten einen Plateau-Wert, worauf 10 μl Eichlösung bzw. Plasma zupipettiert wurden. Nach Durchmischung wurde unverzüglich weiter gemessen. Sofort zeigte sich ein dramatischer Abfall der Lichtintensität, der die Wirkung der Radikalfänger der Eichlösung bzw. des Blutplasmas anzeigte. Erst nach Verbrauch der Antioxidantien stieg die Lichtintensität wieder an, wobei auch Werte über dem vorherigen Plateau erreicht werden konnten. Die Zeit vom Absinken bei Probenzugabe bis zum vorherigen Plateau-Wert wird Auslöschzeit genannt.

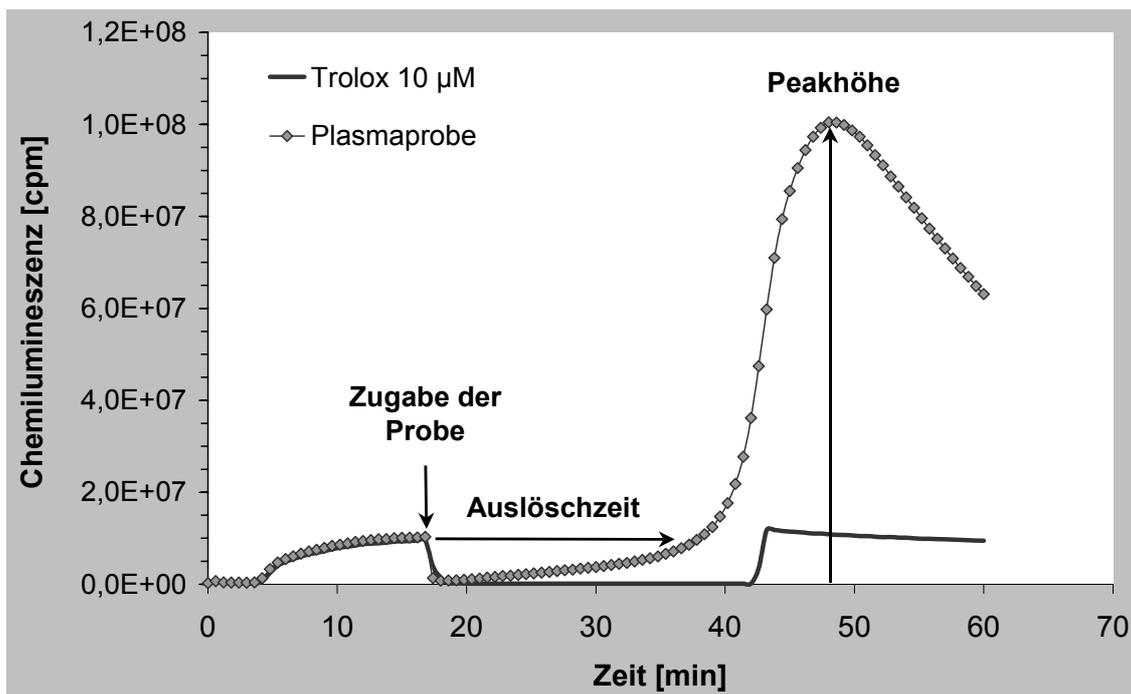


Abb. 3-2: Verlauf der Chemilumineszenz während einer AAPH-Reaktion.

Während bei Trolox der anschließende Plateau-Wert erhalten blieb, stieg bei den Plasma-Proben die Chemilumineszenz weit über den initialen Plateau-Wert

an. Offensichtlich waren im Blutplasma Substanzen vorhanden, die nach der Radikalabfangreaktion prooxidativ wirkten und für die überschießende Chemilumineszenz verantwortlich waren. Nach Erreichen eines Maximalwerts (Peakhöhe) fiel die Radikalproduktion dann wieder stark ab.

Die Dauer der Auslöschzeit liefert also Informationen über den Gehalt an Antioxidantien im Plasma und ist damit ein Maß für die gesamte antioxidative Kapazität des Plasmas, nach Wayner auch als „TRAP“ (= Total peroxy radical-trapping capability of plasma) bezeichnet [Wayner et al., 1985]. Die Bedeutung der Peakhöhe wird später in dieser Arbeit erläutert (Abschnitt 5.2.2).

3.3.2 Durchführung der Messungen

Das emittierte Licht wird über einen Photomultiplier im 6-Kanal-Biolumat (Berthold) bei 37 °C gemessen. Die Messwerte werden in counts per minute (cpm) angegeben, sie sind ein Maß für die Bildung von Radikalen und können als aktuelle Intensität oder als Integral über die gesamte Messzeit aufgenommen werden.

Die Daten der Lichtintensitäten wurden zusammen mit dem Kurvenverlauf ausgedruckt und zusätzlich in einem angeschlossenen PC gespeichert. Da die Empfindlichkeit der Meßkanäle des Biolumats unterschiedlich war, wurde eine Eichung des Gerätes mit gleichen Ansätzen für jeden Kanal durchgeführt.

Die Intensität des empfindlichsten Kanals wurde gleich Eins gesetzt und für die anderen Kanäle des Gerätes wurde ein entsprechender Korrekturfaktor ermittelt. Die Korrekturfaktoren des benutzten Biolumat-Geräts sind in Tabelle 3-1 dargestellt.

Tabelle 3-1: Korrekturfaktoren der Biolumatkanäle bei der AAPH-Reaktion für die Peakwerte (jeweils n = 5).

	Kanal 1	Kanal 2	Kanal 4	Kanal 5	Kanal 6
Mittelwert	1,4103	1,5042	1,2102	1,000	1,2988
Standardabweichung	0,029	0,051	0,016	0,00	0,026

In Tabelle 3-2 wird das Pipettierschema sowie die Konzentrationen der eingesetzten Lösungen für die AAPH-Meßmethode gezeigt (optimiert nach [Dalferth 2000]).

Tabelle 3-2: Pipettierschema der AAPH-Reaktion

Lösung	Stammlösung	Menge	Endkonzentration
PBS-Puffer pH 7,4		475 µl	
Luminol (2 mg / ml)	11,3 mM	5 µl	113 µM
AAPH	500 mM	10 µl	10 mM
Probe		10 µl	

Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität „TRAP_{Probe}“ wurde mittels einer Kalibrierung mit dem Vitamin-E-analogen Trolox[®] durchgeführt, das in Konzentrationen von 2 bis 10 µM eingesetzt wurde. Die Auslöschzeit wurde gegen die Trolox-Konzentration aufgetragen, wobei sich ein linearer Zusammenhang ergab. Eine solche Trolox-Eichgerade ist in Abb. 3-3 dargestellt, über die eine gemessene Auslöschzeit (min) in die entsprechende Troloxkonzentration (µM) umgerechnet werden konnte.

Neben der Auslöschzeit wurde auch die Peakhöhe, also der maximale Wert der Chemilumineszenz, dem korrigierten Verlauf der Chemilumineszenz der AAPH-Reaktion entnommen (Abb. 3-2).

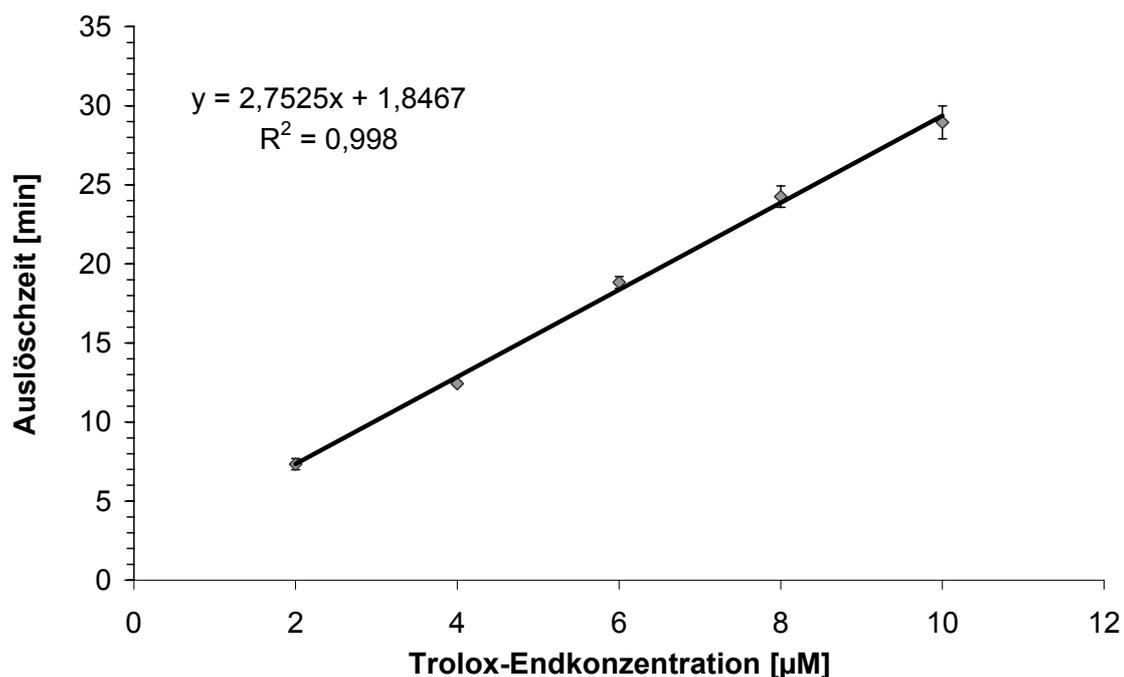


Abb. 3-3: Trolox-Eichgerade für die AAPH-Reaktion. Dargestellt sind die Mittelwerte der Auslöschzeiten bei den einzelnen Konzentrationen \pm S.D. (jeweils $n = 5$).

3.4 Bestimmung von GSH in Erythrozyten und des Thiol-Status im Blutplasma

3.4.1 Prinzip der Thiol-Bestimmung

Die Thiol-Bestimmung erfolgte über die reduktive Spaltung von DTNB (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)), dem sogenannten Ellmann's Reagenz, zur gelb gefärbten 2-Nitro-5-thiobenzoessäure, die photometrisch bei 405 nm bestimmt werden kann [Ellman 1959; Jocelyn 1972; Riener et al., 2002]. Abb. 3-4 zeigt die chemische Reaktion zwischen DTNB und z. B. reduziertem GSH.

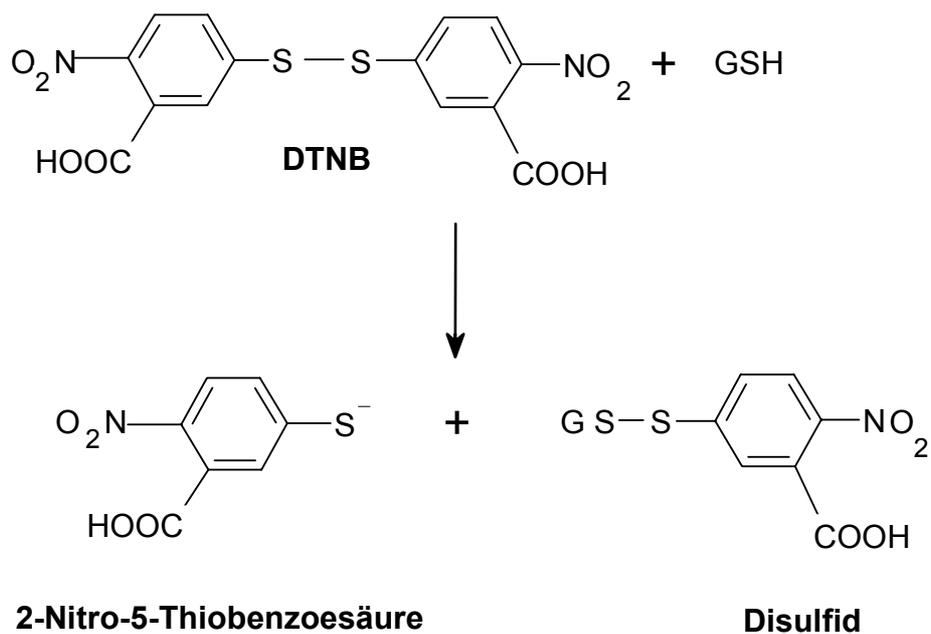


Abb. 3-4: Reaktion von 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) mit GSH.

3.4.2 GSH in Erythrozyten

Die Messung des GSH in Erythrozyten erfolgte durch Zusatz von 50 μl des aus Hämolyolat gewonnenen und neutralisierten Überstands (Abschnitt 3.1) zu 750 μl Phosphatpuffer (pH 7) und 200 μl DTNB-Lösung (Endkonzentration 0,3 mM), das Pipettierschema ist in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

Tabelle 3-3: Pipettierschema bei der GSH-Bestimmung in Erythrozyten.

Lösungen	Ansatz [μl]	Referenz [μl]
Na-Phosphatpuffer 100 mM, pH 7,0	750	750
Probe	50	-
dest. H ₂ O	-	50
DTNB 1,5 mM	200	200

Die Ansätze wurden in Elisa-Testplatten nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur im Victor 1420 Multilabel Counter bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen den Leerwert photometrisch bestimmt.

Für die Bestimmung der Thiolkonzentrationen wurde eine Glutathion-Eichgerade erstellt (Abb. 3-5).

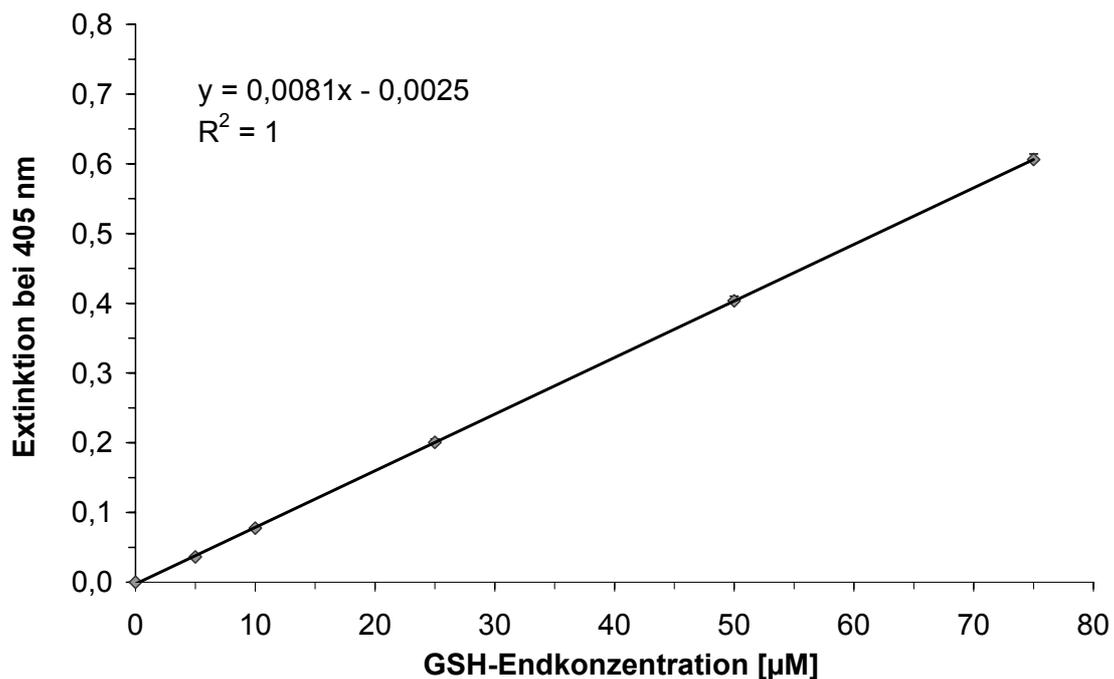


Abb. 3-5: Glutathion-Eichgerade. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. (jeweils $n = 4$).

Als Stammlösung zur Erstellung einer Verdünnungsreihe wurde eine 10 mM Glutathion-Lösung verwendet. Die Stammlösung wurde weiter verdünnt, um Konzentrationen im Bereich 0,1 mM bis 1,5 mM zu erreichen. Diese Eichlösungen wurden dann wie die Proben behandelt und gemessen.

3.4.3 Bestimmung des Thiol-Status in Plasma

Zur Ermittlung des Thiol-Status im Blutplasma, der als Marker für oxidativen Stress dient, wurden die Konzentrationen von vier verschiedenen Spezies von Thiolen gemessen:

- A) die gesamten freien, also reduzierten, SH-Gruppen, d.h. sowohl die niedermolekularen als auch die an Proteine gebundenen;

- B) die gesamten SH-Gruppen nach vollständiger Reduktion mit KBH_4 ;
- C) die freien niedermolekularen SH-Gruppen nach Proteindenaturierung;
- D) die gesamten niedermolekularen SH-Gruppen, die nach Denaturierung im Überstand (von Spezies C) durch Reduktion mit KBH_4 erfassbar waren.

Die Vorbereitung der Probe für die Messung der einzelnen Thiol-Spezies:

Spezies A:

Hier wurden 50 μl Plasma ohne zusätzliche Behandlung zu 750 μl Phosphatpuffer und 200 μl DTNB pipettiert und 10 Minuten bei RT inkubiert. Dann erfolgte die Photometrie.

Spezies B:

Hier wurden 20 μl einer 0,22 M KBH_4 -Lösung zu 200 μl Plasma zugegeben. Der Ansatz wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1 M HCl neutralisiert [Bir et al., 1970]. 50 μl des Ansatzes wurden entsprechend weiter bearbeitet.

Spezies C:

400 μl Plasma wurden mit 400 μl Wasser verdünnt, dann wurde 10 μl 5%ige HClO_4 dazu gegeben und gemischt. Der Ansatz wurde bei 100 °C für 15 Minuten im Heizblock inkubiert, dann auf Eis abgekühlt. Nach der Abkühlung wurde die Probe mit einem Spatel gerührt und zentrifugiert. Danach wurde ein Aliquot des Überstandes für die Thiolbestimmung verwendet.

Spezies D:

20 µl einer 0,22 M KBH_4 -Lösung wurden zu 200 µl vom Überstand aus der Spezies C zugesetzt und für 20 Minuten bei RT inkubiert, anschließend wurde mit 1 M HCl neutralisiert. Danach wurde der Ansatz wie bei den anderen Spezies behandelt.

Zur Bestimmung der Thiolkonzentrationen wurde mit GSH eine Eichgerade erstellt, die jeweiligen Verdünnungen durch Denaturierung, Reduktion etc. wurden berücksichtigt.

3.5 Bestimmung von Malondialdehyd in Blutplasma und Erythrozytenmembranen

3.5.1 Prinzip der Messung

TBARS sind die Peroxidationsprodukte von Lipiden, hauptsächlich von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Die Hauptkomponente dieser Substanzen stellt Malondialdehyd dar, das mit zwei Molekülen Thiobarbitursäure zu einem bei 535 nm photometrisch messbaren Polymethinfarbstoff reagiert [Esterbauer et al., 1991; Roth et al., 1997]. Die chemische Reaktion zwischen TBA und MDA ist in Abb. 3-6 dargestellt.

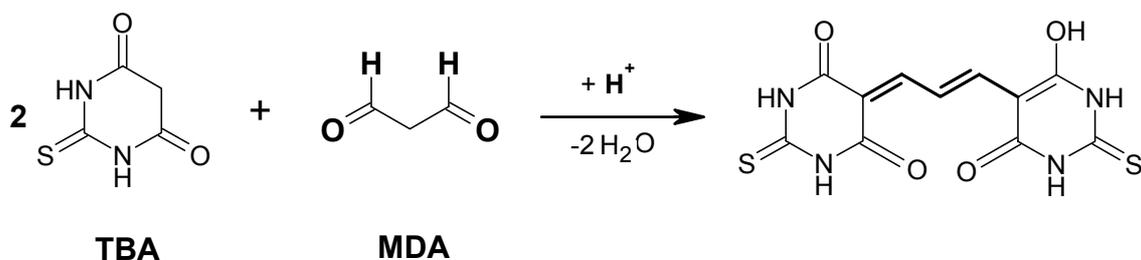


Abb. 3-6: Reaktion von Malondialdehyd (MDA) mit Thiobarbitursäure (TBA).

Zur Bestimmung der MDA-Konzentration wurde eine Eichgerade erstellt (Abb. 3-7). Dazu wurde eine Stammlösung mit 20 mM MDA hergestellt, diese wurde weiter verdünnt, so dass Endkonzentrationen im Bereich von 0,2 bis 2 μM erreicht wurden. Für die Reaktionsansätze wurde jeweils 1 ml MDA-Lösung eingesetzt.

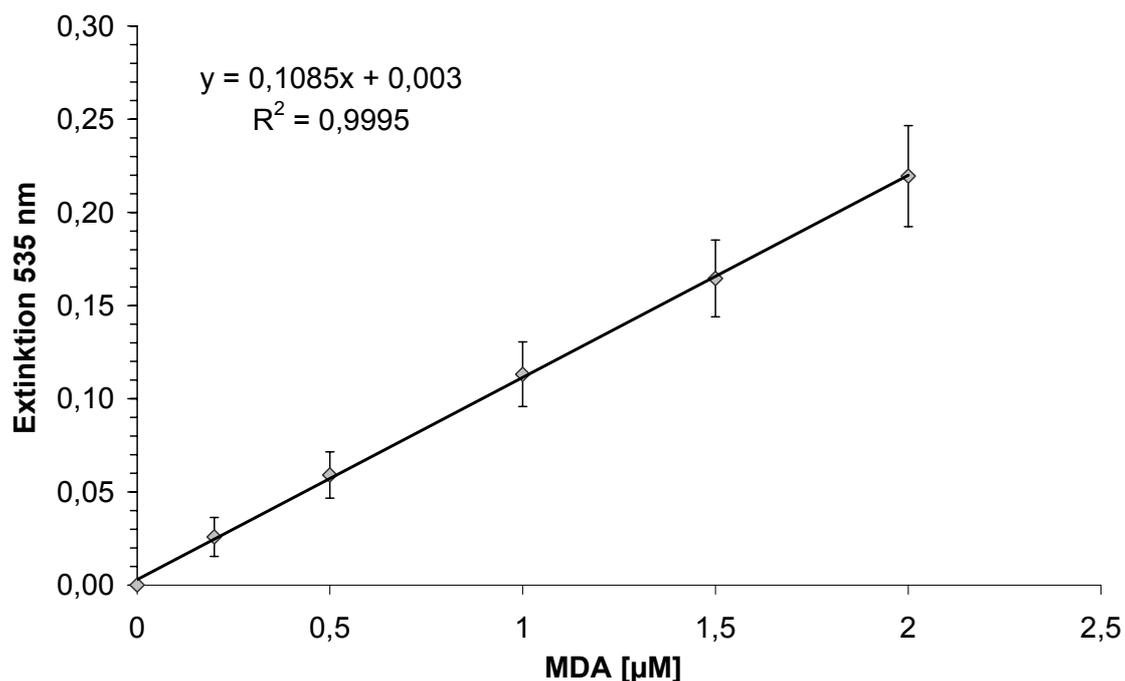


Abb. 3-7: Malondialdehyd-Eichgerade. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. (jeweils $n = 29$).

3.5.2 Gehalt an mit Thiobarbitursäure reagierenden Substanzen (TBARS) im Plasma

Für die MDA-Bestimmung wurden 100 μl Plasma mit Wasser auf 1 ml verdünnt und mit 1 ml einer 1%igen Phosphorsäure-Lösung und 200 μl einer 0,6%igen Thiobarbitursäure-Lösung versetzt. Tabelle 3-4 zeigt das Pipettierschema. Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei 100 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend auf Eis

abgekühlt. Nachher wurde die abgekühlte Probe mit 800 µl Butanol versetzt und ausgeschüttelt. Die Probe wurde 5 Minuten lang zentrifugiert, dann wurde die organische Phase (rosafarbiger Überstand) von der wässrigen Phase getrennt. Die photometrische Messung erfolgte bei 535 nm im Victor 1420 Multilabel Counter.

Tabelle 3-4: Pipettierschema bei der MDA-Bestimmung.

Lösungen	Eichlösung [µl]	Ansatz [µl]
Probe	1000	100
dest. H ₂ O	-	900
H ₃ PO ₄ (1%ig)	1000	1000
Thiobarbitursäure (0,6%ig)	200	200

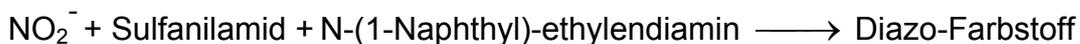
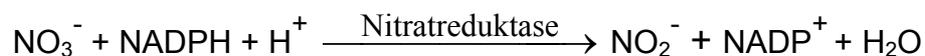
3.5.3 Bestimmung des MDA-Gehalts in Erythrozytenmembranen

Jeweils 400 µl des aufgetauten Hämolysats wurden abzentrifugiert und das Membranpellet 6-mal mit 1 ml KPP gewaschen. Dann wurden die Erythrozytenmembranen mit Puffer auf 1 ml aufgefüllt und homogenisiert.

Davon wurden 100 µl für die TBA-Bestimmung wie vorstehend beschrieben verwendet. Der MDA-Gehalt wurde auf den jeweiligen Hämoglobingehalt des Blutes bezogen.

3.6 Bestimmung von Nitrit/Nitrat

Die Nitrit/Nitrat-Messungen wurden mit einem Kit der Firma Roche durchgeführt. Nitrat wird dabei mit NADPH durch das Enzym Nitrat-Reduktase zu Nitrit reduziert, das weiter mit Sulfanilamid und N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid zu einem rot-violetten Diazo-Farbstoff reagiert.



Das bei -20 °C eingefrorene Heparin-Plasma wurde bei RT aufgetaut. 500 µl Plasma wurde zu 500 µl bidest. H₂O pipettiert und gemischt. Zur Proteindenaturierung wurden 40 µl 5%ige HClO₄ zugegeben, für 10 Minuten auf Eis gelagert und zentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit gesättigter KHCO₃-Lösung auf pH 7 neutralisiert. Dann wurden die Proben noch einmal für 10 min auf Eis gelagert und zentrifugiert. Zu 250 µl vom Überstand wurden 250 µl bidest. H₂O zupipettiert. Anschließend wurden zur Probe 250 µl Reaktionsgemisch 2 aus dem Kit (NADPH) und 20 µl Lösung 3 (Nitrat-Reduktase) pipettiert und gemischt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei RT inkubiert und die Extinktion E₀ bei 540 nm im Hitachi-Photometer U 2000 bestimmt. Danach wurden 250 µl Sulfanilamid-Lösung und 250 µl N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid-Lösung in den Ansatz pipettiert und gemischt. Die Proben wurden nochmals 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert, danach wurde erneut ihre Extinktion E_x bestimmt. Zur Auswertung wurde ΔE = E_x - E₀ berechnet.

Zur Bestimmung der Nitrat-Konzentration wurde eine Eichgerade erstellt. Als Stammlösung wurde eine Kaliumnitrat-Lösung mit einer Konzentration von 8,061 mM verwendet, die mit bidest. H₂O auf Konzentrationsbereiche zwischen 0,05 mg/l und 5 mg/l verdünnt wurde (Abb. 3-8).

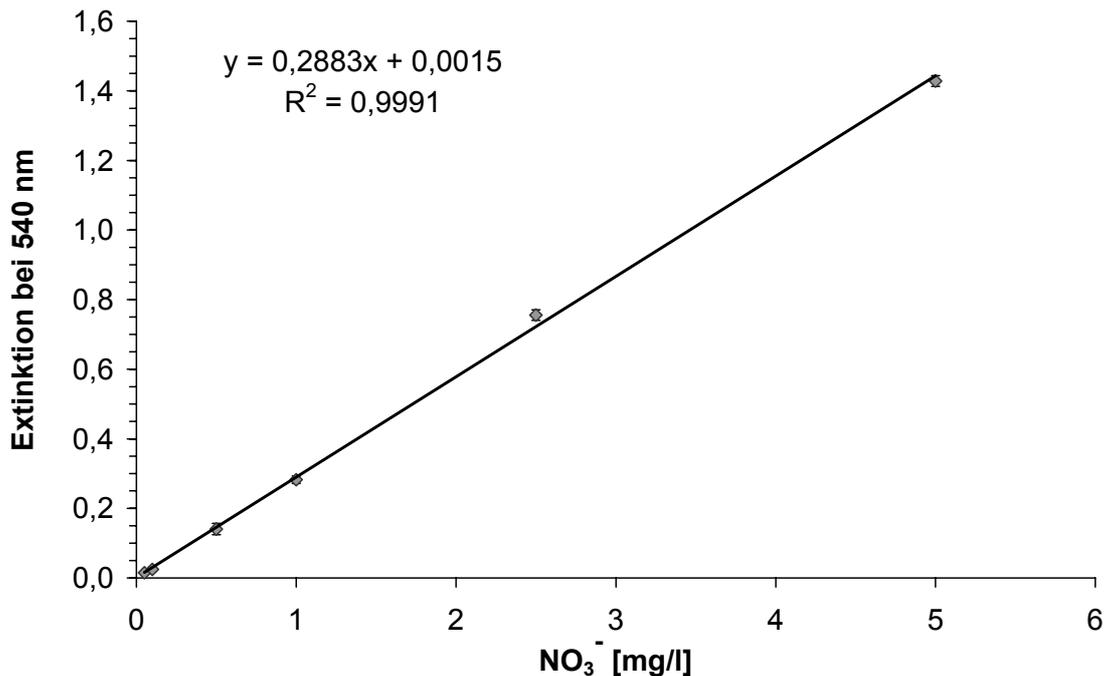


Abb. 3-8: Kaliumnitrat-Eichgerade. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. (jeweils $n = 2$).

3.7 Bestimmung von Harnsäure (2,6,8-Trihydroxypurin)

Für die Harnsäure-Bestimmung wurde der Kit UA Plus der Firma Roche benutzt. Harnsäure wird durch das Enzym Uricase in Allantoin umgewandelt, wobei das entstehende H₂O₂ mit 4-Aminophenazon und TOOS [=N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylanilin] unter katalytischer Wirkung der Peroxidase einen Chinondiimin-Farbstoff bildet. Die Intensität des Farbstoffs ist

proportional zur Konzentration der Harnsäure und kann photometrisch bestimmt werden. Die Reaktionen sind:



Zur Bestimmung der Harnsäure wurde 40 µl Heparin-Plasma zu 1 ml Reagenzlösung aus dem Kit (Puffer und TOOS) in eine Küvette pipettiert, gemischt und nach 5 Minuten Inkubation wurde die Extinktion E_0 bei 555 nm im Hitachi-Photometer U 2000 gemessen. Anschließend wurde in die Küvette 200 µl vom Startreagenz (4-Aminophenazon, Peroxidase, Uricase) pipettiert, die Küvette wurde für 5 Minuten bei RT inkubiert und innerhalb von 15 Minuten wurde die Extinktion E_x gemessen. Zur Auswertung wurde $\Delta E = E_x - E_0$ berechnet.

