

Evaluierung der Bestimmung von Biomarkern
für toxikologische Tests an der menschlichen
Plazenta

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Sarah Elisa Avemarg
geboren am 20. Mai 1991 in Schmalkalden

Gutachter

1: Prof. Dr. med. habil. Udo Markert, Friedrich-Schiller-Universität Jena

2: Prof. Dr. med. Amelie Lupp, Friedrich-Schiller-Universität Jena

3: Prof. Dr. med. Gilbert Schönfelder, Charité Berlin

Tag der öffentlichen Verteidigung: 12. April 2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Zusammenfassung	10
2. Einleitung	13
2.1. Entwicklung der Plazenta	13
2.2. Die reife Plazenta	15
2.3. Funktionen der Plazenta	16
2.4. Plazenta im Rahmen toxikologischer Testverfahren	20
3. Ziele der Arbeit	22
4. Materialien	23
4.1. Zellkultur	23
4.1.1. Passagierung und Zellgewinnung	23
4.1.2. Kryokonservierung	23
4.1.3. Zellzahlbestimmung	23
4.1.4. MTS-Assay	24
4.1.5. pH-Wert-MTS-Assay	24
4.2. Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblaufärbung	24
4.2.1. Durchflusszytometrie	24
4.2.2. Sphäroidgenerierung	24
4.2.3. Probengenerierung für die Elektronenmikroskopie	24
4.2.4. Sphäroidgenerierung	24
4.3. Explantatkultur	25
4.4. Verbrauchsmaterialien und Geräte	26
4.5. Programme und Datenbanken	28
5. Methodik	29
5.1. Ansetzen der Metalllösungen	30

5.2. Zellkultur	31
5.2.1. Die Zelllinien HTR8/SVneo und JEG3	31
5.2.2. Passagierung und Zellgewinnung	32
5.2.3. MTS-Assay	33
5.2.4. pH-Wert-MTS-Assay	33
5.2.5. Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblaufärbung	34
5.2.6. Durchflusszytometrie	34
5.2.7. Parameterbestimmung im Kulturüberstand	35
5.2.8. 2D-Probengenerierung für die Elektronenmikroskopie	37
5.2.9. Sphäroidgenerierung	37
5.2.10. Sphäroidprobengenerierung für Schnittbilder	39
5.3. Explantatkultur	39
5.3.1. Präparation der Explantate	39
5.3.2. MTS-Assay	40
5.3.3. Parameterbestimmung im Kulturüberstand	40
5.3.4. Immunhistochemie	41
5.4. Statistische Methoden	43
6. Ergebnisse	44
6.1. Ergebnisse der Zellkulturversuche	45
6.1.1. Einfluss der Metallbehandlung auf die metabolische Aktivität der Trophoblastzellen	45
6.1.2. Einfluss einer pH-Wert-Veränderung auf Messwerte des MTS-Assays	47
6.1.3. Einfluss der Metallbehandlung auf Zählwerte nach Trypanblaufärbung	47
6.1.4. Einfluss der Metallbehandlung auf Messwerte in der Durchflusszytometrie	50
6.1.5. Einfluss der Metallbehandlung auf die Konzentrationen metabolischer Parameter im Kulturüberstand	50
6.1.6. Einfluss der Metallbehandlung auf die Sphäroidbildung	55
6.1.7. Elektronenmikroskopische Aufnahmen	62
6.2. Ergebnisse der Explantatkultur	67
6.2.1. Ergebnisse der unbehandelten Plazentaexplantate	67
6.2.2. Einfluss der Metallbehandlung auf Plazentaexplantate	74

6.3. Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Methoden	86
6.3.1. Vergleich der verschiedenen Methoden zur Ermittlung der Vi- talität von unbehandelten Plazentaexplantaten	86
6.3.2. Vergleich der Ergebnisse der Zelllinien und Plazentaexplantate nach Metallinkubation	86
7. Diskussion	97
8. Schlußfolgerungen	107
Literaturverzeichnis	109
Anhang	115
A. Abbildungsverzeichnis	116
B. Tabellenverzeichnis	119
C. Danksagung	120
D. Ehrenwörtliche Erklärung	121

Abkürzungsverzeichnis

2D/3D	2-dimensional / 3-dimensional
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Ann V	Annexin V
ATP	Adenosintriphosphat
β-hCG	β -Untereinheit des humanen Choriongonadotropins
BP	behandelte Plazenta
bzw.	beziehungsweise
cleavedPARP	gespaltene Poly(ADP-ribose)-Polymerase, Apoptosemarker
CO₂	Kohlendioxid
DAB	3,3Diaminobezidin
DHEA-S	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
dH₂O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F-12	Hams F-12 Zellkulturmedium
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
°C	Grad Celsius
h	Stunden
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HgCl₂	Quecksilberchlorid
HPL	Humanes Plazentalaktogen
HTR8/SVneo	Immortalisierte Trophoblastzelllinie
IGF	internal growth factor, Wachstumsfaktor
IgG	Immunglobulin G
JEG3	Chorionkarzinomzelllinie
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Ki-67	Protein, Proliferationsmarker
LDH	Laktatdehydrogenase
LD50	letale Dosis 50
M	Molar
MgSO₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolar

μm	Mikrometer
MnSO_4	Mangansulfat
MTS	Tetrazoliumfarbstoff 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NaCl	Natriumchlorid
NAD^+/NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NiCl_2	Nickelchlorid
nm	Nanometer
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
p.c.	post conceptionem, nach der Befruchtung
pH	lat. potentia Hydrogenii
PJ	Propidiumjodid
P/S	Penicillin/Streptomycin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RMSE	Root-Mean-Square-Error; dt.: Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme
RPMI	Zellkulturmedium für HTR8/SVneo Zellen
SN	Supernatant, Kulturüberstand
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF β	Transforming Growth Factor β
TMRM	Tetramethylrhodamine-Methylester

UP	unbehandelte Plazenta
vgl.	vergleiche
vs.	versus
v/v	Volumen in Volumen
w/v	weight in volume (Masse in Volumen)
%	Prozent
%ig	prozentig
1x	einfach

1. Zusammenfassung

Immer wieder kommt es in späten Stadien klinischer Zulassungsverfahren zu Effekten, die anhand der Ergebnisse der vorgeschalteten Grundlagenforschung so nicht zu erwarten waren und den Abbruch des Verfahrens bedingen. Seit einiger Zeit gibt es vielfältige Bemühungen zur Verbesserung der Vorhersagekraft präklinischer Versuchsreihen durch neue Modelle für toxikologische Untersuchungen. Der entscheidende Durchbruch in dieser Richtung gelang jedoch bisher nicht. Ein wesentlicher Faktor ist in einigen Fällen die ungenügende Übertragbarkeit von Tiermodellen auf den Menschen. Die Entwicklung eines humanbasierten, präklinischen Modells wäre deshalb ein wichtiger Schritt. Die menschliche Plazenta bietet diesbezüglich vielversprechende Forschungsmöglichkeiten. Sie ist das einzige menschliche Organ, das regelmäßig in gesundem Zustand für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung steht. Mit ihrer komplexen Struktur und Zusammensetzung an unterschiedlichsten Zelltypen wie bspw. Endothel-, Trophoblast- und Immunzellen stellt sie ein potentiell weitreichendes in vitro-Modell dar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Grundlage einer toxikologischen Testkaskade zur Nutzung der menschlichen Plazenta als toxikologisches Modell etabliert werden. Dafür wurden die plazentaabgeleiteten Zelllinien HTR8/SVneo und JEG3 verwendet, welche zunächst in der konventionellen 2D-Zellkultur Verwendung fanden. Es gelangen zusätzlich erste Ansätze für die 3D-Zellkultur in Form von Sphäroiden, welche eine Brücke zwischen der üblichen 2D-Zellkultur und der Gewebekultivierung als Explantat bilden soll. Es wurde ein Protokoll für die Gewinnung und Kultivierung von Plazentaexplantaten, welche aus villösem Gewebe von Terminplazenten bestehen, erarbeitet.

Die Modelle der Zellkultur sowie der Explantatkultur wurden bezüglich ihrer Vitalität mittels verschiedener Methoden charakterisiert. Zur Beeinflussung der Vitalität erfolgte eine Inkubation mit den unterschiedlich toxischen Metallen Mangansulfat (MnSO_4), Nickelchlorid (NiCl_2) und Quecksilberchlorid (HgCl_2) sowie als nicht to-

xische Kontrolle Magnesiumsulfat (MgSO_4) für 24 Stunden (h). Als Methoden fanden in der 2D-Zellkultur das MTS-Assay, die Trypanblau-Färbung, eine Durchflusszytometrie nach Färbung mit Annexin V (Ann V) und Propidiumjodid (PJ) sowie die Analysen des Kulturüberstandes Anwendung. Im Kulturüberstand wurden die Parameter Glukose, Laktat, LDH-Aktivität und β -hCG bestimmt. In Zusammenarbeit mit dem elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Jena wurden Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der 2D-Zellkulturen angefertigt. Mit der Generierung von Sphäroiden, welche im Anschluss anhand ihrer Morphologie untersucht wurden, gelangen erste Ansätze im Bereich der 3D-Zellkultur. Diese sollten zukünftig um weitere Analysen wie bspw. Überstandsanalysen oder MTS-Assay an 3D-Zellkulturen ergänzt werden. In der Explantatkultur wurden ebenfalls ein MTS-Assay, sowie die Analysen des Kulturüberstandes auf Glukose, Laktat, LDH und β -hCG durchgeführt. Zusätzlich erfolgte hier die Bestimmung der Hormone Progesteron und Estradiol und eine immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki-67 und dem Apoptosemarker cleavedPARP.

Die Kombination von MTS-Assay sowie Analysen des Kulturüberstandes auf Glukose und Laktat zeigten sich sowohl in der Zellkultur als auch der Explantatkultur als besonders effektiv. Die Messung der LDH-Aktivität stellte sich als nicht sensitiv genug heraus, um verwertbare Ergebnisse zu toxischen Schädigungen zu liefern.

Die Ergebnisse konnten mittels Durchflusszytometrie an der 2D-Zellkultur bestätigt werden. Die in der 2D-Zellkultur erfolgte Färbung mit Trypanblau und lichtmikroskopische Bestimmung der Zelltodrate stellte sich als nicht geeignete Methode mit ungünstigem Aufwand-Nutzen-Verhältnis heraus. Für spezielle Fragestellungen besteht weiterhin die Möglichkeit von elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die routinemäßige Anwendung im Screeningverfahren ist dabei jedoch nicht sinnvoll. Das Ziel einer Detektion des Metalls intrazellulär gelang damit nicht.

Die immunhistochemischen Färbungen, welche zur Untermauerung der Ergebnisse im Bereich der Explantatkultur dienen sollten, lieferten bisher noch nicht die erhofften Ergebnisse und müssen durch Optimierung des Protokolls und Nutzung weiterer Antikörper verbessert werden. Des Weiteren sollte dies in Kombination mit einer Begutachtung der Morphologie anhand einer HE-Färbung geschehen.

Für die Versuche mit der Explantatkultur bedarf es weiterer Durchführungen zur Standardisierung der Methoden inklusive Anpassung des Protokolls mit beispielsweise Verlängerung des Erholungszeitraums vor Beginn der Inkubation mit der Testsubstanz. Insbesondere die Standardisierung der Messung von β -hCG und der Ste-

roidhormone Progesteron und Estradiol bedarf einer größeren Anzahl an Versuchswiederholungen aufgrund starker individueller Schwankungen.

Insgesamt konnte die unterschiedliche Toxizität der Metalle $MgSO_4$, $MnSO_4$ und $NiCl_2$ sowie $HgCl_2$ mit den verwendeten Methoden in allen Modellen nachvollzogen werden. Eine gute Abgrenzung zwischen den recht ähnlich toxischen Substanzen $MnSO_4$ und $NiCl_2$ gelang jedoch nicht. Die Plazentaexplantate zeigten sich erwartungsgemäß im Gewebeverband weniger sensibel auf toxische Einflüsse, sodass die Verwendung noch höherer Metallsalzkonzentrationen diskutiert werden muss.

Die im Rahmen dieser Arbeit entstandene Grundlage für eine toxikologische Testkaskade sollte zukünftig um weitere Stufen wie die Nutzung von Primärzellen und die Plazentaperfusion erweitert werden. Die vorliegenden Ergebnisse stellen somit eine wichtige Basis für fortführende Forschungsarbeiten dar.

2. Einleitung

Die Plazenta ist ein hochkomplexes Organ, dessen intakte Funktion die Voraussetzung für eine erfolgreiche Reproduktion darstellt (John und Hemberger 2012). Die Plazenta realisiert zum einen den Stoffaustausch zwischen Mutter und Fetus. Zum anderen bietet die Plazentaschranke einen gewissen Schutz vor toxischen Substanzen sowie Krankheitserregern (Gude et al. 2004). Eine wesentliche Rolle spielen auch die mütterlichen Antikörper in Form von Immunglobulin G (IgG), welche die Plazentaschranke passieren können und den Fetus ohne ausgereiftes Immunsystem schützen. Die Plazenta ist weiterhin ein wichtiges endokrines Organ, was durch die Produktion von humanem Choriongonadotropin (hCG) und Progesteron die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft überhaupt erst ermöglicht.

2.1. Entwicklung der Plazenta

Mit der Implantation der Blastozyste am Tag 6 bis 8 nach der Befruchtung (p.c.) beginnt auch die Entwicklung der Plazenta. Der Embryo entwickelt sich aus der inneren Zellschicht, welche dementsprechend Embryoblast genannt wird. Die äußere Zellschicht der Blastozyste besteht aus Trophoblastzellen, welche die Plazenta bilden. Dafür differenzieren sich die Zellen in Zytotrophoblast und Synzytiotrophoblast (Gude et al. 2004). Der Synzytiotrophoblast ist eine vielkernige Schicht ohne klare Zellgrenzen und wird auch Synzytium genannt. Er verliert die eigene Fähigkeit zur Zellteilung, wohingegen der Zytotrophoblast eine einkernige Zellschicht mit hoher Zellteilungsrate darstellt (Malassiné und Cronier 2002). Sich teilende Zellen des Zytotrophoblasten verschmelzen unter Verlust der eigenen Zellmembran mit dem Synzytiotrophoblasten, welcher dadurch ständig an Dicke zunimmt (Sadler und Langman 2008). Das Synzytium dringt weiter in das Endometrium vor und bildet dabei erste Lakunen (lakunäres Stadium). Synzytiotrophoblastzellen kommen in Kontakt mit mütterlichen Kapillargefäßen. Sie arrodieren das Gefäßendothel bis es zur Eröffnung der Gefäße und Bluteinstrom in die Lakunen kommt (siehe Abb. 2.1). Durch Druck-

differenzen zwischen arteriellen und venösen Kapillaren beginnt ein kontinuierlicher Blutfluss und somit der uteroplazentare Kreislauf (Sadler und Langman 2008).

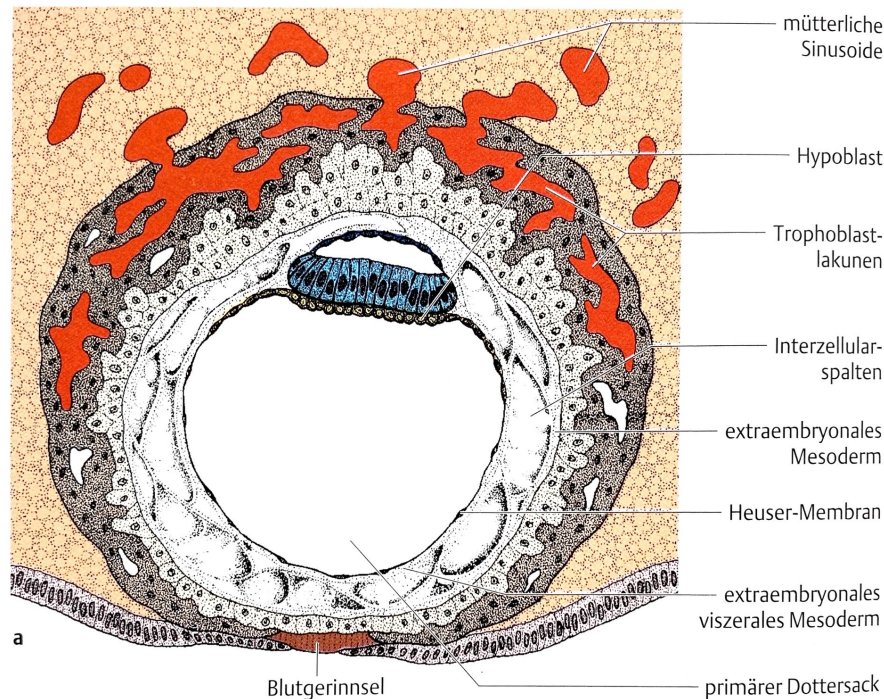


Abb. 2.1.: 12 Tage alte Blastozyste

Dargestellt ist der schematische Aufbau einer 12 Tage alten Blastozyste. Die trophoblastlakunen am embryonalen Pol stehen mit den mütterlichen Sinusoiden des Endometriumstromas in offener Verbindung. (Sadler und Langman 2008)

Ab Tag 13 p.c. wachsen in die gebildeten Bälkchen aus Synzytiotrophoblastzellen auch Zytotrophoblastzellen ein, wodurch primäre Zotten gebildet werden (Primärzottenstadium, vgl. Abb. 2.2 a)). Durch das Einwachsen von mesodermalen Zellen ab Tag 15 p.c. werden Sekundärzotten gebildet (Sekundärzottenstadium), in welchen sich Gefäße entwickeln und damit ab Tag 18 p.c. zu Tertiärzotten werden (Aumüller 2007)(siehe Abb. 2.2 b) & c)). Das Kapillarsystem der Zotten erhält bald Anschluss mit den gebildeten Gefäßen der Chorionplatte und des Haftstiels, welche wiederum die Verbindung zum Embryo herstellen. Wenn in der 4. Woche das Herz des Embryos zu schlagen beginnt, erfolgt die Ernährung des Embryos nicht mehr wie bisher über Diffusion sondern den gebildeten fetoplazentaren Kreislauf (Sadler und Langman 2008).

Mit Bildung der Tertiärzotten ist die Plazentation zwischen der 14. und 16. SSW zwar grundsätzlich abgeschlossen, die Plazenta passt sich jedoch weiterhin den wachsenden Bedürfnissen des Fetus an. Sie nimmt weiterhin an Größe und Gewicht zu.

Die Zottenbäume verzweigen sich stärker in dem aus den Lakunen hervorgegangenen intervillösen Raum, um eine größere Fläche zum Stoffaustausch zu generieren. In die mütterlichen Spiralarterien dringen Zytotrophoblastzellen ein und wandeln sich in Endothelzellen um. Dabei vergrößern sie den Durchmesser der Gefäße und verringern damit den Gefäßwiderstand, wodurch mehr Blut in den intervillösen Raum strömen kann (Sadler und Langman 2008). Ab dem vierten Monat verschwinden die Zellen des Zytotrophoblasten weitgehend aus den Zotten, so dass die Zottengefäße direkt mit dem Synzytium in Kontakt kommen und somit die Plazentaschranke nur noch aus Kapillarendothel und Synzytiotrophoblastschicht besteht (vgl. Abb. 2.2 c).

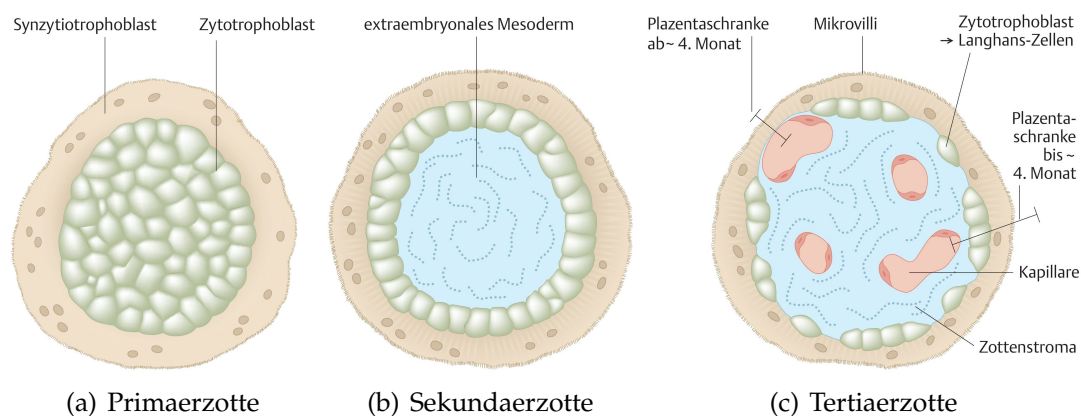


Abb. 2.2.: Plazentazotten in verschiedenen Stadien

Dargestellt sind Querschnitte durch je eine a) Primärzotte, b) Sekundärzotte und c) Tertiärzotte. (Aumüller 2007)

2.2. Die reife Plazenta

Zum Zeitpunkt der Geburt bildet die Plazenta eine circa 20 cm messende Scheibe mit einer Dicke von 3-4 cm und einem Gewicht von durchschnittlich etwa 500 g. Sie gliedert sich in die Basalplatte oder Deziduaplatte, welche der mütterlichen Seite zugewandt ist, die Zottenbäume, welche in den intervillösen Raum ragen und die Chorionplatte, die die fetale Oberfläche bildet (Aumüller 2007) (siehe Abb. 2.3). Nach der Geburt der Plazenta kann man auf der mütterlichen dezidualen Seite 15-20 Kotyledonen erkennen. Diese erhabenen Areale entstehen durch die unvollständige Unterteilung der Plazenta mit Deziduasepten. Auf jeden Kotyledon projizieren 1-4 Zottenbäume, welche sich nach Aufzweigungsgrad in Stamm-, Intermediär- und Terminalzotten gliedern (Aumüller 2007). Die fetale Seite wird durch die gefäßreiche

Chorionplatte mit Amnionüberzug und Insertion der Nabelschnur gebildet (Sadler und Langman 2008) (siehe Abb. 2.4).

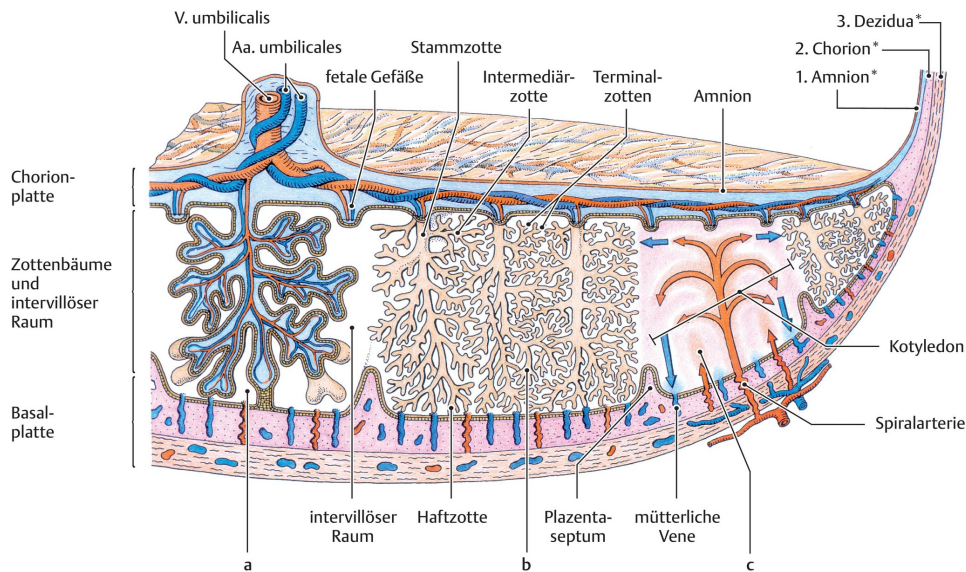


Abb. 2.3.: Aufbau der Plazenta

a junge Plazenta (ca. 4. Woche); b reife Plazenta (ab 4. Monat); c Aufbau eines Kotyledon.

*Beachte die Reihenfolge der Eihäute. (Ulfig und Brand-Saberi 2017)

2.3. Funktionen der Plazenta

Eine wichtige Funktion der Plazenta stellt der Stoffaustausch dar. Dieser wird an den Terminalzotten realisiert, die durch ihre starke Verzweigung eine Oberfläche von bis zu 14 m² aufweisen. Das mütterliche Blut befindet sich im intervillösen Raum, während das kindliche Blut in den Blutgefäßen der Zottenbäume fließt. Der intervillöse Raum enthält ca. 150 ml Blut, welches 3- bis 4-mal pro Minute erneuert wird (Sadler und Langman 2008). Ein enger Kontakt zwischen fetalen Kapillaren und dem Synzytiotrophoblasten ist dafür nötig. Die Plazentaschranke bezeichnet diese trennende Schicht. Sie besteht bis zum 4. Schwangerschaftsmonat aus dem Endothel der fetalen Gefäße, dem mesenchymalen Bindegewebe des Zottenkerns, dem Zytotrophoblasten und dem Synzytiotrophoblasten. Um eine ausreichende Versorgung bei zunehmendem Bedarf des Fetus zu gewährleisten reduziert sich die Plazentaschranke ab dem 4. Monat wesentlich. Der Zytotrophoblast bildet sich bis auf wenige sogenannte Langerhanszellen zurück und die Kapillarendothelien der fetalen Gefäße verlieren den bindegewebigen Überzug, sodass sie zum Teil direkt an den Synzytiotrophoblasten

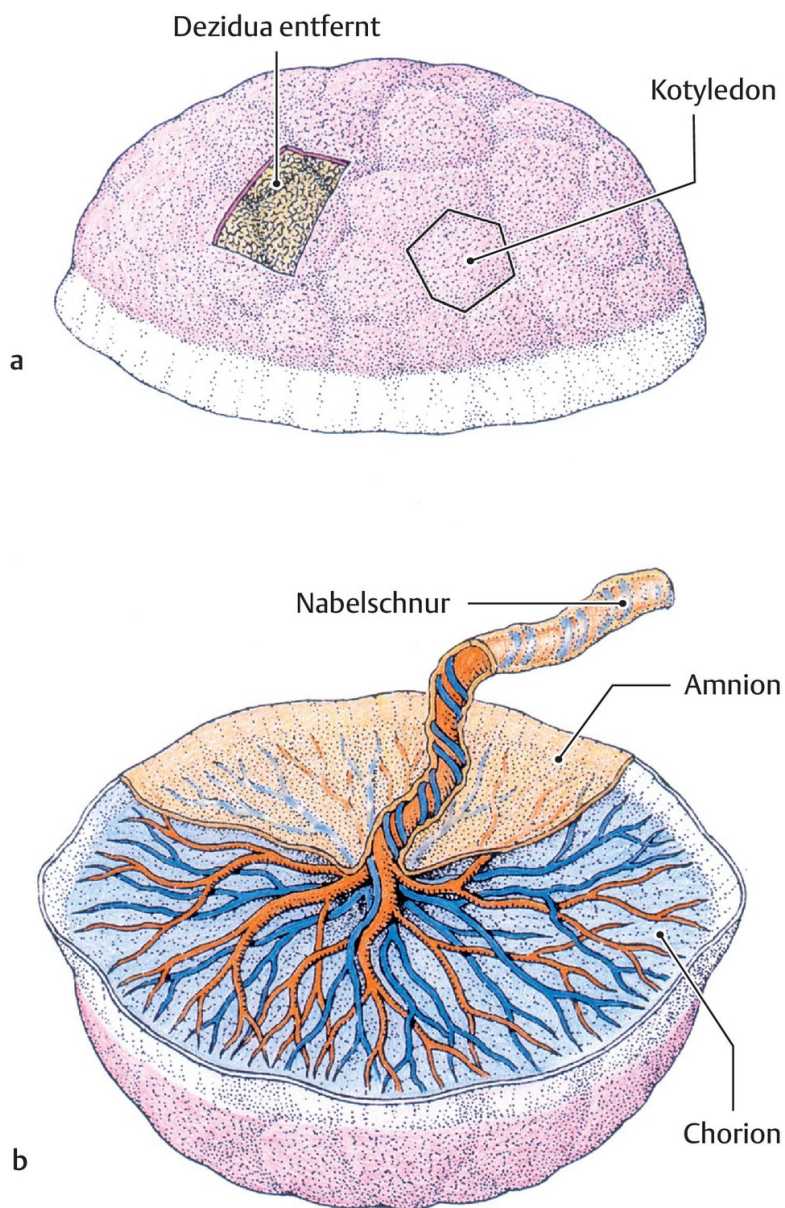


Abb. 2.4.: Geborene Plazenta

a mütterliche Seite (mit Dezidua basalis bedeckt); b fetale Seite. Die basale Oberfläche der Plazenta ist durch Kotyledone gekennzeichnet. (Ulfig und Brand-Saberi 2017)

heranreichen (siehe Abb. 2.2 c)). Die Diffusionsstrecke verringert sich somit maximal und beträgt etwa 2-4 μm (Gude et al. 2004). Die menschliche Plazenta wird auch als Plazenta haemochorialis bezeichnet. Der diaplazentare Stoffaustausch erfolgt via Diffusion wie im Fall von Sauerstoff und Kohlendioxid, erleichterter Diffusion wie zum Beispiel bei Glukose, aber auch durch aktiven Transport von Aminosäuren und Elektrolyten. Durch Transzytose von IgG der Mutter wird ab etwa der 14. SSW ein humoraler Schutz vor Infektionen bis zur Ausreifung des kindlichen Immunsystems ermöglicht.

Die Plazenta weist weiterhin eine Reihe von Entgiftungsmechanismen zum Schutz des Fetus auf. Zu diesen gehören die Expressierung von Cytochrom P-450 und p-Glykoproteinen. Diese gewährleisten einen, wenn auch nicht vollständigen, Schutz vor toxischen Substanzen (Syme et al. 2004).

Die Plazenta hat weiterhin eine wichtige endokrine Funktion. Aufgrund des Fehlens von nervalen Strukturen erfolgt die gesamte Kommunikation zwischen Plazenta, Mutter und Fetus via endokriner, parakriner und autokriner Faktoren (Gude et al. 2004). Eine Vielzahl von Hormonen wie zum Beispiel Östrogene, Progesteron, hCG, Plazentalaktogen, sowie Wachstumsfaktoren, Wachstumshormone, Cytokine, Chemokine und Eikosanoide spielen dabei eine Rolle. Im Folgenden soll auf die wichtigsten Hormone eingegangen werden.

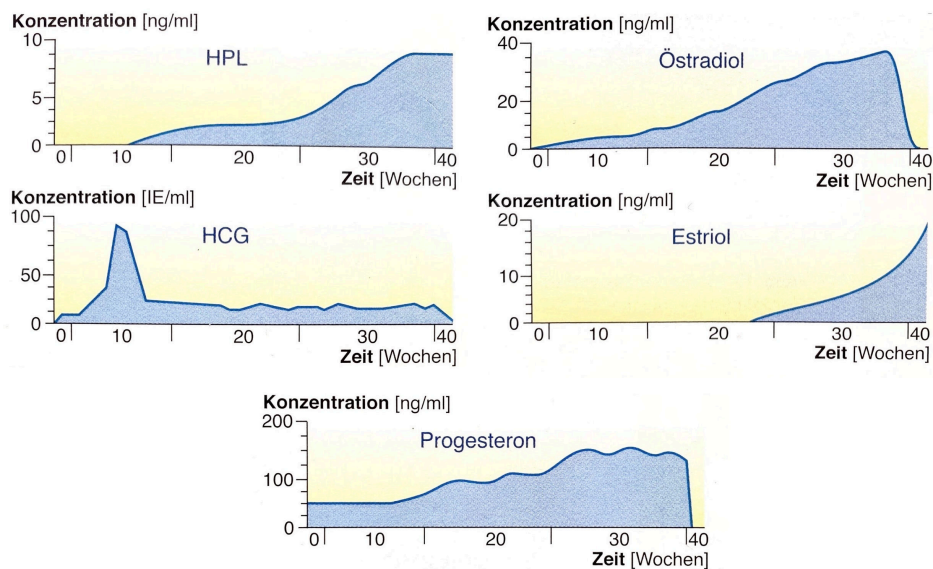


Abb. 2.5.: Hormonkonzentrationen im Plasma der Mutter im Verlauf der Schwangerschaft. (Speckmann et al. 2008)

Zu Beginn der Schwangerschaft spielt hCG eine entscheidende Rolle. Es ist schon zwei Tage nach der Implantation im mütterlichen Blut nachweisbar und erreicht einen Peak in der 8.-10. SSW. Zum Ende des ersten Trimenons fällt der hCG-Spiegel wieder stark ab (Gude et al. 2004) (vgl. Abb. 2.5). Es handelt sich um ein Peptidhormon bestehend aus zwei Untereinheiten. Die α -Untereinheit ist identisch mit der von LH, FSH und TSH (Speckmann et al. 2008). Die bekannte β -Untereinheit wird unter anderem in Blut und Urin zur Schwangerschaftsdiagnostik genutzt. Das hCG wird von Synzytiotrophoblastzellen synthetisiert und hat vielfältige Funktionen. Es unterhält zum Beispiel die Estrogen- und Progesteronsynthese des Corpus luteum graviditatis bis die Plazenta etwa ab der 8. SSW eine ausreichende eigene Produktion ausgebildet hat, um die Schwangerschaft zu erhalten. Es führt weiterhin zum bedarfsgerechten Uteruswachstum, zur Differenzierung von Trophoblastzellen, beeinflusst die Angiogenese und unterdrückt Uteruskontraktionen (Cole 2010). Neben dieser wohl bekanntesten Form des hCG gibt es noch drei weitere Moleküle. Eine hyperglykosilierte Form wird von Zellen des Zytotrophoblasten hergestellt und spielt eine entscheidende Rolle bei der Invasion der Trophoblastzellen. Es wird dementsprechend auch mit dem invasivem Chorionkarzinom in Verbindung gebracht. Ebenso scheint eine inadäquate Produktion mit Schwangerschaftspathologien wie Präeklampsie assoziiert zu sein (Cole 2009, John und Hemberger 2012). Die freie β -Untereinheit von hCG wird ebenso von verschiedenen nicht-trophoblastären malignen Tumoren produziert und ist bei Auftreten häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert. Über eine antagonistische Bindung von β -hCG und hyperglykosiliertes hCG am TGF β -Rezeptor wird die Apoptose der Tumorzellen blockiert und so das Tumorwachstum unterstützt (Cole 2012, Cole 2014). Als letztes existiert noch eine sulfonierte Form von hCG, welche in der Hypophyse produziert wird und Funktionen des lutenisierenden Hormons im normalen Menstruationszyklus unterstützt (Cole 2010).

Die Produktion von Progesteron und Östrogen durch die Plazenta nimmt im Verlauf der Schwangerschaft kontinuierlich zu (vgl. Abb. 2.5). Progesteron wird von der Plazenta aus Cholesterin synthetisiert. Es senkt den Tonus der glatten Muskulatur im Uterus und inhibiert damit myometriale Kontraktionen (Speckmann et al. 2008). Aus diesem Grund wird u.a. bei einer Neigung zu Frühgeburtlichkeit exogen Progesteron zugeführt (Magon und Kumar 2012). Progesteron und Östrogen fördern die Ausbildung der dezidualen Schleimhaut, das Wachstum des Uterus und der Milchdrüsen (Sadler und Langman 2008, Aumüller 2007). Östrogen kann von der Plazenta jedoch

nicht de Novo synthetisiert werden, sondern ist auf fetale Vorstufen bspw. in Form von Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEA-S) angewiesen. Man spricht daher auch von einer fetoplazentaren Einheit bei der Steroidbiosynthese (Speckmann et al. 2008).

Humanes Plazentalaktogen ist ein weiteres Hormon, was strukturell Prolaktin und dem Wachstumshormon der Hypophyse sehr ähnlich ist. Es fördert die Differenzierung der Brustdrüsen und begünstigt über die Stimulation der IGF-Produktion eine diabetogene Stoffwechsellage der Mutter, welche für eine ausreichende Nährstoffversorgung und Wachstum des Fetus sorgt (Sadler und Langman 2008, Murphy et al. 2006).

2.4. Plazenta im Rahmen toxikologischer Testverfahren

Durch ihre relativ leichte Verfügbarkeit in ausreichender Anzahl steht die Plazenta anders als andere menschliche Organe permanent für Versuche zur Verfügung. Nach der Geburt hat die Plazenta ihre physiologische Funktion beendet. Dies führt einerseits dazu, dass es keine ethischen Einwände gegen Tests an termingeborenen Plazenten gibt und gleichzeitig eine hohe Bereitschaft zur Spende dieser vorliegt (Halkoaho et al. 2010). Anders als bei den üblichen toxikologischen Tests, welche zumeist im Tierversuch zum Beispiel an Mäusen durchgeführt werden, kann man anhand der Plazenta als Modellorgan humanspezifische Reaktionen wie beispielsweise die Produktion von β -hCG untersuchen. Somit will man eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen erreichen (Schmidt et al. 2015). Es sind diverse Testverfahren an Modellen unterschiedlicher Komplexität zur Untersuchung verschiedener Fragestellungen möglich. Diese Verfahren können innerhalb einer toxikologischen Testkaskade anhand von plazentabasierten Zelllinien, isolierten primären Plazentazellen, Plazentaexplantaten sowie der einseitigen bzw. zweiseitigen Plazentaperfusion aufeinander aufbauend durchgeführt werden (Göhner et al. 2014).

Die einfachste Möglichkeit stellen plazentabasierte Zelllinien wie die chorionkarzinombasierten Zelllinien JEG3, BeWo oder JAR sowie die immortalisierte Zelllinie HTR8/SVneo dar. Diese bilden in vielerlei Hinsicht die Eigenschaften primärer Trophoblastzellen wider, zeigen allerdings auch ein teilweise anderes Verhalten sichtbar beispielsweise an unterschiedlicher Expression von miRNA-Clustern (Bilban et al. 2010, Morales-Prieto et al. 2012). Ihr maligner bzw. immortalisierter Charakter beeinflusst möglicherweise ihre Resistenz gegenüber toxischen Stimuli (Göhner et al. 2014). Durch ihre leichte Verfügbarkeit und guter Etablierung in vielen Forschungs-

einrichtungen sowie schneller Teilungsfähigkeit ist eine große Anzahl an Versuchen durchführbar. Neben funktionellen Assays, welche Vitalität, Invasion, Proliferation oder Zelltod messen, sind ebenso Analysen der Kulturüberstände auf sezernierte Substanzen wie z.B. Hormone, Zytokine, Interleukine oder Metalloproteinasen denkbar (Markert et al. 2011, Bahn et al. 1981, Schröpfer et al. 2010).

Neben der konventionellen 2D-Zellkultur wurde in den letzten Jahren das Potential der 3D-Zellkultur entdeckt. Diese vermag eine bessere Simulation von Zell-Zell-Interaktion sowie Ausbildung extrazellulärer Matrix zu gewährleisten (Friedrich et al. 2007, Kunz-Schughart et al. 2004, Astashkina et al. 2012). Auch hier sind verschiedene Testmöglichkeiten in der Vergangenheit schon genutzt worden insbesondere zur Untersuchung von Invasions- bzw. Implantationsverhalten sowie Trophoblastendifferenzierung (Lee et al. 2015, Korff et al. 2004, Weber et al. 2013).

Plazentaexplantate stellen aufgrund des erhaltenen Gewebeverbandes mit verschiedensten Zelltypen wie z. B. Trophoblastzellen, Immunzellen und Fibroblasten eine komplexere Simulation von in vivo-Bedingungen dar (Miller et al. 2005). Eine Kultivierung ist über mehrere Tage möglich. Ein dauerhafter Erhalt der Vitalität in Kultur gelingt jedoch nicht, weshalb für jedes Experiment eine neue Explantatkultur angelegt werden muss. Neben den schon o.g. verschiedenen im Kulturüberstand messbaren Substanzen bieten Explantate die Möglichkeit einer histologischen Untersuchung (De Oliveira Gomes et al. 2011).

Weitere Möglichkeiten bieten aus der Plazenta isolierte Primärzellen. Es können verschiedene Zelltypen wie Trophoblastzellen, Immunzellen oder Endothelzellen je nach Fragestellung isoliert werden (Kämmerer et al. 2004, Sölder et al. 2012). Die Isolierung einzelner Zelltypen ist jedoch von geringer Ausbeute und mit hohem Stress für die Zellen geprägt, die herausgerissen aus dem natürlichen Gewebeverband in Kultur nur wenige Passagen überleben. Weiterhin verlieren sie ihre Proliferationsfähigkeit (Pötgens et al. 2001).

Die Plazentaperfusion ist ein sehr komplexes Verfahren. Sie ist als einseitige Perfusion mit Anschluss lediglich des mütterlichen Kreislaufs oder als zweiseitige Perfusion unter Beteiligung des kindlichen Anteils durchführbar. Sie eignet sich damit besonders für Fragestellungen zum Substanzdurchtritt durch die menschliche Plazenta (Troen und Gordon 1958). Insgesamt bietet die menschliche Plazenta damit enorm viele Möglichkeiten zur Untersuchung toxikologischer Fragestellungen.

3. Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit toxikologischen Untersuchungen an der menschlichen Plazenta. Es sind diverse Testverfahren an Modellen unterschiedlicher Komplexität zur Untersuchung verschiedener Fragestellungen möglich. Diese Verfahren können innerhalb einer toxikologischen Testkaskade anhand von plazenta-basierten Zelllinien, isolierten primären Plazentazellen, Plazentaexplantaten sowie der einseitigen bzw. zweiseitigen Plazentaperfusion aufeinander aufbauend durchgeführt werden. Ziel dieser Arbeit ist die Evaluierung verschiedener Methoden und Parameter zur Etablierung der 2D- und 3D- Zellkultur an HTR8/SVneo und JEG3 Zellen und der Explantatkultur innerhalb der beschriebenen toxikologischen Kaskade. Es soll der Einfluss der unterschiedlich toxischen Metalle $MnSO_4$, $NiCl_2$ und $HgCl_2$ sowie als nicht toxische Kontrolle von $MgSO_4$ untersucht werden.

Somit ergeben sich folgende Ziele:

- Evaluierung verschiedener Methoden zur Bestimmung der Zellvitalität in der 2D-Zellkultur
- Generierung von 3D-Sphäroiden aus trophoblastären Zellen unter Einfluss der Metalle
- Etablierung eines Versuchsprotokolls für das Anlegen einer Explantatkultur
- Ist eine Diskriminierung des Einflusses unterschiedlich toxischer Substanzen anhand der Methoden möglich?
- Sind die Ergebnisse zwischen den verwendeten Methoden übertragbar?

Im Folgenden werden die Darstellungen anhand einer steigenden Komplexität zunächst der 2D-, dann 3D-Zellkulturen und zuletzt Explantatkulturen vorgenommen.

4. Materialien

Material/Reagenzien	Firma (Katalognummer)
dH ₂ O	TKA Wasseraufbereitungssysteme (04.1601)
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Roth (P027.1)
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	Merck (105941)
Nickel(II)-chlorid Hexahydrat	Roth (4489.1)
Quecksilberchlorid	J.T.Baker (2594-01)

4.1. Zellkultur

4.1.1. Passagierung und Zellgewinnung

Material/Reagenzien	Firma (Katalognummer)
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco (25300-054)
Descosept AF Desinfektionsmittel	Dr.Schumacher (00-311-010)
DPBS	Gibco (14190-094)
Ethanol $\geq 99,8$ %, unvergällt	Roth (K928.3)
F-12 Nut Mix (Ham)	Gibco (21765-029)
Fetal Bovine Serum	Sigma (F7524)
Penicillin/Streptomycin	Gibco (15140-122)
RPMI Medium 1640	Gibco (21875-034)

4.1.2. Kryokonservierung

Material/Reagenzien	Firma (Katalognummer)
DMSO	Sigma (D8418-50ML)

4.1.3. Zellzahlbestimmung

Material/Reagenzien	Firma (Katalognummer)
Trypanblau 0,4 %	Sigma (93595)

4.1.4. MTS-Assay

Material/Reagenzien	Firma (Katalognummer)
CellTiter 96 AQueous One Solution	
Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega (G3582)
DMEM ohne Phenolrot	Gibco (21063-029)

4.1.5. pH-Wert-MTS-Assay

Material/Reagenzien	Firma (Katalognummer)
HCl	Roth (4625.1)
NaOH	Merck (106462)

4.2. Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblaufärbung

4.2.1. Durchflusszytometrie

Material/Reagenzien	Firma (Katalognummer)
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit BD	Pharmingen (556547)
bestehend aus:	
<i>10xAnnexin-Bindepuffer</i>	
<i>Annexin V FITC</i>	
<i>Propidiumjodid</i>	

4.2.2. Sphäroidgenerierung

Material/Reagenzien	Firma (Katalognummer)
Methylcellulose	Sigma (M0512)
DMEM Low Glucose/Ham's F-12	Sigma-Aldrich (D6421)
Nut-Mix-Medium	

4.2.3. Probengenerierung für die Elektronenmikroskopie

4.2.4. Sphäroidgenerierung

Material/Reagenzien	Firma (Katalognummer)
2,5 %ige Glutaraldehyd-Lösung	Calbiochem (354400)

4.3. Explantatkultur

Material/Reagenzien	Firma (Katalognummer)
Antibody Diluent with Background Reducing Components	Dako (S3022)
Citronensäure	Merck (100244)
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrid	Merck (106580)
Ethanol 99,9 %, vergällt	Nordbrand (520)
Formaldehydlösung 5 %	Fischar (PZN02653137)
Histofluid	Marienfeld (6900002)
Kaliumchlorid	Merck (104936)
Kaliumphosphat liquideDAB+ Substrate	Sigma (P0662)
Chromogen System	Dako (K3468)
Methanol	Roth (CP43.4)
Natriumchlorid	Roth (P029.1)
Natriumcitrat	Merck (106448)
Primärantikörper:	
·Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen Clone MIB-1	Dako (M7240)
·CleavedPARP(Asp214) (D64E10) XP Rabbit mAb	Cell Signaling (5625)
saures Hämalun nach Mayer	Sigma (1.09249)
Sekundärantikörper: Vectastain Elite ABC Kit	
·Mouse IgG	Vector (PK-6102)
·Rabbit IgG	Vector (PK-6101)
Wasserstoffperoxid	Roth (8070.1)
Xylol	VWR (28975.291)

4.4. Verbrauchsmaterialien und Geräte

Material/Reagenzien	Firma (Katalognummer)
-86°C Freezer	Thermo Fisher Scientific
Abzug ohne HOSCH-Filter	Köttermann Systemlabor
Auslaufpipetten cellstar 5 ml, 10 ml, 20 ml	Greiner Bio-One
Bechergläser	Marienfeld
Bleistift	Staedtler
Deckgläschen 24x50 mm	Menzel
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson
Einfridgefäß mit Isopropanol	Thermo Fisher Scientific
Einmalhandschuhe	Braun
FACS-Röhrchen BD Falcon	BD Biosciences
Färbeküvetten	Marienfeld
feuchte Kammer	Laborbestand
gekürzte Pipettenspitzen	Brand
Glasdeckgläschen 12 mm Durchmesser	Thermo Scientific
Glasflaschen	Schott
Glaspetrischalen	Marienfeld
Heizplatte	Bomann
Klingen SEC35p Low Profile Blades	Microm
Kryotubes	Th. Geyer
Kühlakkus	Coolpack BV
Lichtmikroskop Axiovert 25 CFL	Zeiss
lifeimaging Mikroskop Axio Observer Z1	Zeiss
Magnetrührer Heater MR3001	Heidolph
Mikroskop Axioplan 2	Zeiss
Mikrotom Microm HM340E	Zeiss
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific

Material/Reagenzien	Firma (Katalognummer)
Papier	Tapira pur
Paraffinstreckbad	GFL
Pasteurpipetten ISO7712	Hecht Assistent
Petrischalen	Thermo Scientific Nunc
pH-Meter Five Easy 20	Mettler-Toledo
Pinzette	Aesculap
Pipettenspitzen steril	Kisker Biotech
Pipetten Transferpette S	Brand
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann
Plazentagefäß	HP Design Thomas Ellers Torfer
Plazentakulturschrank HERAcell	Heraeus
Präparierbesteck	Aesculap
Präzisionswaage 440-47N	Kern
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße cellstar Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
Rotilabo-Einbettkassetten für Biopsien	Roth
Rotilabo-Schraubdeckeldosen	Roth
Rührfisch	
Schnellkochtopf Steinbach	Real
Skalpell	Dahlhausen
Spektrometer Spectrostar Omega	BMG Labtech
Sterilfilter Filtropur S 0.2	Sarstedt
Sterilwerkbank HERAsafe HS12	Heraeus
Tischabzug Model 3650	LabCaire
Trockenschrank	Laborbestand
Vakuumpumpe BioCem Vacuu-Center BVC21NT	Vaccubrand
Wägeschalen	
Wasserbad	GFL
wasserfester Stift	edding
Well-Platten cellstar 6-Well, 12-Well, 96-Well	Greiner Bio-One

Material/Reagenzien	Firma (Katalognummer)
Zellkulturflaschen cellstar 75 cm ² , 25 cm ² mit Filter	Greiner Bio-One
Zellkulturschrank HERAcell 150i CO ₂ incubator	Heraeus
Zentrifuge Universal 30F	Hettich

4.5. Programme und Datenbanken

Art	Name
Spektrometerbetriebsprogramm	Omega
Auswertesoftware	MARS Data Analysis Software
FACS-Programm	Cell Quest Pro
Mikroskopprogramm	Axiovision 4.8
ZEISS-Programm	ZEN lite
Präsentationen	Microsoft® Powerpoint für Mac, Version 16.37
Tabellenkalkulation	Microsoft® Excel für Mac, Version 16.37
Statistiken	IBM® SPSS® Statistics, Version 24

5. Methodik

Alle Versuche wurden mit den in Kapitel 4 aufgeführten Chemikalien, Materialien und Geräten durchgeführt. Um eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten ist in Abb. 5.1 ein vereinfachtes Schema über die verwendeten Methoden dargestellt.

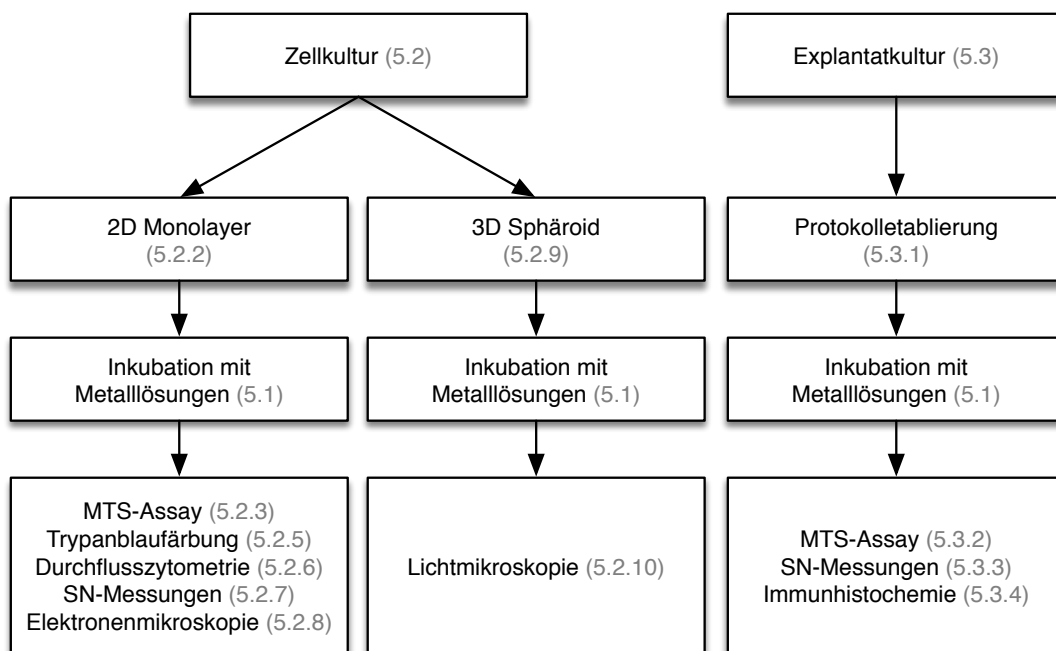


Abb. 5.1.: Übersichtsschema zu den verwendeten Methoden

Ausgehend von der Zellkultur bzw. Explantatkultur symbolisieren die Pfeile nachfolgende Arbeitsschritte. In Klammern finden sich die zugehörigen Kapitelnummern. MTS (Tetrazoliumfarbstoff 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) ; SN (Kulturüberstand)

Im Folgenden sollen zunächst die allgemeinen Vorbereitungen, die Durchführung der Zellkulturversuche und zuletzt die Explantatkulturversuche betrachtet werden. Sowohl für die Zellen als auch die Plazentaexplantate erfolgte eine Kultivierungszeit von 24 h bevor mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentrationen für weitere 24 h inkubiert wurde. Die Metalle wurden aufgrund ihrer Eigenschaft einer speziessübergreifenden Toxizität anhand von LD50-Werte im Tierversuch ausgewählt (vgl.

Tab. 5.1). Der LD50-Wert bezeichnet die Substanzmenge, bei der 50 % der Versuchstiere versterben. Es handelt sich um LD50-Werte bei oraler Aufnahme der Substanz im Tierversuch mit Ratten. MgSO₄ dient als nicht toxische Kontrolle.

Tabelle 5.1.: LD50-Werte der verwendeten Metalle

MgSO ₄	MnSO ₄	NiCl ₂	HgCl ₂
5000 mg/kg	2150 mg/kg	681 mg/kg	1 mg/kg

5.1. Ansetzen der Metalllösungen

Zu Beginn mussten Stammlösungen von hoher Metallsalzkonzentration hergestellt werden, welche für die Versuche jeweils frisch auf die gewünschte Konzentration entsprechend mit Zellkulturmedium verdünnt wurden. Tabelle 5.2 zeigt die verwendeten Konzentrationen. Diese wurden anhand der Ergebnisse eines MTS-Assays als Vorversuch festgelegt, sodass der Konzentrationsbereich eine völlig intakte bis eine nicht mehr vorhandene Vitalität abzubilden vermag. Im Falle von HgCl₂ betrug aufgrund der starken Toxizität die höchste Konzentration 5 mmol/l im Gegensatz zu 10 mmol/l bei den anderen Metallen.

Tabelle 5.2.: In den Versuchen verwendete Metallsalzkonzentrationen (*abweichende Konzentration für HgCl₂)

	Konzentration [mmol/l]					
Zellkultur	0,005	0,01	0,05	0,1	1	10/5*
Explantatkultur				0,1	1	10/5*

Es wurden je 50 ml 1 mol/l Stammlösungen für MgSO₄, MnSO₄ und NiCl₂ angesetzt. Für HgCl₂ wurde aufgrund der starken Toxizität eine Stammlösung von 10 mmol/l verwendet.

Zunächst wurde die benötigte Masse des zu lösenden Stoffes nach folgender Formel berechnet:

$$m = M \cdot c \cdot V$$

wobei

$$m = \text{Masse [g]}$$

$$M = \text{molare Masse [g/mol]}$$

$$c = \text{Molarität [mol/l=M]}$$

$$V = \text{Volumen [l]}$$

Somit ergab sich Folgendes:

$$m(\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}) = 12,324 \text{ g}$$

$$m(\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}) = 11,885 \text{ g}$$

$$m(\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 8,451 \text{ g}$$

$$m(\text{HgCl}_2) = 0,136 \text{ g}$$

Die entsprechende Masse des jeweiligen Metallsalzes wurde in 50 ml dH₂O gelöst. Anschließend wurde die Lösung durch einen 2 µm Filter steril filtriert und sorgfältig verschlossen.

5.2. Zellkultur

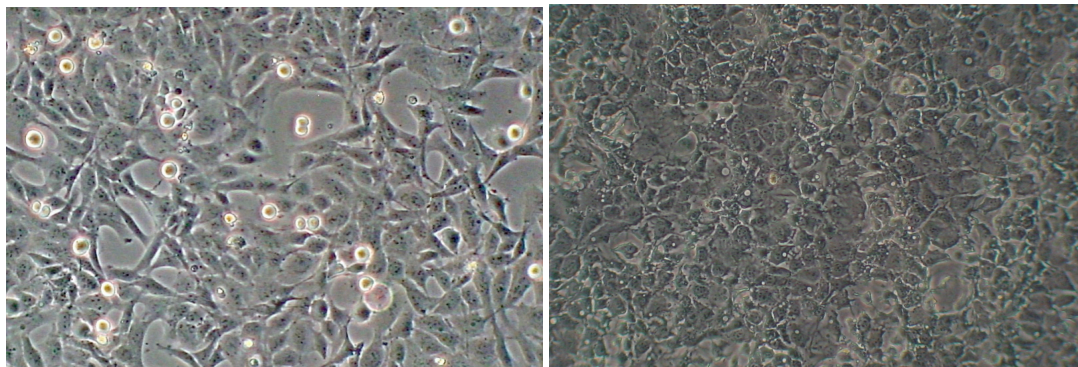
5.2.1. Die Zelllinien HTR8/SVneo und JEG3

Die Zelllinie HTR8/SVneo wurde 1993 von Dr. Charles Graham erzeugt. Es handelt sich um Trophoblastzellen des ersten Trimenons. Die Immortalisierung erfolgte via Gentransduktion von simian Virus 40 large T Antigen. Es ist damit möglich, die Zellen in hohen Passagennummern vital zu kultivieren, wohingegen die Elternzellen nur eine Passagenzahl von ca. 12-14 ermöglichten. HTR8/SVneo Zellen benötigen zum optimalen Wachstum RPMI-Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), proliferieren dann aber wesentlich schneller als die Elternzellen und weisen eine Verdopplungszeit von ca. 30 bis 40 h auf (Graham et al. 1993). Die Zelllinie JEG3 (ATCC® HTB-36™) wurde von Kohler (Kohler und Bridson 1971) aus einem humanen Cho-

rionkarzinom isoliert. Diese Zellen können mit einer Verdopplungszeit von ca. 24 h über hohe Passagennummern vital kultiviert werden und sind in der Lage β -hCG zu produzieren. Als Kulturmedium eignet sich Hams F-12 mit 10 % FKS. Zusätzlich wurde bei beiden Zelllinien 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (P/S) genutzt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 h. Die Zellen wurden stets in einer Umgebung von 37°C, 5 % CO₂ und 97 % Luftfeuchtigkeit im Zellkulturschrank kultiviert.

5.2.2. Passagierung und Zellgewinnung

Bei einer Konfluenz von ca. 80 % mussten die Zellen vereinzelt werden, um weiterhin ein Kulturwachstum zu erzeugen und Zellen für die Versuchsdurchführung zu erhalten. Abbildung 5.2 zeigt Zellkulturen beider Zelllinien unter dem Lichtmikroskop vor der Passagierung mit einer ausreichenden Konfluenz. Dieser Vorgang konnte etwa alle drei Tage erfolgen. Nach Entnahme des Kulturüberstandes wurden die Zellen mittels Trypsin vom Flaschenboden gelöst und anschließend mit frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Je nach Bewuchsdichte des Flaschenbodens wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 oder 1:4 gesplittet. Ein Anteil wurde erneut in Kultur genommen. Die verbliebenen Zellen standen für die Versuche zur Verfügung. Die für die jeweiligen Versuche benötigte Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt.



(a) HTR8/SVneo

(b) JEG3

Abb. 5.2.: Zellkulturen von a) HTR8/SVneo und b) JEG3 Zellen
Lichtmikroskopische Aufnahmen vor Passagierung der Zellen

5.2.3. MTS-Assay

Das MTS-Assay erlaubt die Bestimmung der metabolischen Aktivität, welche als Maß für die Vitalität von Zellen genutzt wird. Im Zusammenhang mit dem MTS-Assay wird folglich der Begriff Vitalität gleichgesetzt mit der metabolischen Aktivität. Während des Versuchs führt die NADH bzw. NADPH-abhängige Reduktion von MTS zu Formazan zu einem Farbumschlag der kolorimetrisch bei 490 nm gemessen werden kann.

Es wurden 10^4 Zellen in 250 μl Medium pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät und für 24 h im Zellkulturschrank kultiviert. So wurden eine ausreichende Adhärenz der Zellen im Reaktionsgefäß und gleichmäßige Wachstumsbedingungen generiert.

Nach einer Kultivierungszeit von 24 h wurden die Zellen für weitere 24 h mit Metalllösungen in den unterschiedlichen Konzentrationen (vgl. Tab. 5.2) inkubiert. Es wurden dafür aus der wässrigen Stammlösung der Metalle Verdünnungsreihen angefertigt. Der benötigte Anteil Stammlösung wurde mit dem entsprechenden Zellkulturmedium verdünnt bis die gewünschte Konzentration erreicht wurde.

Anschließend wurde der Kulturüberstand aus den Wells entfernt und jeweils 250 μl Metalllösung auf die Zellen gegeben. Bei den Kontrollen wurde der Kulturüberstand durch frisches Kulturmedium ohne Metallkonzentration ausgetauscht. Für das MTS-Assay wurden für jede Konzentration und die Kontrolle jeweils Duplikate in jeder der drei Versuchsdurchführungen verwendet.

Nach 24 h Inkubation mit den Metalllösungen bzw. unverändertem Kulturmedium im Falle der Kontrolle wurde lichtmikroskopisch das Wachstum und die Morphologie der Zellen kontrolliert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen jeweils mit 100 μl serumfreiem DMEM ohne Phenolrot sowie je 20 μl MTS-Reagenz versetzt. Nach Ablauf der 4 h Inkubationszeit erfolgte die spektrometrische Messung bei 490 nm. Die anschließende Auswertung der Messdaten erfolgte Blank-korrigiert (Medium ohne Zellen) mittels der MARS Data Analysis Software.