Zur Bestimmung der Konzentration von Harnsäure wurde eine Harnsäure-Eichgerade erstellt (Abb. 3-9). Dazu wurde eine Stammlösung von Natrium-Urat mit einer Konzentration von 0,4 mg/ml hergestellt. Die Stammlösung wurde weiter für die Konzentrationen im Bereich 0,01 bis 0,1 mg/ml mit dest. H_2O verdünnt.

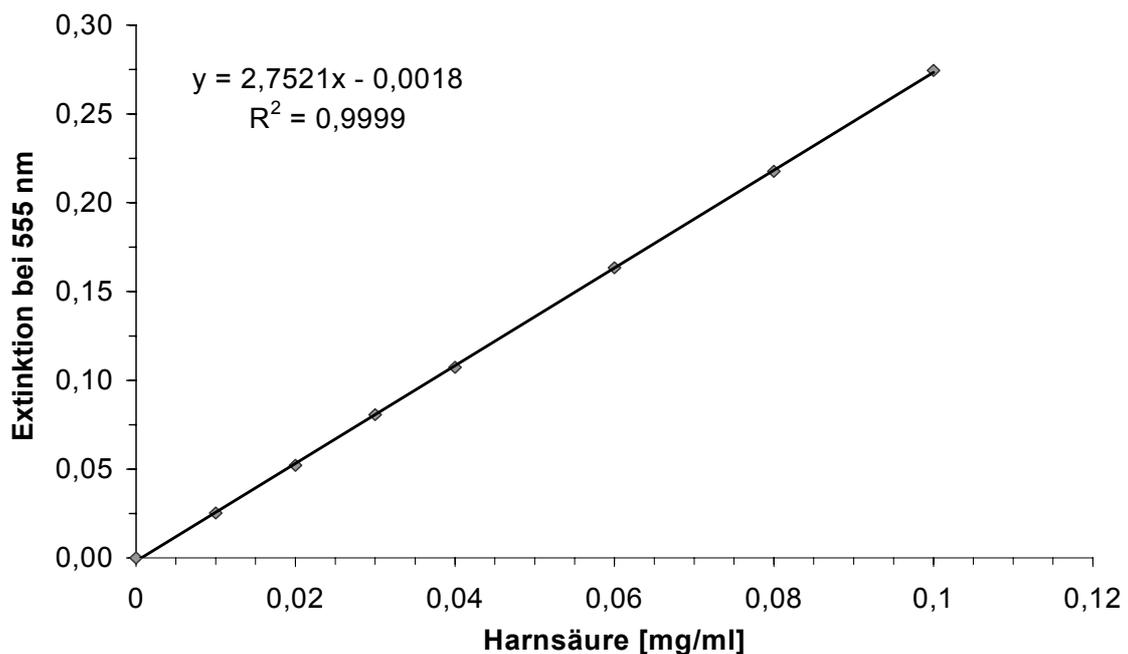


Abb. 3-9: Harnsäure-Eichgerade. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. (jeweils $n = 3$).

3.8 Bestimmung des ATP-Gehaltes in Erythrozyten

3.8.1 Prinzip der Lumineszenz-Reaktion

Die Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehaltes erfolgte mittels eines luminometrischen Verfahrens im 1-Kanal-Biolumat. Zum quantitativen Nachweis des ATPs wurde der „ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II“ verwendet. Luciferin wird in Gegenwart von Sauerstoff und ATP durch das Enzym Luciferase oxidiert. Die Reaktion ist in Abb. 3-10 dargestellt. In Abhängigkeit von Gerät und Methode können Endkonzentrationen im Messansatz zwischen 10^{-6} und 10^{-11} M erfasst werden [Wulff and Döppen 1985].

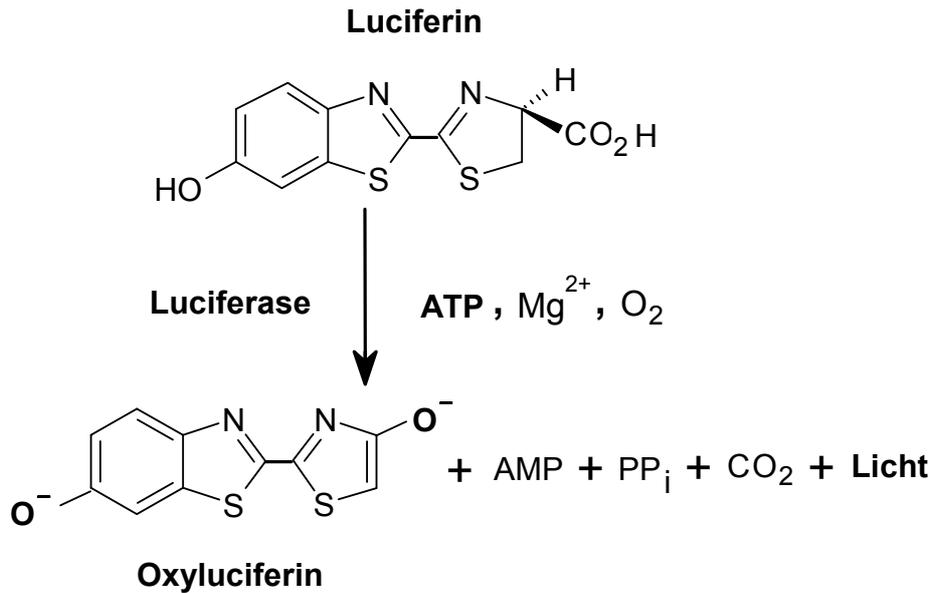


Abb. 3-10: Luciferin-Luciferase-Reaktion mit ATP unter Lichtemission.

3.8.2 Durchführung der Messungen

Zur ATP-Bestimmung wurden 10 µl des enteiweißten Hämolyсата (Abschnitt 3.1) zu 100 µl Kaliumphosphat in Biolumat-Meßröhrchen gegeben und dazu 40 µl Luciferin/Luciferase-Reagenz pipettiert. Die Lumineszenz wurde nach einer Inkubationszeit von 60 Sekunden im 1-Kanal-Biolumat bei 37 °C für 10 Sekunden gemessen. Zur Bestimmung der ATP-Konzentrationen wurde eine ATP-Eichgerade (Abb. 3-11) erstellt.

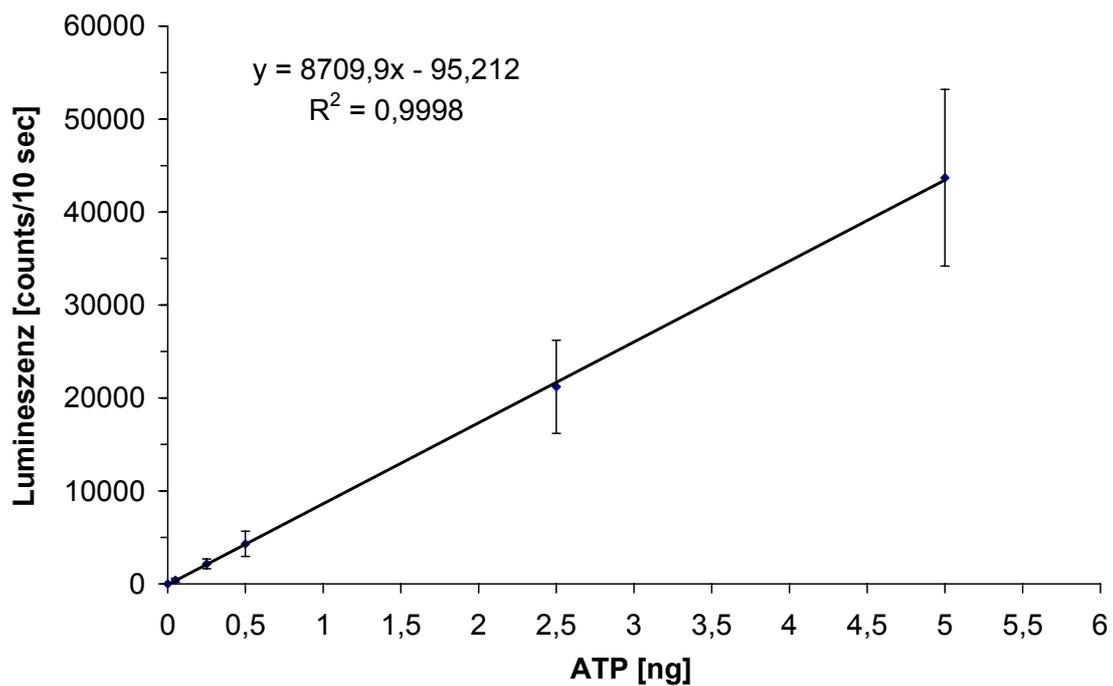


Abb. 3-11: ATP-Eichgerade. Dargestellt sind die Mittelwerte der Lumineszenz-Messung (counts pro 10 sec) \pm S.D. (jeweils $n = 12$).

Dazu wurde eine ATP-Stammlösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml (8,25 mM) hergestellt. Aus der Stammlösung wurde nach weiterer Verdünnung eine Lösung A mit der Konzentration 50 ng/ml erhalten. Die Lösung A wurde noch weiter verdünnt bis eine Konzentration von 0,5 ng/ml entstand, die als Lösung B bezeichnet wird. Kaliumdihydrogenphosphat (0,1 M) wurde zuerst in Biolumatröhrchen pipettiert und auf Eis aufbewahrt. Dann wurden von der Lösung A 100 μ l, 50 μ l, 10 μ l und 5 μ l sowie von der Lösung B entsprechend 100 μ l, 50 μ l und 10 μ l in die Biolumatröhrchen mit 100 μ l KPP pipettiert. Die Biolumatröhrchen wurden mit bidest. H₂O auf ein Endvolumen von 200 μ l aufgefüllt. Direkt vor der Messung wurde in die einzelnen Biolumatröhrchen 40 μ l Luciferin/Luciferase-Reagenz pipettiert und gemischt. Das Pipettierschema ist in Tabelle 3-5 zusammengefasst.

Tabelle 3-5: Pipettierschema der ATP-Messung

Lösungen	Eichkurve [μl]	Probe [μl]
Kaliumphosphatpuffer pH 7,0	100	100
Lösung A + bidest. H ₂ O	100+0; 50+50; 10+90; 5+95	-
Lösung B + bidest. H ₂ O	100+0; 50+50; 10+90; 5+95	
Probe + bidest. H ₂ O	-	10+90
Luciferin/Luciferase-Reagenz	40	40

3.9 Leukozytenaktivierung

Werden Leukozyten z. B. durch Zymosan zur Phagozytose stimuliert, so sezernieren sie reaktive Sauerstoffmetabolite, die mit Chemilumineszenz nachgewiesen werden können. Als Lumineszenzindikator wurde Luminol gewählt, die Reaktion wurde in einem 1-Kanal-Biolumat LB 9500 der Firma Berthold gemessen.

Zur Durchführung wurden in ein Biolumatröhrchen 300 μl Normal-Tyrode und 30 μl EDTA-Blut pipettiert und 25 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 5 μl Luminol wurde die Chemilumineszenz gemessen und die Counts über 10 Minuten integriert (basale Chemilumineszenz CL_B). Danach wurden 10 μl opsonisiertes Zymosan zugegeben und die Chemilumineszenz weitere 10 Minuten lang gemessen und integriert (stimulierte Chemilumineszenz CL_S). Nach Korrektur der erhaltenen Werte mit einer Referenz ohne Leukozyten wurden die Messwerte auf die Zahl der Leukozyten bezogen. Der Aktivierungsgrad der Leukozyten ergab sich als Quotient CL_S/CL_B .

3.10 Inkubationsversuche mit Vitamin C

Unter dem Aspekt, dass Antioxidantien möglicherweise von therapeutischem Nutzen bei Präeklampsie sind, sollte als Vorversuch die Inkubation von normalen Blutproben in Gegenwart von Vitamin C durchgeführt und die Effekte auf die Parameter des oxidativen Stresses gemessen werden.

Da der Vitamin-C-Spiegel im Plasma bei 2-14 mg/l (= 11-79 $\mu\text{mol/l}$) liegt, wurde frisch abgenommenes Heparinblut mit 113 bzw. 562 μM Vitamin-C-Lösung versetzt und über einen Zeitraum bis zu 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zum Vergleich wurde eine Blutkontrolle ohne Vitamin C und zwei vergleichbare Vitamin-C-Konzentrationen in Tyrode-Lösung inkubiert. Analysiert wurden die gesamte antioxidative Kapazität und Peakhöhe mittels der AAPH-Reaktion, der MDA-Gehalt im Plasma und in der Erythrozytenmembran sowie der ATP-Gehalt in Erythrozyten.

3.11 Hämoglobin-Bestimmung

Bei der Vorbereitung der Proben (Abschnitt 3.1) für die GSH- und ATP-Messung wurde immer ein Aliquot für die Hb-Bestimmung bei -20 °C aufbewahrt. Nach dem Auftauen des Hämolysats bei Raumtemperatur wurden 10 μl des Lysats zu 2500 μl Transformationslösung aus dem Hämoglobin-Kit Ecoline[®] gegeben und gemischt. Die photometrische Bestimmung wurde nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur im Hitachi-Photometer U 2000 bei einer Wellenlänge von 540 nm durchgeführt. Die Berechnung der Hb-Konzentration wurde mit dem Lambert-Beerschen Gesetz durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Induktion von oxidativem Stress in Plasma von gesunden Probanden in vitro

In diesen Untersuchungen ging es darum, geeignete biochemische bzw. klinisch-chemische Parameter für oxidativen Stress zu charakterisieren. Dazu wurde in vitro oxidativer Stress durch entsprechende Oxidantien (Wasserstoffperoxid, Kaliumsuperoxid, Xanthin/Xanthinoxidase, t-Butylhydroperoxid) in Plasma induziert, das anschließend durch verschiedene Verfahren analysiert wurde.

4.1.1 Wirkungen von H₂O₂

4.1.1.1 Einfluss von H₂O₂ auf den Zeitverlauf der AAPH-Reaktion mit Plasma

Bei diesen Versuchen wurden mittels der AAPH-Reaktion die Veränderungen der antioxidativen Eigenschaften des Plasmas nach Oxidation mit H₂O₂ (Endkonzentration 5 mM) untersucht. Die Effekte der Oxidation auf den Zeitverlauf der Reaktion sind in Abb. 4-1 dargestellt. Als Kontrolle wurde unbehandeltes Plasma verwendet.

Es zeigte sich einerseits eine Abnahme der Auslöschzeit bzw. der gesamten antioxidativen Kapazität (angegeben als TRAP) um etwa 11 %, wie in Abb. 4-2 zu sehen ist. Diese Verminderung der Auslöschzeit erwies sich als signifikant ($p < 0,01$).

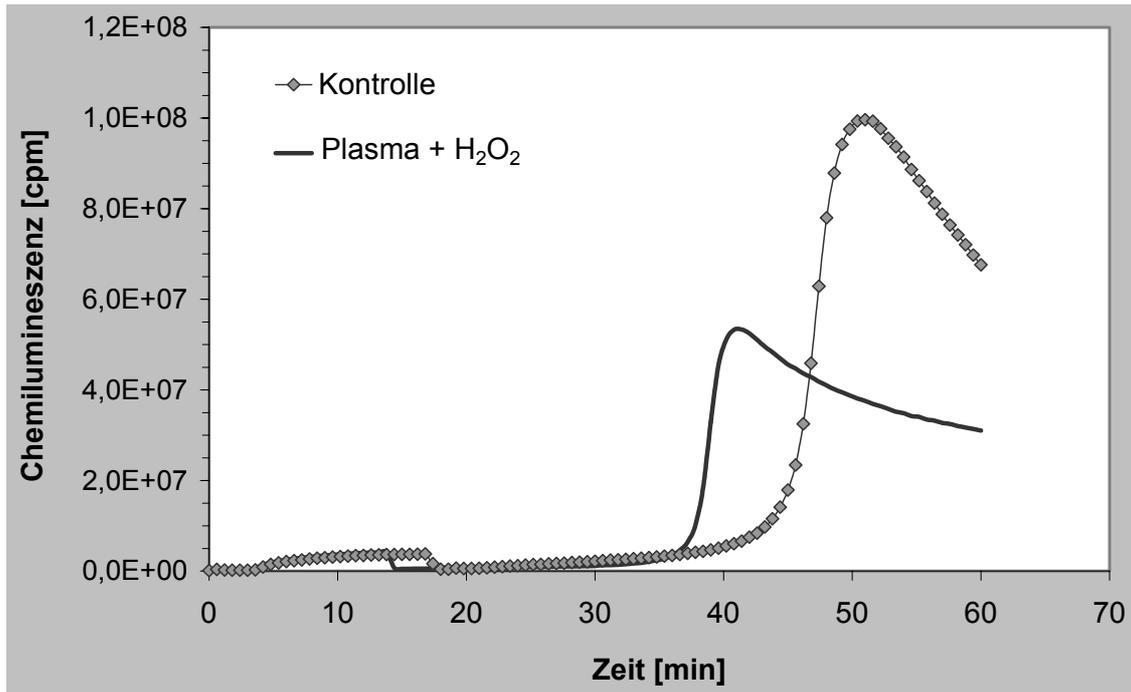


Abb. 4-1: Einfluss der H₂O₂-Inkubation von Plasma auf den Verlauf der AAPH-Reaktion (Original-Messung). H₂O₂ mit Endkonzentration von 5 mM.

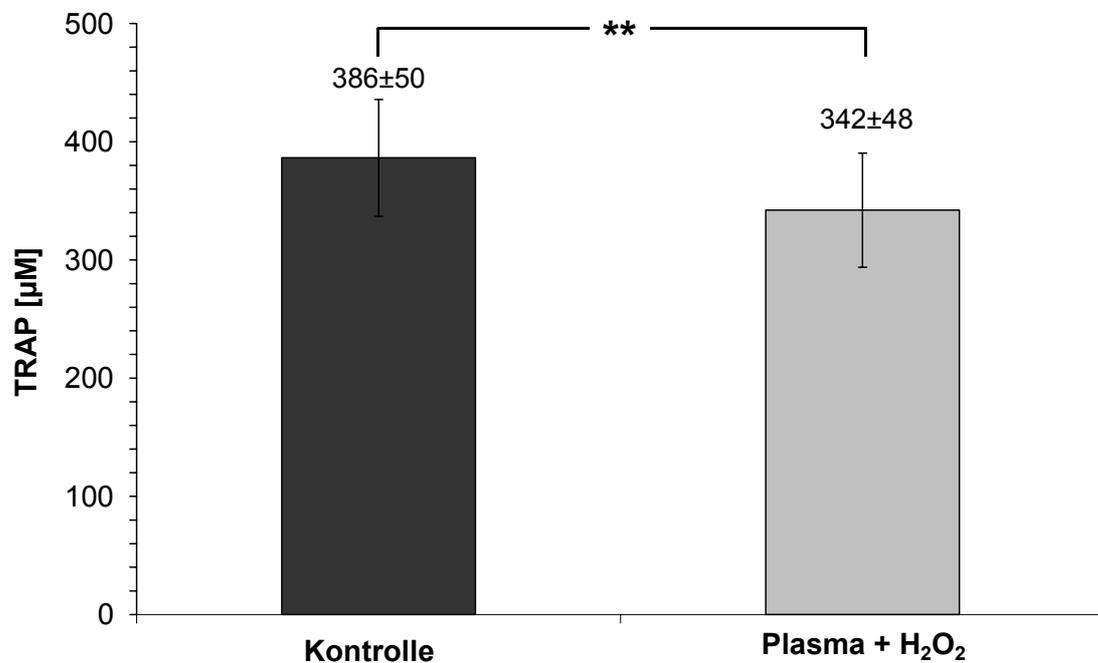


Abb. 4-2: Einfluss der H₂O₂-Inkubation (5 mM) auf die gesamte antioxidative Kapazität (TRAP) von Plasma. Mittelwerte ± S.D., n = 5, ** p < 0,01, verbundener t-Test.

Andererseits sieht man aber auch eine signifikante Abnahme der Peak-Intensität, die in der AAPH-Reaktion nach der Phase der Radikalauslöschung auftritt. Der Vergleich mit unbehandeltem Plasma zeigt, dass der Lumineszenzwert für die Peakhöhe durch die Oxidation auf etwa 50 % reduziert wird (Abb. 4-3). Dies spricht dafür, dass die Peak-Intensität unter Einwirkung von oxidativem Stress einen empfindlicheren Parameter darstellt als die Auslöschzeit.

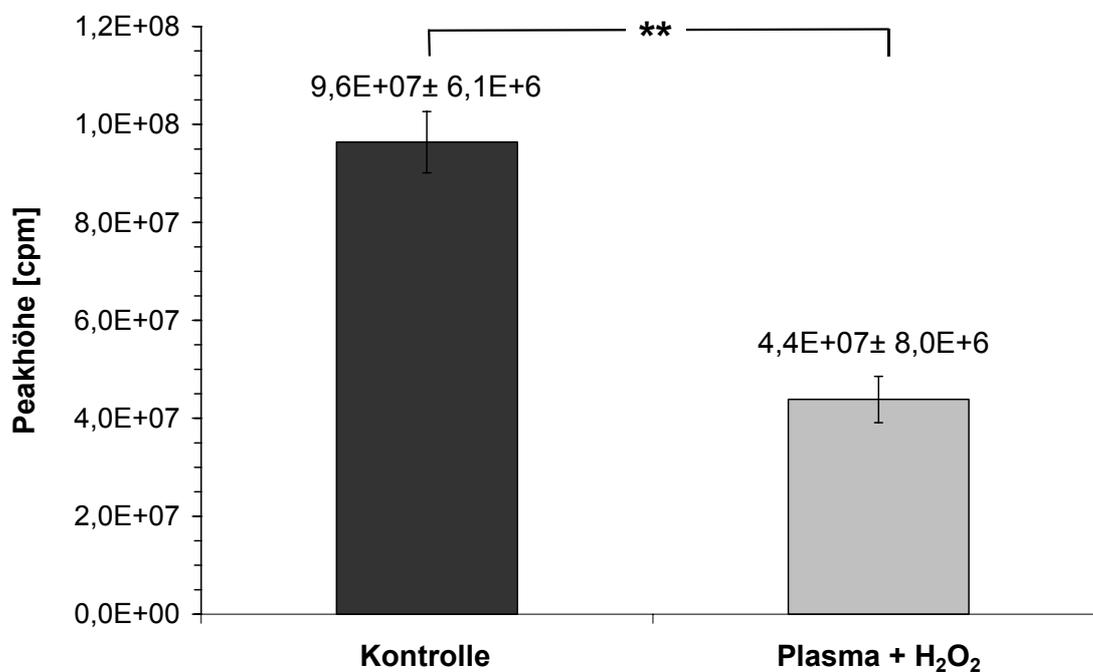


Abb. 4-3: Einfluss der H₂O₂-Inkubation von Plasma auf die Peakhöhe der AAPH-Reaktion. Mittelwerte ± S.D., n = 5, ** p < 0,01, verbundener t-Test.

4.1.1.2 Einfluss von H₂O₂ auf den Thiol-Status im Plasma

Mit diesen Untersuchungen sollte die Auswirkung von oxidativem Stress auf den Thiol-Status im Plasma charakterisiert werden. Der gesamte Thiol-Gehalt (B), der nach Reduktion von unbehandeltem Plasma gemessen wurde, wurde zu 100 % gesetzt; darauf wurden alle anderen Thiol-Spezies bezogen.

Abb. 4-4 zeigt den Thiol-Status von nativem Kontrollplasma: Knapp 40 % aller SH-Gruppen sind frei, d. h. nicht oxidiert (Spezies A). Von diesen freien SH-Gruppen ist etwa die Hälfte niedermolekular, die andere Hälfte an Proteine gebunden (C). Von den im Plasma durch Reduktion messbaren Thiolgruppen liegt der größte Anteil in Form niedermolekularer Disulfid-Komponenten (D) vor, nur ca. 20 % stammen aus Protein-Disulfiden.

Nach Einwirkung von H₂O₂ zeigt sich der Thiol-Status des Plasmas stark verändert (Abb. 4-5). Nur noch etwa 20 % aller SH-Gruppen sind frei, von diesen sind praktisch alle niedermolekular. Berechnet man speziell den Anteil der proteingebundenen Thiole (Quotient (A-C)/B), so erhält man die in Abb. 4-6 dargestellten Werte. Man erkennt sehr deutlich die Abnahme dieser Thiol-Spezies unter den gewählten Bedingungen des oxidativen Stresses. Das lässt darauf schließen, dass die Einwirkung der H₂O₂-Inkubation in erster Linie Auswirkungen auf die freien proteingebundenen SH-Gruppen hat, während sich der Anteil der freien niedermolekularen SH-Gruppen nur geringfügig verändert.

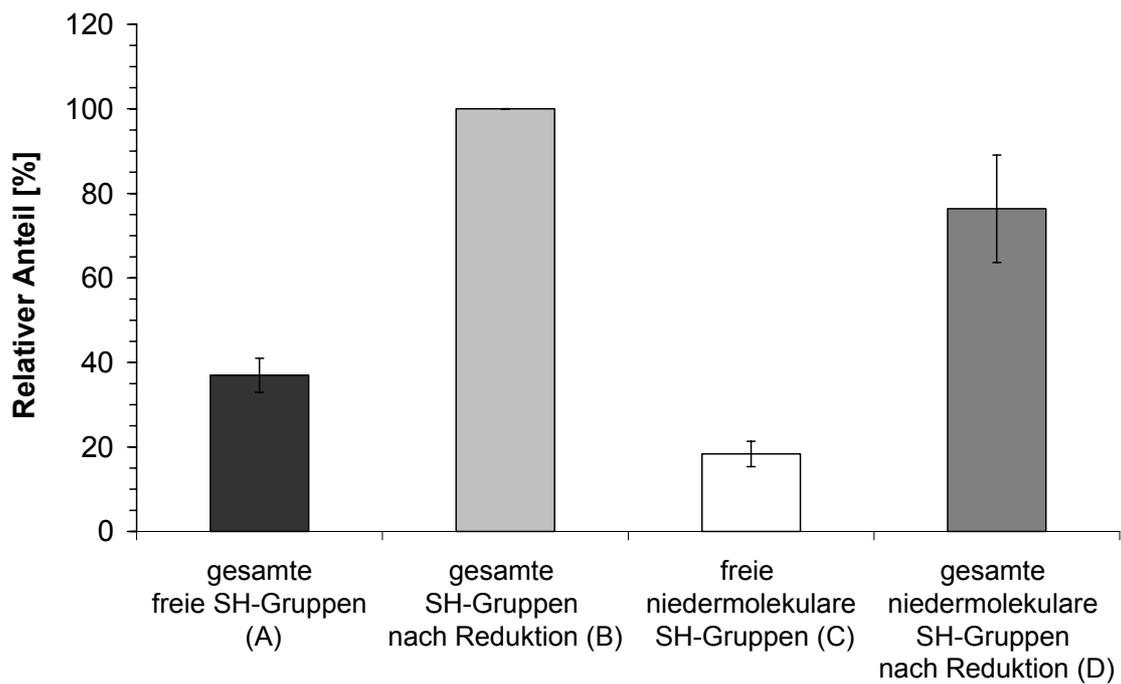


Abb. 4-4: Thiol-Status von Plasma (Kontrolle). Dargestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Thiol-Spezies \pm S.D., n = 4.

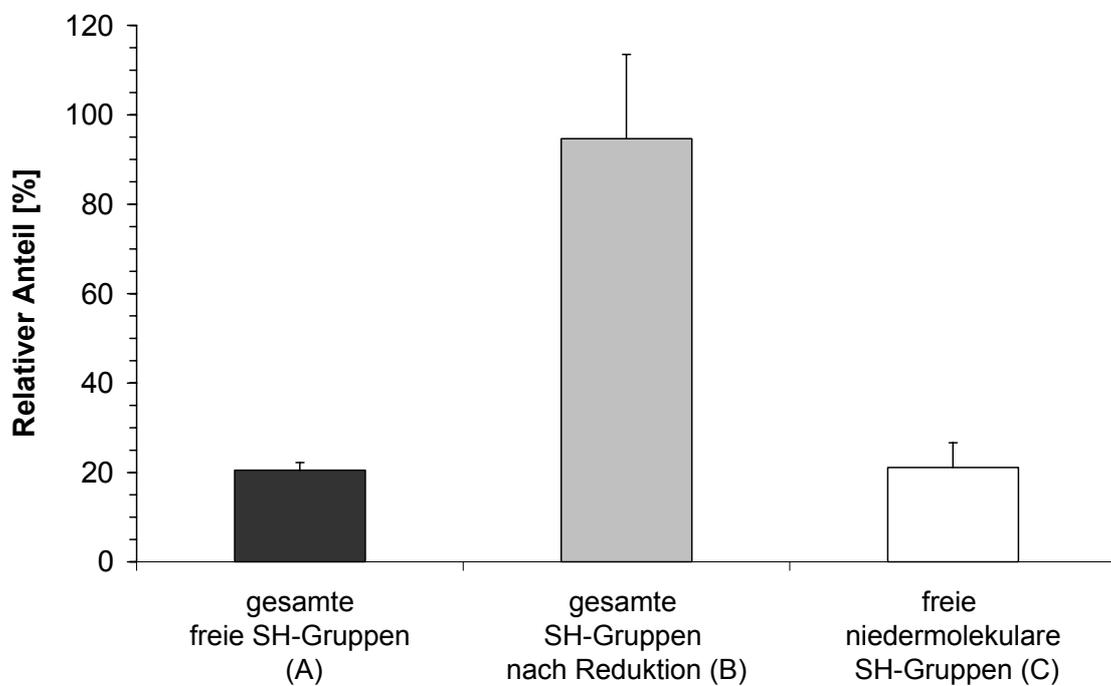


Abb. 4-5: Thiol-Status von Plasma nach H_2O_2 -Inkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Thiol-Spezies \pm S.D., n = 4.