5.2.4. pH-Wert-MTS-Assay

Analog zum Versuchsaufbau beim MTS-Assay wurden Lösungen der Metalle in F-12-Medium in den Konzentrationen 0,1 mmol/l, 1 mmol/l und 10 mmol/l bzw. 5 mmol/l bei HgCl_2 hergestellt und mittels pH-Meter gemessen. Ebenso wurde das reine Zellkulturmedium als Kontrolle gemessen. Es ergaben sich pH-Werte zwischen 7,08 und 8,19. Es wurden daraufhin Zellkulturmedien mit verschiedenen pH-Werten,

welche den gemessenen Bereich von 7,08 bis 8,19 umfassten, hergestellt. Dafür wurde zum F-12-Medium HCl bzw. NaOH zugegeben, bis der entsprechende Ziel-pH erreicht war. Die Zielwerte wurden auf pH-Werte von 6,6; 7,0; 7,4; 7,8 und 8,6 festgelegt. Anschließend wurden die Lösungen zur Vermeidung einer Kontamination der Zellkultur durch einen 2 μm Filter steril filtriert. Die JEG3 Zellen wurden entsprechend des Versuchsaufbaus beim MTS-Assay vorbereitet. Nach der 24 h Wachstumsphase wurden anstatt der Metalllösungen 250 μl der pH-Wert-veränderten Kulturmedien auf die Zellen gegeben. Die weitere Durchführung entsprach der des MTS-Assays mit Metalllösungen.

5.2.5. Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblaufärbung

Es wurden in eine 24-Well-Platte je 5×10^4 HTR8/SVneo Zellen in 1 ml RPMI-Medium pro Well ausplattiert. Nach einer 24 h Wachstumsphase wurde das gleichmäßige Zellwachstum lichtmikroskopisch überprüft und analog zum MTS-Assay die Inkubation mit der entsprechenden Testsubstanz bzw. frischem Kulturmedium im Falle der Kontrolle für weitere 24 h vorgenommen. Die toten und damit nicht mehr adhärenen Zellen wurden aus dem Überstand herauszentrifugiert und mit den vitalen Zellen, welche durch Trypsinierung vom Wellboden gelöst wurden, zusammengeführt. Die entstandene Zellsuspension wurde mit Trypanblau gemischt. Anschließend wurde mittels Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch anhand der Färbung die Anzahl lebender und toter Zellen bestimmt.

5.2.6. Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie soll der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Inkubation mit den Metalllösungen bestimmt werden. Fluoreszenzmarkiertes Annexin V (Ann V) bindet an Phosphatidylserin, welches im Zuge des Apoptosevorgangs an die Außenseite der Zellmembran verlagert wird. Zusätzlich erfolgt eine Färbung mit Propidiumjodid (PJ), welches durch Löcher in der Zellmembran nekrotischer Zellen eindringt und mit der DNA interkaliert. Die farbstoffmarkierten Zellen werden im Durchflusszytometer gemessen und können anschließend mit den ungefärbten und damit lebenden Zellen ins Verhältnis gesetzt werden.

Es wurden in 6-Well-Platten 5×10^5 HTR8/SVneo Zellen bzw. 4×10^5 JEG3 Zellen in jeweils 2 ml Zellkulturmedium ausplattiert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium durch das Testmedium (s. Tab. [5.2](#)) ersetzt und für 24 h inkubiert. Nach Ende der

Inkubationszeit wurden aus dem Überstand jedes Wells die nicht mehr adhären- ten, toten Zellen mittels Zentrifugation gewonnen und mit den durch Trypsinierung vom Wellboden gelösten, vitalen Zellen suspendiert. Um eine geeignete Zellzahl für die Messung zu erhalten, wurde die Kontrolle und die Probe mit der erwarteten stärk- sten toxischen Wirkung mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die eingesetzte Zellzahl sollte zwischen 150.000 und 300.000 Zellen liegen. Entsprechend den ausge- zählten Werte wurde ein geeignetes Volumen der Zellsuspension errechnet. Für die Kontrolle wurden vier Proben generiert, die nach Abschluss der Vorbereitungen je- weils unterschiedlich angefärbt wurden - eine ungefärbt, eine mit Ann V, eine mit PJ und eine mit Ann V und PJ. Pro Zellprobe, die mit Metall inkubiert wurde, wurde eine doppelgefärbte Probe hergestellt. Aus dem entsprechenden Volumen Zellsus- pension wurde durch erneute Zentrifugation ein Zellpellet gewonnen, welches mit dem Versuchsreagenz bestehend aus Annexin-Bindepuffer und dem entsprechenden Farbstoffen (Ann V und PJ) resuspendiert wurde. Die Kontrollproben wurden, wie schon beschrieben, ungefärbt, einfach- und doppelgefärbt behandelt. Nach Ablauf der in Dunkelheit erfolgten Inkubation von 15 min wurde die Messung am Durch- flusszytometer FACS Calibur der Firma Becton Dickinson vorgenommen. Während der Messung wurden die Proben stets dunkel gelagert und vor dem Einspannen in das Gerät noch einmal suspendiert. Die Messung wurde innerhalb von 1 h beendet und anschließend mit dem Programm Cell Quest Pro ausgewertet.

5.2.7. Parameterbestimmung im Kulturüberstand

Im Kulturüberstand der Zellkultur wurden die Parameter Glukose, Laktat, LDH und β -hCG nach den entsprechenden Inkubationszeiten bestimmt. Für die Zellkultur wur- den die Kulturüberstände nach 24 h Inkubationszeit mit dem entsprechenden Metall- salz gemessen. Es wurden dafür lediglich die Kulturen der JEG3 Zellen verwendet, da die HTR8/SVneo Zellen kein β -hCG produzieren und somit bei ihnen nicht alle gewünschten Parameter bestimmbar waren. Anschließend wurden die Proben sofort bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefroren und zeitnah im gekühlten Zustand ins Institut für klinische Che- mie der Universität Jena geschickt. Dort erfolgte die Messung aller Parameter.

Glukose, Laktat, LDH und β -hCG wurden am Architekt Ci 16200 der Firma Abbott bestimmt.

Glukose wird durch die Hexokinase unter Anwesenheit von ATP und Magnesium- ionen zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert, wobei ADP entsteht. Glukose-6-

Phosphat wird, katalysiert durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, weiter zu 6-Phosphoglukonat oxidiert. Dabei wird gleichzeitig NAD⁺ zu NADH reduziert. NADH wird anschließend photospektrometrisch als erhöhte Extinktion gemessen. NADH hat im Gegensatz zu NAD⁺ ein zweites Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm.

Laktat wird mittels Laktat-Oxidase in Pyruvat und Wasserstoffperoxid gespalten. In einer zweiten Reaktion wird das entstandene Wasserstoffperoxid mit p-Aminoantipyrin und Phenol durch eine Peroxidase zu einem rot gefärbten Chinonimin umgesetzt. Die Zunahme der Rotfärbung ist proportional zur Laktat-Konzentration im Ausgangsmedium.

LDH katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat unter Reduktion von NAD zu NADH. Die entstandene NADH-Menge ist analog der Glukosemessung photospektrometrisch messbar.

β -hCG: Grundlage der β -hCG-Messung war ein in zwei Schritten durchgeführtes Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassay. Zunächst wurde die Probe mit anti- β -hCG beschichteten paramagnetischen Mikropartikeln versetzt, an welche sich β -hCG bindet. Nach einem Waschschrift wurde ein anti- β -hCG-Akridinium-Konjugat zugefügt. Nach Zugabe der Pretrigger- und Triggerlösung entstand eine Chemilumineszenzreaktion. Das emittierte Licht wurde mittels Architect in relativen Lichteinheiten gemessen, welche proportional zur Gesamt- β -hCG-Menge war.

Estradiol wurde mittels Elektrochemilumineszenz Immunoassay (ECLIA-Kompetitionsprinzip) am Cobas e411-Analysensystem der Firma Roche bestimmt.

Der Probe wurde zunächst Mesterolone, welches proteingebundenes Estradiol freisetzt, und ein Estradiol-spezifischer biotinylierter Antikörper zugefügt. Der Antikörper bindet sich an das vorhandene Estradiol. Durch Zugabe eines Ruthenium-markierten Estradiolderivats wurden die freien Bindungsstellen des Antikörpers gesättigt. Je mehr Estradiol in der Ausgangsprobe vorhanden war, umso weniger Bindungsstellen wurden durch das markierte Derivat besetzt.

Es wurde nach dem Hinzufügen von Streptovadin-beschichteten Mikropartikeln der entstandene Komplex an die Festphase gebunden und in der Messzelle an der Elektrode fixiert. Nach Auswaschen aller ungebundenen Substanzen

wurde durch Anlegen einer Spannung eine mit dem Photomultiplier messbare Chemilumineszenzreaktion hervorgerufen, welche sich umgekehrt proportional zur Estradiol-Konzentration der Probe verhält.

Progesteron wurde analog zu Estradiol ebenfalls mit dem Cobas-Analysensystem von Roche ebenfalls im Institut für klinische Chemie der Universität Jena gemessen. Zur Freisetzung des proteingebundenen Progesterons wurde Danazol zugegeben. Ein biotinylierter, gegen Progesteron gerichteter Antikörper wurde zugegeben wie auch ein Ruthenium-markiertes Progesteronderivat. Das Progesteron der Probe und das markierte Derivat konkurrieren um die Bindungsstellen des Antikörpers. Je weniger Progesteron in der Probe, desto mehr markiertes Derivat wird gebunden. Danach folgte die Zugabe der Streptavidinbeschichteten Mikropartikel, Überführung in die Messzelle, Waschen und Anlegen der Spannung. Die entstandene Chemilumineszenzemission durch das Ruthenium-markierte Progesteronderivat war umgekehrt proportional zum Progesterongehalt der Probe.

5.2.8. 2D-Probengenerierung für die Elektronenmikroskopie

Es wurden 5×10^4 HTR8/SVneo bzw. JEG3 Zellen auf Glasdeckgläschen mit 12 mm Durchmesser in 1 ml Zellkulturmedium für 24 h kultiviert. Nach 24 h wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und 1 ml 0,01 mmol/l HgCl_2 -Zellkulturmedium bzw. frisches Zellkulturmedium auf die Kontrolle gegeben. Nach weiteren 24 h Inkubationszeit wurde wiederum der Überstand von den Zellen entfernt und je 500 μl 2,5%ige Glutaraldehyd-Lösung zugegeben. Die so vorbereiteten Proben wurden für alle weiteren Vorgänge ans Elektronenmikroskopische Zentrum verbracht, wo diese weiter bearbeitet wurden. Es entstanden einige rasterelektronenmikroskopische und transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellen.

5.2.9. Sphäroidgenerierung

Die Sphäroide wurden mittels Hanging Drop Methode erzeugt (vgl. Abb. 5.3). Diese verhindert durch am Deckel einer Petrischale hängende Tropfen mit Zellsuspension die Adhärenz der Zellen an der Oberfläche und ermöglicht die Bildung von kompakten dreidimensionalen Zellstrukturen.

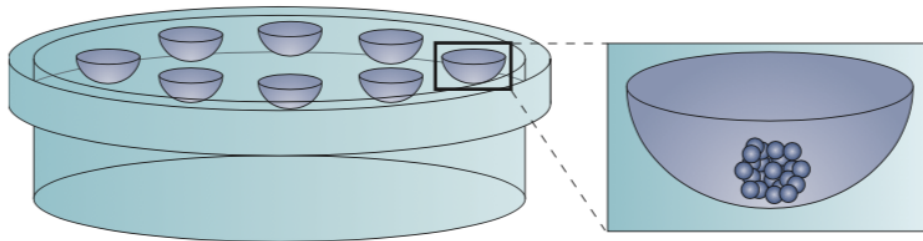


Abb. 5.3.: Hanging Drop Methode

Schematische Darstellung der Hanging Drop Methode. (Pampaloni et al. 2007)

Es wurden pro 20 μl Tropfen 10^4 HTR8/SVneo bzw. JEG3 Zellen in Testmedium und Methylcellulose im Verhältnis 1:4 verwendet. Methylcellulose erhöht die Viskosität des Testmediums und erleichtert somit die Sphäroidbildung. Für 25 Tropfen ergab dies $0,25 \times 10^6$ Zellen in 375 μl Testmedium und 125 μl Methylcellulose. Die Methylcelluloselösung wurde aus 6 g Methylcellulose und 500 ml DMEM Low Glucose/Ham's F-12 Nut-Mix-Medium inkl. 10 % FKS hergestellt. Um den Einfluss der Metalle auf die Sphäroidbildung zu untersuchen, bestand das Testmedium aus dem jeweils zelltypspezifischen Medium unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Metall (s. Tab. 5.3). Eine unbehandelte Kontrolle wurde lediglich mit dem entsprechenden Kulturmedium inkubiert.

Tabelle 5.3.: Bei der Sphäroidbildung verwendete Metallsalzkonzentrationen.

	Metalle			
	HgCl ₂	NiCl ₂	MnSO ₄	MgSO ₄
Konzentrationen [mmol/l]	0,01	0,05	0,05	1
	0,05	0,1	0,1	5
	0,1	0,5	0,5	10

In den Boden der Petrischalen mit 10 cm Durchmesser wurden 5 ml PBS eingefüllt, um das Austrocknen der Tropfen während der Kultur zu verhindern. Auf die Deckelinnenseite wurden Tropfen mit je 20 μl Volumen aufgetragen und im Tropfen am Deckel hängend für 24 h inkubiert. Anschließend konnte man im Zentrum des Tropfens einen kleinen weißen Punkt mit bloßem Auge ausmachen. Um die Sphäroidbildung mikroskopisch zu überprüfen, wurden die Sphäroide in eine 48-Well-Platte überführt. Dafür wurden zunächst 400 μl Zellkulturmedium pro Well vorgelegt. Mit gekürzten Pipettenspitzen, um eine mechanische Zerstörung zu verhindern, wurden

die Tropfen samt Sphäroid vom Petrischalendeckel aufgenommen und in die Well-Platte überführt. Nach der Überführung in die Well-Platte erfolgte die mikroskopische Auswertung der Sphäroidbildung mittels Life-Imagine-Mikroskop Axio Observer Z1 der Firma Zeiss und der Software ZEN lite von Zeiss.

5.2.10. Sphäroidprobengenerierung für Schnittbilder

In Zusammenarbeit mit dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Jena wurden Schnittbilder von Sphäroiden angefertigt. Dafür wurden die Sphäroide analog zur in Kap. 5.2.9 beschriebenen Methode angesetzt. Es wurde eine unbehandelte Kontrolle und Sphäroide mit Zusatz von 0,01 mmol/l HgCl₂ erzeugt. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Sphäroide in 2,5%ige Glutaraldehyd-Lösung überführt. Die so vorbereiteten Proben wurden für alle weiteren Vorgänge ans Elektronenmikroskopische Zentrum verbracht.

5.3. Explantatkultur

5.3.1. Präparation der Explantate

Nach der Entgegennahme der Plazenta im Kreißsaal wurde diese in einem Gefäß innerhalb von 10 min ins Labor verbracht und dort sofort auf Kühllakus gelagert, um einen vorzeitigen Gewebeerfall zu verhindern. Zunächst wurde die Plazenta in vier Quadranten eingeteilt und mit Hilfe eines Skalpells entsprechend eingeschnitten. Es wurden aus der frischen Schnittfläche ca. 100 mg schwere Stücke villösen Gewebes stumpf abgelöst, um die Gewebestruktur möglichst nicht zu zerstören. Diese Stücke wurden 2x in gekühltem PBS mit 1 % P/S gewaschen. So wurde das Blut aus dem Gewebe entfernt. Das P/S sollte die Kontaminationsgefahr vor allem bei einer vaginalen Geburt vermindern.

Die Gewebestücke wurden auf Glaspetrischalen abgetupft und mittels einer Feinwaage auf 100 mg (± 5 mg) abgewogen. Die so abgewogenen Gewebestücke wurden in vier möglichst gleich große Stücke geteilt. So entstanden die eigentlichen ca. 25 mg schweren Explantate. Diese vier, welche in Summe das Ausgangsgewicht von 100 mg erreichten, wurden in eine 12-Well-Platte mit jeweils 2 ml Explantatkulturmedium gegeben. Das Explantatkulturmedium enthielt 50 % F-12, 50 % RPMI, 10 % FKS und 1 % P/S. Anschließend wurde die fertige Explantatkultur bei 37°C, 5 % CO₂

und 97 % Luftfeuchtigkeit im Plazentakulturschrank inkubiert. Alle 24 h wurde der Kulturüberstand abgenommen und durch frisches Explantatkulturmedium ersetzt. Zur Protokolletablierung wurden zunächst Explantate ohne Zusatz von Metalllösungen für 144 h kultiviert (n=3). Um den Einfluss der Metalle zu untersuchen, erfolgte nach der Protokolletablierung eine weitere Versuchsreihe an drei neuen Plazenten. Die Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentration erfolgte in diesem Fall nach einer 24 h Erholungszeit nach Präparation der Explantate ebenfalls für 24 h analog zum Versuchsansatz in der Zellkultur. Im Anschluss erfolgte die weitere Kultivierung mit Explantatkulturmedium bis zu einer Gesamtkulturdauer von 72 h.

5.3.2. MTS-Assay

Nach dem Anlegen der Explantatkultur wie in Kap. [5.3.1](#) beschrieben und Ablauf der entsprechenden Kulturdauer wurde ein MTS-Assay am Gewebe durchgeführt. Die Kulturdauer ergab sich parallel zur Kulturdauer für die Parameterbestimmung im Kulturüberstand und die Immunhistochemie. Somit ergaben sich die Zeitpunkte 0, 24, 48 und 72 h nach Präparation der Explantate.

Für die Durchführung des MTS-Assays am Plazentagewebe wurde zunächst der Kulturüberstand abgenommen und durch 500 μ l DMEM ohne Phenolrot ersetzt. Es wurden pro Well 100 μ l MTS-Reagenz zugegeben. Der Ansatz wurde nun für 4 h im Plazentakulturschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gewebe sorgfältig aus den Wells entfernt. Anschließend wurde der gefärbte Überstand in eine 96-Well-Platte analog zum MTS-Assay mit der Zellkultur umpipettiert. So entstanden pro Explantatüberstand Quadruplikate von je 120 μ l Volumen für die anschließende Messung mit dem Spectrometer.

5.3.3. Parameterbestimmung im Kulturüberstand

Analog zur Parametermessung im Kulturüberstand der Zellkultur erfolgte diese auch bei der Explantatkultur. Es wurden die Parameter Glukose, Laktat, LDH, Estradiol, Progesteron und β -hCG bestimmt. Alle 24 h wurden SN-Proben entnommen und jeweils frisches Kulturmedium bzw. Testmedium mit Metallzusatz auf die Explantate gegeben. Ebenso wie in der Zellkultur wurden die Proben im gefrorenen Zustand für die Messung der Parameter schnellstmöglich ins Institut für klinische Chemie der Universität Jena verbracht und dort mit den in Kap. [5.2.7](#) beschriebenen Methoden untersucht.

5.3.4. Immunhistochemie

Vorbereitung von Gewebeschnitten für Färbungen

Analog zum MTS-Assay am Plazentagewebe wurden Explantate für immunhistochemische Färbungen gewonnen. Dies erfolgte ebenso nach 0, 24, 48 und 72 h Kulturdauer. Dafür wurden die Explantate aus den Wells in Einbettbehälter mit 5%iger Formalinlösung gegeben, um das Gewebe zu konservieren. Nach mindestens 24 h in der Formalinlösung wurden die Explantate in Einbettkassetten gelegt und in 70%iger Ethanollösung gelagert. So vorbereitet wurden die Explantate im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena mittels Einbettautomaten in Paraffin eingebettet. Aus den entstandenen Paraffinblöcken wurden 5 μm dicke Schnitte am Mikrotom angefertigt, von denen jeweils 2 Explantatgewebeschnitte auf einen Superfost-Objekträger aufgebracht wurde und anschließend getrocknet wurden.

Ansetzen der Lösungen für die Färbungen

In Vorbereitung auf die Färbung mussten die benötigten Lösungen angesetzt werden, indem die entsprechenden Mengen an Chemikalien in dH_2O gelöst wurden.