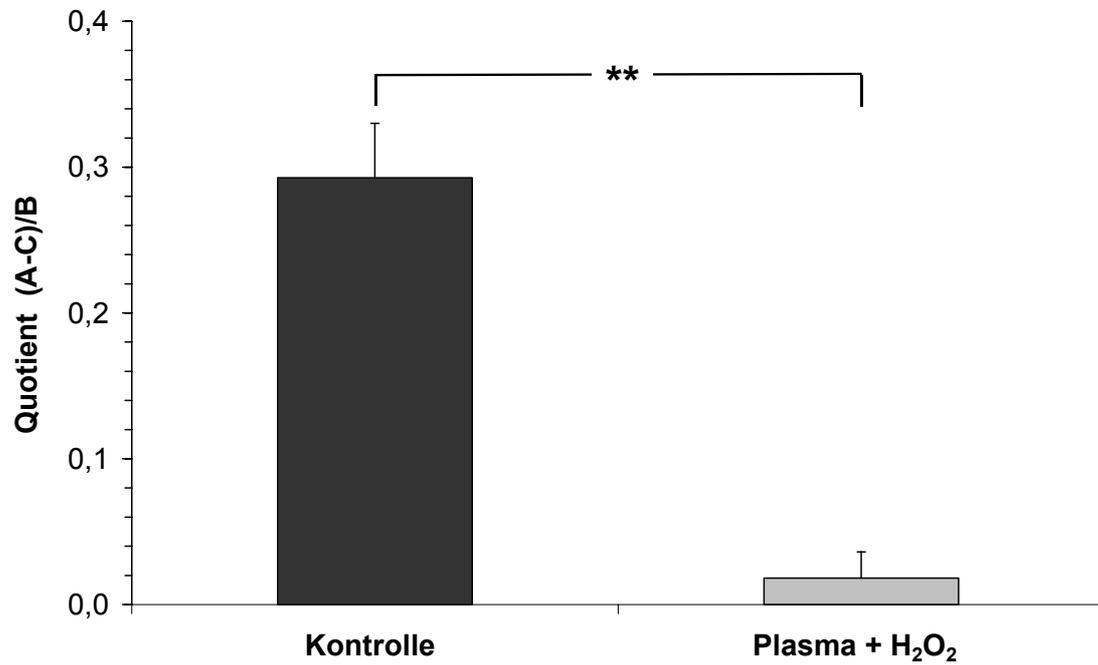


Abb. 4-6: Thiol-Status von Plasma nach H₂O₂-Inkubation. Gezeigt wird der Anteil proteingebundener freier SH-Gruppen. Mittelwerte \pm S.D., n = 4, ** p < 0,01, verbundener t-Test.

4.1.1.3 Einfluss von H₂O₂ auf den Malondialdehyd-Gehalt im Plasma

Um die Wirkung der gewählten Oxidationsbedingungen im Plasma weiter zu charakterisieren, wurde auch der Einfluss von H₂O₂ auf den Malondialdehyd-Gehalt des inkubierten Plasmas untersucht. Das Ergebnis zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen dem mit H₂O₂ inkubierten Plasma und der Kontrolle (Abb. 4-7).

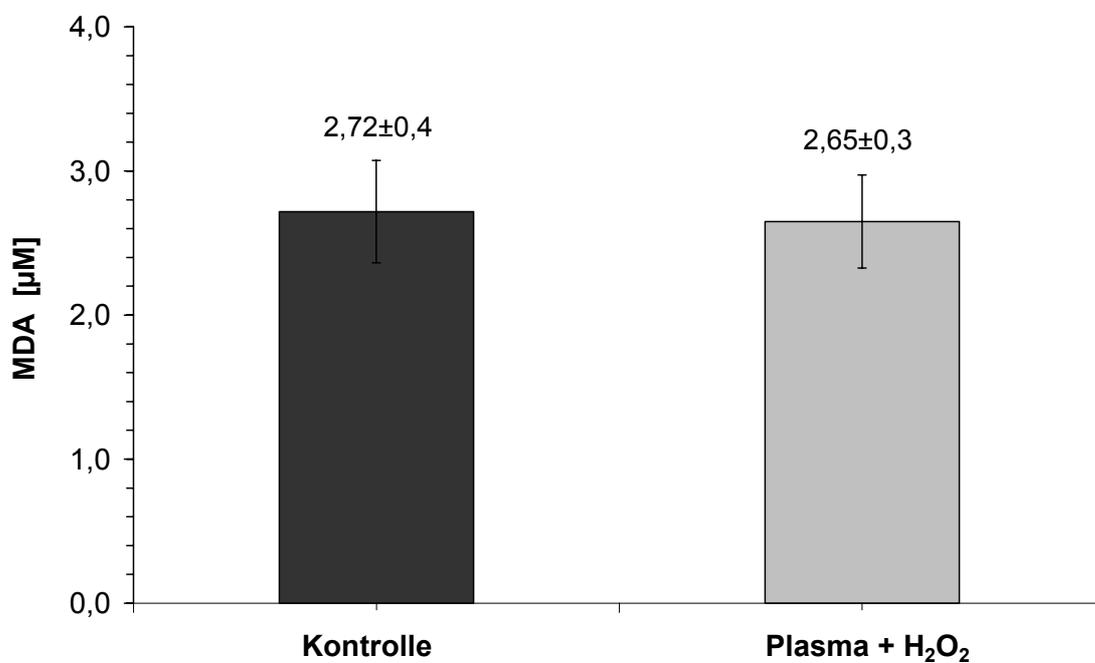


Abb. 4-7: Einfluss von H₂O₂ auf die Malondialdehyd-Konzentration im Plasma. Mittelwerte ± S.D., n = 3, verbundener t-Test, p = 0,2.

4.1.2 Wirkungen von KO_2

Hier wurde die Simulation des oxidativen Stresses im Plasma gesunder Probanden mit Kaliumsuperoxid durchgeführt. Zur Analyse wurden die AAPH-Reaktion und die Bestimmung des Thiol-Status verwendet.

4.1.2.1 Einfluss von KO_2 auf den Zeitverlauf der AAPH-Reaktion mit Plasma

Abb. 4-8 zeigt die Ergebnisse der Messung der gesamten antioxidativen Kapazität. Man erkennt eine nicht signifikante Tendenz zur Verringerung der Auslöschzeit.

Die Auswirkung der Inkubation mit Kaliumsuperoxid auf die Peak-Intensität des Plasmas ist in Abb. 4-9 dargestellt. Das Ergebnis zeigte eine signifikante Abnahme der Peak-Intensität im Vergleich zur Kontrolle, d. h. dass auch bei KO_2 -Inkubation die Peak-Intensität den oxidativen Stress sensitiver anzeigt als die Auslöschzeit.

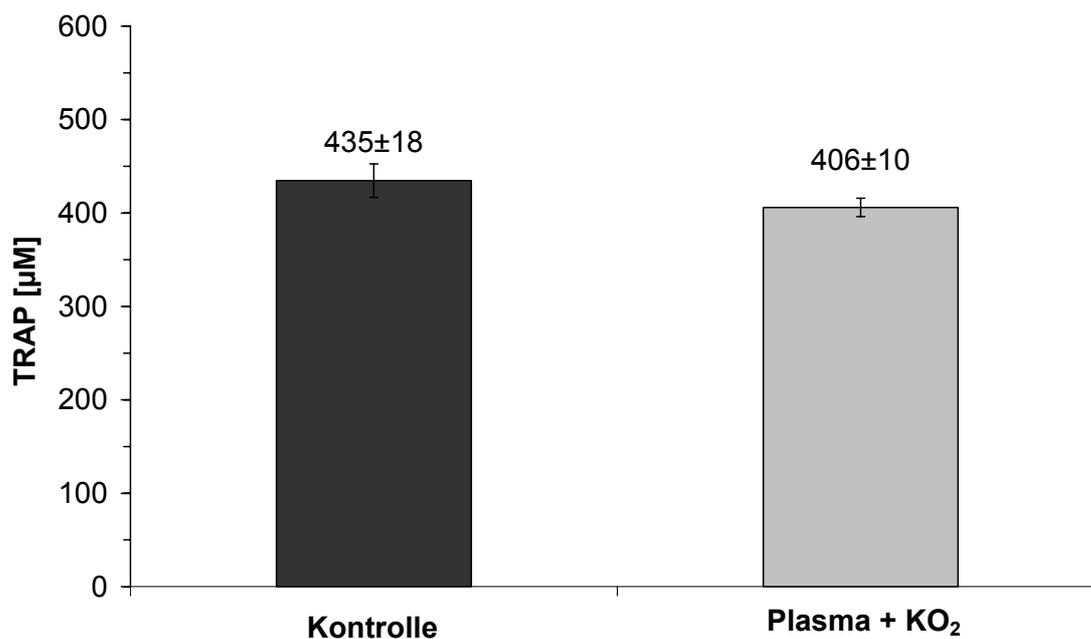


Abb. 4-8: Einfluss der KO₂-Inkubation auf die gesamte antioxidative Kapazität von Plasma. Mittelwerte ± S.D., n = 3, p = 0,13, verbundener t-Test.

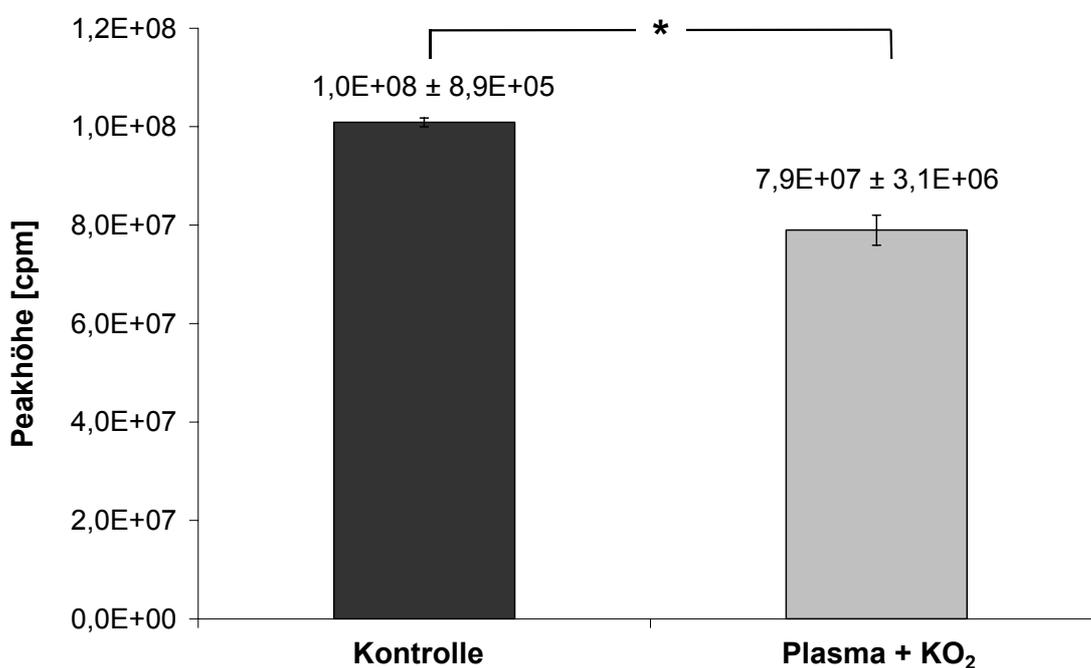


Abb. 4-9: Einfluss der KO₂-Inkubation auf die Peak-Intensität der AAPH-Reaktion. Mittelwerte ± S.D., n = 3, * p < 0,05, verbundener t-Test.

4.1.2.2 Einfluss von KO_2 auf den Thiol-Status im Plasma

Die Thiol-Untersuchungen verliefen analog zu den entsprechenden Versuchen mit H_2O_2 . Nach Einwirkung des KO_2 zeigte sich der Thiol-Status des Plasmas stark verändert (Abb. 4-10). Die Abb. 4-11 zeigt einen signifikant ($p < 0,01$) verminderten Anteil der freien proteingebundenen SH-Gruppen durch die Oxidation im Plasma. Das lässt darauf schließen, dass die Einwirkung der KO_2 -Inkubation ebenso wie die der H_2O_2 -Inkubation in erster Linie Auswirkungen auf die freien proteingebundenen SH-Gruppen hat, während sich der Anteil der freien niedermolekularen SH-Gruppen nur geringfügig verändert.

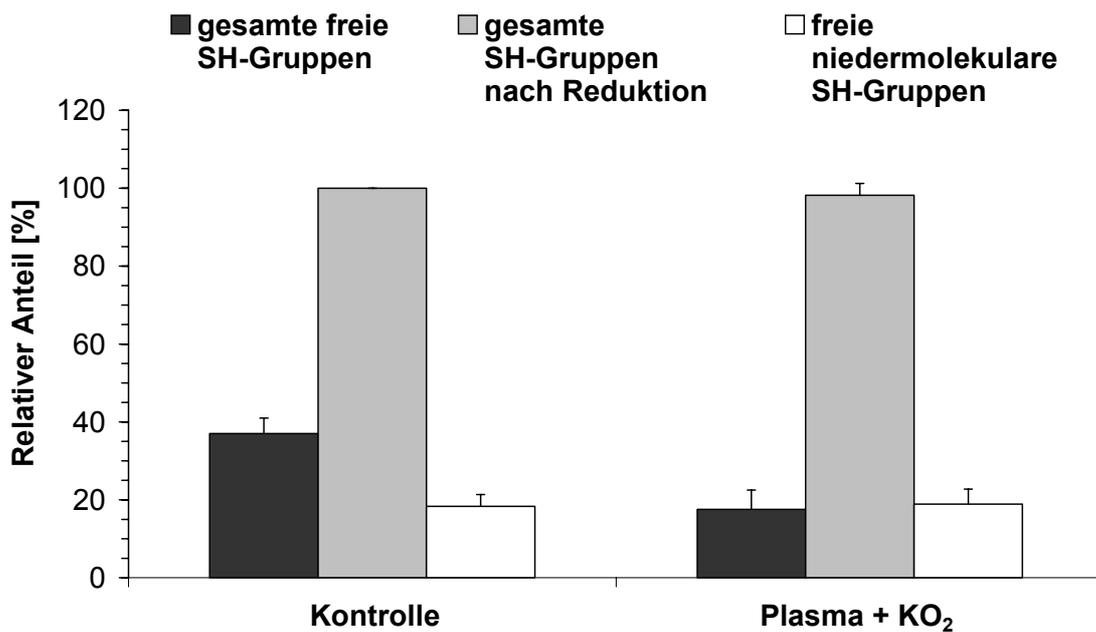


Abb. 4-10: Thiol-Status von Plasma ohne und mit KO_2 -Inkubation. Mittelwerte \pm S.D., $n = 3$.

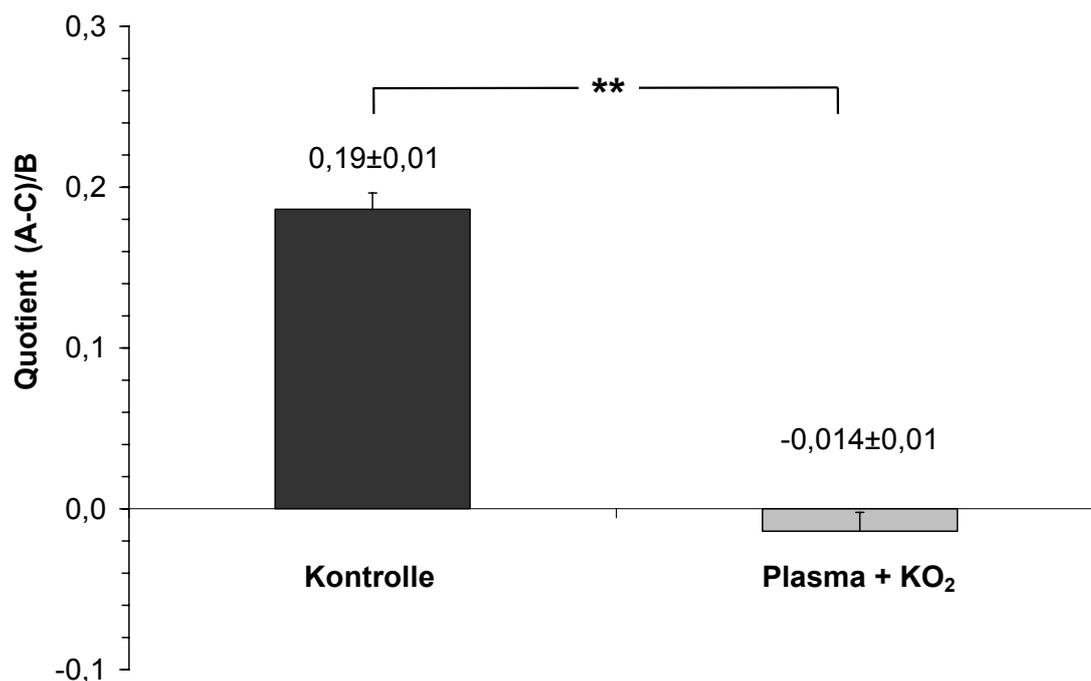


Abb. 4-11: Thiol-Status von Plasma nach KO₂-Inkubation. Dargestellt ist der Anteil proteingebundener freier SH-Gruppen. Mittelwerte ± S.D., n = 3, ** p < 0,01, verbundener t-Test.

4.1.3 Wirkungen von Xanthin/Xanthinoxidase

Bei diesem Versuch wurde Xanthin/Xanthinoxidase als Superoxidradikal-Erzeuger zur Induzierung des oxidativen Stresses im Plasma gesunder Probanden verwendet. Dabei wurde Plasma mit dem Enzymsystem für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurde Plasma nur mit Xanthin ohne Xanthinoxidase inkubiert.

4.1.3.1 Einfluss von Xanthin/Xanthinoxidase auf den Zeitverlauf der AAPH-Reaktion mit Plasma

Der Effekt von Xanthin/Xanthinoxidase auf die gesamte antioxidative Kapazität des Plasmas ist in Abb. 4-12 dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass Xanthin allein erwartungsgemäß keinerlei Veränderung in der gesamten antioxidativen Kapazität bewirkt. Mit der Xanthinoxidase jedoch erhöht sich diese Kapazität signifikant ($p < 0,01$). Dies ist auf den ersten Blick überraschend, doch könnte die Ursache für die Erhöhung auf der Bildung von Harnsäure durch die Xanthinoxidase beruhen.

Der Einfluss von Xanthin/Xanthinoxidase auf die Peak-Intensität der AAPH-Reaktion ist in Abb. 4-13 dargestellt. Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Oxidationseffekten erkennt man eine schwächere, aber noch signifikante Abnahme der Peak-Intensität.

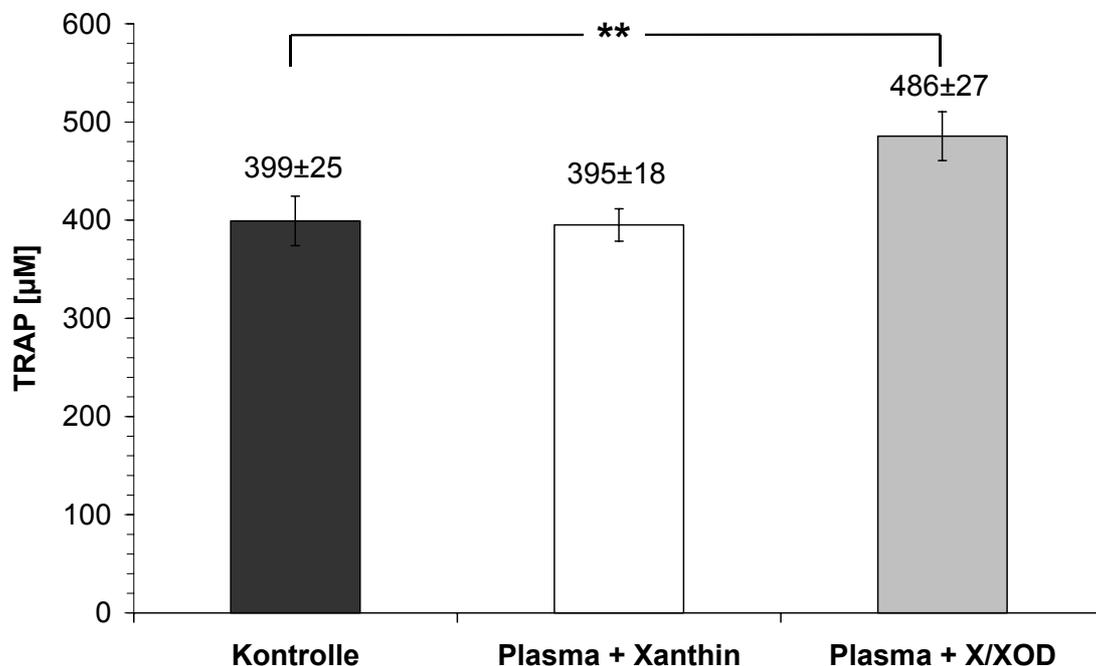


Abb. 4-12: Einfluss von Xanthin/Xanthinoxidase auf die gesamte antioxidative Kapazität des Plasmas. Mittelwerte \pm S.D., $n = 3$, ** $p < 0,01$, ANOVA.

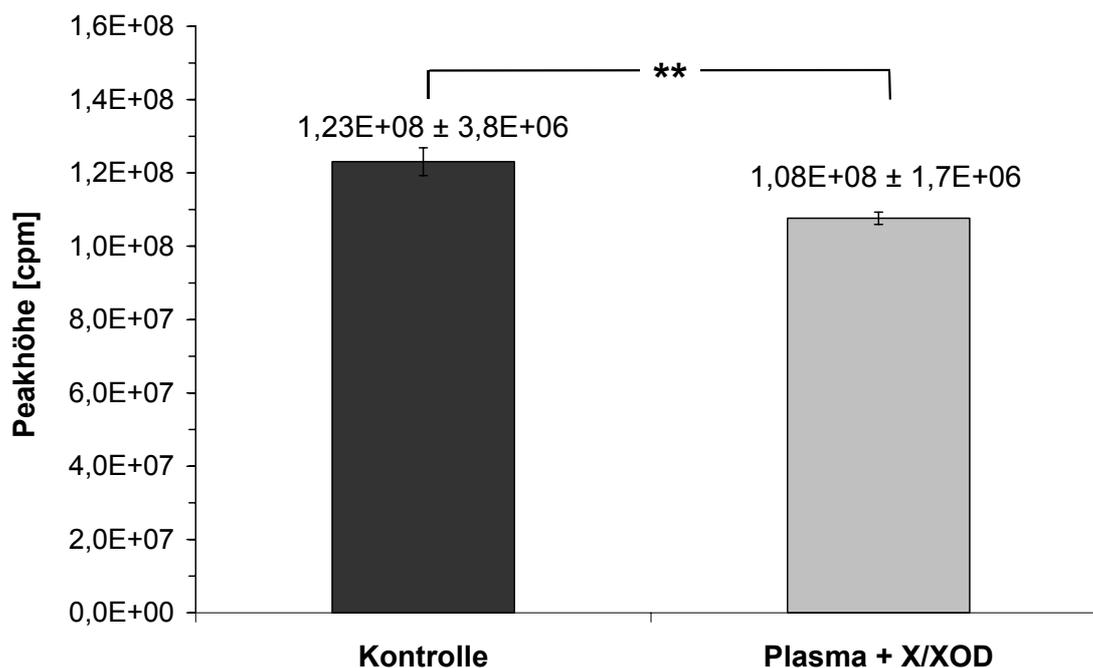


Abb. 4-13: Einfluss von Xanthin/Xanthinoxidase auf die Peak-Intensität der AAPH-Reaktion. Mittelwerte \pm S.D., $n = 3$, ** $p < 0,01$, verbundener t-Test.

4.1.3.2 Einfluss von Xanthin/Xanthinoxidase auf den Thiol-Status im Plasma

Die Bestimmungen des Thiol-Status liefen nach dem üblichen Verfahren. Nach Einwirkung von Xanthin/Xanthinoxidase erweist sich der Thiol-Status des Plasmas nur wenig verändert, (Abb. 4-14 und Abb. 4-15). Es zeigt sich in keiner der Thiol-Spezies ein signifikanter Unterschied.

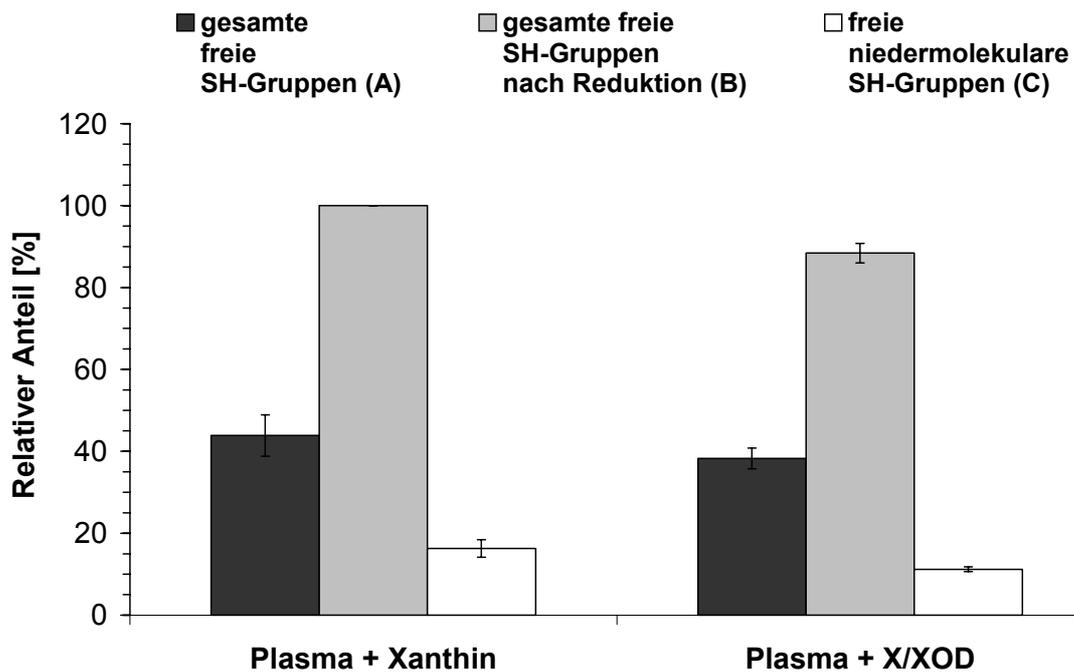


Abb. 4-14: Thiol-Status von Plasma nach Xanthin- bzw. Xanthin/XOD-Inkubation. Mittelwerte \pm S.D., $n = 3$. Dargestellt sind die Mittelwerte der verschiedenen Thiol-Spezies.

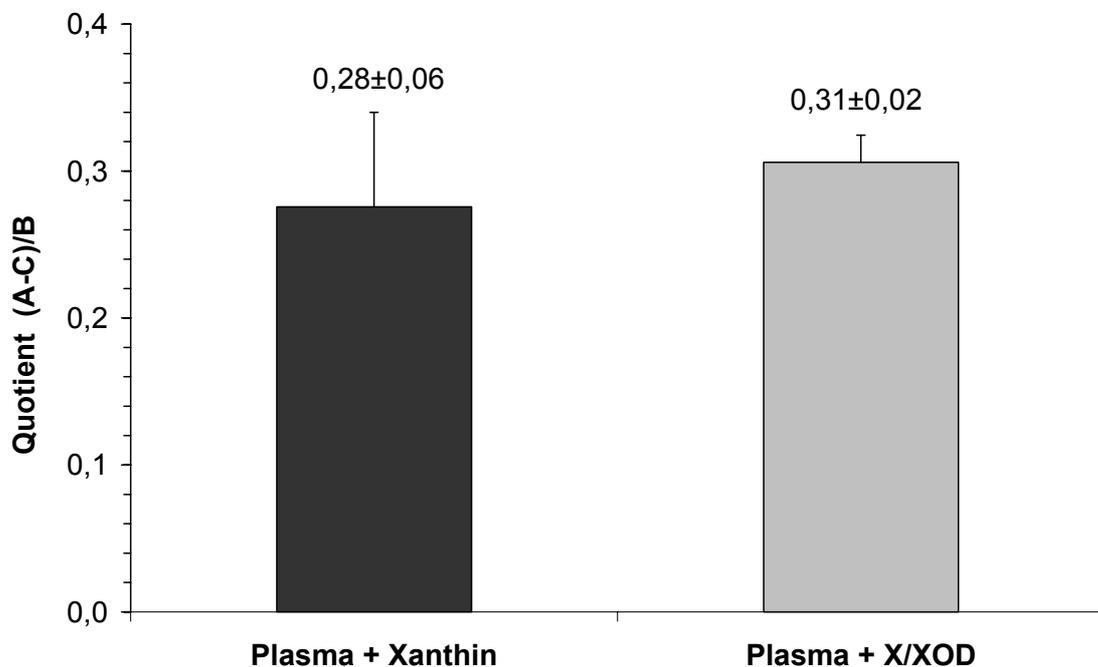


Abb. 4-15: Thiol-Status von Plasma nach Xanthin- bzw. Xanthin/XOD-Inkubation. Dargestellt ist der Anteil proteingebundener freier SH-Gruppen. Mittelwerte \pm S.D., $n = 3$.

4.1.4 Wirkungen von t-Butylhydroperoxid

Als weiteres Modellsystem für Induktion von oxidativem Stress wurde bei diesem Versuch t-Butylhydroperoxid in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Diese Messungen wurden mit Plasma von einer Probandin in Doppelbestimmung durchgeführt.

4.1.4.1 Einfluss von t-Butylhydroperoxid auf den Zeitverlauf der AAPH-Reaktion mit Plasma

Wie aus der Abb. 4-16 abgelesen werden kann, wurde eine Abnahme der gesamten oxidativen Kapazität bei allen Konzentrationen von t-BHP erzielt, wobei bei 30 mM t-BHP eine Abnahme um ca. 20 % erreicht wurde.

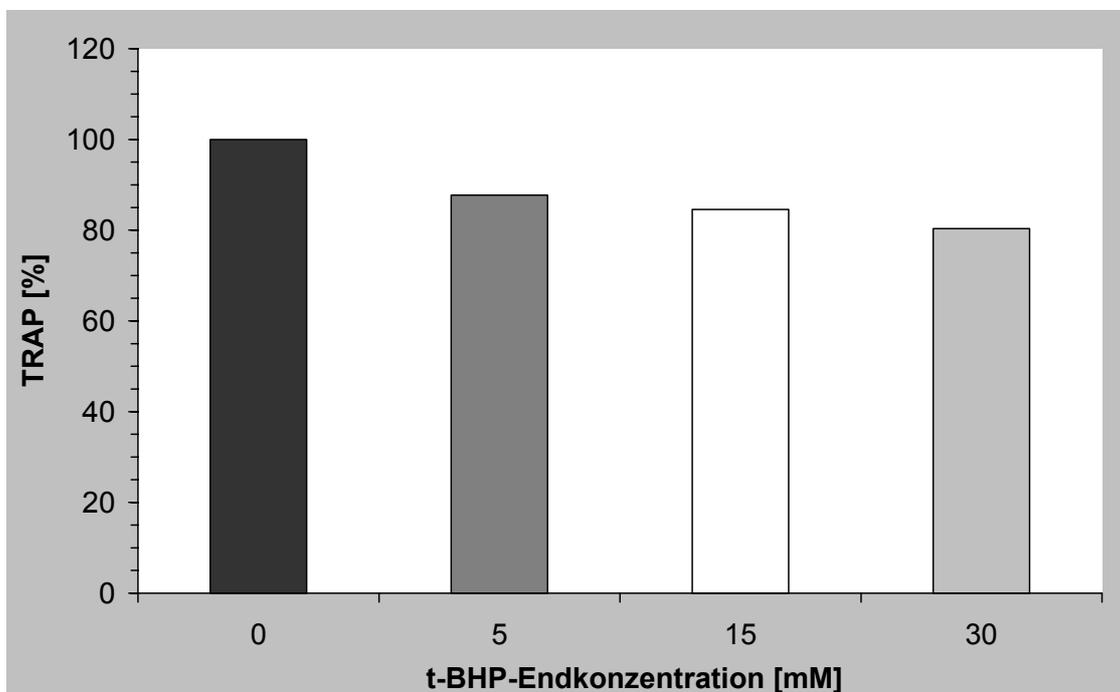


Abb. 4-16: Einfluss verschiedener Konzentrationen von t-BHP im Plasma auf die gesamte antioxidative Kapazität der AAPH-Reaktion. Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

Bezüglich der Peak-Intensität wurde wie bei allen anderen Radikalbildnern eine Abnahme beobachtet (Abb. 4-17). Bei der höchsten Konzentration (30 mM) wurde eine Abnahme der Peakhöhe auf ca. 40 % gefunden.

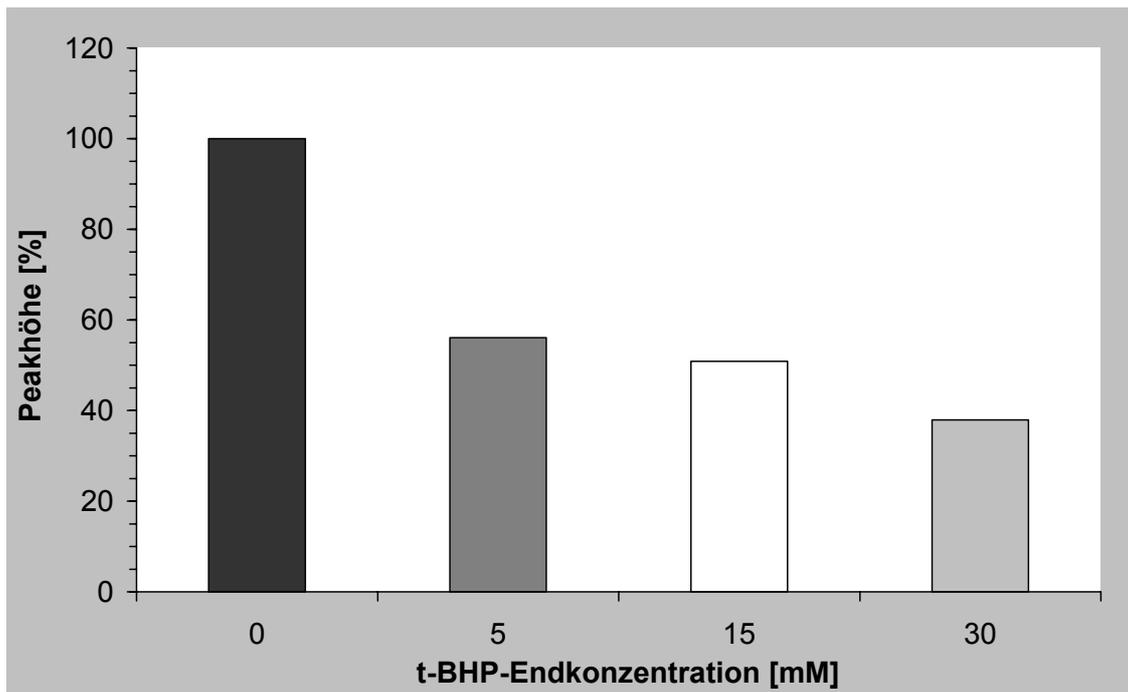


Abb. 4-17: Einfluss verschiedener Konzentrationen von t-Butylhydroperoxid im Plasma auf die Peakhöhe der AAPH-Reaktion. Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

4.1.4.2 Einfluss von t-Butylhydroperoxid auf die Malondialdehyd-Konzentration im Plasma

Auch die Wirkung von t-Butylhydroperoxid auf den Malondialdehyd-Gehalt des inkubierten Plasmas wurde untersucht. Das Ergebnis zeigt einen starken Anstieg der MDA-Konzentration schon ca. 15 Minuten nach Zugabe des Radikalbildners (Abb. 4-18).

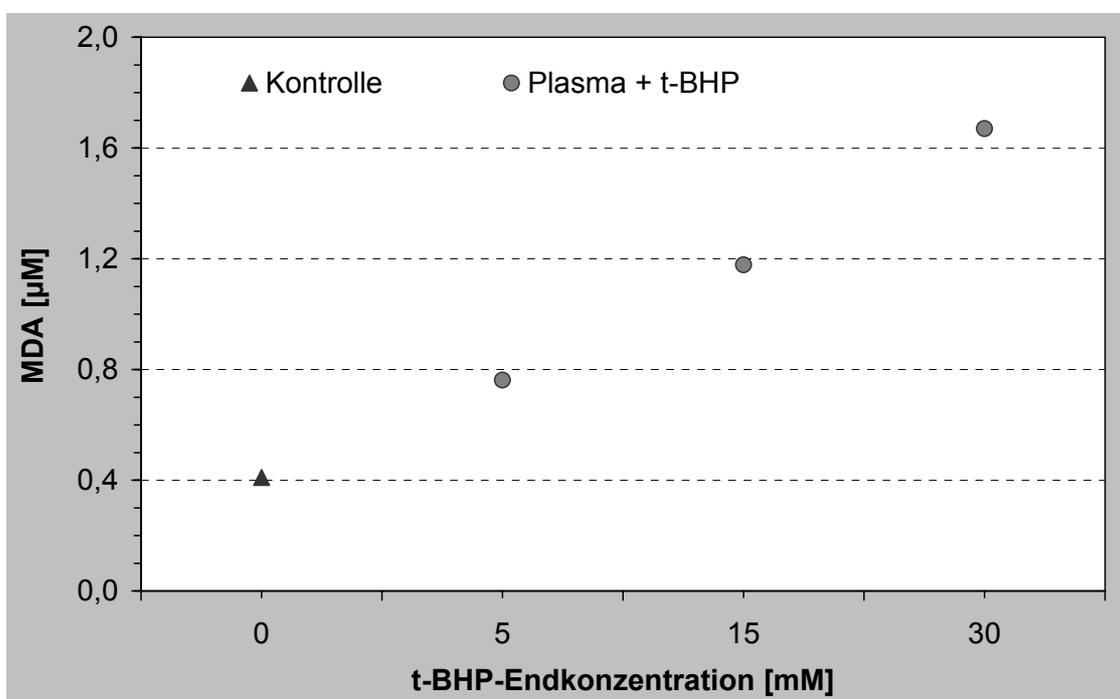


Abb. 4-18: Einfluss verschiedener Konzentrationen von t-Butylhydroperoxid im Plasma auf den Malondialdehyd-Gehalt.

4.1.4.3 Einfluss von H_2O_2 und t-Butylhydroperoxid auf den ATP-Gehalt von Erythrozyten

Um den Einfluss von oxidativem Stress auf die ATP-Konzentration in Erythrozyten zu untersuchen, wurden Blutproben mit Wasserstoffperoxid und t-Butylhydroperoxid eine Stunde bei 37°C inkubiert. Abb. 4-19 zeigt die Versuchsergebnisse: Während die Kontrolle und die Inkubation mit H_2O_2 nur eine geringe ATP-Abnahme der Erythrozyten aufweisen, findet man einen ATP-Verlust von ca. 30 % bei Inkubation mit t-BHP.

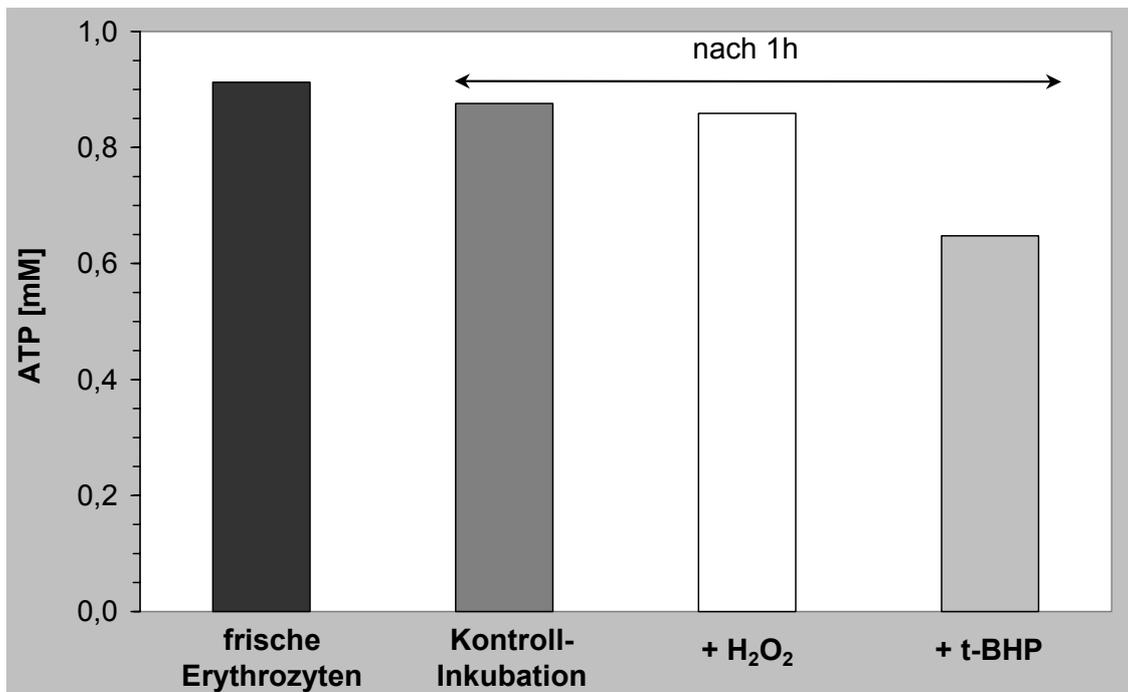


Abb. 4-19: Einfluss von H_2O_2 bzw. t-BHP (5 mM) auf die ATP-Konzentration in Erythrozyten. Inkubationszeit 1 h, Einzelversuche.

4.2 Untersuchungen von Parametern des oxidativen Stresses bei normalen und präeklampsischen Schwangeren

In diesem Teil sollen die Ergebnisse der Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Präeklampsie und oxidativem Stress dargestellt werden. Dazu wurden Blutproben von normalen Schwangeren und von Patientinnen mit Präeklampsie auf verschiedene Parameter des oxidativen Stresses hin untersucht. Insgesamt wurden 86 Probandinnen herangezogen, davon 49 mit normaler Schwangerschaft, 37 mit Präeklampsie. Die folgende Tabelle listet einige wichtige Eigenschaften der Probandinnen auf.

Tabelle 4-1: Eigenschaften der untersuchten Probandinnen. Mittelwerte \pm S. D., ** $p < 0,01$, ns = nicht signifikant.

	gesunde Schwangere	präeklampsische Schwangere
Anzahl	49	37
Alter (Jahre)	32,1 \pm 6,0	33,9 \pm 4,5 ^{ns}
BMI (kg/m ²)	27,04 \pm 4,1	34,3 \pm 5,8 ^{**}
Systolischer Blutdruck (mmHg)	114,5 \pm 13,4	151,9 \pm 23,4 ^{**}
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	71,6 \pm 10,7	97,9 \pm 13,9 ^{**}
Entbunden in der SSW	36,4 \pm 4,2	35,9 \pm 3,9

4.2.1 Untersuchungen im Plasma

4.2.1.1 Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften von Plasma durch die AAPH-Reaktion

Die AAPH-Reaktion wurde verwendet, um Auslöschzeit und Peakhöhe von den Plasma-Proben aller 86 Probandinnen zu bestimmen. In Abb. 4-20 ist das Ergebnis der Bestimmung der gesamten antioxidativen Kapazität dargestellt, die bei den Patientinnen mit Präeklampsie signifikant erhöht ist ($p < 0,01$).

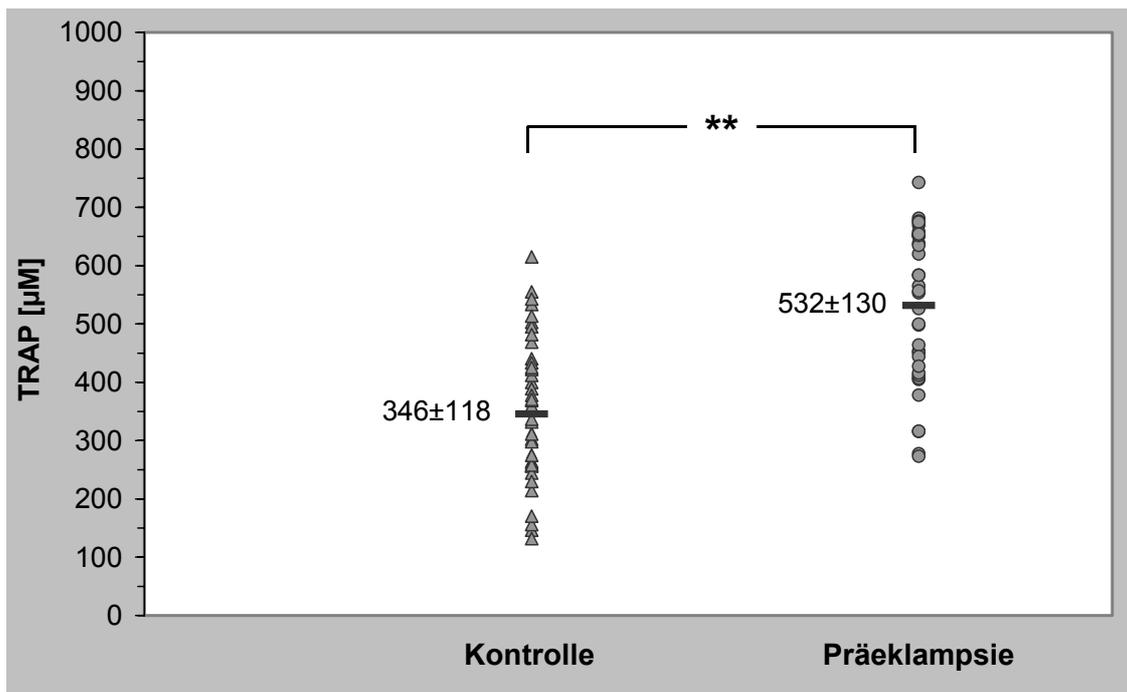


Abb. 4-20: Antioxidative Kapazität des Plasmas bei Präeklampsie. Gezeigt sind die Einzelwerte der Kontrollen ($n = 49$) und der Patientinnen mit Präeklampsie ($n = 37$). ** $p < 0,01$, unverbundener t-Test.

Neben der Auslöschzeit wurde auch die Peakhöhe bestimmt. Hier ergibt sich ein umgekehrtes Resultat: Die Peakhöhe der normalen Schwangeren erweist sich als signifikant ($p < 0,01$) erhöht gegenüber der der Patientinnen mit Präeklampsie (siehe Abb. 4-21).

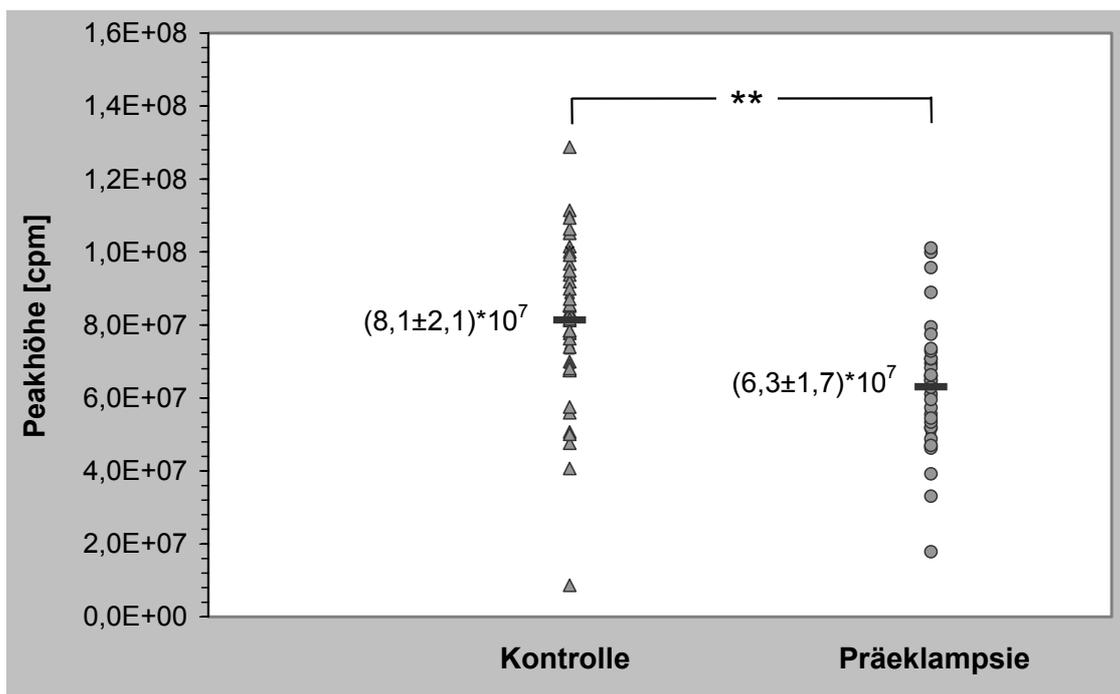


Abb. 4-21: Peakhöhe der AAPH-Reaktion bei Präeklampsie. Gezeigt sind die Einzelwerte der Kontrollen ($n = 49$) und der Patientinnen mit Präeklampsie ($n = 37$). ** $p < 0,01$, unverbundener t-Test.

4.2.1.2 Bestimmung des Thiol-Status im Plasma

Bei diesen Untersuchungen wurde der Thiol-Gehalt, wie in 3.4 beschrieben, im Plasma von 54 Schwangeren (davon $n = 24$ mit normaler Schwangerschaft, $n = 30$ mit Präeklampsie) bestimmt und der relative Anteil der freien, proteingebundenen Thiolgruppen berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-22 dargestellt und zeigen eine signifikante Erniedrigung bei den Patientinnen mit Präeklampsie ($p < 0,05$).

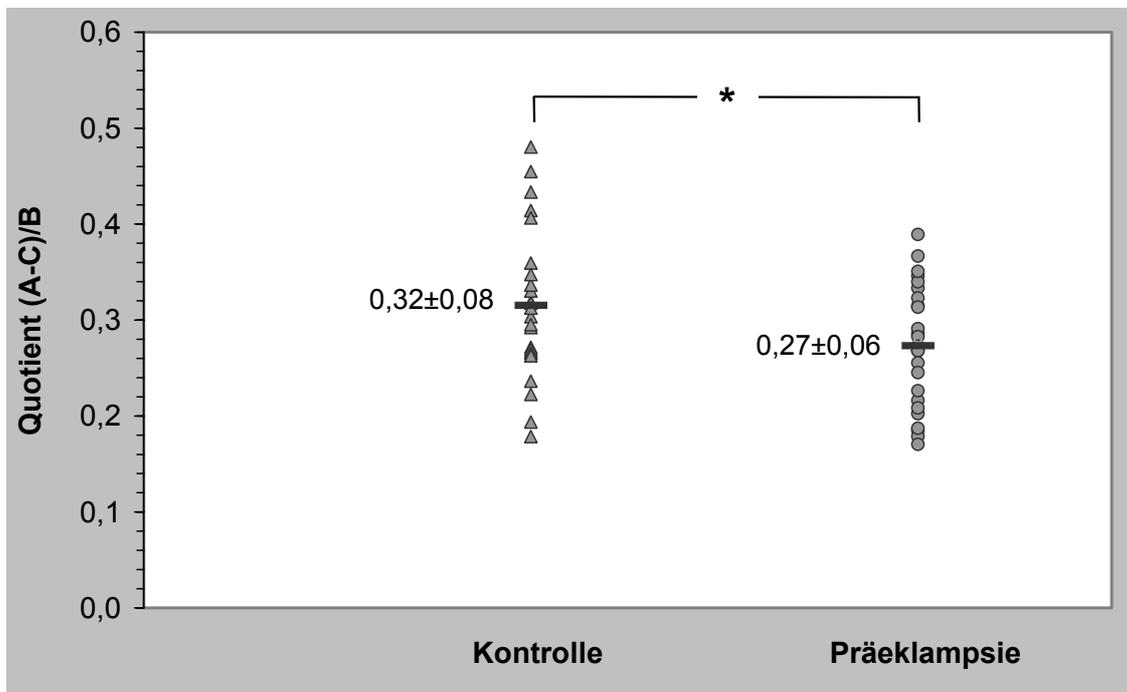


Abb. 4-22: Thiol-Status im Plasma bei Präeklampsie. Gezeigt sind die Einzelwerte des relativen Anteils der freien, proteingebundenen Thiole der Kontrollen ($n = 24$) und der Patientinnen mit Präeklampsie ($n = 30$). * $p < 0,05$, unverbundener t-Test.

4.2.1.3 Bestimmung der Konzentration des Malondialdehyds (TBARS) im Plasma

Die Malondialdehyd-Konzentration als weiterer Marker des oxidativen Stresses wurde bei insgesamt 47 schwangeren Probandinnen untersucht. In Abb. 4-23 ist das Ergebnis mit 21 normal Schwangeren und 26 Schwangeren mit Präeklampsie zu sehen. Die Probandinnen mit Präeklampsie zeigten einen höheren Malondialdehyd-Gehalt im Plasma als normale Probanden. Ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) wurde zwischen den beiden Gruppen konstatiert, wobei allerdings eine große Standardabweichung auffällt.

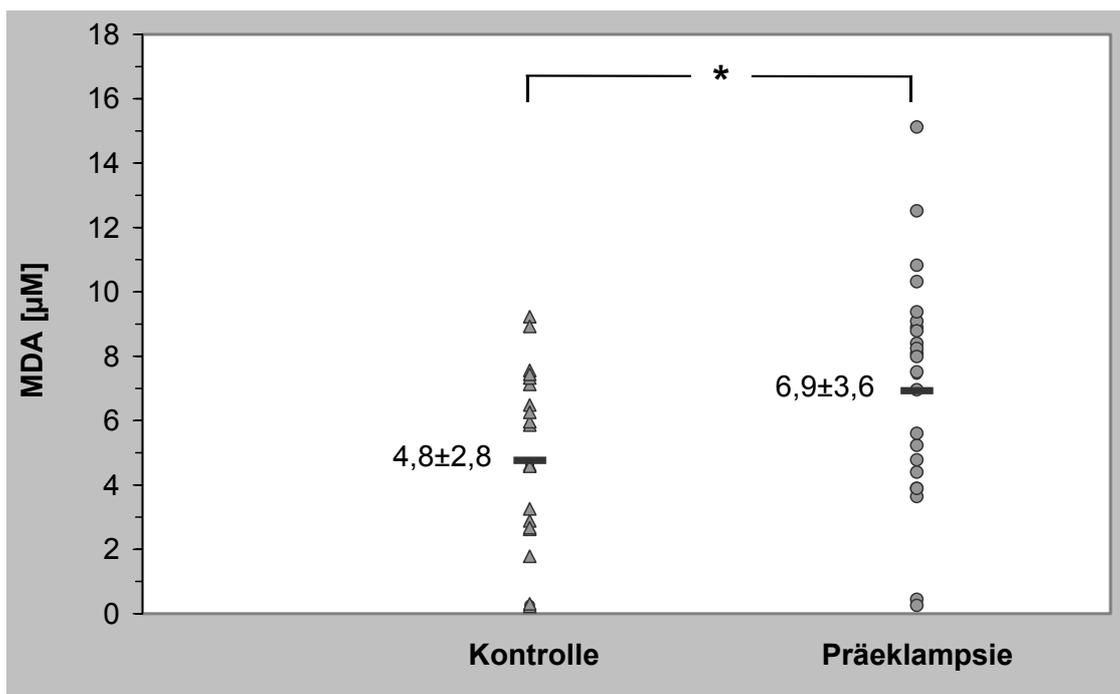


Abb. 4-23: MDA-Gehalt im Plasma bei Präeklampsie. Gezeigt sind die Einzelwerte der Kontrollen ($n = 21$) und Patientinnen mit Präeklampsie ($n = 26$). * ($p < 0,05$), unverbundener t-Test.

4.2.1.4 Bestimmung der Nitrit/Nitrat-Konzentration im Plasma

Die Konzentration von Nitrit und Nitrat im Plasma wurde bei 54 Schwangeren gemessen. Davon waren $n = 35$ mit normaler Schwangerschaft und $n = 19$ mit Präeklampsie. Wie in Abb. 4-24 zu erkennen ist, zeigt das Ergebnis der Untersuchungen eine erhöhte Nitrit/Nitrat-Konzentration bei Patientinnen mit Präeklampsie im Vergleich zu solchen mit normaler Schwangerschaft. Es konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) nachgewiesen werden.

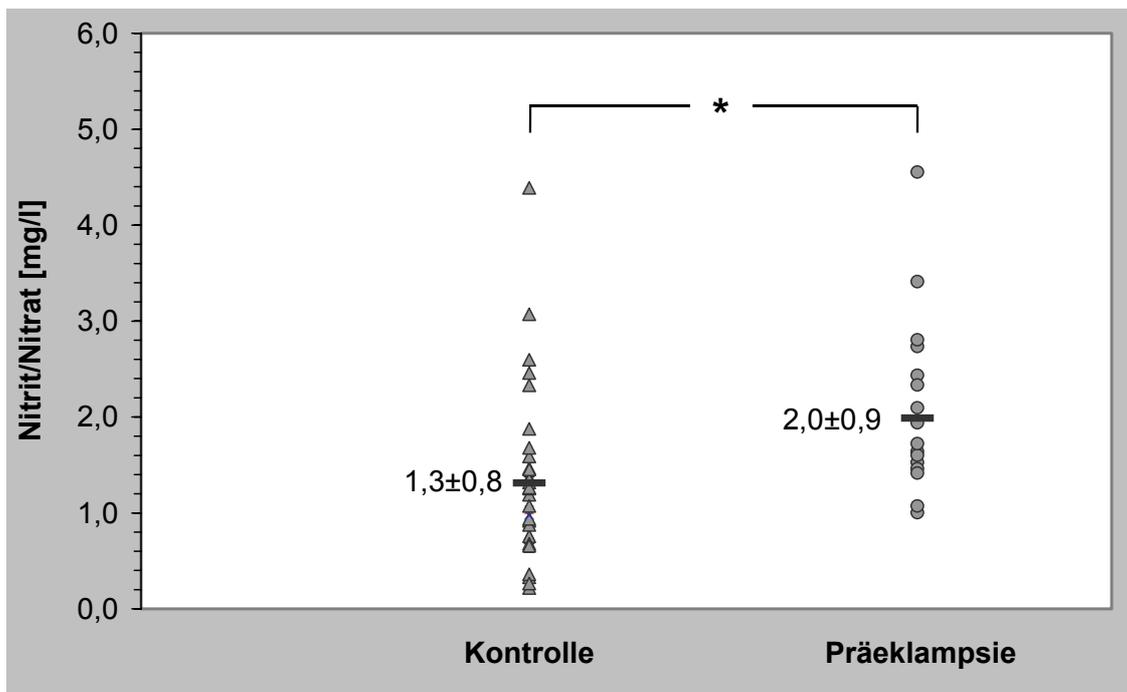


Abb. 4-24: Nitrit/Nitrat-Gehalt im Plasma bei Präeklampsie. Gezeigt sind die Einzelwerte der Kontrollen ($n = 35$) und Patientinnen mit Präeklampsie ($n = 19$). * $p < 0,05$, unverbundener t-Test.

4.2.1.5 Bestimmung der Harnsäure im Plasma

Untersucht wurden 78 Schwangere, n = 49 mit normaler Schwangerschaft und n = 29 mit Präeklampsie. Das Ergebnis ist in Abb. 4-25 dargestellt. Eine erhöhte Harnsäure-Konzentration wurde mit statistischer Signifikanz ($p < 0,01$) bei den Schwangeren mit Präeklampsie festgestellt.