- Citronensäure: 5,25 g Citronensäure in 250 ml dH_2O
- Natriumcitrat: 29,41 g Natriumcitrat in 1000 ml dH_2O

Tabelle 5.4.: 10faches PBS in 1000 ml dH_2O

Stoff	Menge	entspricht
NaCl	1,37 mol/l	80,1 g/l
KCl	27 mmol/l	2,0 g/l
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,1 mol/l	17,799 g/l
KH_2PO_4	20 mmol/l	2,74 g/l

Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst mittels absteigender Ethanolreihe entparafiniert (2x Xylol, 2x 100 % Ethanol, 2x 96 %

Ethanol, 2x 70 % Ethanol). Die endogene Peroxidase, welche falsch positive Färbungen erzeugen kann, wurde durch eine Inkubation mit 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung blockiert. Nach Spülung mit PBS erfolgte eine Demaskierung der Proteine im Gewebe durch eine Hitzevorbehandlung für 7 min bei 95 °C und einem pH-Wert von 6,0. Dazu wurde ein Natriumcitratpuffer mit pH 6,0 aus Citronensäure, Natriumcitrat und dH₂O genutzt. Nach erneutem Waschen erfolgte die Überführung der Objektträger in eine feuchte Kammer. Anschließend wurden die Schnitte für 20 min mit Blockierungsserum behandelt. Das Blockierungsserum verhindert die unspezifische Bindung des Primärantikörpers durch Absättigung elektrostatischer Ladungen im Gewebe. Dieses ließ sich ebenso wie der Sekundär-AK und der ABC-Komplex mit Hilfe des verwendeten Detektionskits Vectastain Elite mouse-IgG für die Ki-67-Färbung bzw. Vectastain Elite rabbit-IgG für cleavedPARP-Färbung herstellen. Die Lösungen wurden entsprechend der Herstellerangaben aus den im Detektionskit befindlichen Lösungen in sterilem PBS angesetzt. Nach dem Blockierungsserum wurden die Gewebeschnitte mit dem Primär-AK in der entsprechenden Verdünnung für 60 min inkubiert. Dafür wurde die AK-Lösung aus AntibodyDiluent with BackgroundReducingComponents von Dako und der entsprechenden Menge AK hergestellt. Es wurde der Ki-67-AK in einer Verdünnung von 1:50 und der cleavedPARP-AK in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Eine Negativkontrolle, um eine spezifische Bindung des Sekundär-AK an den Primär-AK nachzuweisen, wurde lediglich mit AntibodyDiluent behandelt. Im Anschluss an die Inkubation mit dem Primär-AK erfolgte nach erneutem Waschen mit PBS die Behandlung mit dem Sekundär-AK. Dieser soll als biotinylierter Link-AK den Primär-AK auf der einen Seite und den Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Lösung) auf der anderen Seite binden. Die ABC-Lösung muss mind. 30 min vor dessen Anwendung ruhen, damit sich die für die Antigen-Antikörperreaktion benötigten Enzymkomplexe bilden können. Nach Inkubation mit der ABC-Lösung erfolgte die Substratfärbung mit DAB-Lösung mittels Peroxidasereaktion. Eine Gegenfärbung wurde mit saurem Hämalaun nach Mayer und anschließendem Bläuen unter fließendem Leitungswasser vorgenommen. Es folgte die Dehydrierung der Explantatgewebeschnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit 2x 70 %, 2x 96 %, 2x 100 % Ethanol, Ethanol/Xylol-Mischung und 2x Xylol. Im Anschluss wurden die Schnitte luftdicht eingedeckt mit Histofluid und einem Deckgläschen. Nach dem Trocknen der fertigen Präparate wurden diese mikroskopisch am Axioplan 2 imaging Mikroskop der Firma Zeiss ausgewertet und mit der AxioCam HRc und der Axiovision 4.8-Software festgehalten.

5.4. Statistische Methoden

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte unter Verwendung Microsoft® Excel für Mac Version 16.37 und IBM® SPSS® Statistics Version 24.

Aufgrund der geringen Anzahl von Versuchswiederholungen von maximal $n=3$ konnte trotz des Vorhandenseins von biologischen Proben nicht auf die Überprüfung der Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test verzichtet werden.

Dieser zeigte, dass die vorhandenen Daten nicht in allen Fällen einer Normalverteilung entsprachen. Somit musste der T-Test als statistisches Testverfahren ausgeschlossen werden. Es wurde stattdessen der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben verwendet, welcher keine Normalverteilung verlangt. Als zu erreichendes Signifikanzniveau wurde ein p -Wert $<0,05$ festgelegt.

Für den Vergleich der Methoden untereinander konnte aufgrund der geringen Wiederholungszahl und somit nicht ausreichend belastbarer Daten keine vollständige Regressionsanalyse durchgeführt werden. Es wurde stattdessen zum Vergleich der Root-Mean-Square-Error (RSME; dt.: Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme) genutzt, welcher die Abweichungen von zwei Datenreihen zueinander ermittelt. Die ideale Übereinstimmung wird durch einen RMSE von 0 gekennzeichnet, d.h. je näher die Werte des RMSE an 0 heranreichen, desto besser stimmen zwei Kurven überein. Werte von $\leq 0,3$ wurden als starke Übereinstimmung zwischen 0,3 und $\leq 0,6$ als mittlere und $>0,6$ als eher schwache Übereinstimmung gewertet. Für die Berechnung des RMSE wurden die Mittelwerte der Rohdaten aus jeder Versuchsdurchführung benutzt. Im Falle der Versuche an Plazentaexplantaten wurden die Rohdaten zuvor auf das Explantatgewicht normiert.

6. Ergebnisse

Nachfolgendes Schema soll die Abfolge der Betrachtungen in diesem Kapitel verdeutlichen, um eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten (vgl. Abb. 6.1).

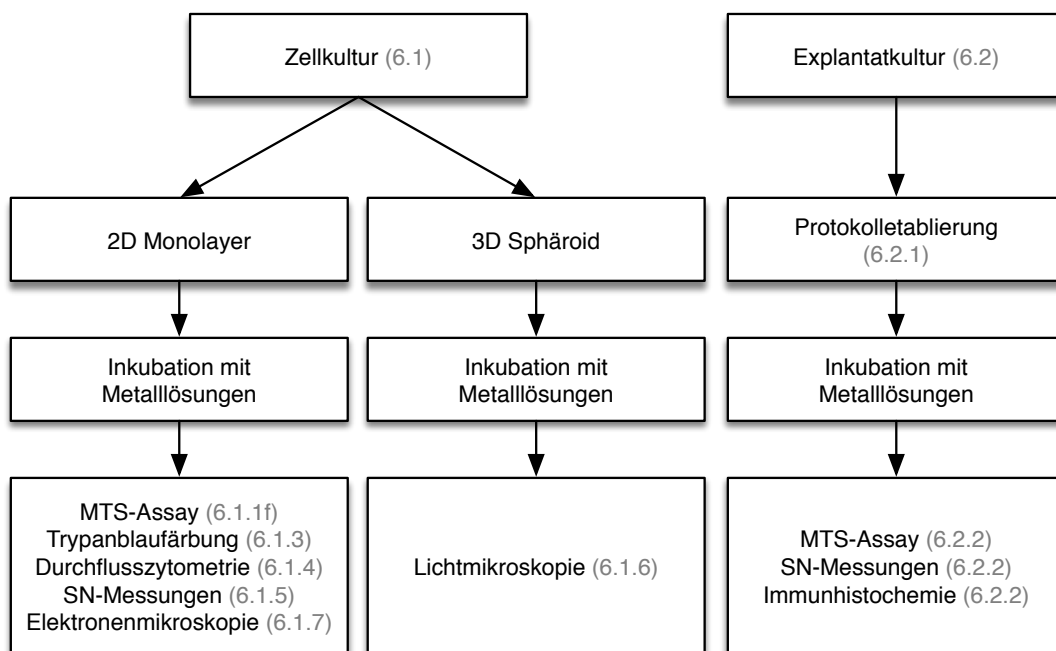


Abb. 6.1.: Übersichtsschema zu den Versuchsergebnissen

Ausgehend von der Zellkultur bzw. Explantatkultur symbolisieren die Pfeile nachfolgende Arbeitsschritte. In Klammern finden sich die zugehörigen Kapitelnummern. MTS (Tetrazoliumfarbstoff 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium); SN (Kulturüberstand)

Zunächst werden die Ergebnisse der Zellkulturversuche und anschließend die Ergebnisse der Explantatkultur betrachtet, bevor schlussendlich der Vergleich der Methoden miteinander erfolgt.

6.1. Ergebnisse der Zellkulturversuche

Im ersten Teil dieses Kapitels sollen die Ergebnisse der 2D- und 3D-Zellkultur dargestellt werden.

6.1.1. Einfluss der Metallbehandlung auf die metabolische Aktivität der Trophoblastzellen

Zunächst soll der Einfluss einer Inkubation von HTR8/SVneo und JEG3 Zellen mit verschiedenen Metalllösungen auf die metabolische Aktivität als Maßzahl für die Vitalität ermittelt im MTS-Assay dargestellt werden.

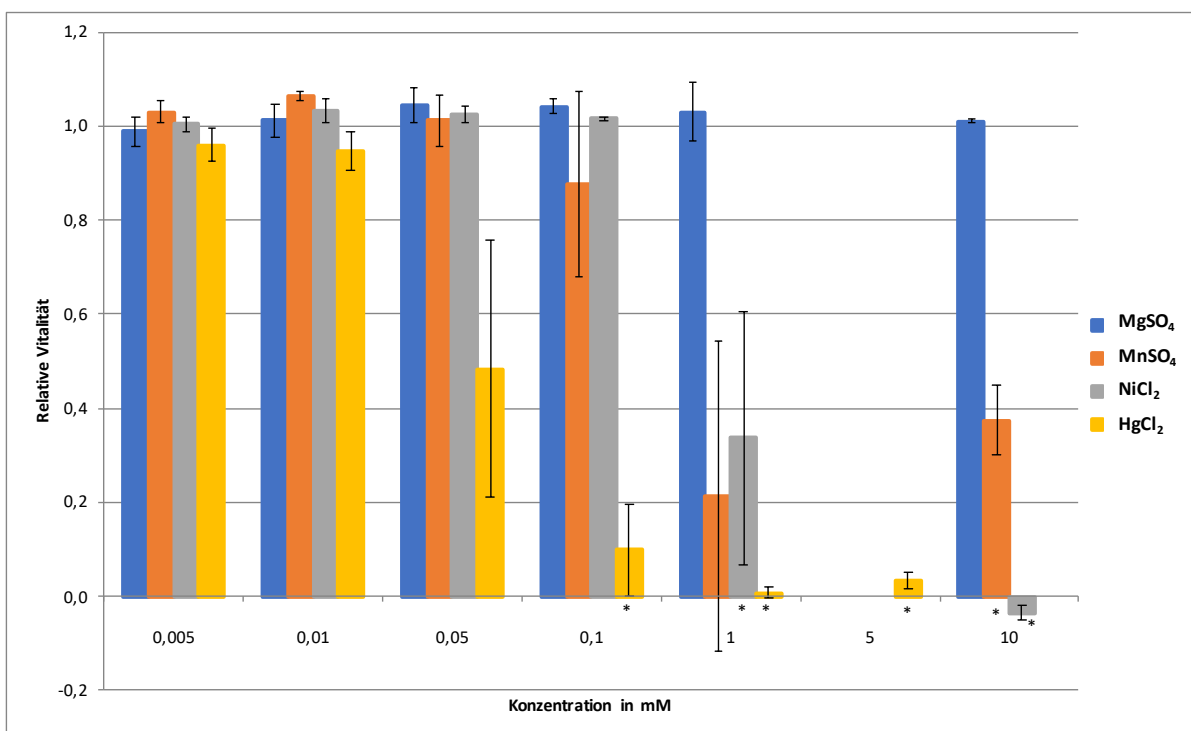


Abb. 6.2.: Relative Vitalität von HTR8/SVneo Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen mittels MTS-Assay.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Vitalität von HTR8/SVneo Zellen nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentration gemessen im MTS-Assay. Die Normierung erfolgte auf die unbehandelte Kontrolle (jeweils Duplikate in n=3 Versuchswiederholungen). Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl₂ mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. *p<0,05 (Mann-Whitney-U-Test, SPSS)

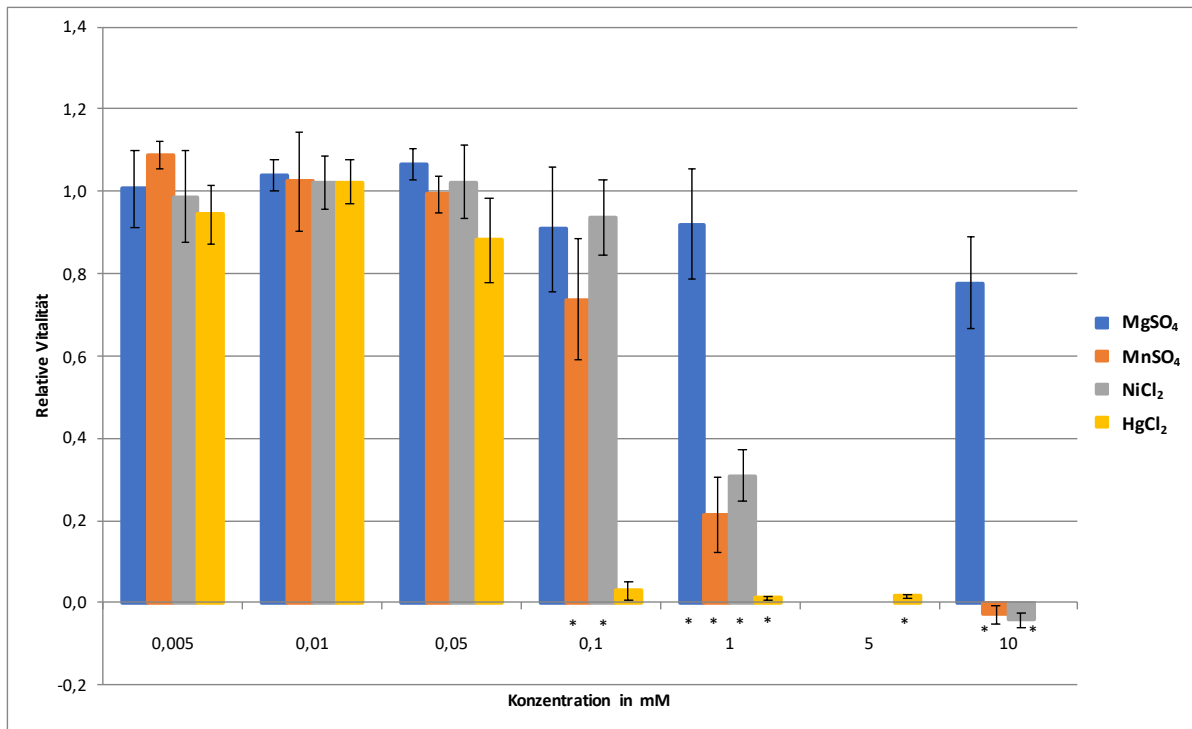


Abb. 6.3.: Relative Vitalität von JEG3 Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen mittels MTS-Assay.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Vitalität von JEG3 Zellen nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentration gemessen im MTS-Assay. Die Normierung erfolgte auf die unbehandelte Kontrolle (jeweils Duplikate in n=3 Versuchswiederholungen). Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl₂ mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. *p<0,05 (Mann-Whitney-U-Test, SPSS)

Es ließen sich deutlich unterschiedliche Effekte auf die Vitalität der Zellen nach Inkubation mit den unterschiedlichen Metallen feststellen. Unter der Behandlung mit MgSO_4 zeigte sich über alle Konzentrationen eine mit der Kontrolle vergleichbare Vitalität. Die Vitalität der mit HgCl_2 behandelten Zellen fiel bei zunehmender Konzentration der Metalllösung steil ab und zeigte den stärksten Effekt der verwendeten Metalle. Die unter Behandlung mit MnSO_4 - und NiCl_2 -Lösung gemessene Vitalität lag jeweils zwischen der von MgSO_4 und HgCl_2 . Ein deutlicher Unterschied zwischen MnSO_4 und NiCl_2 ließ sich nicht erkennen. Dieses Ergebnis lieferten die Versuchsreihen mit beiden verwendeten Zelllinien in ähnlicher Weise (Abb. 6.2 und 6.3). Es besteht weiterhin eine nachlassende metabolische Aktivität mit steigender Metallkonzentration bei allen Metallen außer MgSO_4 , welches auch in hohen Konzentrationen keinen signifikanten Abfall erzeugt.

6.1.2. Einfluss einer pH-Wert-Veränderung auf Messwerte des MTS-Assays

Um auszuschließen, dass der im MTS-Assay messbare Effekt nach Inkubation mit den Metalllösungen lediglich auf pH-Wert-Veränderungen zurückzuführen ist, wurde der pH-Wert des Kulturmediums manipuliert (s. Kapitel 5.2.4). Anhand von fünf verschiedenen Medien im pH-Range von 6,6 bis 8,6, mit denen JEG3 Zellen für 24 h inkubierten, konnte kein Einfluss des pH-Wertes im untersuchten Messbereich auf die Vitalität der Zellen festgestellt werden (Abb. 6.4).

6.1.3. Einfluss der Metallbehandlung auf Zählwerte nach Trypanblaufärbung

Der folgende Abschnitt enthält die Ergebnisse der visuellen Bestimmung der Zelltodrate mittels Trypanblaufärbung.

Es zeigte sich eine deutliche erhöhte Zelltodrate nach Inkubation mit HgCl_2 und NiCl_2 mit steigenden Konzentrationen. Die mit MgSO_4 behandelten Proben wiesen bis 1 mM eine ähnliche Anzahl toter Zellen wie die Kontrollproben auf. Lediglich bei 10 mM MgSO_4 kam es zu einem geringen Anstieg der Zelltodrate. Nach Inkubation mit MnSO_4 lag die Zelltodrate im Bereich zwischen MgSO_4 und HgCl_2 (Abb. 6.5).

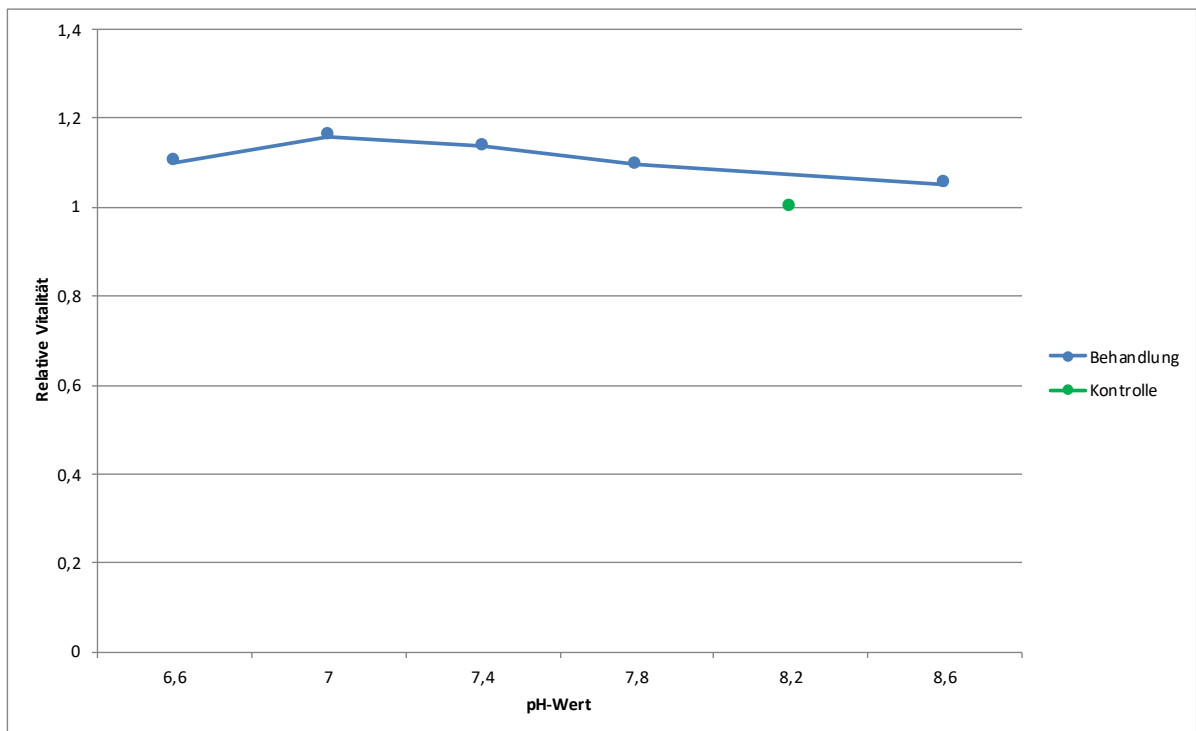


Abb. 6.4.: Orientierender Versuch zur relativen Vitalität von JEG3 Zellen bei verschiedenen pH-Werten gemessen mittels MTS-Assay.

Dargestellt ist die Vitalität von JEG3 Zellen nach 24 h Inkubation mit pH-Wert-verändertem Zellkulturmedium gemessen im MTS-Assay. Es erfolgte eine Normierung auf die Kontrolle, die mit unverändertem Zellkulturmedium inkubiert wurde (Duplikate, n=1).