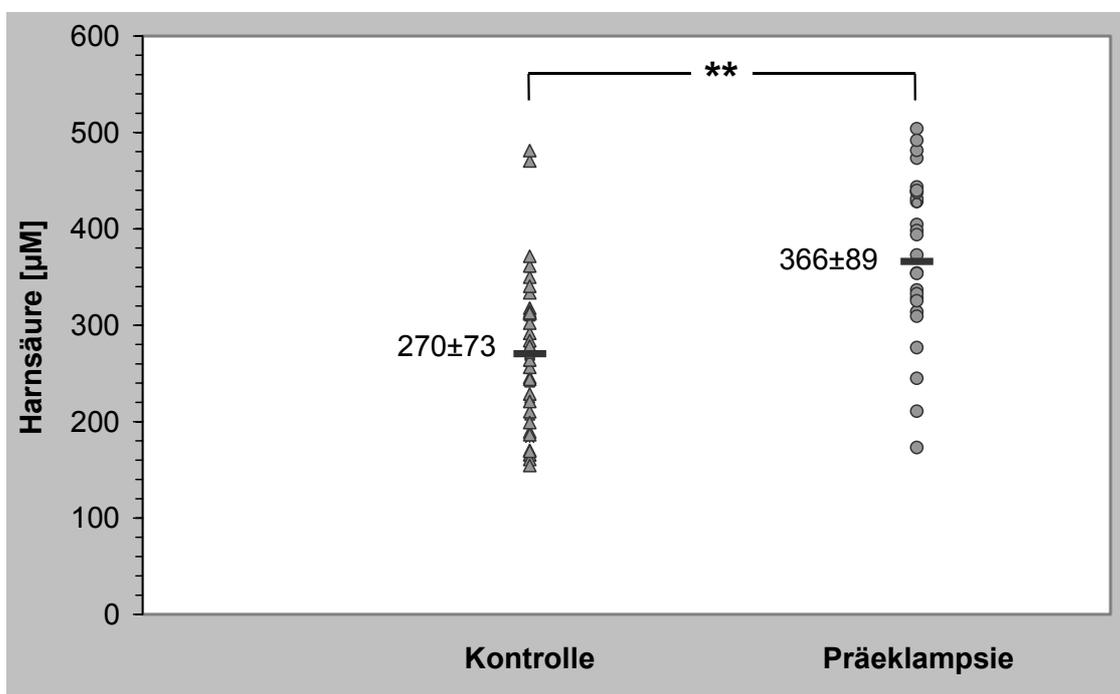


Abb. 4-25: Harnsäuregehalt im Plasma bei Präeklampsie. Gezeigt sind die Einzelwerte der Kontrollen (n = 49) und Patientinnen mit Präeklampsie (n = 29). ** $p < 0,01$, unverbundener t-Test.

4.2.2 Untersuchungen an Erythrozyten

4.2.2.1 Bestimmung des Thiol-Gehalts in Erythrozyten

Hier wurde der erythrozytäre Gehalt an freien Thiolen von 51 Schwangeren (davon $n = 20$ mit normaler Schwangerschaft, $n = 31$ mit Präeklampsie) bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt Abb. 4-26. Es wurde ein signifikant verminderter Glutathion-Gehalt in den Erythrozyten von Schwangeren mit Präeklampsie festgestellt ($p < 0,05$).

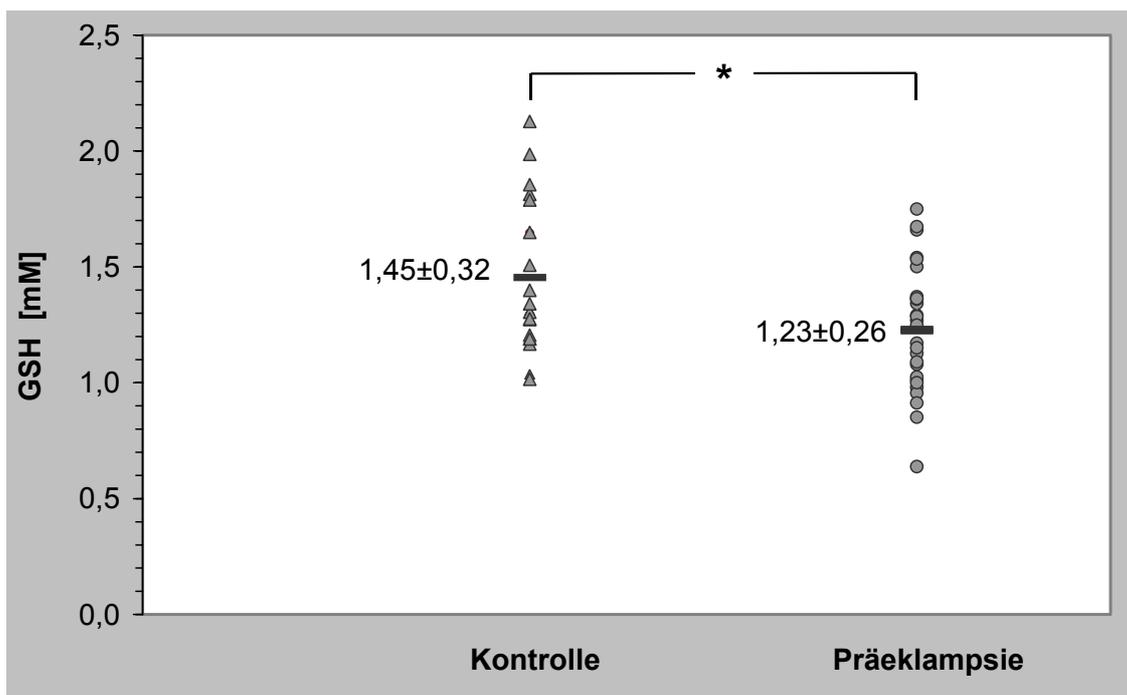


Abb. 4-26: Thiol-Gehalt in Erythrozyten bei Präeklampsie. Gezeigt sind die Einzelwerte der Kontrollen ($n = 20$) und der Patientinnen mit Präeklampsie ($n = 31$). * $p < 0,05$, unverbundener t-Test.

4.2.2.2 Bestimmung der Konzentration des Malondialdehyds in der Erythrozytenmembran

Bei diesen Untersuchungen wurde der Malondialdehyd-Gehalt in der Erythrozytenmembran von 33 Schwangeren (davon $n = 14$ mit normaler Schwangerschaft, $n = 19$ mit Präeklampsie) bestimmt und auf den Hämoglobin-Gehalt bezogen. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt Abb. 4-27. Es wurde ein signifikant erhöhter MDA-Gehalt bei Schwangeren mit Präeklampsie festgestellt ($p < 0,05$).

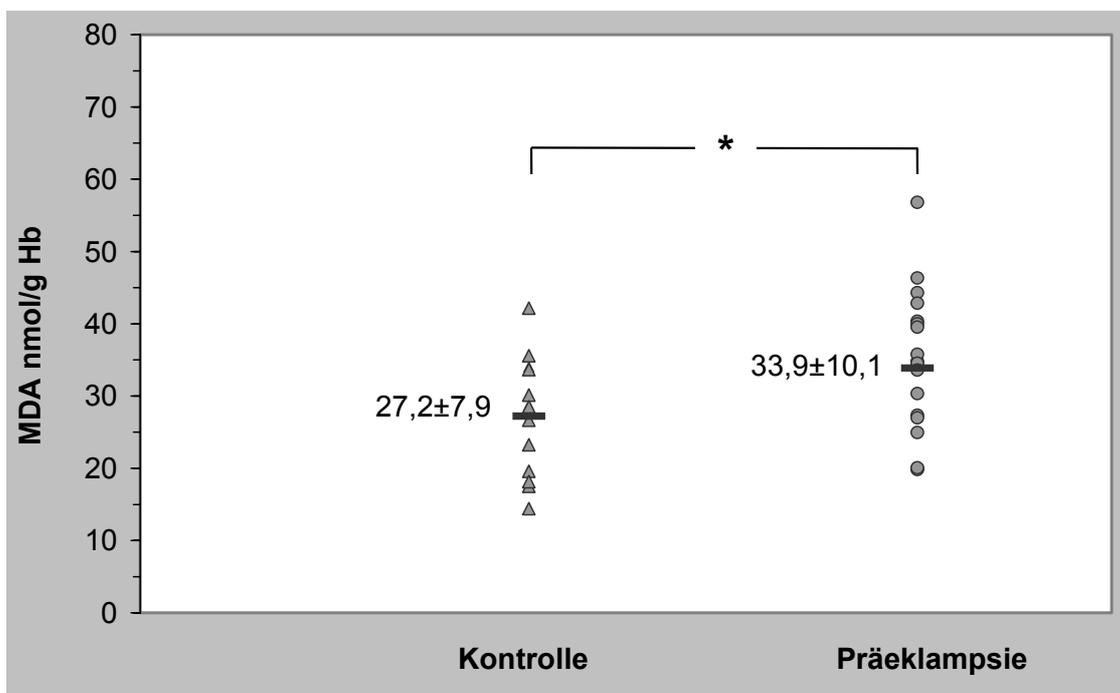


Abb. 4-27: MDA-Gehalt der Erythrozytenmembran bei Präeklampsie. Gezeigt sind die Einzelwerte der Kontrollen ($n = 14$) und der Patientinnen mit Präeklampsie ($n = 19$). * $p < 0,05$, unverbundener t-Test.

4.2.2.3 Bestimmung des ATP-Gehalts in Erythrozyten

Es wurde die ATP-Konzentration in Erythrozyten von 51 Probandinnen (davon 20 mit normaler Schwangerschaft und 31 mit Präeklampsie) untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 4-28 dargestellt. Es zeigt einen signifikant reduzierten Gehalt bei Patientinnen mit Präeklampsie ($p < 0,05$).

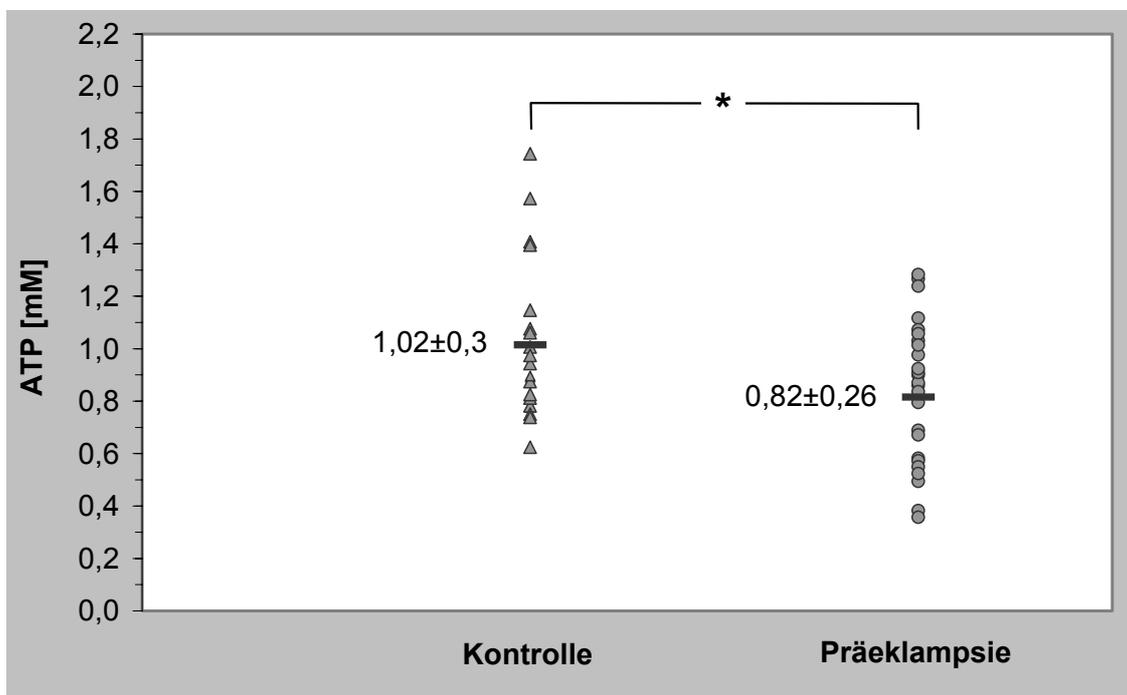


Abb. 4-28: ATP-Gehalt in Erythrozyten bei Präeklampsie. Gezeigt sind die Einzelwerte der Kontrollen ($n = 20$) und der Patientinnen mit Präeklampsie ($n = 31$). * $p < 0,05$, unverbundener t-Test.

4.2.3 Bestimmung der Radikalbildung von Leukozyten im Vollblut

Bei diesem Versuch wurde die Radikalproduktion von Leukozyten in EDTA-Blut mittels Chemilumineszenz ermittelt. Dabei wird zum einen die basale, zum anderen die nach Zymosan-Stimulation auftretende Radikalproduktion gemessen. Werden die basalen Chemilumineszenz-Werte auf die Zellzahl normiert, so errechnet sich für die Kontrollen ein Wert von $16 \text{ cpm}/10^3 \text{ Zellen}$, für die Präeklampsie-Patientinnen ein Wert von $9,2 \text{ cpm}/10^3 \text{ Zellen}$. Wird allerdings der Aktivierungsgrad der Leukozyten durch die Stimulation mit Zymosan bestimmt, so zeigen Präeklampsie-Patientinnen einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) auf fast das Doppelte (Abb. 4-29).

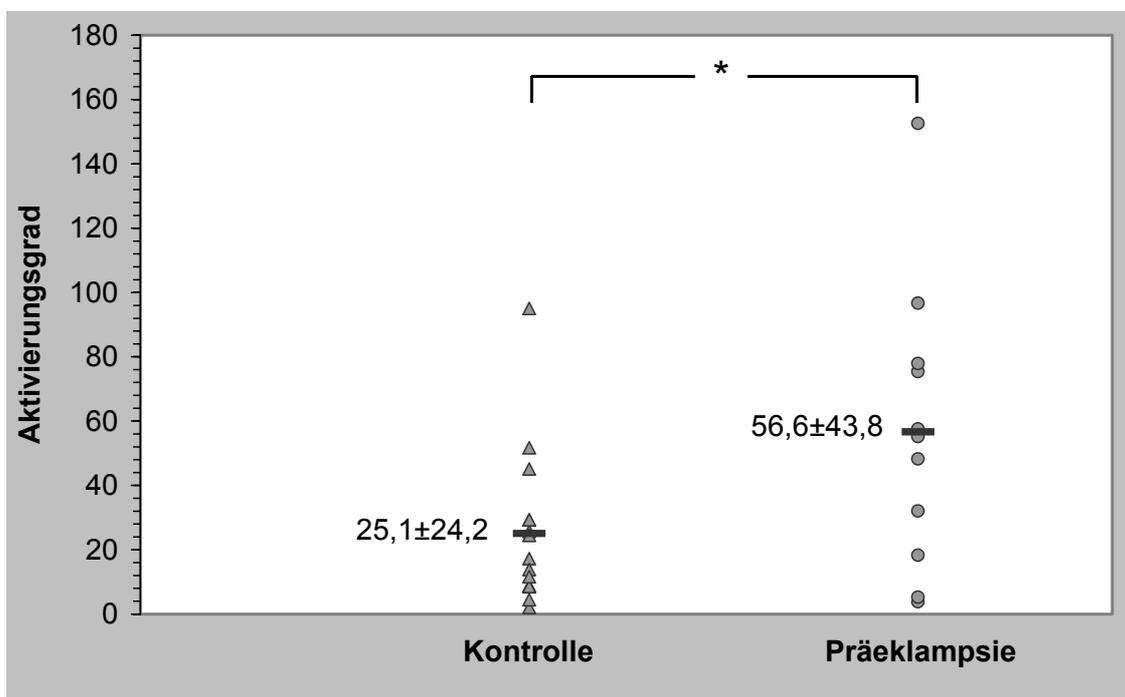


Abb. 4-29: Aktivierung von Blutleukozyten durch Zymosan. Gezeigt sind die Einzelwerte der Kontrollen ($n = 15$) und der Patientinnen mit Präeklampsie ($n = 11$). * $p < 0,05$, unverbundener t-Test.

4.3 Untersuchungen der therapeutischen Wirkungen von Vitamin C auf verschiedene Parameter des oxidativen Stresses im Plasma von gesunden Probandinnen in vitro

Unter dem Aspekt, dass Präeklampsie offensichtlich mit der Ausprägung von oxidativem Stress in der Schwangerschaft verbunden ist, sollte in einem dritten Abschnitt der Arbeit untersucht werden, ob möglicherweise Vitamin C als Therapeutikum in Frage kommt, d. h. es wurde untersucht, inwieweit Vitamin C die untersuchten Parameter bei in-vitro-Inkubation mit Vollblut von gesunden Probandinnen verändert.

4.3.1 Einfluss von Vitamin C auf den Zeitverlauf der AAPH-Reaktion mit Plasma

Die TRAP-Messung wurde mit Inkubationszeiten von bis zu 6 Stunden und 30 Minuten durchgeführt. Wie in Abb. 4-30 zu sehen ist, bewirkte der Zusatz von Vitamin C eine signifikante Erhöhung ($p < 0,01$) der Auslöschzeit in Abhängigkeit von der Konzentration, sie blieb aber im Verlauf der Inkubationszeit konstant. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei Inkubation von Vitamin C in Tyrode gefunden (Werte nicht gezeigt).

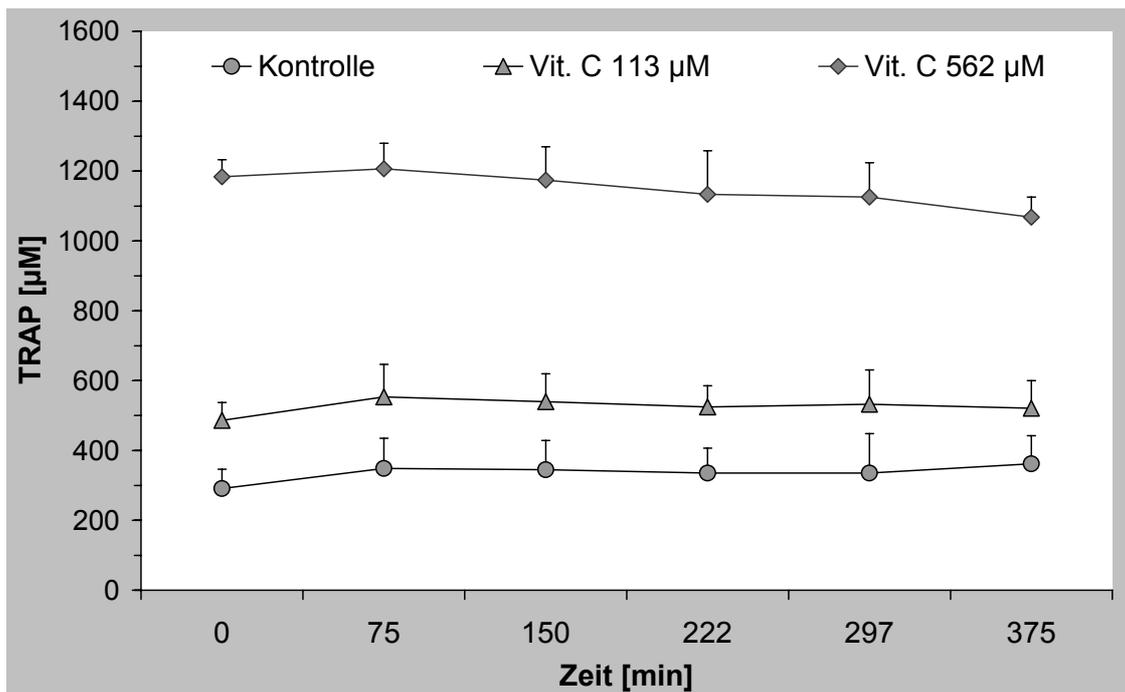


Abb. 4-30: Einfluss von Vitamin C auf die gesamte antioxidative Kapazität (TRAP) von Plasma. Mittelwerte \pm S.D, $n = 4$. Die Gruppen unterscheiden sich jeweils signifikant. $p < 0,01$, ANOVA.

Parallel zur Bestimmung der TRAP wurde auch die Peakhöhe der AAPH-Reaktion nach Vitamin C-Inkubation untersucht. Die Ergebnisse (Abb. 4-31) zeigen, dass die Peak-Intensität in allen drei Fällen nahezu parallel im Lauf der Zeit abnimmt. Dabei ist im Plasma die Peakhöhe geringer, je höher die Vitamin-C-Konzentration ist, in der Tyrode ist es umgekehrt. Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Unterschied (ANOVA) zwischen der Kontrolle und der Gruppe mit $113 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$) und zwischen der Kontrolle und der Gruppe mit $562 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$).

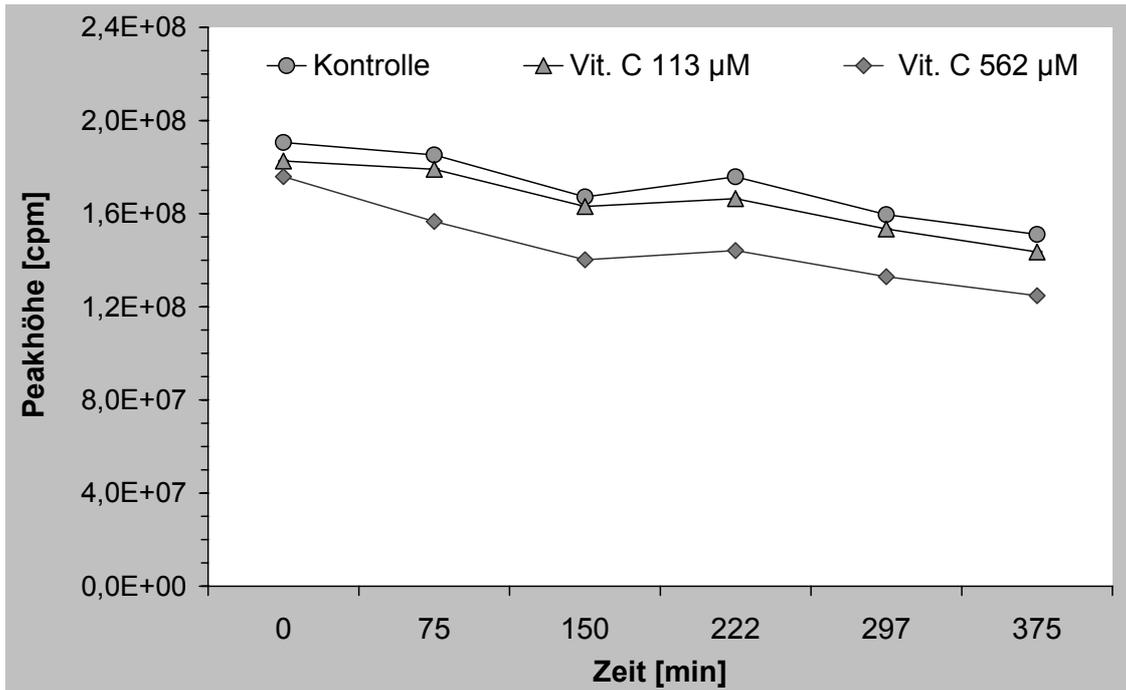


Abb. 4-31: Einfluss von Vitamin C auf die Peakhöhe der AAPH-Reaktion von Plasma. Mittelwerte \pm S.D, $n = 4$. Es gab einen signifikanten Unterschied (ANOVA) zwischen Kontrolle und Gruppe mit $113 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$) und zwischen Kontrolle und Gruppe mit $562 \mu\text{M}$ ($p < 0,01$).

4.3.2 Einfluss von Vitamin C auf den Malondialdehyd-Gehalt im Plasma

Auch der Malondialdehyd-Gehalt im Plasma nach Vitamin-C-Inkubation wurde untersucht. Abb. 4-32 zeigt, dass nach zwei Stunden bei allen Proben der MDA-Gehalt im Plasma zugenommen hatte. Wurde die Kontrolle ohne Vitamin C initial zu 100 % gesetzt, so zeigte diese nach zwei Stunden eine Zunahme um 26 %, die Probe mit $113 \mu\text{M}$ Vitamin C um 37 % und die mit $562 \mu\text{M}$ Vitamin C um 57 %. Nach sechs Stunden Inkubation stieg der MDA-Gehalt noch weiter an (Werte nicht gezeigt), bei der Probe ohne Vitamin C am geringsten (57 %), bei der Probe mit der höheren Vitamin C-Konzentration am stärksten (109 %). Die Unterschiede waren dabei jeweils signifikant ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$, ANOVA).

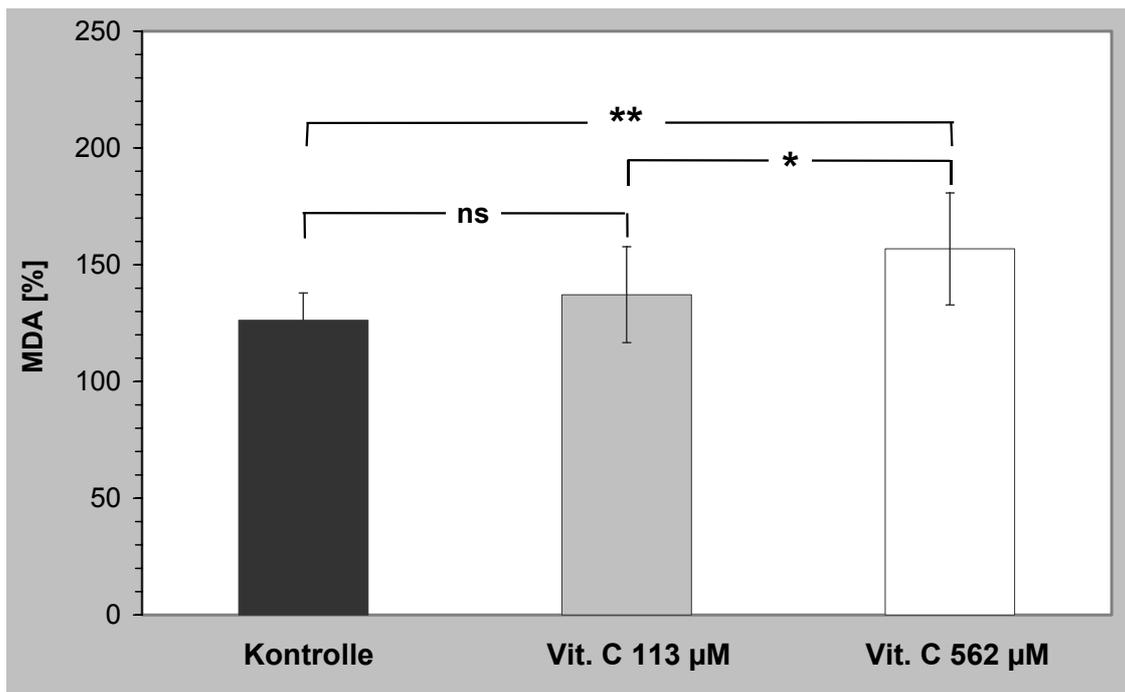


Abb. 4-32: Einfluss der Vitamin-C-Inkubation (2h) auf die Malondialdehyd-Konzentration im Plasma. Mittelwerte \pm S.D., 100 % = MDA-Konzentration ohne Inkubation, $n = 6$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, ns = nicht signifikant, ANOVA.

4.3.3 Einfluss von Vitamin C auf den Malondialdehyd-Gehalt in der Erythrozytenmembran

Auch der Einfluss der Vitamin-C-Inkubation auf den MDA-Gehalt in der Erythrozytenmembran wurde untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 4-33 zu sehen. Die Probe ohne Vitamin C vor der Inkubation wurde auf 100 % gesetzt und die anderen Proben darauf bezogen.

Nach zwei Stunden war bei allen Proben der MDA-Gehalt in der Erythrozytenmembran erhöht, bei den Proben mit 113 µM Vitamin C um 100 %, bei den Proben mit 562 µM Vitamin C um 114 %, im Vergleich dazu war die Erhöhung bei den Proben ohne Vitamin C 64 %. Auch nach sechs Stunden war

der MDA-Gehalt der Proben mit Vitamin C noch deutlich höher als der ohne Vitamin C (Werte nicht abgebildet).

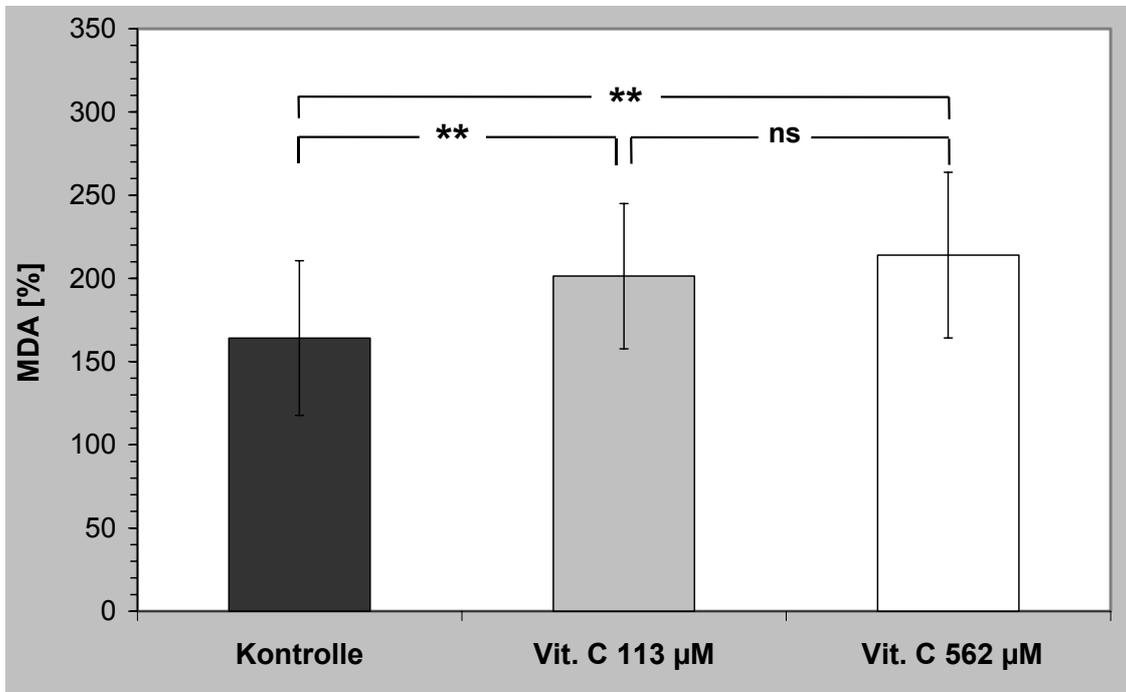


Abb. 4-33: Effekt von Vitamin C auf die Malondialdehyd-Konzentration in der Erythrozytenmembran von gesunden Probandinnen. Mittelwerte \pm S.D., 100 % = MDA-Konzentration ohne Inkubation, $n = 4$, ** $p < 0,01$, ns = nicht signifikant, ANOVA.

4.3.4 Einfluss von Vitamin C auf den ATP-Gehalt in Erythrozyten

Untersucht wurde der Effekt der Inkubation mit Vitamin C auf die ATP-Konzentration in Erythrozyten. Nach zwei bzw. sechs Stunden wurde der intrazelluläre Gehalt von ATP bestimmt. Dabei wurde die ATP-Konzentration ohne Vitamin C vor der Inkubation gleich 100 % gesetzt und die verbleibenden

Konzentrationen nach Einwirkung von Vitamin C darauf bezogen. Das Ergebnis nach zweistündiger Inkubation ist in Abb. 4-34 dargestellt.

Nach zwei Stunden hatte der ATP-Gehalt in den Kontrollen und den Proben mit der Vitamin-C-Endkonzentration von 113 μM um ca. 10 % (n.s.) abgenommen, in den Proben mit 562 μM um 2% ($p < 0,01$). Nach sechs Stunden ging der Vitamin-C-Gehalt der Kontrolle auf 75% zurück, bei den Proben mit Vitamin C war die Abnahme deutlich geringer (113 μM : 20 %, 562 μM : 16 %, Werte nicht gezeigt).

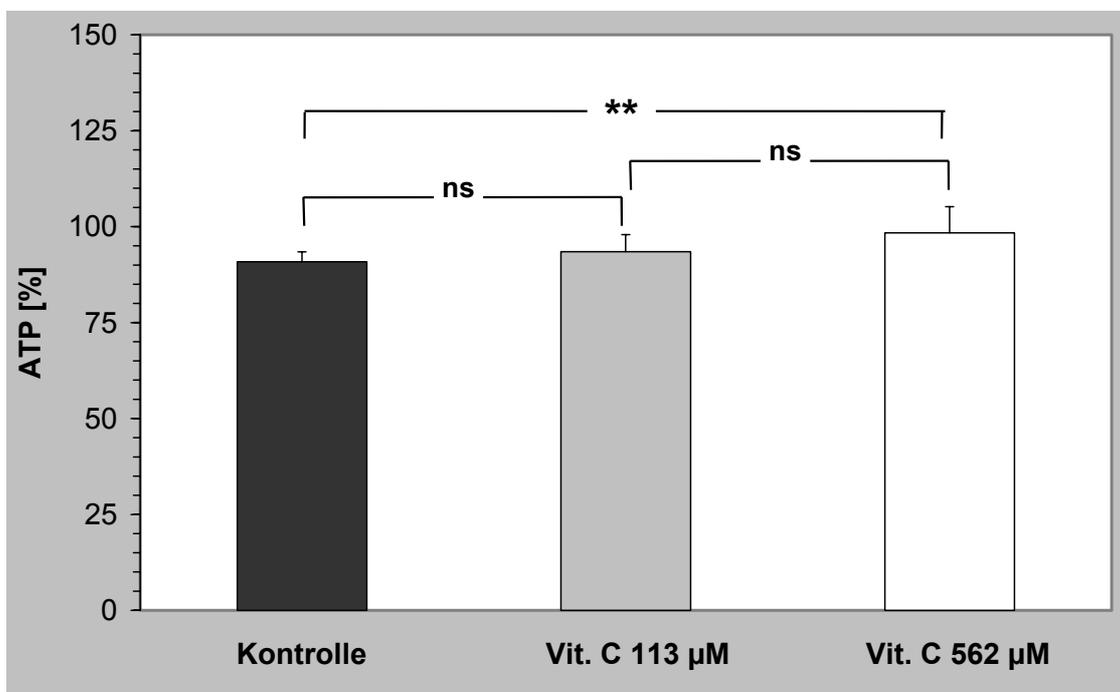


Abb. 4-34: Effekt von Vitamin C auf die ATP-Konzentration in Erythrozyten von gesunden Probandinnen ($n = 6$) nach zweistündiger Inkubation. Mittelwerte \pm S.D, 100 % = ATP ohne Inkubation, ** $p < 0,01$, ns = nicht signifikant; ANOVA.

5 Diskussion

5.1 Bisherige Untersuchungen zur Bedeutung von oxidativem Stress bei Präeklampsie

In der Tabelle 5-1 sind im Überblick die wichtigsten der bisherigen Untersuchungen zusammengestellt, die einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Präeklampsie belegen. Als häufig gemessene Parameter wurden die totale antioxidative Kapazität des Plasmas, der Thiol-Status in Plasma und Erythrozyten sowie die Produkte der Lipidperoxidation (z. B. Lipidperoxide, MDA und Isoprostane) bestimmt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen über die gesamte antioxidative Kapazität des Plasmas zeigen bis auf eine Ausnahme eine Erhöhung des Wertes bei Präeklampsie (siehe Tabelle 5-1), was mit dem erhöhten Harnsäurespiegel bei präeklampsischen Schwangeren in Zusammenhang gebracht wurde. Dieser könnte durch eingeschränkte Nierenfunktion oder durch Aktivierung von Xanthinoxidase, bedingt durch Plazentahypoxie, verursacht werden.

Eine Vielzahl von Untersuchungen über den Thiol-Status im Plasma und über Glutathion in Erythrozyten konnte eine niedrigere Konzentration von Thiolen bei Patientinnen mit Präeklampsie belegen. Nicht nur die Konzentration von reduziertem GSH wurde als niedriger erkannt, auch die Gesamtkonzentration von GSH und seiner oxidierten Form GSSG erwies sich als erniedrigt im Fall der Präeklampsie. Die Gründe für diese Gesamtniedrigung sind nicht bekannt, und es wird auf vermehrten Verbrauch in Folge des oxidativen Stresses bzw. auf verminderte Synthese in den Zellen verwiesen.

Tabelle 5-1: Ausgewählte Untersuchungen über den Zusammenhang von oxidativem Stress mit Präeklampsie. ↑ bedeutet eine Erhöhung, ↓ eine Erniedrigung, ↔ keine Veränderung.

Marker für oxidativen Stress	Im Vergleich zu gesunden Schwangeren	Referenzen
TRAP im Plasma	↑ ↓	[Kharb 2000c] [Poranen et al., 1996] [Uotila et al., 1994] [Jendryczko and Tomala 1995]
Thiole im Plasma	↓ ↔	[Kharb 2000a] [Chen et al., 1994] [Wisdom et al., 1991] [Raijmakers et al., 2000]
MDA im Plasma	↑ ↔	[Aydin et al., 2004] [Serdar et al., 2003] [Var et al., 2003] [Madazli et al., 2002] [Kharb 2000c] [Kumar and Das 2000] [Hubel et al., 1996] [Poranen et al., 1996] [Bowen et al., 2001] [Raijmakers et al., 2004]
GSH in den Erythrozyten		[Madazli et al., 2002]

	<p>↓</p> <p>↔</p>	<p>[Kharb 2000a]</p> <p>[Bayhan et al., 2000]</p> <p>[Knapen et al., 1998]</p> <p>[Chen et al., 1994]</p> <p>[Wisdom et al., 1991]</p> <p>[Kabi et al., 1994]</p> <p>[Raijmakers et al., 2001]</p>
MDA in der Erythrozytenmembran	<p>↑</p>	<p>[Basbug et al., 2003]</p> <p>[Carreiras et al., 2002]</p> <p>[Matteo et al., 1998].</p> <p>[Teppa-Garran et al., 2004]</p>
Aktivierung von Leukozyten	<p>↑</p>	<p>[Redman and Sargent 2003]</p> <p>[Clark et al., 1998]</p> <p>[Sacks et al., 1998]</p> <p>[Holthe et al., 2004]</p> <p>[Tsukimori et al., 1993]</p> <p>[Barden et al., 1997]</p> <p>[Mellembakken et al., 2001]</p> <p>[Hayashi et al., 2004]</p> <p>[Greer et al., 1989]</p>
Antioxidative Vitamine	<p>↓</p> <p>↔</p>	<p>[Serdar et al., 2003]</p> <p>[Kharb 2000c]</p> <p>[Jendryczko and Tomala 1995]</p> <p>[Mikhail et al., 1994]</p> <p>[Wang et al., 1991]</p> <p>[Bowen et al., 2001]</p>

Lipidperoxide in Plasma und Plazenta	↑	[Bayhan et al., 2000] [Staff et al., 1999b] [Wang et al., 1991]
	↔	[Bowen et al., 2001]
MDA in der Plazenta	↑	[Wang et al., 1992] [Serdar et al., 2003] [Poranen et al., 1996]
	↔	[Bowen et al., 2001]
Isoprostane in Plasma und Plazenta	↑	[Staff et al., 1999a] [Barden et al., 1996] [Barden et al., 2001]

In einigen Untersuchungen wurde das Hauptaugenmerk auf die Lipidperoxidation gelenkt, in deren Verlauf viele wesentliche Biomarker des oxidativen Stresses entstehen.

In den meisten Studien wurde ein erhöhter Plasmaspiegel von Malondialdehyd bei Patientinnen mit Präeklampsie herausgefunden [Aydin et al., 2004; Kharb 2000b; Kumar and Das 2000; Madazli et al., 2002; Poranen et al., 1996; Serdar et al., 2003; Var et al., 2003]. Nur zwei Publikationen geben unveränderte Plasmaspiegel an [Bowen et al., 2001; Raijmakers et al., 2004].

Neben dem Plasmaspiegel wurde auch der Gehalt von MDA in der Erythrozytenmembran untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante Erhöhung bei präeklampsischen Schwangeren [Carreiras et al., 2002; Matteo et al., 1998]. Bei den Isoprostanen und Lipidperoxiden wurden ebenfalls Erhöhungen des Spiegels im Blutplasma präeklampsischer Patientinnen gefunden (siehe Tabelle 5-1). Verschiedene Produkte der Peroxidation werden

als wichtige Ursachen für die Störung der arteriellen Endothelfunktion der Mutter [Hubel 1998] angesehen.

Eine erhöhte Aktivierung der Leukozyten wurde generell in der Schwangerschaft beobachtet. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass die Expression der Entzündungsmediatoren bei Schwangeren mit Präeklampsie im Vergleich zu gesunden Schwangeren überschießend hoch ist. Man nimmt an, dass diese Aktivierung durch die von den Trophoblasten der Plazenta freigesetzten Cytokine verursacht wird. Verwiesen wird in der Literatur auf eine zusätzliche Schädigung des Endothels, die zu einer weiteren entsprechenden Verstärkung der Entzündungsreaktionen führt [Dekker and Sibai 1998; Taylor et al., 1998; Walker 1998].

Die Konzentrationen von Vitamin C, Vitamin E und β -Carotin spielen eine wichtige Rolle als antioxidative Parameter. Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen sind nicht völlig einheitlich. Die Mehrzahl der Studien zeigt jedoch eine Abnahme der Plasmaspiegel dieser Vitamine bei Präeklampsie [Jendryczko and Tomala 1995; Kharb 2000d; Mikhail et al., 1994; Serdar et al., 2003; Wang et al., 1991]. Einige Autoren finden aber eine erhöhte Vitamin E-Konzentration [Zusterzeel et al., 2002], was als Kompensationsmechanismus gegen den vorhandenen oxidativen Stress angesehen wird. Die Ergebnisse zweier Arbeitsgruppen zeigen dagegen eine Abnahme bei schweren Formen der Präeklampsie [Jendryczko and Tomala 1995; Wang et al., 1991].

Auch Untersuchungen mit der Plazenta von Patientinnen mit Präeklampsie wurden durchgeführt. In den Gewebeproben wurden statistisch signifikant erhöhte Konzentrationen von Lipidperoxiden, MDA und Isoprostanen gefunden.

Die Literatur belegt, dass Präeklampsie mit oxidativem Stress verbunden ist, unklar bleibt, ob zuerst oxidativer Stress ausgelöst wird, der dann die Symptome der Präeklampsie hervorruft, oder ob z. B. durch plazentare Cytokin-Freisetzung in der Mutter u. a. eine Inflammation mit sekundärem, aber krankheitverstärkendem oxidativem Stress verursacht wird.

5.2 Vergleich der eigenen Befunde mit den bisher publizierten Daten

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl von Parametern untersucht, von denen einige auch schon mehrmals durch andere Autoren beschrieben wurden. Als neuer sensitiver Marker für oxidativen Stress wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal die Peakhöhe der Plasma-AAPH-Reaktion eingeführt, auch der Gehalt von ATP in den Erythrozyten wurde als ein solcher Marker, der indirekt eine Rolle bei oxidativem Stress spielt, gemessen.

5.2.1 Die gesamte antioxidative Kapazität (TRAP) von Plasma

Mit TRAP werden die wichtigen bekannten Antioxidantien wie Vitamin E, Vitamin C, Harnsäure, Thiolgruppen und auch noch nicht identifizierte Antioxidantien in ihrer Wirkung im Plasma gleichzeitig erfasst. In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Erhöhung der gesamten antioxidativen Kapazität um 52 % bei präeklampsischen Schwangeren (532 μM) im Vergleich zu normal Schwangeren (346 μM) gezeigt werden.

Einige Autoren fanden ebenfalls eine erhöhte Konzentration von TRAP bei präeklampsischen Frauen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe [Kharb 2000c; Poranen et al., 1996; Uotila et al., 1994]. Allerdings wurde TRAP in der Arbeit von Kharb nicht direkt bestimmt, sondern als Summe aus den gemessenen Konzentrationen von Harnsäure, Vitamin C, Vitamin E und Thiolgruppen unter Berücksichtigung der jeweiligen stöchiometrischen Faktoren im Plasma berechnet:

$$TRAP_{Calc} = 1,3 \cdot c_{Harnsäure} + 1,7 \cdot c_{Vitamin C} + 2,0 \cdot c_{Vitamin E} + 0,2 \cdot c_{SH-Gruppen}$$

Dabei ergab sich eine signifikante Erhöhung von etwa 25 %, d.h. von 612 μM bei gesunden Schwangeren auf 762 μM bei Patientinnen mit Präeklampsie.

Im Widerspruch dazu fanden Jendryczko & Tomala (1995) bei Eklampsiepatientinnen einen verminderten TRAP-Wert von 856 μM gegenüber normalen Schwangeren mit 1085 μM .

Es liegt nahe, die Erhöhung der antioxidativen Kapazität bei Patientinnen mit Präeklampsie durch einen erhöhten Harnsäurespiegel im Plasma zu erklären. Die anderen wichtigen Komponenten für TRAP wie Vitamin C und E scheinen dagegen in verringerter Konzentration im Plasma bei Präeklampsie vorzuliegen [Kharb 2000d]. Daher war es in der vorliegenden Arbeit von großem Interesse, die Harnsäure-Konzentration bei gesunden und präeklampsischen Schwangeren zu untersuchen und mit dem TRAP-Wert zu vergleichen. Das Ergebnis zeigt einerseits eine signifikante Erhöhung des Harnsäurespiegels um 38 % bei Patienten mit Präeklampsie im Vergleich zu normalen Schwangeren, andererseits eine signifikante Korrelation zwischen dem Harnsäurespiegel und der gesamten antioxidativen Kapazität der einzelnen Blutproben ($r = 0,89$, Abb. 5-1).

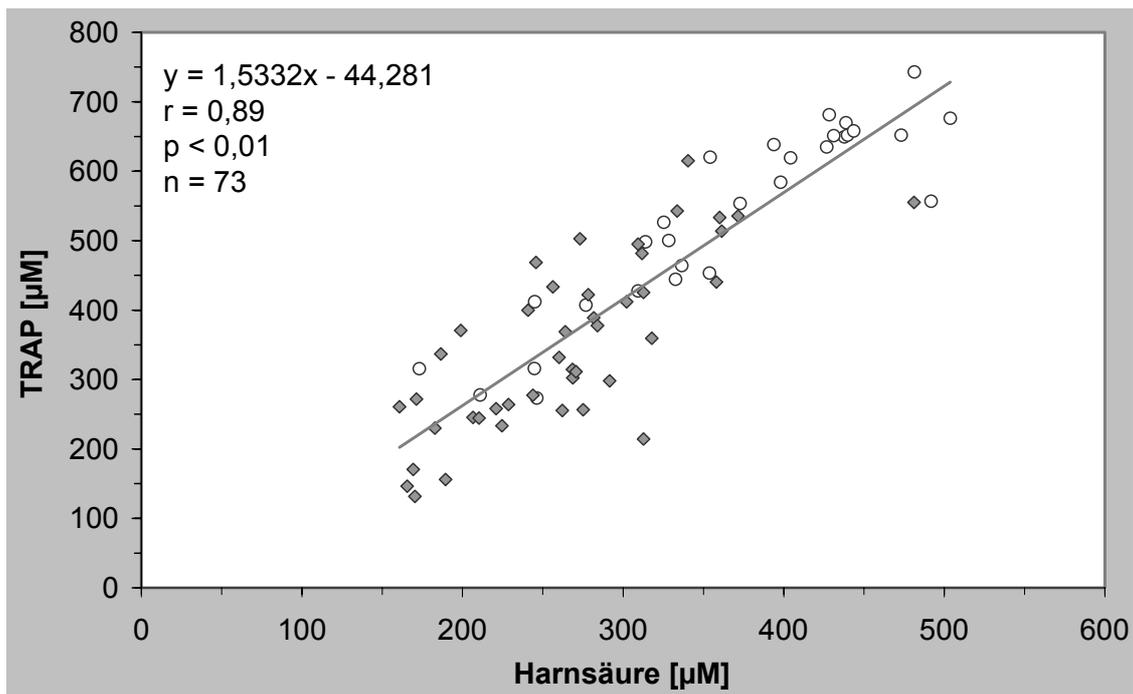


Abb. 5-1: Korrelation zwischen der gesamten antioxidativen Kapazität (TRAP) und der Harnsäure-Konzentration im Plasma von allen untersuchten Proben (n = 73). \diamond Kontrollen, \circ Präeklampsie, $p < 0,01$, $r = 0,89$ nach Pearson.

Die Korrelationsgerade zeigt eine Steigung von 1,53. Diese Steigung entspricht etwa dem stöchiometrischen Koeffizienten für Harnsäure, der für die theoretische Berechnung des TRAP-Wertes herangezogen und von Wayner et al. (1987) mit 1,3 angegeben wird. Die Abweichung in unserem Fall ergibt sich vermutlich durch den Einfluss der übrigen Antioxidantien, die bei den einzelnen Patientinnen unterschiedlich sind.

Mögliche Ursachen für den erhöhten Harnsäurespiegel bei den Präeklampsie-Patientinnen können in der gestörten Nierenfunktion [Dunlop and Davison 1977; Redman et al., 1976; Redman and Bonnar 1978] oder in einer erhöhten Xanthinoxidase-Aktivität [Hubel 1999; Many et al., 1996; Nemeth et al., 2002] liegen.

5.2.2 Peakhöhe der AAPH-Reaktion von Plasma

Während über die Auslöschzeit der AAPH-Reaktion bei präeklampsischen Patientinnen schon einige Untersuchungen durchgeführt wurden, ist über die Peakhöhe bzw. Peak-Intensität der AAPH-Reaktion in der Literatur noch nichts geschrieben worden. Bei einigen Antioxidantien wird nach der Auslöschzeit wieder die ursprüngliche Lichtintensität bzw. Radikalbildung erreicht, wie dies bei Trolox der Fall ist (vgl. die entsprechende Kurve in Abb. 5-2).

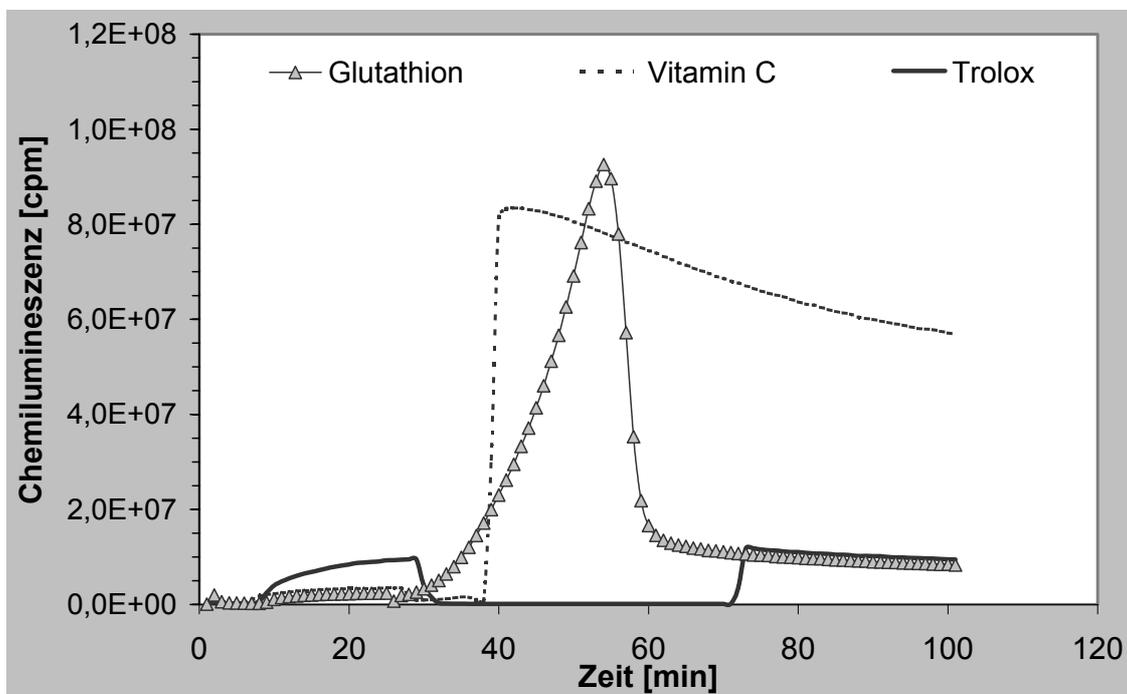


Abb. 5-2: AAPH-Reaktionskurven für verschiedene Antioxidantien.

Dagegen unterscheidet sich der Verlauf bei anderen Antioxidantien, wie z. B. Vitamin C oder GSH: Nach Ende der Auslöschzeit wird nicht nur der ursprüngliche Wert wieder erreicht, sondern die Radikalbildungsrate steigt weit über den Plateauwert an. Blutplasma zeigt nun einen Intensitätsverlauf (Abb.

4-1), der dem Erscheinungsbild bei Glutathion ähnlich ist. Unsere Untersuchungen zur Simulation des oxidativen Stresses zeigen, dass Thiole im Plasma wesentlich zu diesem Phänomen beitragen und die Oxidation von proteingebundenen Thiolgruppen für die Veränderungen der Peakhöhen verantwortlich sind.

Das in dieser Arbeit erhaltene Ergebnis (Abb. 4-21) zeigt eine Abnahme der Peakhöhe um 22,5 % bei den Patientinnen mit Präeklampsie ($6,3 \cdot 10^7$ cpm) im Vergleich zu den gesunden Schwangeren ($8,1 \cdot 10^7$ cpm). Die Abnahme der Peakhöhe bei präeklampsischen Frauen wird also nach dem oben Gesagten auf einem Mangel an Antioxidantien, in erster Linie an proteingebundenen Thiolgruppen, beruhen. Auf jeden Fall stellt die Abnahme der Peakhöhe einen empfindlichen Marker des oxidativen Stresses dar, wie in Abschnitt 5.3 bei der Diskussion der in-vitro-Versuche noch weiter erläutert wird.

Setzt man die individuell erfassten Werte in Relation, so zeigen die beiden Parameter Auslöschzeit und Peakhöhe eine negative Korrelation. Die Auslöschzeit, die zu einem großen Teil auf die Harnsäure zurückgeführt werden kann, nimmt mit steigender Peakhöhe ab (Abb. 5-3). Damit könnte auch der Spiegel der Harnsäure, obwohl diese selbst ein Antioxidans darstellt, als Maß für oxidativen Stress angesehen werden.

Ähnlich zeigt auch Abb. 5-4 eine negative Korrelation zwischen Harnsäurespiegel und Peakhöhe. Nimmt die Peakhöhe als Zeichen des oxidativen Stresses ab, so nimmt der Harnsäurespiegel zu.

Andererseits konnte eine positive signifikante Korrelation ($r = 0,44$, $p < 0,01$) bei 44 Schwangeren zwischen Harnsäure und Malondialdehyd im Plasma berechnet werden, ein Befund, der unterstreicht, dass Harnsäure ein Indikator für oxidativen Stress darstellt (nicht abgebildet).

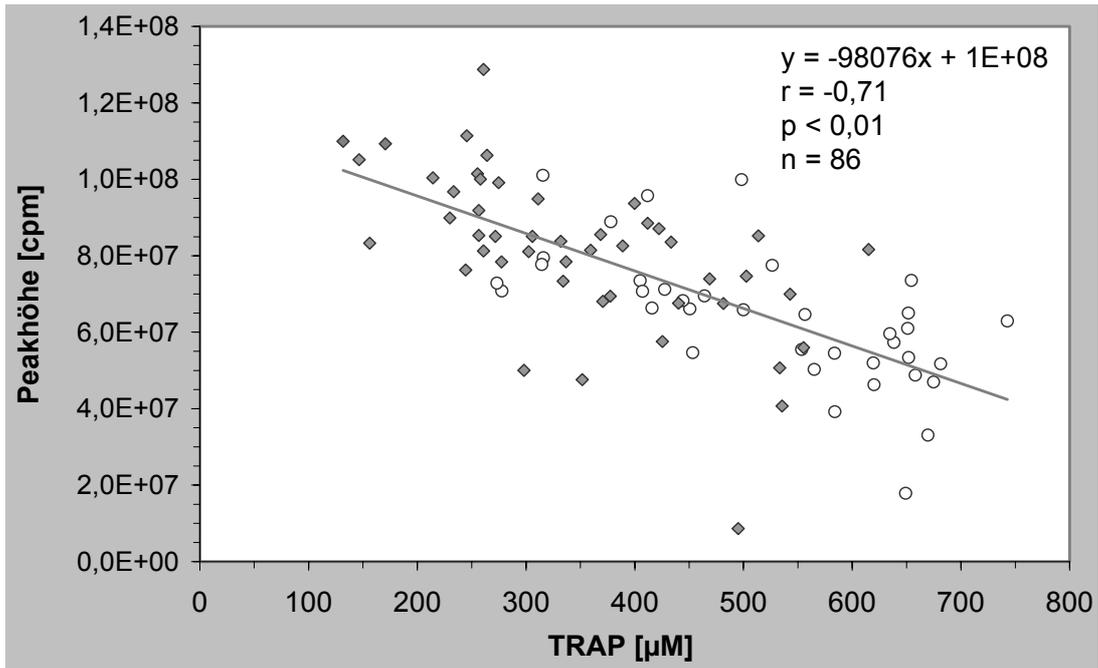


Abb. 5-3: Korrelation zwischen der gesamten antioxidativen Kapazität (TRAP) und der Peakhöhe im Plasma von allen untersuchten Proben ($n = 86$). \diamond Kontrollen, \circ Präeklampsie, $p < 0,01$, $r = -0,71$ nach Pearson.

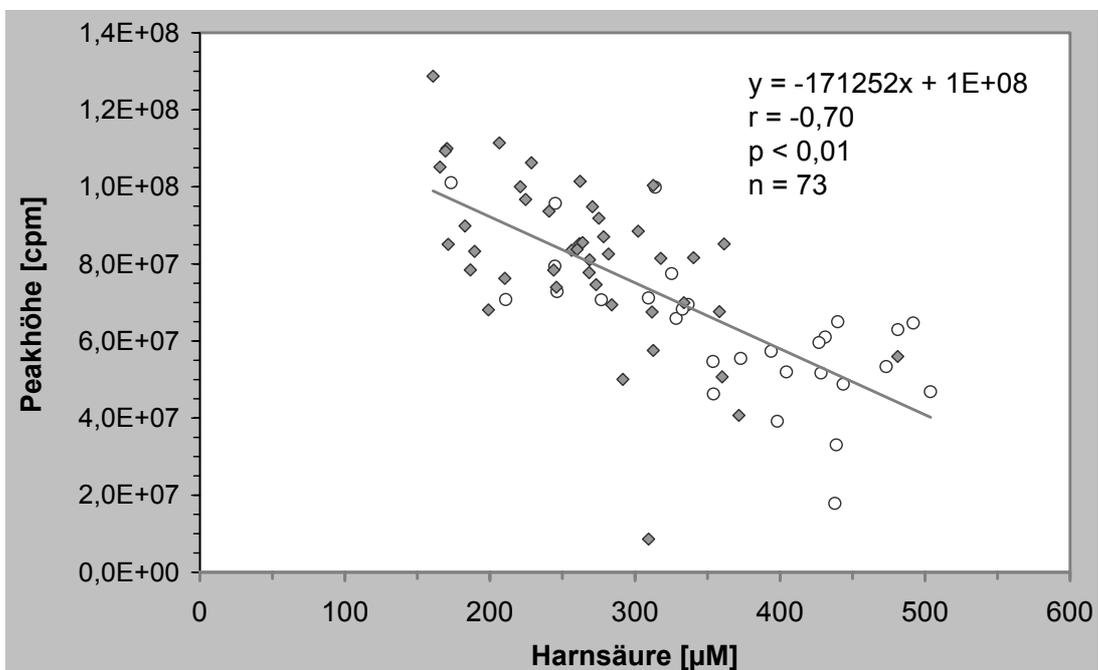


Abb. 5-4: Korrelation zwischen der Harnsäure-Konzentration und der Peakhöhe im Plasma von allen untersuchten Proben ($n = 73$). \diamond Kontrollen, \circ Präeklampsie, $p < 0,01$, $r = -0,70$ nach Pearson.

5.2.3 Thiole im Plasma

Die Thiolgruppen im Plasma wurden in dieser Arbeit mittels der DTNB-Reaktion bestimmt. Um zwischen den niedermolekularen Thiolen wie Glutathion, Cystein u. a. und den an Proteinen gebundenen Thiolen zu unterscheiden, wurden folgende Bestimmungen durchgeführt: Die gesamten reduzierten, d.h. frei vorliegenden Thiole, die gesamten oxidierten und reduzierten Thiole nach Reduktion mit KBH_4 , sowie die frei vorliegenden niedermolekularen und die gesamten oxidierten und reduzierten niedermolekularen Thiole nach Reduktion mit KBH_4 .

Der Anteil von proteingebundenen Thiolgruppen (Quotient A-C/B) zeigt einen niedrigeren Wert bei Präeklampsie-Patientinnen im Vergleich zu Normalschwangeren. Das bedeutet, dass im Falle der Präeklampsie die proteingebundenen Thiole vermindert, d. h. oxidiert wurden, ein weiterer Hinweis auf oxidativen Stress. Bei den Voruntersuchungen wurde der Einfluss von Oxidantien wie H_2O_2 und KO_2 auf die Thiol-Spezies gezeigt. Auf Grund unserer Ergebnisse konnten wir feststellen, dass die Oxidantien hauptsächlich auf die proteingebundenen Thiole Einfluss haben.