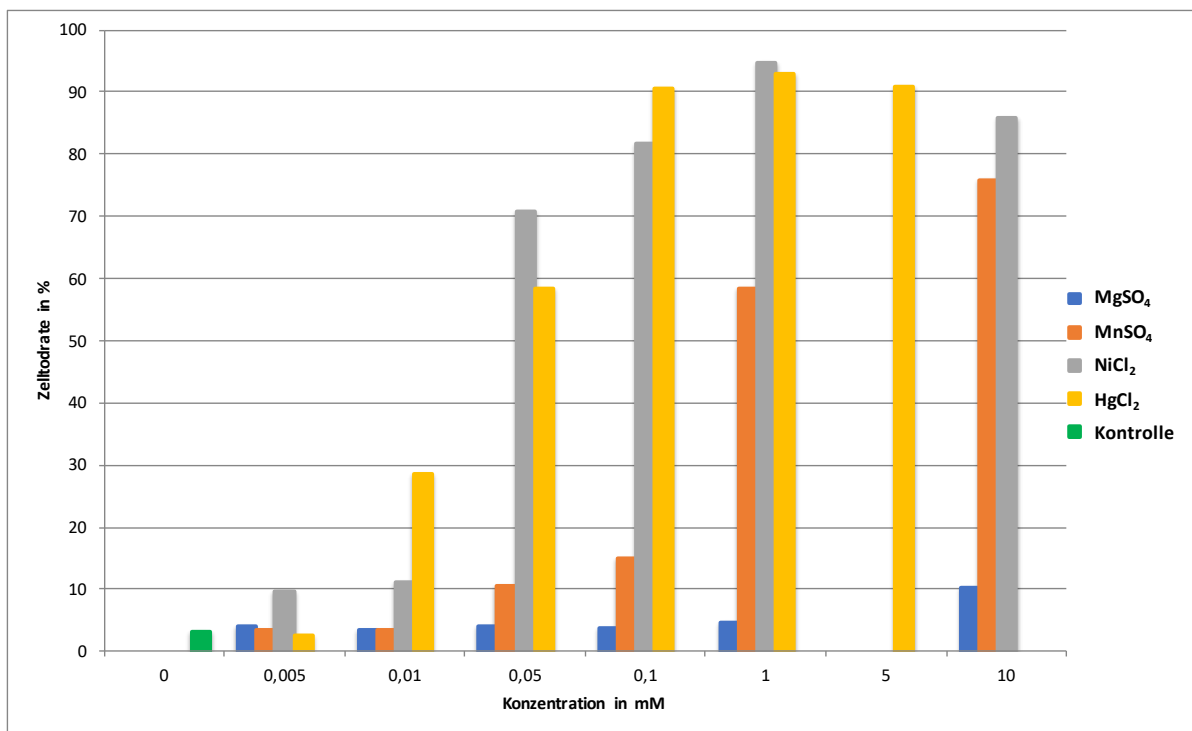


Abb. 6.5.: Orientierender Versuch zur Ermittlung der Zelltodrate von HTR8/SVneo Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen mittels Trypanblaufärbung

Dargestellt ist die Zelltodrate in % von HTR8/SVneo Zellen nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentration. Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl₂ mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Die Zelltodrate wurde visuell nach Färbung der toten Zellen mit Trypanblau ermittelt. Es erfolgte die Normierung der Ergebnisse der behandelten Proben auf die Ergebnisse der unbehandelten Kontrolle (n=1).

6.1.4. Einfluss der Metallbehandlung auf Messwerte in der Durchflusszytometrie

Zur Verifizierung der bisherigen Ergebnisse erfolgte die Durchflusszytometrie nach Färbung mit PJ und AnnV, welche die folgenden Ergebnisse lieferte.

Es ließen sich ähnlich zur Färbung mit Trypanblau auch in der Durchflusszytometrie für MgSO_4 über den gesamten Konzentrationsbereich keine Änderung der Zelltodrate im Vergleich zur Kontrolle nachweisen. Den stärksten Anstieg der Zelltodrate gegenüber der Kontrolle zeigte wiederum HgCl_2 mit steigenden Konzentrationen. Die Inkubation mit NiCl_2 - und MnSO_4 -Lösung erbrachte in den höheren Konzentrationen eine Zelltodrate, welche höher lag als die der Kontrolle, jedoch niedriger als die Zelltodrate nach Inkubation mit HgCl_2 .

In den niedrigeren Konzentrationsbereichen von 0,005 mM bis 0,05 mM für HTR8/SVneo Zellen bzw. 0,1 mM für JEG3 Zellen ließ sich für keines der verwendeten Metalle ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle feststellen (vgl. Abb. [6.6](#) und [6.7](#)).

6.1.5. Einfluss der Metallbehandlung auf die Konzentrationen metabolischer Parameter im Kulturüberstand

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Parameterbestimmung aus dem Kulturüberstand und der Einfluss der Metallbehandlung auf diese dargestellt. Parameter, welche in der Kultur von JEG3 Zellen gemessen wurden, sind Glukose, Laktat, LDH-Aktivität und β -hCG-Spiegel.

Einfluss der Metallbehandlung auf den Glukosespiegel

Nach Inkubation der Zellen mit Metalllösungen bis 0,05 mM wurden stets zur Kontrolle ähnliche Glukosekonzentrationen gemessen. Eine Inkubation mit MgSO_4 höherer Konzentrationen führte zu leicht, jedoch nicht signifikant höheren Glukosekonzentrationen im Kulturüberstand. Nach der Inkubation mit HgCl_2 in den Konzentrationen 0,1 mM und 1 mM stieg der Glukosespiegel signifikant an, wohingegen eine Konzentration von 5 mM zu einem signifikanten Abfall führte. Für die Inkubation mit MnSO_4 - und NiCl_2 -Lösungen zeigte sich ein Anstieg des Glukosespiegels mit steigender Metallkonzentration, mit signifikant höheren Messwerten für die höchsten Metallkonzentrationen. Bei 5 mM HgCl_2 ließ sich jedoch in allen Versuchswiederholungen ein sehr niedriger Glukosespiegel messen (vgl. Abb. [6.8](#)).

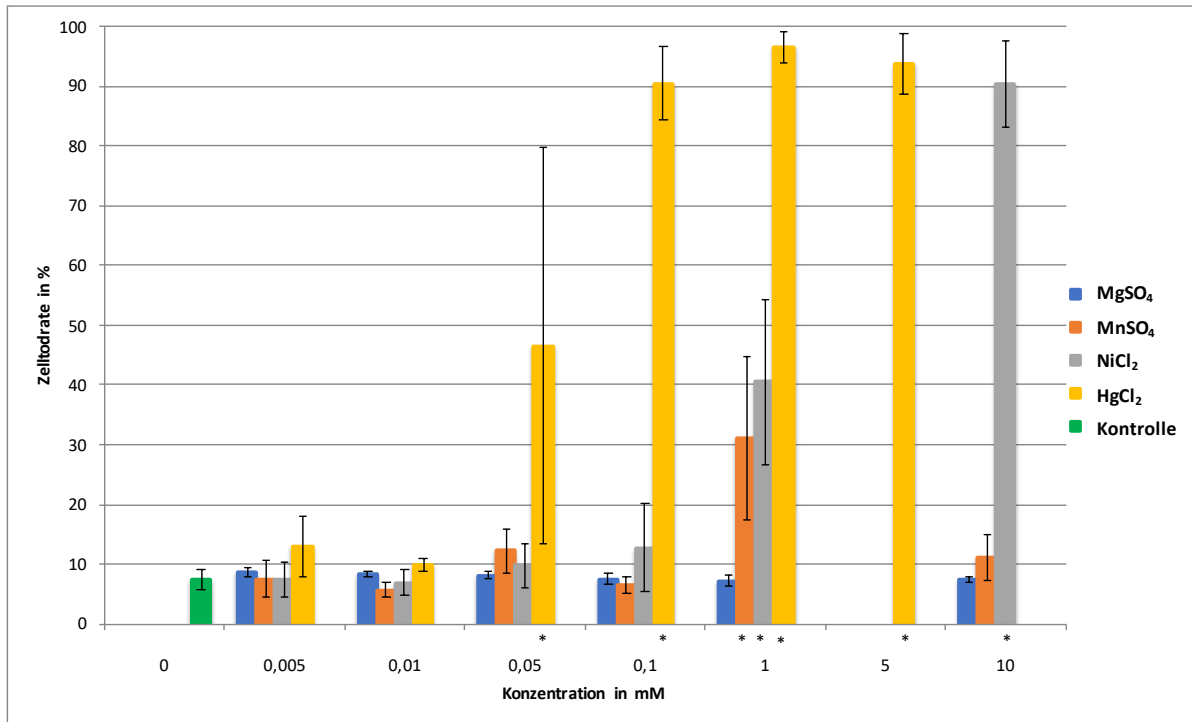


Abb. 6.6.: Zelltodrate von HTR8/SVneo Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen in der Durchflusszytometrie nach Färbung mit PJ und Ann V.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Zelltodrate in % von HTR8/SVneo Zellen nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentration. Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl₂ mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Die Ergebnisse wurden durchflusszytometrisch nach Färbung mit PJ und Ann V ermittelt. Die Inkubation der Kontrolle erfolgte mit unverändertem Zellkulturmedium (n=3). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. *p<0,05 (Mann-Whitney-U-Test, SPSS)

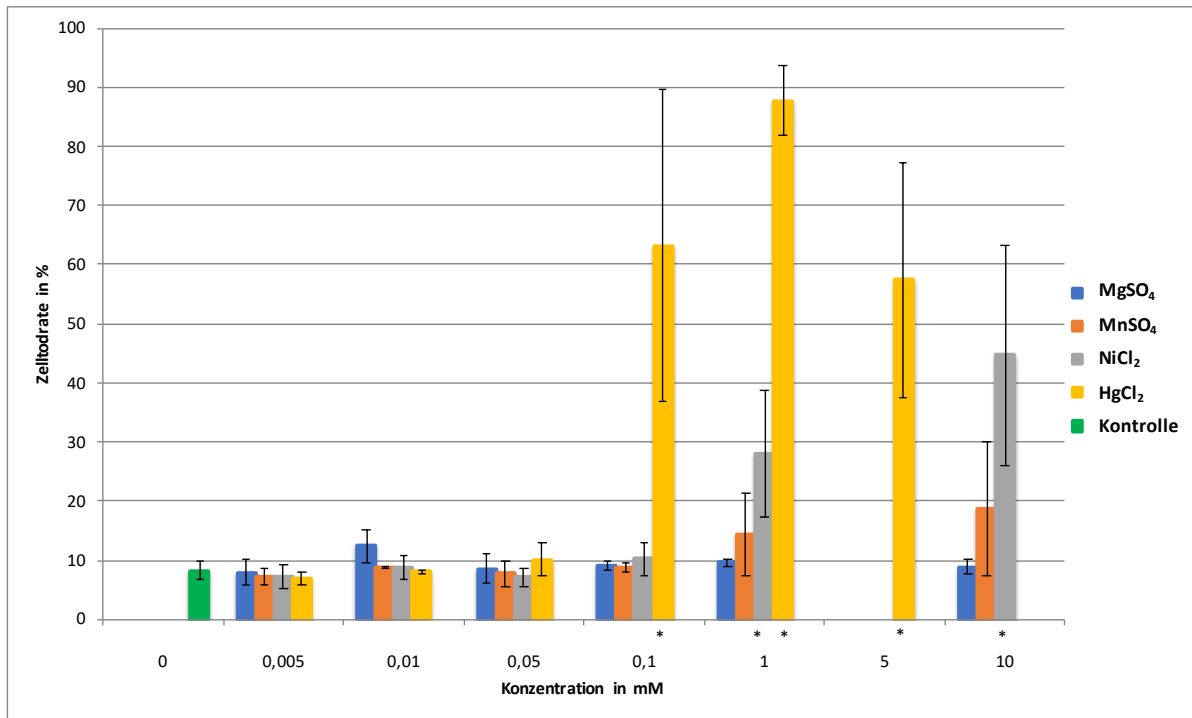


Abb. 6.7.: Zelltodrate von JEG3 Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen in der Durchflusszytometrie nach Färbung mit PJ und Ann V.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Zelltodrate in % von JEG3 Zellen nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentration. Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl₂ mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Die Ergebnisse wurde durchflusszytometrisch nach Färbung mit PJ und Ann V ermittelt. Die Inkubation der Kontrolle erfolgte mit unverändertem Zellkulturmedium (n=3). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. *p<0,05 (Mann-Whitney-U-Test, SPSS)

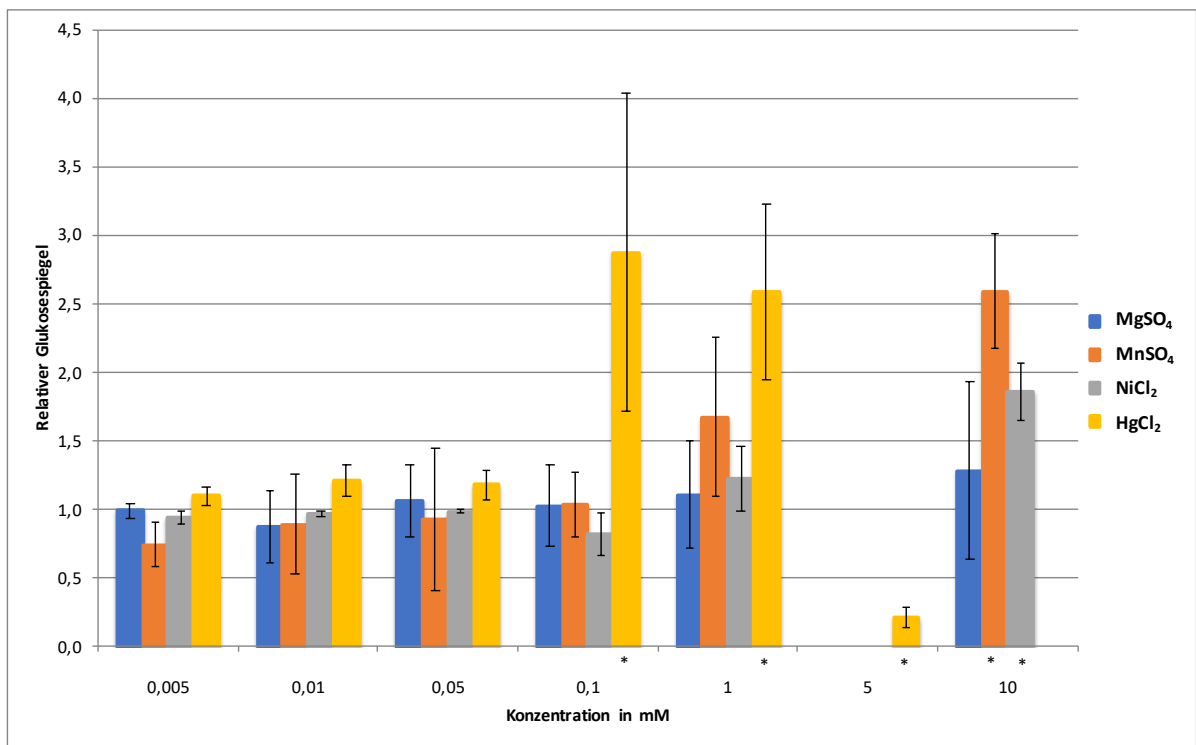


Abb. 6.8.: Relativer Glukosespiegel von JEG3 Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand.

Dargestellt sind die Mittelwerte des Glukosespiegels von JEG3 Zellen nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentration. Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl₂ mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Die Bestimmung des Glukosespiegels erfolgte im Kulturüberstand. Es wurde eine Normierung auf die unbehandelte Kontrolle vorgenommen (n=3). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. *p<0,05 (Mann-Whitney-U-Test, SPSS)

Einfluss der Metallbehandlung auf den Laktatspiegel

Über den betrachteten Konzentrationsbereich ließ sich mit steigenden Konzentrationen ein Abfall des Laktatspiegels im Vergleich zur Kontrolle bei allen Metallen außer MgSO_4 messen. Den stärksten Abfall zeigten die mit HgCl_2 behandelten Zellen. Für die Inkubation mit NiCl_2 - und MnSO_4 -Lösung lag der gemessene Abfall des Laktatspiegels jeweils zwischen dem von HgCl_2 und MgSO_4 , wobei sich zwischen NiCl_2 und MnSO_4 kein deutlicher Unterschied zeigte (vgl. Abb. 6.9).

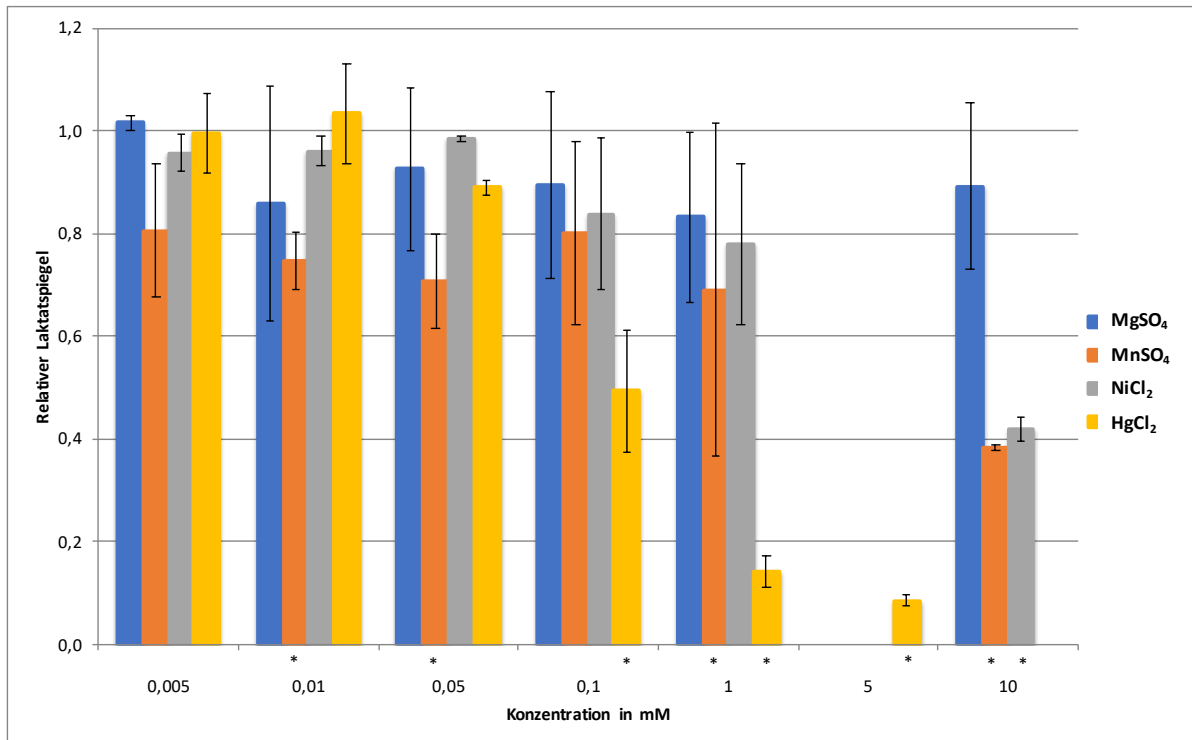


Abb. 6.9.: Relativer Laktatspiegel von JEG3 Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand.

Dargestellt sind die Mittelwerte des Laktatspiegels von JEG3 Zellen nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentration. Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl_2 mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Die Bestimmung des Laktatspiegels erfolgte im Kulturüberstand. Es wurde eine Normierung auf die unbehandelte Kontrolle vorgenommen ($n=3$). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. $*p < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test, SPSS)

Einfluss der Metallbehandlung auf die LDH-Aktivität

Die Methode der Bestimmung der LDH-Aktivität stellte sich als nicht sensitiv genug heraus, um eine Diskriminierung zwischen den unterschiedlichen Behandlungen zu ermöglichen. Die Ergebnisse lagen beim Großteil der Proben unter dem messbaren Grenzwert, sodass keine sinnvolle Auswertung der Zellkulturproben wie auch der Explantatproben bezüglich der LDH-Aktivität möglich war.

Einfluss der Metallbehandlung auf den β -hCG-Spiegel

Insgesamt zeigte sich ein hoher Schwankungsbereich zwischen den Messwerten. In der niedrigsten verwendeten Konzentration ließ sich für MgSO_4 ein etwa der Kontrolle entsprechender β -hCG-Spiegel messen. Die Werte für NiCl_2 und MnSO_4 lagen höher als bei der Kontrolle. Für HgCl_2 ließ sich ein niedrigerer Wert ermitteln.

Dennoch ließ sich bei jedem verwendeten Metall außer für die Inkubation mit MgSO_4 ein Abfall des β -hCG-Spiegels mit steigender Konzentration nachweisen (vgl. Abb. 6.10).

6.1.6. Einfluss der Metallbehandlung auf die Sphäroidbildung

Dieses Kapitel zeigt die Ergebnisse der 3D-Zellkulturversuche und die Beeinflussung dieser durch Inkubation mit verschiedenen Metalllösungen.