Die Untersuchungen, die sich mit dem Thiol-Status im Plasma beschäftigten, geben zwar keinen Quotient an und sie berücksichtigen auch nicht die verschiedenen Thiol-Spezies, doch weisen ihre Ergebnisse in dieselbe Richtung: Die Konzentrationen der freien, nicht oxidierten Thiole sinkt im Fall der Präeklampsie ab [Chen et al., 1994; Kharb 2000a; Wisdom et al., 1991]. Der Unterschied zwischen Präeklampsie und normaler Schwangerschaft liegt in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen bei etwa 10 %.

5.2.4 MDA im Plasma

Das Ergebnis unserer Untersuchung zeigte eine Erhöhung des Malondialdehyd-Spiegels im Plasma der Schwangeren mit Präeklampsie ($6,9 \pm 3,6 \mu\text{M}$) im Vergleich mit den normal Schwangeren ($4,8 \pm 2,8 \mu\text{M}$). Dabei sind sowohl der Konzentrationsbereich als auch die pathologische Erhöhung des MDA-Spiegels vergleichbar mit den Daten der meisten Publikationen [Aydin et al., 2004; Hubel et al., 1996; Kharb 2000c; Madazli et al., 1999; Madazli et al., 2002; Serdar et al., 2003]. Lediglich bei Bowen et al. (2001) wird eine Abnahme um 20 % bei Präeklampsie beschrieben.

Die Ursache der erhöhten MDA-Produktion ist unklar, durch einige Autoren wurden plazentare und deziduale Gewebe als wichtige Quelle für die Produkte der Lipidperoxidation verantwortlich gemacht [Hubel 1999; Staff et al., 1999b; Wang and Alexander 2000]. Dort wird sie möglicherweise durch Hypoxie verursacht, wobei Entzündungsreaktionen ausgelöst werden und als Folge davon werden Cytokine freigesetzt und Leukozyten aktiviert.

Unabhängig von der Quelle, die zur Erhöhung des MDA-Spiegels führt, signalisiert diese Erhöhung auf alle Fälle eine klare Zunahme des oxidativen Stresses.

5.2.5 Nitrit/Nitrat

NO, das verschiedene wichtige physiologische Rollen spielt, stellt auch einen potenten Vasodilatator dar. Es wird im Gefäßendothel aus der Aminosäure L-Arginin von dem Enzym NO-Synthase synthetisiert und luminal und abluminal sezerniert. In den medialen glatten Gefäßmuskelzellen stimuliert es das Enzym Guanylatcyclase, das die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und dadurch über mehrere

Zwischenschritte die Relaxation der Gefäßmuskelzellen bewirkt. Da NO ein sehr labiles Molekül ist, ist eine direkte Bestimmung sehr schwierig. Daher wurden dessen stabile Metaboliten NO_2^- und NO_3^- im Plasma bestimmt.

Unsere Werte für Nitrat/Nitrit zeigen eine Erhöhung bei den präeklampsischen Frauen ($19,7 \pm 8,9 \mu\text{mol/l}$) im Vergleich zu normalen Schwangeren ($13,0 \pm 8,4 \mu\text{mol/l}$). Eine vergleichbare Relation bei ähnlichen Konzentrationswerten wurden von vielen Arbeitsgruppen beschrieben [Baker et al., 1995; Nobunaga et al., 1996; Ranta et al., 1999; Shaamash et al., 2000; Smarason et al., 1997; Yoneyama et al., 2002]. Allerdings gibt es auch widersprüchliche Befunde, nach denen bei Präeklampsie verminderte oder unveränderte $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ -Gehalte im Plasma gefunden wurden [Davidge et al., 1996; Diejomaoh et al., 2004; Egerman et al., 1999; Garmendia et al., 1997; Lyall et al., 1995; Seligman et al., 1994; Silver et al., 1996].

Sofern die Konzentration von $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ auch die Synthese von NO widerspiegelt, erscheint es paradox, dass ausgerechnet ein Vasodilatator bei einer Krankheit wie Präeklampsie, die mit erhöhtem Blutdruck verbunden ist, vermehrt gebildet wird. Unter physiologischen Umständen muss man davon ausgehen, dass eine Erhöhung des NO-Spiegels zu einer Erniedrigung des Blutdrucks führt, doch konnte Nobunaga et al. (1996) eine positive Korrelation des NO-Spiegels und des systolischen Blutdrucks bei präeklampsischen Patientinnen feststellen. Offensichtlich müssen andere Faktoren wie das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, Endothelin oder Prostaglandine für den erhöhten Blutdruck verantwortlich sein, die erhöhte Produktion des NO wäre dann ein kompensatorischer Mechanismus, der den genannten Faktoren entgegenwirkt. Die Erhöhung des Nitrit/Nitrat-Spiegels im Plasma kann unter anderem durch eine erhöhte Aktivität der NO-Synthase im Myometrium und Synzytiotrophoblast der Plazenta erfolgen [Shaamash et al., 2001]. Als weitere

Ursache wird aber auch eine reduzierte Nierenfunktion bei Präeklampsie genannt [Smarason et al., 1997].

5.2.6 GSH in Erythrozyten

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Verminderung des erythrozytären Glutathion-Spiegels in der Gruppe der Schwangeren mit Präeklampsie ($1,23 \pm 0,26$ mM) gegenüber Normalschwangeren ($1,45 \pm 0,3$ mM) festgestellt. Eine solche Abnahme wurde auch in beinahe allen vorliegenden Untersuchungen gefunden [Bayhan et al., 2000; Chen et al., 1994; Kabi et al., 1994; Kharb 2000a; Knapen et al., 1998; Madazli et al., 2002; Wisdom et al., 1991]. Nur eine Arbeitsgruppe konnte keine signifikante Verminderung feststellen, doch deuten die Ergebnisse auf eine Tendenz zur Abnahme hin [Raijmakers et al., 2001]. Der verminderte GSH-Gehalt kann durch eine Zunahme des oxidativen Stresses bei Präeklampsie bzw. durch ein Defizit an Antioxidantien und antioxidativen Schutz-Enzymen wie SOD in der Blutzelle bedingt sein. Außerdem wurde eine höhere Aktivität von Glutathionperoxidase in den Erythrozyten und im Plasma präeklampsischer Frauen gefunden, wodurch Glutathion als Cofaktor für dieses Enzym vermehrt verbraucht wird [Uotila et al., 1993]. Diese gesteigerte Aktivität wird als ein Kompensationsmechanismus angesehen, der der erhöhten Lipidperoxidation mit der Oxidation von Glutathion begegnet [Knapen et al., 1998]. Ein Teil des oxidierten Glutathions wird in den Erythrozyten wieder reduziert, ein anderer Teil wird aus der Zelle transportiert und durch die Niere ausgeschieden, was zur Abnahme des Gehalts an Glutathion führen kann [Dass et al., 1992].

5.2.7 MDA in der Erythrozytenmembran

Übereinstimmend mit Ergebnissen aus anderen Untersuchungen konnten wir auch eine Erhöhung des Malondialdehyd-Gehalts in der Erythrozytenmembran von Schwangeren mit Präeklampsie ($33,9 \pm 10,1$ nmol MDA/g Hb) gegenüber Normalschwangeren ($27,2 \pm 7,9$ nmol MDA/g Hb) finden.

Diese Zahlenwerte stimmen mit denen von Basbug et al. (2003) sehr gut überein ($41,8 \pm 9,6$ bei Präeklampsie und $28,6 \pm 16,2$ in der Kontrollgruppe), während von anderen Arbeitsgruppen 20- bis 50-fach höhere Werte publiziert wurden [Carreiras et al., 2002; Matteo et al., 1998; Teppa-Garran et al., 2004]. Doch auch dort ergibt sich als Zeichen für oxidativen Stress eine Erhöhung des MDA-Gehalts in der Erythrozytenmembran bei Präeklampsie um 40 bis 200 %.

An Vesikeln aus Erythrozyten konnte gezeigt werden, dass die Peroxidation der Zellmembran mit einer reduzierten Ca^{2+} -ATPase-Aktivität und damit einer verringerten Abgabe von Calcium durch die Erythrozyten assoziiert ist [Teppa-Garran et al., 2004]. Dies hat eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im Cytoplasma der Erythrozyten zur Folge. Entsprechend konnte bei Präeklampsie eine erhöhte Konzentration von Calcium in Erythrozyten, Blutplättchen und im plazentaren Gewebe sowie eine Abnahme der Aktivität der Ca^{2+} -ATPase in der Erythrozytenmembran nachgewiesen werden [Carreiras et al., 2002; Haller et al., 1989; Nardulli et al., 1994; Pitkin 1985; Sowers et al., 1989]. Speziell für Erythrozyten könnte dies zu einer verringerten Verformbarkeit führen.

Es ist anzunehmen, dass nicht nur Erythrozyten Ziel erhöhten oxidativen Stresses sind, sondern auch die Endothel- und glatten Muskelzellen der Gefäße. Vor allem in letzteren konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress auch dort zu veränderter zellulärer Ca^{2+} -Homöostase und damit zu erhöhter Kontraktilität führen kann [Heinle 1988]. Dieser Mechanismus könnte also zur

Erhöhung des peripheren arteriellen Widerstandes und damit zur arteriellen Hypertonie beitragen.

5.2.8 ATP im Erythrozyten

Die Aufgabe der Erythrozyten besteht im Transport von Sauerstoff von der Lunge zu den Geweben und im Rücktransport von CO₂ von den Geweben zur Lunge. Für diese Funktion benötigen sie einen intakten Energiestoffwechsel, der durch die Glykolyse sichergestellt wird. Die Erythrozyten brauchen das gebildete ATP zur Aufrechterhaltung der transmembranären Ionengradienten von Natrium-, Calcium- und Kalium-Ionen ebenso wie zur Stabilisierung ihrer Form sowie für die Biosynthese von Glutathion. Durch Glutathion werden die Enzyme im Cytoplasma und an der Zellmembran vor Oxidation geschützt. Somit hängt auch die Verformbarkeit der Erythrozyten sehr stark vom ATP-Gehalt ab.

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnte eine Abnahme des ATP-Gehalts bei Patientinnen mit Präeklampsie ($0,8 \pm 0,3$ mM) im Vergleich zu Normalschwangeren ($1,0 \pm 0,3$ mM) gezeigt werden. Dies sind die ersten Daten, die für Präeklampsie erhalten wurden.

Bei Schwangeren mit Hypertonie wurde eine verminderte Erythrozyten-Verformbarkeit nachgewiesen [Heilmann et al., 1994], ebenso bei Patientinnen mit Präeklampsie [Schauf et al., 2002].

Mögliche Interaktionen zwischen ATP-Mangel und verminderter Flexibilität könnten auf einer erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Konzentration beruhen. Die Überladung der Erythrozyten mit Calcium als mögliche Ursache für ihre verminderte Verformbarkeit wurde durch verschiedene Untersuchungen bestätigt [Shiga et al., 1985; Weed et al., 1969]. Wie schon erwähnt, wurde

auch in Erythrozyten von präeklaptischen Patientinnen erhöhtes intrazelluläres Calcium gefunden [Sowers et al., 1989].

Ein Zusammenhang zwischen ATP-Konzentration und Verformbarkeit der Erythrozyten wurde von Schauf et al. (2002) diskutiert. Demnach wird ATP dafür gebraucht, das Tubulin-Gerüst, das wesentlich am Cytoskelett beteiligt ist, aufzuweichen, denn nur mit ATP kann Tubulin depolymerisiert werden. Ein Mangel von ATP führt nun zu einer vollständigeren Polymerisation, das Cytoskelett erstarrt. Da die Tubulin-Polymerisation auch Ca^{2+} -abhängig ist, hat auch die oben beschriebene Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration einen entsprechenden Einfluß. Damit hängen ATP-Mangel, Ca^{2+} -Erhöhung und Abnahme der Verformbarkeit in Erythrozyten eng voneinander ab. Auch bei Patientinnen mit intrauteriner Wachstumsretardierung konnte eine reduzierte Verformbarkeit der Erythrozyten gezeigt werden. Ursache für die Retardierung ist eine reduzierte utero-plazentare Perfusion, ein gemeinsames Merkmal der intrauterinen Wachstumsretardierung und der Präeklampsie [Schauf et al., 2002].

5.2.9 Aktivität der Leukozyten

Ausgehend von der Hypothese, dass durch plazentare Faktoren, z. B. Cytokine, die Leukozyten der Mutter aktiviert werden und damit dort oxidativen Stress auslösen [Benyo et al., 1997; Benyo et al., 2001; Conrad and Benyo 1997; Hayashi et al., 2004; Pijnenborg et al., 1998; Taylor et al., 1998; Tsukimori et al., 1993; Walker 1998; Wang and Walsh 1996], wurde die Bestimmung der Leukozytenaktivität im Blut durch opsonisiertes Zymosan mit luminolverstärkter Chemilumineszenz durchgeführt. Das Ergebnis aus unseren Untersuchungen zeigt, dass die basale, auf die Zellzahl bezogene Radikalbildung bei Patientinnen mit Präeklampsie weniger hoch ist als bei gesunden

Schwangeren. Doch nach Stimulation mit Zymosan zeigen Präeklampsie-Patientinnen eine Erhöhung der oxidativen-Burst-Aktivität der Leukozyten um etwa 100 % gegenüber den gesunden Schwangeren.

Andere Arbeitsgruppen untersuchten weitere Marker der Aktivierung der Leukozyten, z. B. Oberflächenmoleküle wie CD11b, CD14 u. v. a. [Sacks et al., 1998], die parakrinen Faktoren GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) und M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) [Hayashi et al., 2004], sowie das Granulozyten-Enzym Myeloperoxidase [Mellembakken et al., 2001]. In all diesen Untersuchungen wurde ein vermehrter Gehalt dieser Aktivierungsmarker gefunden. Redman und Sargent ermittelten einen höheren Gehalt von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies in Granulozyten und Monozyten bei Präeklampsie [Holthe et al., 2004; Redman and Sargent 2003; Sacks et al., 1998].

Die bisherigen Daten belegen also in verschiedenster Weise die höhere Aktivität oder Aktivierbarkeit der Leukozyten, sie kann damit als wichtiger Mechanismus der Präeklampsie angesehen werden.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse liefern eine zusätzliche Evidenz für die Bedeutung des oxidativen Stresses bei Präeklampsie. Neben der bisher größten Anzahl parallel gemessener Parameter konnte durch die Peakhöhe der AAPH-Reaktion ein neuer, sensitiver Marker für oxidativen Stress dargestellt werden; ebenso erwies sich der ATP-Gehalt in Erythrozyten als neuer Parameter zur Erfassung des oxidativen Stresses. Bemerkenswert erscheint die Rolle von Harnsäure, die als Antioxidans wirkt, deren Gehalt aber praktisch mit dem Ausmaß des oxidativen Stresses korreliert. Ein ebenfalls interessantes Ergebnis ist der Abfall des ATP-Gehalts in Erythrozyten und seine mögliche Bedeutung für deren Flexibilität, dadurch ließe sich eine uterine Perfusionsstörung leicht erklären, die dann für den Fetus zu einer intrauterinen Wachstumsretardierung führen kann.

5.3 Bewertung einzelner Parameter (in-vitro-Versuche)

5.3.1 Einfluss der Oxidantien auf die gesamte antioxidative Kapazität und die Peakhöhe der AAPH-Reaktion

Im Blutplasma von gesunden, nichtschwangeren Probandinnen wurde durch Inkubation mit verschiedenen Oxidantien wie Wasserstoffperoxid, Kaliumsuperoxid, Xanthin/Xanthinoxidase und t-Butylhydroperoxid künstlich oxidativer Stress induziert, um deren Auswirkungen auf die Parameter des oxidativen Stresses festzustellen und damit die Sensitivität dieser Parameter für oxidativen Stress zu überprüfen.

Die Ergebnisse (siehe Abb. 4-2, Abb. 4-8, Abb. 4-12 und Abb. 4-16) zeigen eine signifikante Verringerung der gesamten antioxidativen Kapazität (TRAP) um 11 % mit H_2O_2 , um 7 % mit KO_2 , um 13 % mit t-BHP und eine Steigerung um 22 % mit Xanthinoxidase (+Xanthin). Während die Peroxide bei einer Endkonzentration von 5 mM beim Parameter TRAP vergleichbar wirksam waren, ergab sich ein Unterschied nach Inkubation mit Xanthin/Xanthinoxidase. Hier zeigte sich offensichtlich durch die gleichzeitige Bildung der Harnsäure eine Vergrößerung des TRAP-Wertes.

Beim Einfluss auf die Peakhöhe der AAPH-Reaktion ist für die verschiedenen Oxidantien generell eine Abnahme zu verzeichnen (siehe Abb. 4-3, Abb. 4-9, Abb. 4-13 und Abb. 4-17): Mit H_2O_2 um etwa 54 %, mit KO_2 um 21 %, mit t-BHP 44 %, mit Xanthin/Xanthinoxidase um 12 %. Die Peakhöhe, so wird hier deutlich, kommt nicht durch die Harnsäure, sondern durch andere Antioxidantien wie Thiole, Vitamin C oder (noch) nicht identifizierte Substanzen zustande. Die Veränderungen der Peakhöhe unter den gewählten Oxidationsbedingungen sind stärker ausgeprägt als die von TRAP. Dies

beweist, dass in der Peakhöhe der AAPH-Reaktion ein interessanter, neuer und empfindlicher Biomarker für oxidativen Stress vorliegt.

5.3.2 Einfluss der Oxidantien auf die Thiole

Abb. 4-6 und Abb. 4-11 zeigen einen signifikant verminderten Anteil der freien proteingebundenen SH-Gruppen durch H_2O_2 bzw. KO_2 im Plasma. Die Oxidation der proteingebundenen SH-Gruppen war bei der verwendeten Oxidantienkonzentration praktisch vollständig, die niedermolekularen Thiolgruppen zeigen sich dagegen nahezu unverändert. Das lässt darauf schließen, dass unter den gewählten Oxidationsbedingungen vorzugsweise die freien proteingebundenen SH-Gruppen oxidiert wurden, während sich der Anteil der freien niedermolekularen SH-Gruppen nur geringfügig veränderte. Bei Verwendung von Xanthin/XOD, bei der eine Zunahme von TRAP und nur eine geringe Abnahme der Peakhöhe auftraten, ergab sich keine messbare Veränderung des Thiol-Status.

5.3.3 Einfluss der Oxidantien auf den MDA-Spiegel im Plasma

Um die Sensitivität der verschiedenen Indikatoren für oxidativen Stress zu vergleichen, wurden die Peroxid-inkubierten Plasmaproben auch auf ihren Gehalt an MDA untersucht. Dabei zeigte sich bei H_2O_2 (5 mM) keine Veränderung, bei t-BHP (5 mM) dagegen eine Zunahme von 80 %.

Worauf der stärkere Effekt von t-BHP auf die MDA-Bildung zurückzuführen ist, müsste durch weitere Untersuchungen geklärt werden; vermutlich liegt er darin, dass H_2O_2 schnell durch Katalase abgebaut wird, während t-BHP über die Reduktion durch Glutathionperoxidase stärker in den Zellstoffwechsel eingreift.

Doch zeigte sich gerade für die H₂O₂-Inkubation, dass die Parameter wie TRAP oder vor allem die Peakhöhe der AAPH-Reaktion sensitivere Indikatoren darstellen als der MDA-Spiegel (Abb. 4-7 und Abb. 4-18).

5.3.4 Einfluss der Oxidantien auf den ATP-Gehalt

Unter Einfluss der Peroxide mit einer 5 mM-Endkonzentration wurde eine Abnahme des ATP-Gehalts beobachtet, wobei diese mit H₂O₂ 6 %, mit t-BHP 30 % betrug. Auch hier wurde also bei t-BHP ein stärkerer Effekt beobachtet.

Die Problematik der Erfassbarkeit des oxidativen Stresses ist durch diese Untersuchungen klar umrissen worden. Zwar gibt es einheitliche Befunde bei der AAPH-Reaktion, aber unterschiedliche beim Vergleich der MDA-Zunahme und beim Effekt auf den ATP-Gehalt in Erythrozyten mit H₂O₂ bzw. t-BHP. Es ergibt sich somit die Notwendigkeit eines vielfältigen Methodenspektrums, um oxidativen Stress deutlich zu erfassen.

5.4 Überlegungen zur Therapie mit Vitamin C

Da oxidativer Stress ein wichtiger Faktor bei der Entstehung bzw. Ausprägung der Präeklampsie ist, könnte eine Therapie durch Antioxidantien erfolgreich sein. Dabei muss jedoch auf die Problematik der prooxidativen Wirkungen verwiesen werden, die diese Antioxidantien in vivo auch haben können [Halliwell 1996]. Daher wurden weitere Versuche durchgeführt, bei denen Plasma von gesunden Probandinnen mit Vitamin C inkubiert und auf die Parameter des oxidativen Stresses analysiert wurde. Dabei wurden die gesamte antioxidative Kapazität sowie die Peakhöhe der AAPH-Reaktion, der MDA-Gehalt im Plasma und in den Erythrozyten bestimmt.

5.4.1 Einfluss von Vitamin C auf die Parameter des oxidativen Stresses

Erwartungsgemäß stieg der TRAP-Wert durch Zusatz von Vitamin C an. Der stöchiometrische Faktor zur Berechnung des TRAP-Wertes über die Konzentration der Antioxidantien konnte bestätigt werden [Wayner et al., 1987]: Durch Zusatz von 113 μM Vitamin C stieg TRAP um etwa 200 μM an, ein Zusatz von 562 μM Vitamin C ergab eine Steigerung von TRAP auf etwa 900 μM , was jeweils dem 1,7-fachen der Konzentration von Vitamin C entsprach. Bei Inkubation in Tyrode ergab sich jedoch eine Erhöhung des TRAP-Wertes von nur etwa dem 0,5-fachen der zugesetzten Vitamin-C-Konzentration. Dies bedeutet, dass das Reaktionsmilieu einen entscheidenden Einfluss auf die antioxidativen Eigenschaften von Vitamin C in der AAPH-Reaktion ausübt.

Ähnlich auch bei der Peakhöhe: In Tyrode wuchs die Peakhöhe mit steigender Vitamin-C-Konzentration, im Plasma war es umgekehrt. Es gab im Plasma also keinen additiven Effekt bei Zusatz von Vitamin C, eher sogar umgekehrt. Durch Zugabe von 562 μM Vitamin C erfolgte eine Abnahme um etwa 10 %, was auf einen prooxidativen Effekt von Vitamin C deutet. Die Peakhöhe nahm also mit zunehmender Vitamin-C-Konzentration ab. Da es sich jedoch um einen in-vitro-Versuch handelte, sind eindeutige Schlüsse noch nicht möglich.

Bei der ATP-Messung in den Erythrozyten zeigte sich ein nur geringer Einfluss von Vitamin C. Die zeitliche Abnahme von ATP ist tendenziell bei höherer Vitamin-C-Konzentration schwächer.

Bei den MDA-Messungen zeigte sich dagegen ein prooxidativer Effekt: je mehr Vitamin C zugegeben wurde, desto mehr MDA wurde gebildet. Dieser Effekt ist insbesondere in der Erythrozytenmembran ausgeprägt. Auch in einigen anderen in-vitro-Versuchen wurde für Vitamin C nicht nur antioxidative Wirkungen festgestellt, sondern auch prooxidative [Halliwell 1996]. Diese

prooxidativen Wirkungen können in erster Linie über die Reaktion mit Eisen(III)-Ionen oder Kupfer-Ionen zustande kommen. Hierbei wird Eisen(III) durch Ascorbat zu Eisen(II) reduziert. Dieses wird in Verbindung mit H₂O₂ wieder oxidiert und generiert hierbei das reaktive Hydroxyl-Radikal:



Da Vitamin C in Vollblut inkubiert wurde, ist zumindest mit katalytischen Spuren von Metall-Ionen zu rechnen, so dass die obigen Reaktionen ablaufen können.

Die gebildeten Hydroxyl-Radikale können dann eine gesteigerte Lipidperoxidation verursachen. Auch in Zellkulturen kann Ascorbat auf diese Weise, d. h. in Anwesenheit von Metall-Ionen, oxidativen Schaden anrichten [Shamberger 1984].

5.4.2 Vitamin C als Therapie bei oxidativem Stress in der Gynäkologie

In der Gynäkologie wurde schon durch einige Arbeitsgruppen eine Vitamin-C-Therapie bei verschiedenen Erkrankungen angewendet. So wurde intravenös injiziertes Vitamin C verwendet, um den oxidativen Stress bei intrauteriner Wachstumsretardierung zu verringern [Karowicz-Bilinska et al., 2002]. Die in-vivo-Messungen ergaben nach 10 Tagen eine signifikante Erniedrigung der MDA- und der Lipidperoxid-Konzentrationen im Blutplasma. Auch zur Verringerung des oxidativen Stresses bei zu früh geborenen Säuglingen wurde den Müttern oral ein Mix aus Vitamin C und E sowie Beta-Carotin gegeben. Die Konzentration des MDA im Plasma war sowohl bei der Mutter wie auch bei den

Neugeborenen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit Placebo deutlich niedriger [Bolisetty et al., 2002].

Auch für Präeklampsie wurden Studien zur Therapie mit Vitaminen durchgeführt. Eine Studie untersuchte den Effekt von Vitamin E, eine andere den von Vitamin C und Vitamin E in Kombination [Gulmezoglu et al., 1997; Stratta et al., 1994]. In beiden Studien wurde keinerlei Besserung der behandelten Patientinnen festgestellt, doch beide Arbeitsgruppen wiesen darauf hin, dass eine frühzeitige Behandlung noch vor Einsetzen der Symptome u. U. trotzdem eine Verbesserung des Zustandes bringen könnte. Eine entsprechende Untersuchung wurde durchgeführt. Schwangere mit Verdacht auf eine mögliche spätere Präeklampsie (Verdachtsmomente waren hierbei eine abnormale Doppler-Wellenform der Uterus-Arterien oder eine frühere Präeklampsie-Erkrankung) wurden in zwei Gruppen eingeteilt, eine Placebo-Gruppe und eine Gruppe, die Vitamin C und E erhielt. In der Vitamin-Gruppe erkrankten deutlich weniger Frauen (8 %) als in der Placebo-Gruppe (14 %) [Chappell et al., 1999; Poston and Chappell 2001].

Eine Therapie während der Schwangerschaft erscheint immer problematisch, doch scheint das Risiko mit Vitaminen gering zu sein. Dennoch bedarf es weiterer Abklärung, ob z. B. Vitamin C tatsächlich in vivo Schutz vor oxidativem Stress bieten kann.

6 Zusammenfassung

Präeklampsie ist eine der häufigsten schwerwiegenden Schwangerschafts-Komplikationen mit einer Inzidenz von ca. 5 %. Sie ist durch Hypertonie, Proteinurie und Ödeme charakterisiert, oft kommt noch eine intrauterine Wachstumsretardierung des Fetus dazu. Die Pathogenese ist nach wie vor weitgehend unklar. Mangelhafte Trophoblast-Invasion im Myometrium, endotheliale und leukozytäre Aktivierung durch die Freisetzung von Inflammationsmediatoren wie z. B. Cytokine in den mütterlichen Kreislauf werden als mögliche Ursache der Entstehung dieser Krankheit erwähnt. Viele Untersuchungen legen nahe, dass Präeklampsie mit oxidativem Stress im mütterlichen Organismus verbunden ist.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Indikatoren des oxidativen Stresses durch in-vitro-Versuche charakterisiert. Dabei wurde ein künstlicher oxidativer Stress im Plasma gesunder Probandinnen induziert. Als Quelle für ROS wurden Hydroperoxide (H_2O_2 und t-BHP) und Superoxidanionen, die direkt aus KO_2 stammten oder enzymatisch aus Xanthin/XOD gebildet wurden, verwendet. Zur Erfassung der Parameter für oxidativen Stress diente zunächst die durch Chemilumineszenz messbare AAPH-Reaktion, bei der spontan Radikale gebildet werden. Die antioxidative Gesamt-Kapazität (TRAP), als Unterdrückung der Radikalbildung auch als Auslöschzeit charakterisiert, spiegelt den Gehalt an Antioxidantien, der im Plasma nach oxidativem Stress abnimmt, wider. Als weiterer, aus der AAPH-Reaktion ableitbarer Parameter wurde die im Anschluss an die Auslöschzeit auftretende überschüssige Radikalproduktion, gemessen als Peakhöhe der Chemilumineszenz, bestimmt. Diese wurde durch die verwendeten Oxidantien vermindert.

Zusätzlich wurden zur Beschreibung des antioxidativen Status im Plasma die Konzentrationen der Thiole untersucht. Dazu wurde die Verteilung von niedermolekularen sowie proteingebundenen Thiolgruppen (jeweils reduziert

und oxidiert) bestimmt. Unter der Einwirkung der Oxidantien wurde eine Abnahme der freien Thiolgruppen im Plasma festgestellt. Dabei zeigte sich, dass sich der Gehalt der freien niedermolekularen SH-Gruppen nur geringfügig veränderte, während der Gehalt der freien proteingebundenen Thiolgruppen sehr stark zurückging. Die Wirkung der Oxidantien auf die Malondialdehyd-Konzentration zeigte bei H_2O_2 keinen Effekt, bei t-BHP aber eine Zunahme. Auch bei der Wirkung auf die ATP-Konzentration in Erythrozyten wurde eine viel stärkere Abnahme des ATP durch t-BHP im Vergleich zu H_2O_2 gefunden.

Es zeigte sich insgesamt, dass die empfindlichsten Marker zur Bestimmung des oxidativen Stresses unter den gewählten Inkubationsbedingungen zum einen die Peakhöhe der AAPH-Reaktion, die in der bisherigen Literatur keine Erwähnung findet, und zum anderen der Gehalt an freien proteingebundenen Thiolgruppen waren.

Im zweiten Teil wurde durch klinisch-chemische Blutanalyse der Frage nachgegangen, inwieweit oxidativer Stress bei der Präeklampsie eine Bedeutung hat. Dabei wurden Blutproben aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen von gesunden und präeklampsischen Schwangeren auf Marker des oxidativen Stresses hin untersucht. Unsere Untersuchung war die bisher an Messparametern umfangreichste, neu waren die Messungen der Peakhöhe der AAPH-Reaktion sowie des ATP-Gehalts in Erythrozyten.

Insgesamt belegen die Messdaten erhöhten oxidativen Stress bei Präeklampsie. Allerdings ergab sich zunächst eine erhöhte gesamte antioxidative Kapazität des Plasmas (TRAP) bei den präeklampsischen Schwangeren, die aber auf einer entsprechenden Zunahme der Harnsäure bei dieser Gruppe beruht.