Von beiden Zelllinien ließen sich in der Hanging Drop Methode aus 10^4 Zellen innerhalb von 24 h Sphäroide generieren (vgl. Abb. 6.11). Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturmedium mit Zusatz von Methylcellulose im Verhältnis 1:4 zur Erhöhung der Viskosität. Es lässt sich optisch eine Zweischichtung innerhalb des Sphäroids erahnen mit hellerer äußerer und dunklerer innerer Schicht. Die Sphäroide der JEG3 Zellen waren mit mehr als $500 \mu\text{m}$ größer als die der HTR8/SVneo Zellen.

Bei der Sphäroidgenerierung unter Einfluss von HgCl_2 war ein sehr deutlicher Effekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erkennbar. HgCl_2 in einer Konzentration von $0,01 \text{ mM}$ führte in beiden Zelllinien zwar zu einer Sphäroidbildung, doch wiesen diese eine gegenüber der Kontrolle unregelmäßigere Oberfläche auf. Bei Verwendung höherer Konzentrationen von HgCl_2 konnten in HTR8/SVneo und JEG3 Zellen nur lose Zellaggregate detektiert werden (vgl. Abb. 6.12 a-c) & 6.13 a-c).

Unter Zugabe von NiCl_2 und MnSO_4 ließ sich in sämtlichen getesteten Konzentrationen bei beiden Zelllinien Sphäroide generieren. Bezogen auf die höchsten verwendeten Konzentrationen der Metalllösungen wiesen die generierten Sphäroide im

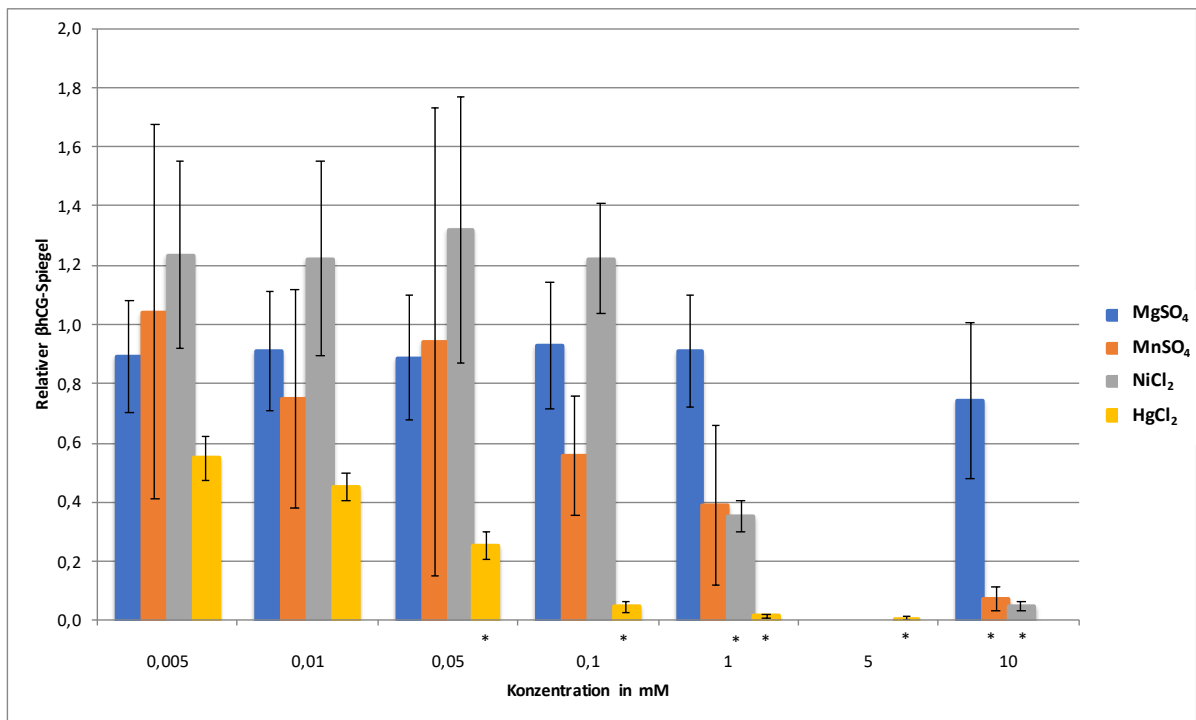
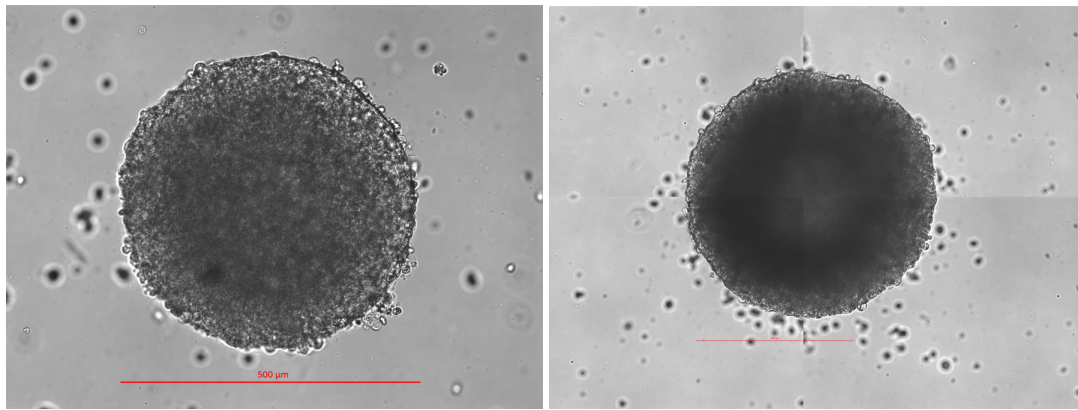


Abb. 6.10.: Relativer β -hCG-Spiegel von JEG3 Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand.

Dargestellt sind die Mittelwerte des β -hCG-Spiegels von JEG3 Zellen nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentration. Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl₂ mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Die Bestimmung des β -hCG-Spiegels erfolgte im Kulturüberstand. Es wurde eine Normierung auf die unbehandelte Kontrolle vorgenommen (n=3). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. *p<0,05 (Mann-Whitney-U-Test, SPSS)



(a) HTR8/SVneo

(b) JEG3

Abb. 6.11.: Sphäroid von HTR8/SVneo Zellen und JEG3 Zellen ohne Zusatz von Metalllösungen.

Abgebildet sind ein Sphäroid aus a) HTR8/SVneo Zellen und ein Sphäroid aus b) JEG3 Zellen nach 24 h Kulturdauer. Es wurden in einem orientierenden Versuch zur Sphäroidgenerierung 10^4 Zellen pro Tropfen in der Hanging Drop Methode verwandt. Dem Kulturmedium wurde Methylcellulose im Verhältnis 1:4 zugefügt. Eine Zugabe von Metalllösungen erfolgte bei diesen nicht. Der Maßstab kennzeichnet jeweils 500 μm . (orientierender Versuch, n=1)

Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine weniger runde, kompakte Struktur auf mit z.T. löchrigem Erscheinungsbild. Unter Verwendung von 0,5 mM MnSO_4 bildete sich aus den JEG3 Zellen ein leicht deformierter Sphäroid (siehe Abb. [6.13 i](#)). Insgesamt beeinflussten diese beiden Metalle die Sphäroidgenerierung auf ähnliche Weise (vgl. Abb. [6.12 d-i](#)) & [6.13 d-i](#)). Unter Zugabe von MgSO_4 ließ sich kein Einfluss auf die Sphäroidbildung erkennen (vgl. Abb. [6.12 j-1](#)) & [6.13 j-1](#)). Insgesamt lässt sich eine unterschiedlich ausgeprägte Beeinflussung der Sphäroidbildung durch die verschiedenen Metalle erkennen. Eine Diskriminierung zwischen NiCl_2 und MnSO_4 war nicht möglich.

In Kooperation mit dem elektronenmikroskopischen Zentrum gelang es, lichtmikroskopischen Aufnahmen von Schnittbildern der Sphäroide zu erstellen (vgl. Abb. [6.14](#) & [6.15](#)). Die HTR8/SVneo Zellen bildeten eine Kugel mit erkennbarer Schichtung von einer helleren Außen- und dunklerer Innenschicht. Teilweise wurde der apoptotische Kern bei der Präparation herausgelöst. Die Kugeloberfläche erschien glatt und regelmäßig (vgl. Abb. [6.14 a](#)) & c)). Unter Inkubation mit 0,01 mM HgCl_2 -Kulturlösung gelang es ebenfalls noch kugelige Sphäroide mit Schichtung zu generieren. Diese wiesen im Vergleich zur Kontrolle eine unregelmäßigere Oberfläche auf (vgl. Abb. [6.14 b](#)) & d)). Es gelang weiterhin von JEG3 Zellen kugelige Sphäroide zu

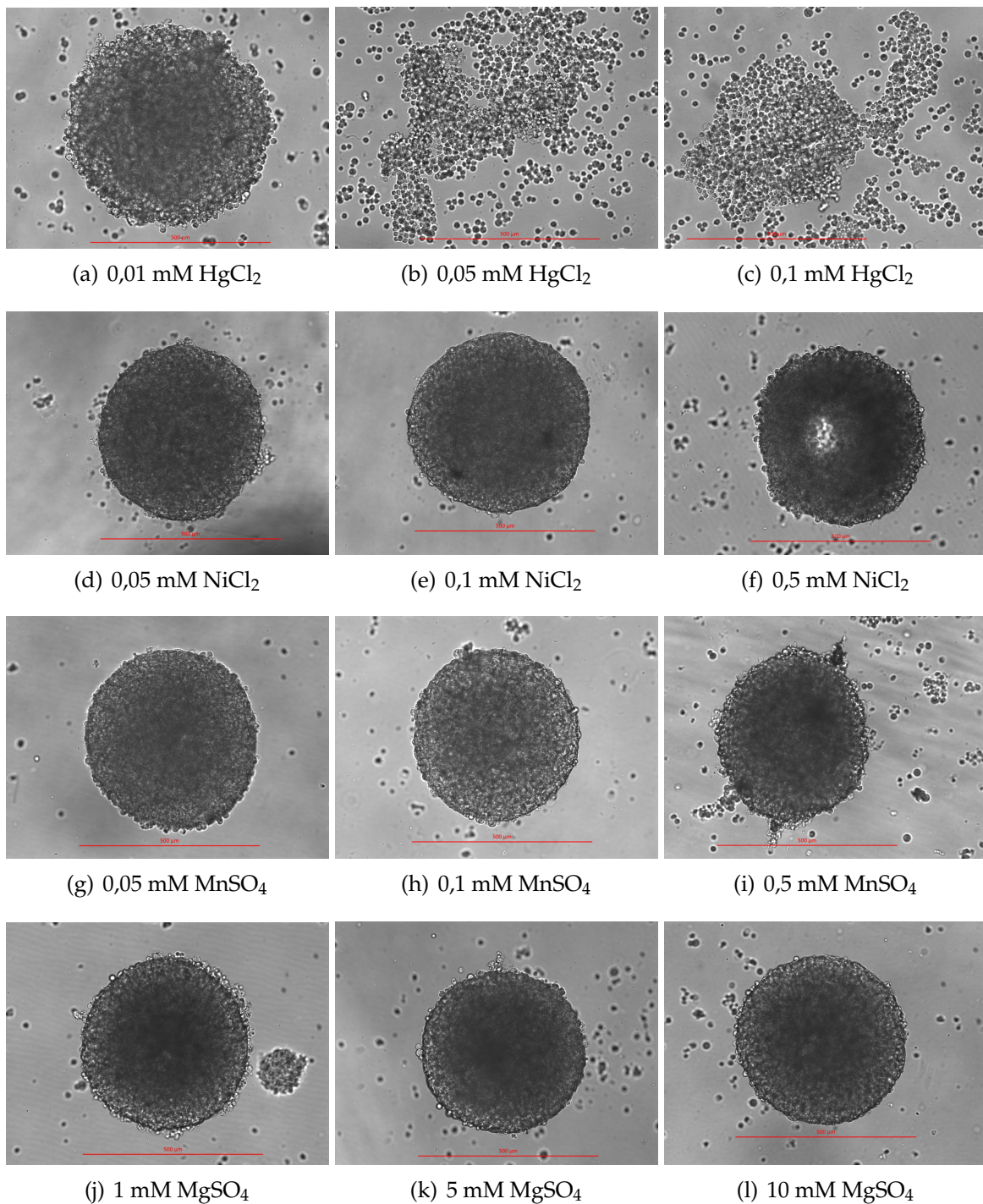


Abb. 6.12.: Sphäroide von HTR8/SVneo Zellen

Abgebildet sind Sphäroide aus jeweils 10^4 HTR8/SVneo Zellen unter Zugabe verschiedener Konzentrationen von Metallsalzen nach einer Kulturdauer von 24 h. Der Maßstab kennzeichnet jeweils $500\ \mu\text{m}$. (orientierender Versuch, n=1)

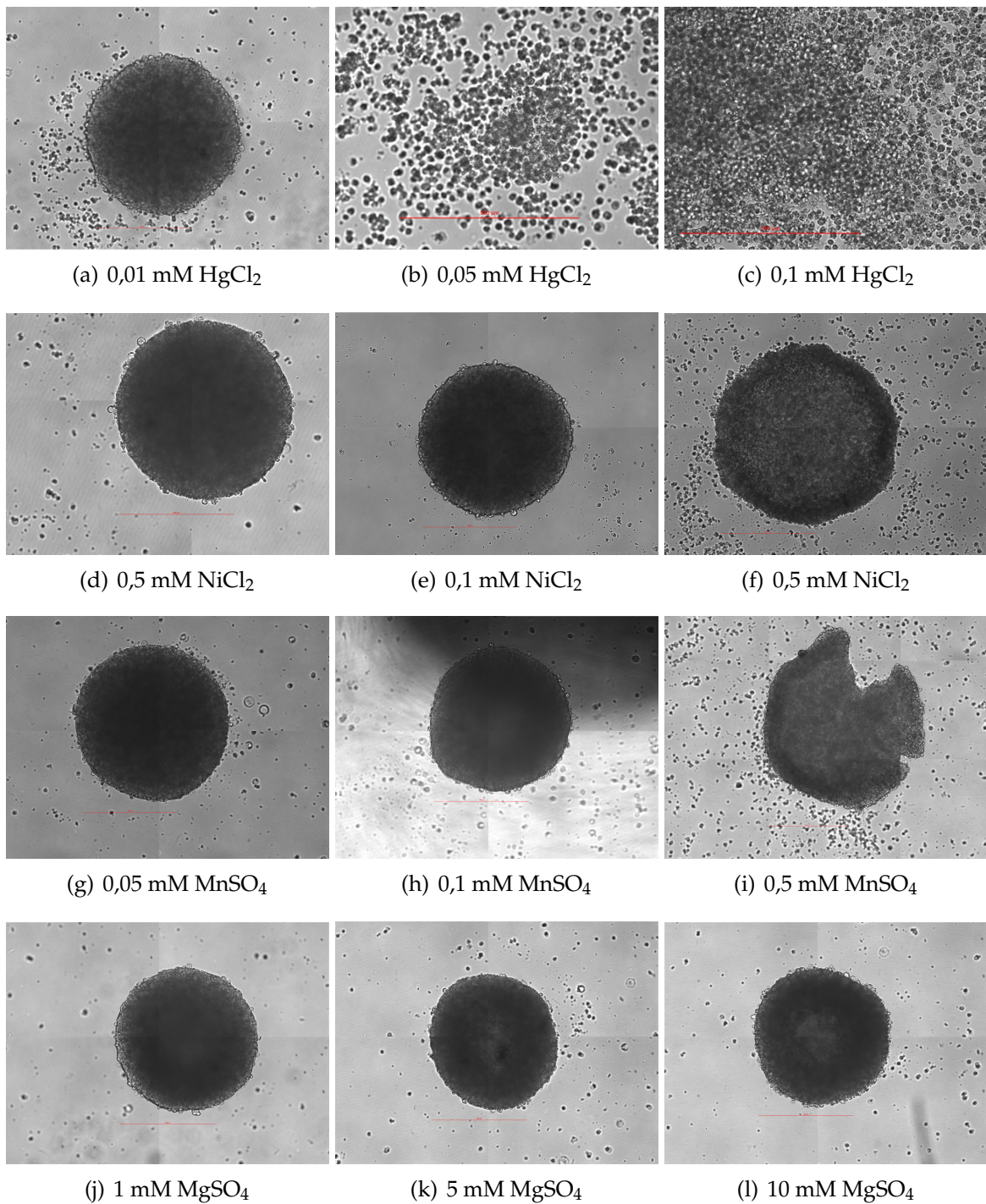


Abb. 6.13.: Sphäroide von JEG3 Zellen

Abgebildet sind Sphäroide aus jeweils 10^4 JEG3 Zellen unter Zugabe verschiedener Konzentrationen von Metallsalzen nach einer Kulturdauer von 24 h. Der Maßstab kennzeichnet jeweils $500 \mu\text{m}$. (orientierender Versuch, $n=1$)

bilden. Diese wiesen eine undeutlichere Schichtung auf und hatten eine unregelmäßigere Oberfläche als die HTR8/SVneo-Sphäroide (vgl. Abb. 6.15 a) & c)). Unter Verwendung von 0,01 mM HgCl₂-Kulturlösung ließen sich keine kugeligen Sphäroide abbilden. Es handelte sich vielmehr um unförmige Zellaggregate mit unregelmäßiger Oberfläche, sodass eine Störung der Sphäroidbildung durch eine Inkubation mit HgCl₂ in subletaler Konzentration zu beobachten war (vgl. Abb. 6.15 b) & d)).

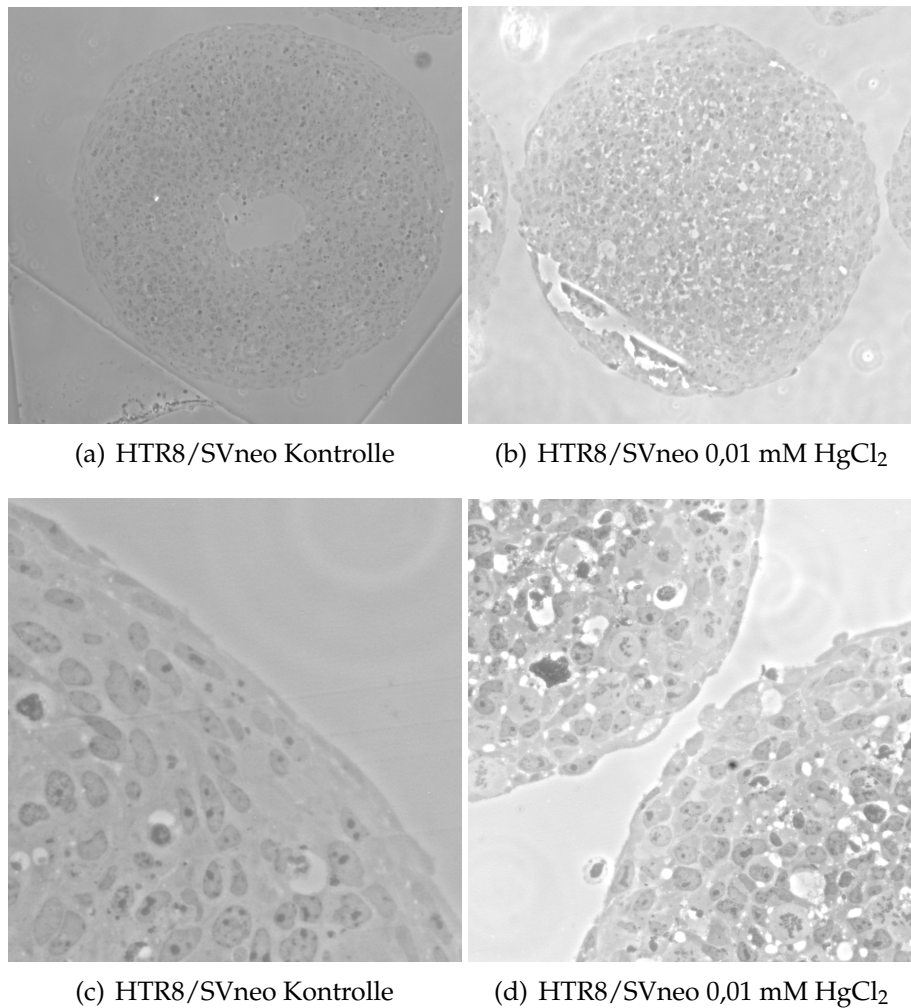


Abb. 6.14.: Schnittbilder von Sphäroiden von HTR8/SVneo Zellen

Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen von Schnittbildern von Sphäroiden der unbehandelten Kontrollen (linke Spalte) sowie unter Inkubation mit 0,01 mM HgCl₂-Kulturlösung (rechte Spalte) in verschiedenen Vergrößerungen. Es erfolgte jeweils eine Kultivierung von 24 h in unverändertem Zellkulturmedium bzw. unter Zugabe von 0,01 mM HgCl₂. Einbettung und Anfertigung der Schnitte erfolgte durch das Elektronenmikroskopische Zentrum. (orientierender Versuch, n=1)