Als eindeutige Indikatoren für oxidativen Stress bei Präeklampsie wurde einerseits eine signifikante Verringerung der Peakhöhe der AAPH-Reaktion beobachtet. Höchstwahrscheinlich spielt dabei eine Abnahme der freien

proteingebundenen Thiole die entscheidende Rolle, wie die Ergebnisse der in-vitro-Versuche ergaben. Andererseits zeigte sowohl der Gehalt der erythrozytären als auch der Plasma-Thiole eine Abnahme bei den präeklampsischen Patientinnen gegenüber den gesunden Schwangeren, was auf einen erhöhten Verbrauch dieser Antioxidantien durch den oxidativen Stress hindeutet.

Des Weiteren war die Konzentration von Malondialdehyd als eines der Produkte der Lipidperoxidation im Plasma und in der Erythrozytenmembran von präeklampsischen Schwangeren erhöht gegenüber gesunden Probandinnen.

Außerdem wurde gezeigt, dass bei Präeklampsie der Gehalt von Nitrit bzw. Nitrat im Plasma größer ist als bei einer normalen Schwangerschaft. Unter der Annahme, dass die Plasma-Konzentration von Nitrat die endotheliale Synthese des Vasodilatators NO widerspiegelt, könnte es sich hierbei um ein Anzeichen eines blutdruckregulierenden kompensatorischen Mechanismus handeln. Allerdings könnte auch eine eingeschränkte Nierenfunktion, wie bei der Harnsäure, zu erhöhten Werten führen.

Zwischen Harnsäurespiegel und Peakhöhe zeigte sich eine negative Korrelation. Nimmt die Peakhöhe als Zeichen des oxidativen Stresses ab, so nimmt der Harnsäurespiegel zu. Außerdem konnte eine positive Korrelation zwischen Harnsäure und Malondialdehyd im Plasma berechnet werden, ein Befund, der unterstreicht, dass Harnsäure einen Indikator für oxidativen Stress darstellt.

Der Gehalt von ATP in den Erythrozyten dagegen erwies sich bei Präeklampsie als erniedrigt, möglicherweise als Folge des oxidativen Stresses. Diese ATP-Messungen waren die ersten überhaupt, die bei präeklampsischen Patientinnen durchgeführt wurden. Der Abfall des ATP-Gehalts in Erythrozyten kann eine Ursache für deren verminderte Flexibilität sein, die wiederum die verminderte Uterus- und Plazenta-Perfusion und damit letztlich die intrauterine Wachstumsretardierung des Fetus erklären könnte.

Die Untersuchungen der Aktivierbarkeit von Leukozyten mit opsonisiertem Zymosan durch Chemilumineszenz zeigten einen höheren Wert bei präeklampsischen Schwangeren. Dies könnte eine der Hauptursachen für den oxidativen Stress im mütterlichen Organismus sein.

Im letzten Teil der Arbeit wurden in-vitro-Versuche mit Vitamin C durchgeführt, um dessen Einfluss auf die Parameter des oxidativen Stresses zeigen zu können. Dabei ergaben sich zwei gegensätzliche Effekte: Ein antioxidativer Effekt in Bezug auf den TRAP-Wert, der nach der Inkubation des Plasmas in Abhängigkeit von der Vitamin-C-Konzentration deutlich zunahm, und ein prooxidativer Effekt in Bezug auf den erhöhten Gehalt von Malondialdehyd im Plasma und der Erythrozytenmembran. Diese prooxidative Wirkung ist wahrscheinlich die Folge einer gesteigerten Lipidperoxidation durch die in einer Reaktion zwischen Vitamin C und Metall-Ionen im Vollblut entstehenden Hydroxylradikale. Diese in-vitro-Ergebnisse erlauben natürlich keine abschließende Bewertung der Frage, ob Vitamin C als Therapie bei Präeklampsie eingesetzt werden kann. Obwohl das Risiko einer Vitamintherapie während der Schwangerschaft gering erscheint, bedarf es dennoch weiterer Abklärung, ob Vitamin C tatsächlich in vivo Schutz vor oxidativem Stress bieten kann.

7 **Literaturverzeichnis**

Ames BN, Saul RL: Oxidative DNA damage as related to cancer and aging. *Prog Clin Biol Res* 1986;209A:11-26.

Aydin S, Benian A, Madazli R, Uludag S, Uzun H, Kaya S: Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;113:21-25.

Babior BM: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med* 1978;298:659-668.

Baker PN, Davidge ST, Roberts JM: Plasma from women with preeclampsia increases endothelial cell nitric oxide production. *Hypertension* 1995;26:244-248.

Barden A, Beilin LJ, Ritchie J, Croft KD, Walters BN, Michael CA: Plasma and urinary 8-iso-prostane as an indicator of lipid peroxidation in pre-eclampsia and normal pregnancy. *Clin Sci (Lond)* 1996;91:711-718.

Barden A, Graham D, Beilin LJ, Ritchie J, Baker R, Walters BN, Michael CA: Neutrophil CD11B expression and neutrophil activation in pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond)* 1997;92:37-44.

Barden A, Ritchie J, Walters B, Michael C, Rivera J, Mori T, Croft K, Beilin L: Study of plasma factors associated with neutrophil activation and lipid peroxidation in preeclampsia. *Hypertension* 2001;38:803-808.

Basbug M, Demir I, Serin IS, Ozcelik B, Saraymen R, Narin F, Tayyar M: Maternal erythrocyte malondialdehyde level in preeclampsia prediction: a longitudinal study. *J Perinat Med* 2003;31:469-474.

Bayhan G, Atamer Y, Atamer A, Yokus B, Baylan Y: Significance of changes in lipid peroxides and antioxidant enzyme activities in pregnant women with preeclampsia and eclampsia. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2000;27:142-146.

Benyo DF, Miles TM, Conrad KP: Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1582-1588.

Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP: Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2505-2512.

Berlett BS, Stadtman ER: Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272:20313-20316.

Bir K, Crawhall JC, Mauldin D: Reduction of disulfides with sodium and potassium borohydrides and its application to urinary disulfides. *Clin Chim Acta* 1970;30:183-190.

Bolisetty S, Naidoo D, Lui K, Koh TH, Watson D, Whitehall J: Antenatal supplementation of antioxidant vitamins to reduce the oxidative stress at delivery--a pilot study. *Early Hum Dev* 2002;67:47-53.

Bowen RS, Moodley J, Dutton MF, Theron AJ: Oxidative stress in pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80:719-725.

Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG: The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu* 1972;1:177-191.

Carreiras MM, Proverbio T, Proverbio F, Marin R: Preeclampsia and calcium-ATPase activity of red cell ghosts from neonatal and maternal blood. *Hypertens Pregnancy* 2002;21:97-107.

Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59:527-605.

Chappell LC, Seed PT, Briley AL, Kelly FJ, Lee R, Hunt BJ, Parmar K, Bewley SJ, Shennan AH, Steer PJ, Poston L: Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet* 1999;354:810-816.

Chen G, Wilson R, Cumming G, Walker JJ, Smith WE, McKillop JH: Intracellular and extracellular antioxidant buffering levels in erythrocytes from pregnancy-induced hypertension. *J Hum Hypertens* 1994;8:37-42.

Clark P, Boswell F, Greer IA: The neutrophil and preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16:57-64.

Conrad KP, Benyo DF: Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:240-249.

Dalferth. Oxidativ modifiziertes LDL: Untersuchungen zu seiner Bildung und seinen zellulären Effekten. 2000. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Dass PD, Bermes EW, Jr., Holmes EW: Renal and hepatic output of glutathione in plasma and whole blood. *Biochim Biophys Acta* 1992;1156:99-102.

Davidge ST: Oxidative stress and altered endothelial cell function in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16:65-73.

Davidge ST, Stranko CP, Roberts JM: Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1008-1013.

Dekker GA, Sibai BM: Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1359-1375.

Diejomaoh FM, Omu AE, Al Busiri N, Taher S, Al Othman S, Fatinikun T, Fernandes S: Nitric oxide production is not altered in preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2004;269:237-243.

Draper HH, McGirr LG, Hadley M: The metabolism of malondialdehyde. *Lipids* 1986;21:305-307.

Dunlop W, Davison JM: The effect of normal pregnancy upon the renal handling of uric acid. *Br J Obstet Gynaecol* 1977;84:13-21.

Egerman RS, Andersen RN, Manejwala FM, Sibai BM: Neuropeptide Y and nitrite levels in preeclamptic and normotensive gravid women. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:921-923.

Ellman GL: Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-77.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128.

Garmendia JV, Gutierrez Y, Blanca I, Bianco NE, De Sanctis JB: Nitric oxide in different types of hypertension during pregnancy. *Clin Sci (Lond)* 1997;93:413-421.

Gerschman R, Gilbert D, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO: Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. 1954. *Nutrition* 1954;17:162.

Greer IA, Haddad NG, Dawes J, Johnstone FD, Calder AA: Neutrophil activation in pregnancy-induced hypertension. *Br J Obstet Gynaecol* 1989;96:978-982.

Grospietsch G: Herz-Kreislauf-Erkrankung; in: *Erkrankungen in der Schwangerschaft*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2000, pp 189-251.

Gulmezoglu AM, Hofmeyr GJ, Oosthuisen MM: Antioxidants in the treatment of severe pre-eclampsia: an explanatory randomised controlled trial. *Br J Obstet Gynaecol* 1997;104:689-696.

Gutteridge JM, Quinlan GJ: Free radical damage to deoxyribose by anthracycline, aureolic acid and aminoquinone antitumour antibiotics. An essential requirement for iron, semiquinones and hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 1985;34:4099-4103.

Haller H, Oeney T, Hauck U, Distler A, Philipp T: Increased intracellular free calcium and sensitivity to angiotensin II in platelets of preeclamptic women. *Am J Hypertens* 1989;2:238-243.

Halliwell B: Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994a;52:253-265.

Halliwell B: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994b;344:721-724.

Halliwell B: Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res* 1996;25:439-454.

Halliwell B, Whiteman M: Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004;142:231-255.

Harrison R: Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002;33:774-797.

Hayashi M, Hamada Y, Ohkura T: Elevation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the placenta and blood in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:456-461.

Heilmann and Rath, Schwangerschaftshochdruck, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2002.

Heilmann L, Hojnacki B, von Tempelhoff GF: Red cell deformability in gestational hypertension. *Gynecol Obstet Invest* 1994;37:155-159.

Heinle H: Influence of Oxidative Stress on Metabolic and Contractile Functions of Arterial Smooth Muscle; in Acker H (ed): *Oxygen Sensing in Tissues*. Heidelberg, Springer-Verlag, 1988, pp 151-164.

Heinle H: Physiologie und Pathophysiologie der Arterien; in Marshall M, Breu F (eds): *Handbuch der Angiologie*. Landsberg, ecomed verlagsgesellschaft, 1999, pp 1-11.

Holthe MR, Staff AC, Berge LN, Lyberg T: Leukocyte adhesion molecules and reactive oxygen species in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2004;103:913-922.

Hubel CA: Dyslipidemia, iron, and oxidative stress in preeclampsia: assessment of maternal and feto-placental interactions. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16:75-92.

Hubel CA: Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;222:222-235.

Hubel CA, McLaughlin MK, Evans RW, Hauth BA, Sims CJ, Roberts JM: Fasting serum triglycerides, free fatty acids, and malondialdehyde are increased in preeclampsia, are positively correlated, and decrease within 48 hours post partum. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:975-982.

Jendryczko A, Tomala J: The total free radical trapping ability of blood plasma in eclampsia. *Zentralbl Gynakol* 1995;117:126-129.

Jocelyn: Assay of thiols and disulfides; in: *Biochemistry of the SH group*. London, Academic Press Inc., 1972, pp 137-162.

Kabi BC, Goel N, Rao YN, Tripathy R, Tempe A, Thakur AS: Levels of erythrocyte malonyldialdehyde, vitamin E, reduced glutathione, G6PD activity & plasma urate in patients of pregnancy induced hypertension. *Indian J Med Res* 1994;100:23-25.

Karowicz-Bilinska A, Suzin J, Sieroszewski P: Evaluation of oxidative stress indices during treatment in pregnant women with intrauterine growth retardation. *Med Sci Monit* 2002;8:CR211-CR216.

Kharg S: Altered thiol status in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2000a;50:36-38.

Kharg S: Lipid peroxidation in pregnancy with preeclampsia and diabetes. *Gynecol Obstet Invest* 2000b;50:113-116.

Kharg S: Total free radical trapping antioxidant potential in pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2000c;69:23-26.

Kharg S: Vitamin E and C in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000d;93:37-39.

Knapen MF, Mulder TP, Van Rooij IA, Peters WH, Steegers EA: Low whole blood glutathione levels in pregnancies complicated by preeclampsia or the hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets syndrome. *Obstet Gynecol* 1998;92:1012-1015.

Kojo S: Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 2004;11:1041-1064.

Kontos HA: Oxygen radicals from arachidonate metabolism in abnormal vascular responses. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:474-477.

Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF: PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986;59:612-619.

Kumar CA, Das UN: Lipid peroxides, anti-oxidants and nitric oxide in patients with pre-eclampsia and essential hypertension. *Med Sci Monit* 2000;6:901-907.

Lissi E, Pascual C, del Castillo MD: Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Commun* 1992;17:299-311.

Lyall F, Young A, Greer IA: Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:714-718.

Madazli R, Benian A, Aydin S, Uzun H, Tolun N: The plasma and placental levels of malondialdehyde, glutathione and superoxide dismutase in preeclampsia. *J Obstet Gynaecol* 2002;22:477-480.

Madazli R, Benian A, Gumustas K, Uzun H, Ocak V, Aksu F: Lipid peroxidation and antioxidants in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;85:205-208.

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

Many A, Hubel CA, Roberts JM: Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia, revisited. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:288-291.

Matteo R, Proverbio T, Cordova K, Proverbio F, Marin R: Preeclampsia, lipid peroxidation, and calcium adenosine triphosphatase activity of red blood cell ghosts. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:402-408.

McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-6055.

Mellembakken JR, Hogasen K, Mollnes TE, Hack CE, Abyholm T, Videm V: Increased systemic activation of neutrophils but not complement in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2001;97:371-374.

Michaelis L, Wollmann SH: Free radicals derived from tocopherol and related substances. *Biochim Biophys Acta* 1950;4:156-159.

Mikhail MS, Anyaegbunam A, Garfinkel D, Palan PR, Basu J, Romney SL: Preeclampsia and antioxidant nutrients: decreased plasma levels of reduced ascorbic acid, alpha-tocopherol, and beta-carotene in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:150-157.

Misra HP, Fridovich I: The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-3175.

Nardulli G, Proverbio F, Limongi FG, Marin R, Proverbio T: Preeclampsia and calcium adenosine triphosphatase activity of red blood cell ghosts. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:1361-1365.

Nemeth I, Talosi G, Papp A, Boda D: Xanthine oxidase activation in mild gestational hypertension. *Hypertens Pregnancy* 2002;21:1-11.

Ness RB, Roberts JM: Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:1365-1370.

Nobunaga T, Tokugawa Y, Hashimoto K, Kimura T, Matsuzaki N, Nitta Y, Fujita T, Kidoguchi KI, Azuma C, Saji F: Plasma nitric oxide levels in pregnant patients with preeclampsia and essential hypertension. *Gynecol Obstet Invest* 1996;41:189-193.

Ounsted M: The children of women who had hypertension during pregnancy; in Rubin P (ed): *Handbook of hypertension: Hypertension in pregnancy*. Amsterdam, Elsevier, 1988, pp 341-362.

V. Peltola, Oxidative stress in the rat testis in response to physiological and pathophysiological stimuli, 1995.

Pijnenborg R, McLaughlin PJ, Vercruyssen L, Hanssens M, Johnson PM, Keith JC, Jr., Van Assche FA: Immunolocalization of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in the placental bed of normotensive and hypertensive human pregnancies. *Placenta* 1998;19:231-239.

Pitkin RM: Calcium metabolism in pregnancy and the perinatal period: a review. *Am J Obstet Gynecol* 1985;151:99-109.

Poranen AK, Ekblad U, Uotila P, Ahotupa M: Lipid peroxidation and antioxidants in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta* 1996;17:401-405.

Poston L, Chappell LC: Is oxidative stress involved in the aetiology of pre-eclampsia? *Acta Paediatr Suppl* 2001;90:3-5.

Pryor WA: Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 1986;48:657-667.

Raijmakers MT, van Tits BJ, Hak-Lemmers HL, Roes EM, Steegers EA, Peters WH: Low plasma levels of oxidized low density lipoprotein in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:1173-1177.

Raijmakers MT, Zusterzeel PL, Roes EM, Steegers EA, Mulder TP, Peters WH: Oxidized and free whole blood thiols in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2001;97:272-276.

Raijmakers MT, Zusterzeel PL, Steegers EA, Hectors MP, Demacker PN, Peters WH: Plasma thiol status in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000;95:180-184.

Ranta V, Viinikka L, Halmesmaki E, Ylikorkala O: Nitric oxide production with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1999;93:442-445.

Redman CW, Beilin LJ, Bonnar J: Renal function in preeclampsia. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1976;91-94.

Redman CW, Bonnar J: Plasma urate changes in pre-eclampsia. *Br Med J* 1978;1:1484-1485.

Redman CW, Sargent IL: Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. *Placenta* 2003;24 Suppl A:S21-S27.

Reimann. Oxidativer Stress: Charakterisierung von pflanzlichen Antioxidantien in vitro und Marker für oxidativen Stress in vivo. 2003. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Riener CK, Kada G, Gruber HJ: Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem* 2002;373:266-276.

Roberts JM, Hubel CA: Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet* 1999b;354:788-789.

Roberts JM, Hubel CA: Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet* 1999a;354:788-789.

Rosenfield and Fatalla, Reproductive health, global issues, Park-Ridge, New York 1990.

Roth, Eger.K and Troschütz.R, Pharmazeutische Chemie II, Arzneistoffanalyse, pp. 148-149, Gustav Fischer, Stuttgart 1997.

Sacks GP, Studena K, Sargent K, Redman CW: Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:80-86.

Schauf B, Lang U, Stute P, Schneider S, Dietz K, Aydeniz B, Wallwiener D: Reduced red blood cell deformability, an indicator for high fetal or maternal risk, is found in preeclampsia and IUGR. *Hypertens Pregnancy* 2002;21:147-160.

Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB: The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:944-948.

Serdar Z, Gur E, Colakoethullary M, Develioethlu O, Sarandol E: Lipid and protein oxidation and antioxidant function in women with mild and severe preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2003;268:19-25.

Shaamash AH, Elsonosy ED, Makhlouf AM, Zakhari MM, Ibrahim OA, El Dien HM: Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2000;68:207-214.

Shaamash AH, Elsonosy ED, Zakhari MM, Radwan SH, El Dien HM: Placental nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) production in normal

pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2001;72:127-133.

Shamberger RJ: Genetic toxicology of ascorbic acid. *Mutat Res* 1984;133:135-159.

Shiga T, Sekiya M, Maeda N, Kon K, Okazaki M: Cell age-dependent changes in deformability and calcium accumulation of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985;814:289-299.

Siems W, Schmidt H, Muller M, Henke W, Gerber G: H₂O₂ formation during nucleotide degradation in the hypoxic rat liver: a quantitative approach. *Free Radic Res Commun* 1986;1:289-295.

Siems WG: Die wichtigsten Radikalquellen im menschlichen Organismus. *Pharmazeutische Zeitung* 1998;143:1515-1527.

Sies H, Cadenas E: Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985;311:617-631.

Silver RK, Kupfermanc MJ, Russell TL, Adler L, Mullen TA, Caplan MS: Evaluation of nitric oxide as a mediator of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:1013-1017.

Smarason AK, Allman KG, Young D, Redman CW: Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1997;104:538-543.

Smith WL: The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 1989;259:315-324.

Snoke J, Yanaris S, BLOCH K: Synthesis of glutathione from gamma-glutamylcysteine. *J Biol Chem* 1953;201:573-586.

Sowers JR, Zemel MB, Bronsteen RA, Zemel PC, Walsh MF, Standley PR, Sokol RJ: Erythrocyte cation metabolism in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:441-445.

Staff AC, Halvorsen B, Ranheim T, Henriksen T: Elevated level of free 8-iso-prostaglandin F₂alpha in the decidua basalis of women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999a;181:1211-1215.

Staff AC, Ranheim T, Khoury J, Henriksen T: Increased contents of phospholipids, cholesterol, and lipid peroxides in decidua basalis in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999b;180:587-592.

Stratta P, Canavese C, Porcu M, Dogliani M, Todros T, Garbo E, Belliardo F, Maina A, Marozio L, Zonca M: Vitamin E supplementation in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 1994;37:246-249.

Taylor RN, de Groot CJ, Cho YK, Lim KH: Circulating factors as markers and mediators of endothelial cell dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16:17-31.

Teppa-Garran A, Proverbio T, Marin R, Proverbio F: Lipid peroxidation and active calcium transport in inside-out vesicles of red blood cells from preeclamptic women. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:806-813.

Tsukimori K, Maeda H, Ishida K, Nagata H, Koyanagi T, Nakano H: The superoxide generation of neutrophils in normal and preeclamptic pregnancies. *Obstet Gynecol* 1993;81:536-540.

Tyrrell RM: UVA (320-380 nm) Radiation as an Oxidative Stress; in: *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. London, Academic Press Limited, 1991, pp 57-83.

Ullrich O, Grune T: Oxidative Schäden bei neurodegenerativen Erkrankungen. *Pharmazeutische Zeitung* 2004;48:10-15.

Uotila JT, Kirkkola AL, Rorarius M, Tuimala RJ, Metsa-Ketela T: The total peroxy radical-trapping ability of plasma and cerebrospinal fluid in normal and preeclamptic parturients. *Free Radic Biol Med* 1994;16:581-590.

Uotila JT, Tuimala RJ, Aarnio TM, Pyykko KA, Ahotupa MO: Findings on lipid peroxidation and antioxidant function in hypertensive complications of pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1993;100:270-276.

Var A, Kuscu NK, Koyuncu F, Uyanik BS, Onur E, Yildirim Y, Oruc S: Atherogenic profile in preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2003;268:45-47.

Visser GH, Huisman A, Saathof PW, Sinnige HA: Early fetal growth retardation: obstetric background and recurrence rate. *Obstet Gynecol* 1986;67:40-43.

von Sonntag C: Carbohydrate radicals: from ethylene glycol to DNA strand breakage. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1984;46:507-519.

Walker JJ: Antioxidants and inflammatory cell response in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16:47-55.

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

Walsh SW, Wang Y, Jesse R: Peroxide induces vasoconstriction in the human placenta by stimulating thromboxane. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:1007-1012.

Wang Y, Alexander J: Placental pathophysiology in preeclampsia. *Pathophysiology* 2000;6:261-270.

Wang Y, Walsh SW: TNF alpha concentrations and mRNA expression are increased in preeclamptic placentas. *J Reprod Immunol* 1996;32:157-169.

Wang Y, Walsh SW, Kay HH: Placental lipid peroxides and thromboxane are increased and prostacyclin is decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:946-949.

Wang YP, Walsh SW, Guo JD, Zhang JY: The imbalance between thromboxane and prostacyclin in preeclampsia is associated with an imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1695-1700.

Warso MA, Lands WE: Lipid peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. *Br Med Bull* 1983;39:277-280.

Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ: The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987;924:408-419.

Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Locke S: Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett* 1985;187:33-37.

Weed RI, LaCelle PL, Merrill EW: Metabolic dependence of red cell deformability. *J Clin Invest* 1969;48:795-809.

Wisdom SJ, Wilson R, McKillop JH, Walker JJ: Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1701-1704.

Wulff K, Döppen W: ATP: Luminometric method; in Bergmeyer H (ed): *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim, Verlag Chemie, 1985, pp 357-364.

Yoneyama Y, Suzuki S, Sawa R, Miura A, Doi D, Otsubo Y, Araki T: Plasma nitric oxide levels and the expression of P-selectin on platelets in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:676-680.

Zusterzeel PL, Steegers-Theunissen RP, Harren FJ, Stekkinger E, Kateman H, Timmerman BH, Berkelmans R, Nieuwenhuizen A, Peters WH, Raijmakers MT, Steegers EA: Ethene and other biomarkers of oxidative stress in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2002;21:39-49.

Danksagung

Zuletzt kommt noch das Wichtigste: Vielen Leuten schulde ich Dank für das Zustandekommen dieser Arbeit, aus den unterschiedlichsten Gründen. Im Einzelnen möchte ich mich bedanken

- bei Herrn Prof. Dr. Heinle nicht nur für die Überlassung dieses interessanten Themas, sondern für einiges mehr, für die schöne Zeit in seiner Arbeitsgruppe, für seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, seine fachliche Betreuung, für die angenehme Zusammenarbeit und die Möglichkeit zur Teilnahme an Kongressen in so interessanten Orten wie Como oder Sevilla; es ist mehr als fraglich, ob ich je wieder so einen lieben Chef bekommen werde;
- bei Herrn Prof. Dr. Stefan Laufer für die freundliche Übernahme des Referates der Dissertation und die angenehme Betreuung;
- bei Herrn OA PD Dr. Burkhard Schauf für die gute Zusammenarbeit und die Überlassung der Blutproben, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre;
- bei Frau Klein, die mit ihrer Stiftung meine Arbeit finanziell unterstützt hat;
- bei meinen Geschwistern Fereshteh, Kambiz, Behrouz und Fariba sowie meinem Schwager Mojtaba für ihr Interesse am Fortgang meiner Arbeit (und für die eine oder andere Ablenkung davon); einen besonderen Dank auch an meine Neffen (Pedram, Behnam & Pouya) und Nichten (Samira und Saghar), sowie an Sourour, Firouzeh und Hamed;
- bei Anneke Blumenstein, die einen ganz wesentlichen Beitrag zur netten und herzlichen Atmosphäre der Arbeitsgruppe leistete und ohne die ich nie auf dieses Institut aufmerksam geworden wäre; nicht zuletzt hatte sie sich sogar bereit erklärt, diese Arbeit nach Fehlern abzusuchen, von denen sie auch einen großen Teil erwischte hat;

- bei Ines Germann für ihre ganz liebevolle Zusammenarbeit im Labor und die vielen lustigen Tage, an denen wir zusammen dort promoviert haben;
- bei Frau Dr. Brehme aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin für ihre engagierte Hilfe bei der Statistik und einigem anderen;
- beim Laborteam der Frauenklinik der Universität Tübingen für die ständige Unterstützung meiner Arbeit;
- bei Uschi Pacht, Ninja Jardin, Martin Emmerich, Wolfram Reimann, Daniela Hagelauer, Dayong Zhang für die nette und angenehme Atmosphäre im Labor; bei Daniela auch noch speziell für das Korrekturlesen, so hatten die Druckfehler nichts zu lachen;
- bei Lejla Subasic für ihre große Hilfsbereitschaft und ihr Interesse für meine Arbeit;
- bei Hamideh Pouya-Bahar, Hashem Savoji, Hossein Ehia, Christiane Schüller, Ute & Mark Gleich-Theurer, Elke Ackermann, Nicole Pflumm, Artur Dettinger und Alfons Weilbach für die Zerstreungen, die sie mir während dieser Zeit geboten haben;
- bei Horst Apfel für seine ständige Hilfsbereitschaft und Aufmunterung;
- bei Renate Pöhler und Frau Korn aus der Universitäts-Apotheke für die angenehme Zusammenarbeit;
- bei den Mitarbeitern des Physiologischen Instituts für ihre Hilfsbereitschaft in allerlei Angelegenheiten, vom (freiwilligen) Blutspenden und Blutabnehmen bis zu technischen, v. a. Computer-Problemen, insbesondere bei Uwe Schüler, Peter Dürr, Susanne Berchtold, Elfriede Faber, Birgitta Noll, Tanja und Marion;
- bei Frau und Herrn Dr. Ullbrich sowie meinen ehemaligen Kollegen in der Apotheke am Lustnauer Tor für ihr Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Ganz besonderen Dank geht noch einmal an meine Familie für Ihre Unterstützung in vielerlei Hinsicht, besonders an meine Geschwister Fereshteh und Kambiz, die mich immer begleitet und mir während meines Studiums und

meiner Promotion in jeder Weise zur Seite standen. Ich kann ohne Übertreibung sagen, dass ich ohne die beiden niemals so weit gekommen wäre.

Auch bei der Familie meines Mannes (Rita, Manuela, Richard, Helga und Manfred) möchte ich mich ganz herzlich für das Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Am Ende möchte ich mich bei einem der wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken, meinem Mann, der mich immer während meines Studiums und meiner Promotion fachlich, moralisch und seelisch unterstützt hat und mit seiner Geduld und Liebe mich auch in schwierigen Zeiten aufgemuntert und begleitet hat.

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. Ammon, Dr. Beyer, Prof. Dr. Drews, Prof. Dr. Gauglitz, Frau
PD. Dr. Gündisch, Prof. Dr. Heide, Prof. Dr. Heinle, Prof. Dr. Kovar ,
Prof. Dr. Laufer, Dr. Mechler, Prof. Dr. Schmidt, Prof. Dr. Schultz,
Prof. Dr. Wahl, Prof. Dr. Wankmüller, Dr. Zimmermann

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Felor Amraei Davijani
Geboren am 06.07.1964, in Teheran/Iran
Verheiratet mit Dr. Bernd Bühler seit 2003

SCHULBILDUNG:

1971-1984 Grund-, Sekundar- und Oberschule in Teheran
Abitur (Schwerpunkt: Naturwissenschaften)

BERUFLICHE ERFAHRUNG IM IRAN:

1984 - 1992 Arbeit in einer Apotheke und als Laborantin und
Leiterin in den diagnostischen Laboratorien des
Apadana- und des Day-Krankenhauses in Teheran
1992 Umzug nach Deutschland

STUDIUM IM DEUTSCHLAND:

1992 Deutschkurs an der RWTH Aachen
1993 - 1994 Studienkolleg an der Universität Köln (Erwerb des
deutschen Abiturs)
1995 - 2000 Pharmaziestudium in Tübingen
2000 - 2001 Praktisches Jahr in der Apotheke am Lustnauer Tor
in Tübingen
Seit 2002 Promotion bei Prof. Dr. Heinle im Physiologischen
Institut der Universität Tübingen über das Thema:
„Untersuchungen zur Bedeutung von oxidativem
Stress bei Präeklampsie“