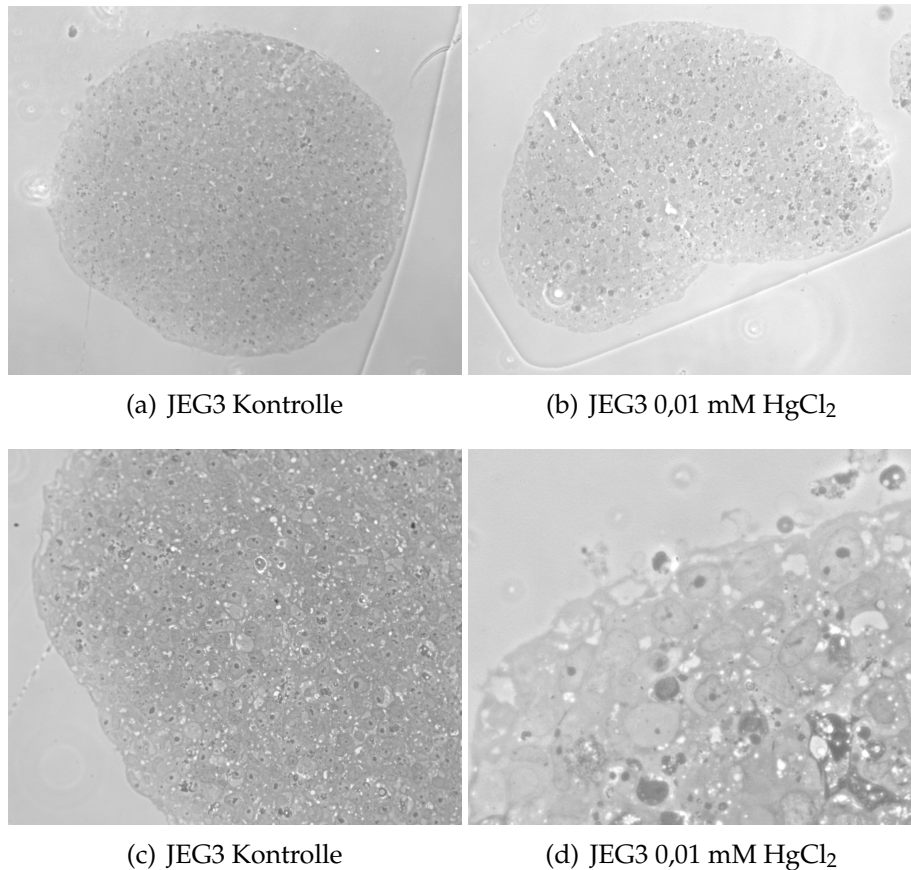


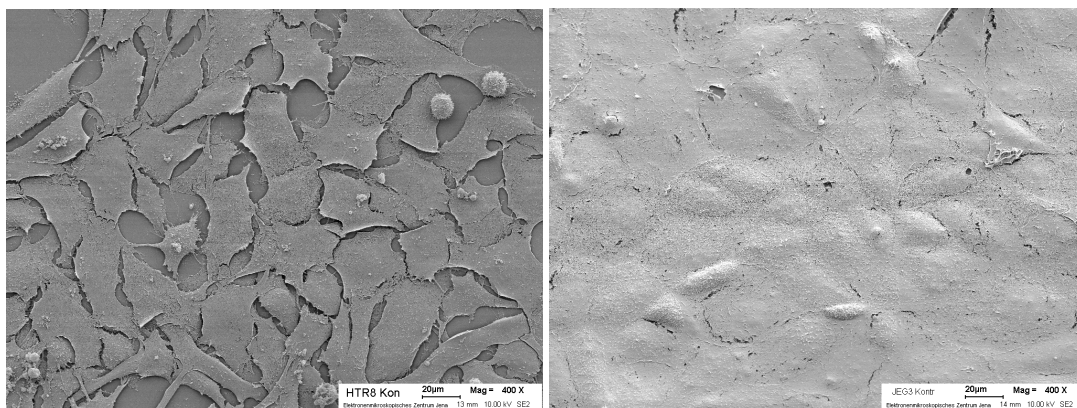
Abb. 6.15.: Schnittbilder von Späroiden von JEG3 Zellen

Abgebildet sind lichtmikroskopische Aufnahmen von Schnittbildern von Sphäroiden der unbehandelten Kontrollen (linke Spalte) sowie unter Inkubation mit 0,01 mM HgCl₂-Kulturlösung (rechte Spalte). Es erfolgte jeweils eine Kultivierung von 24 h in unverändertem Zellkulturmedium bzw. unter Zugabe von 0,01 mM HgCl₂. Einbettung und Anfertigung der Schnitte erfolgte durch das Elektronenmikroskopische Zentrum. (orientierender Versuch, n=1)

6.1.7. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Es folgen einige elektronenmikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen von HTR8/SVneo und JEG3 Zellen.

Mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie ließ sich die Oberfläche der Zellkulturen in verschiedenen Vergrößerungsstufen beurteilen. In Abb. 6.16 erkennt man, dass die JEG3 Zellen ein viel dichteres Wachstum als die HTR8/SVneo Zellen aufweisen. Die HTR8/SVneo Zellen wiederum scheinen expansiver zu wachsen, da sie im Randbereich der Kolonie mehr Zellfortsätze ausbilden (siehe Abb. 6.17 c) & d)).



(a) HTR8 REM Kontrolle 400fach

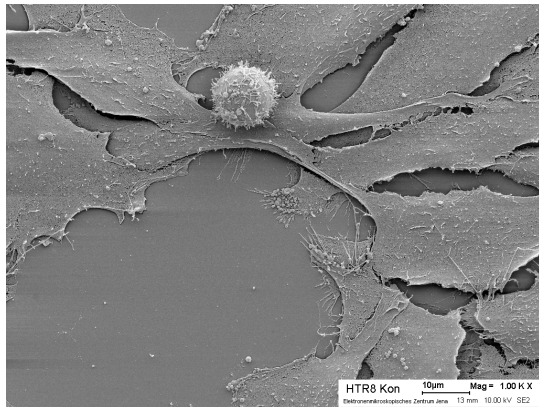
(b) JEG3 REM Kontrolle 400fach

Abb. 6.16.: REM-Aufnahmen von Zellkulturen von HTR8/SVneo Zellen und JEG3 Zellen

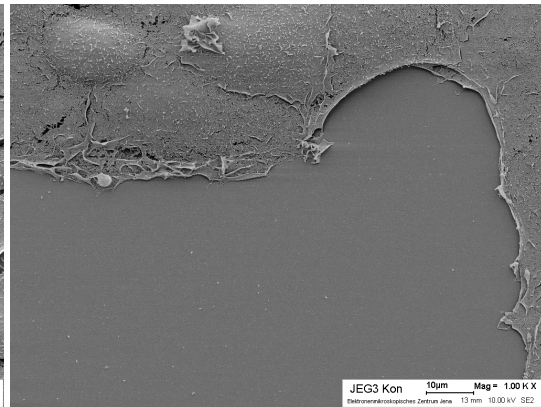
Es handelt sich um rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unbehandelter Kontrollen von a) HTR8/SVneo Zellen und b) JEG3 Zellen in 400facher Vergrößerung. Die Kultivierung der 5×10^4 Zellen erfolgte auf Glasdeckgläschen für 24 h mit unverändertem Zellkulturmedium. (orientierender Versuch, n=1)

Wie in Abb. 6.18 ersichtlich, scheinen HTR8/SVneo Zellen nach Inkubation mit 0,01 mM HgCl_2 -Lösung mehr Zellfortsätze als die unbehandelte Kontrolle auszubilden. Ein ähnliches Verhalten ließ sich auch bei den JEG3 Zellen beobachten (vgl. Abb. 6.19).

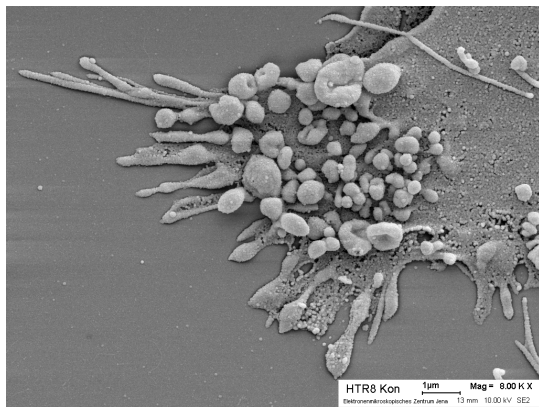
Es ließen sich anhand der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen sowohl bei den JEG3 als auch bei den HTR8/SVneo Zellkulturen keine Unterschiede zwischen unbehandelter Kontrolle und Inkubation mit 0,01 mM HgCl_2 -Kulturlösung feststellen. Es gelang auch keine Detektion von intrazellulär akkumuliertem HgCl_2 (vgl. Abb. 6.20 & 6.21).



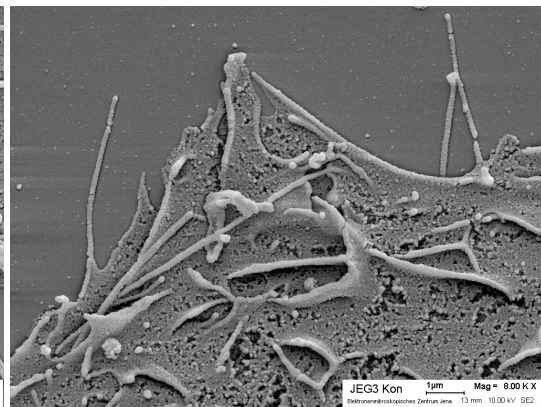
(a) HTR8 Kontrolle 1000fach



(b) JEG3 Kontrolle 1000fach

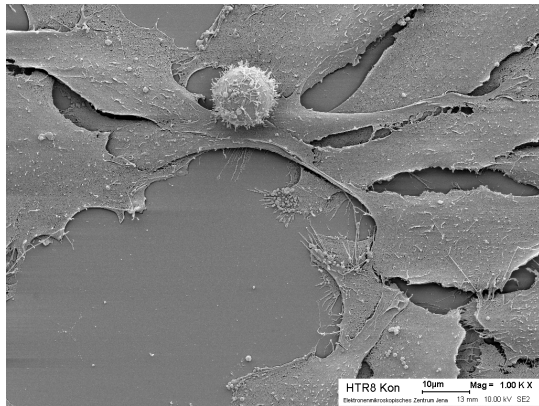


(c) HTR8 Kontrolle 8000fach

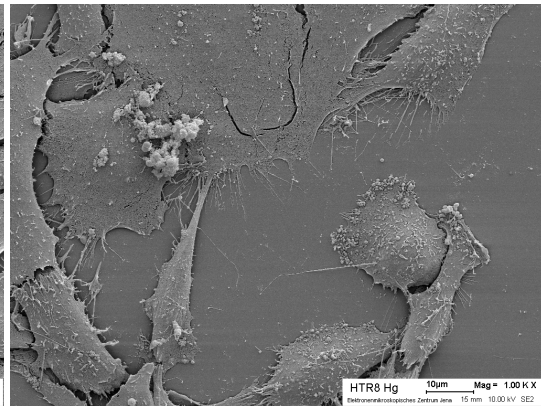


(d) JEG3 Kontrolle 8000fach

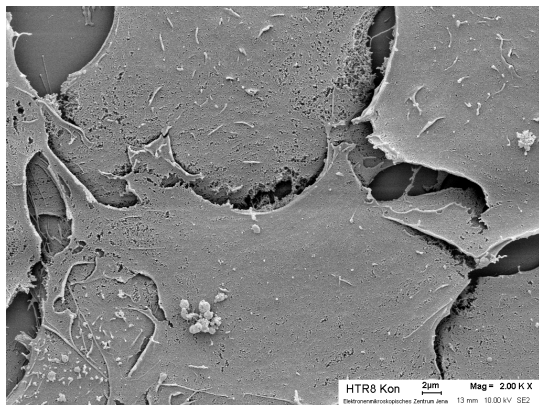
Abb. 6.17.: REM-Aufnahmen von Zellkulturen von HTR8/SVneo Zellen und JEG3 Zellen
 Es handelt sich um rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen un behandelter HTR8/SVneo (linke Spalte) und JEG3 Zellen (rechte Spalte) in 1000facher und sowie 8000facher Vergrößerung. Die Kultivierung der 5×10^4 Zellen erfolgte auf Glasdeckgläschen für 24 h mit unverändertem Zellkulturmedium. (orientierender Versuch, n=1)



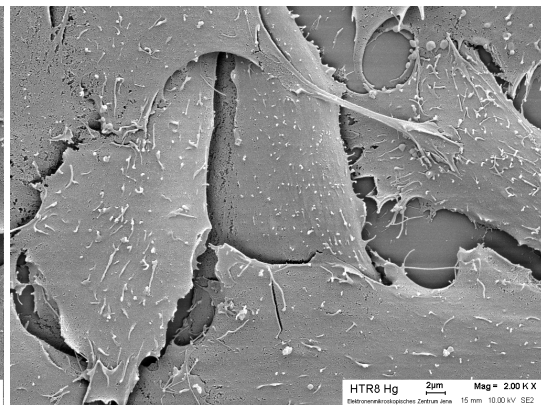
(a) HTR8 Kontrolle 1000fach



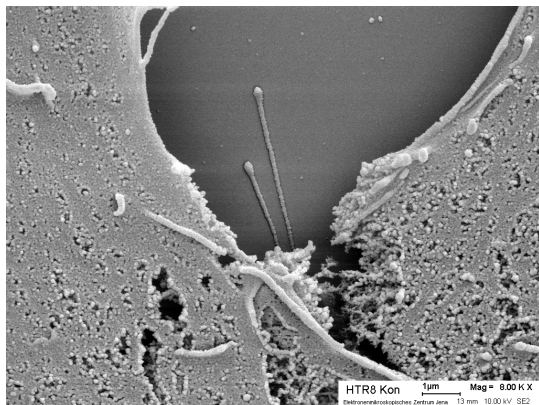
(b) HTR8 HgCl₂ 1000fach



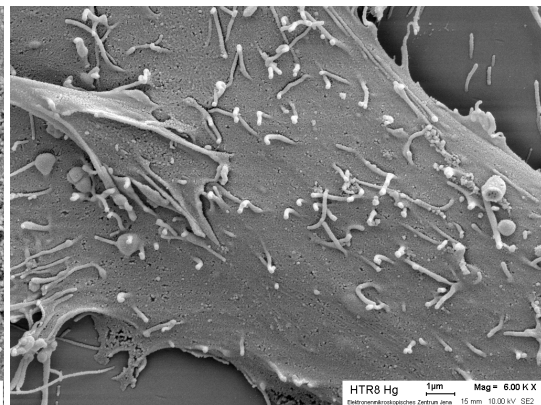
(c) HTR8 Kontrolle 2000fach



(d) HTR8 HgCl₂ 2000fach



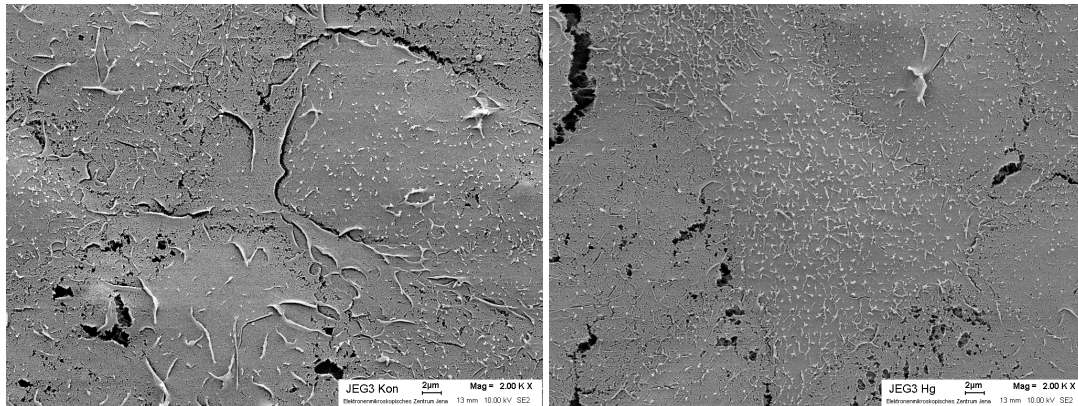
(e) HTR8 Kontrolle 8000fach



(f) HTR8 HgCl₂ 8000fach

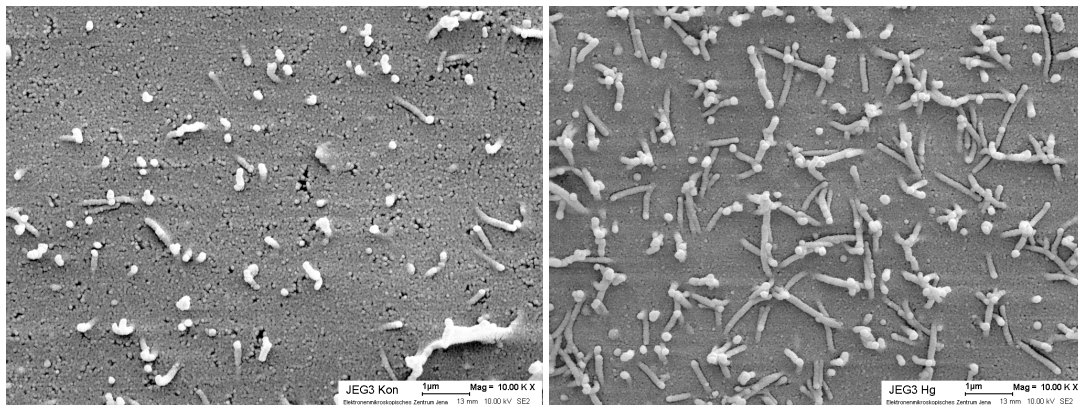
Abb. 6.18.: REM-Aufnahmen von Zellkulturen von HTR8/SVneo Zellen unbehandelt und unter Zugabe von HgCl₂

Abgebildet sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten HTR8/SVneo Zellkulturen (linke Spalte) und nach 24 h Inkubation mit 0,01 mM HgCl₂-Kulturlösung (rechte Spalte) in verschiedenen Vergrößerungen. Die Kultivierung der 5×10^4 Zellen erfolgte auf Glasdeckgläschen. (orientierender Versuch, n=1)



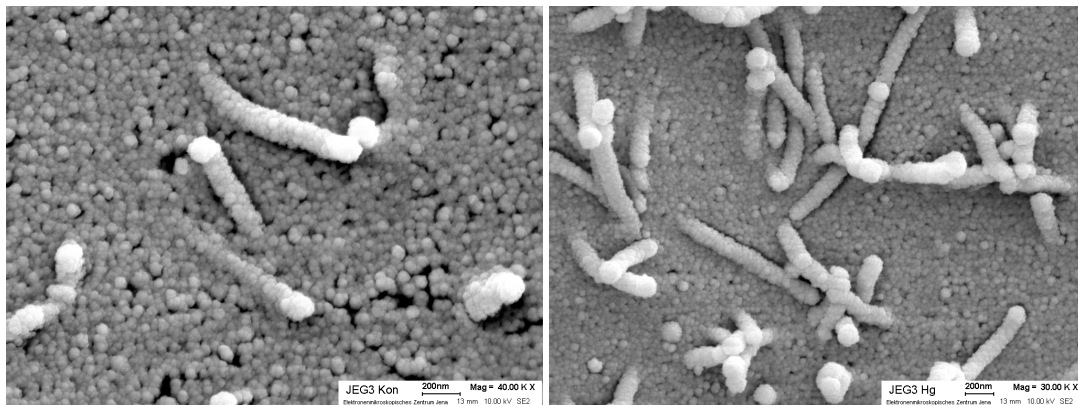
(a) JEG3 Kontrolle 2000fach

(b) JEG3 HgCl₂ 2000fach



(c) JEG3 Kontrolle 10000fach

(d) JEG3 HgCl₂ 10000fach



(e) JEG3 Kontrolle 40000fach

(f) JEG3 HgCl₂ 30000fach

Abb. 6.19.: REM-Aufnahmen von Zellkulturen von JEG3 Zellen unbehandelt und unter Zugabe von HgCl₂

Abgebildet sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von unbehandelten JEG3 Zellkulturen (linke Spalte) und nach 24 h Inkubation mit 0,01 mM HgCl₂-Kulturlösung (rechte Spalte) in verschiedenen Vergrößerungen. Die Kultivierung der 5×10^4 Zellen erfolgte auf Glasdeckgläschen. (orientierender Versuch, n=1)

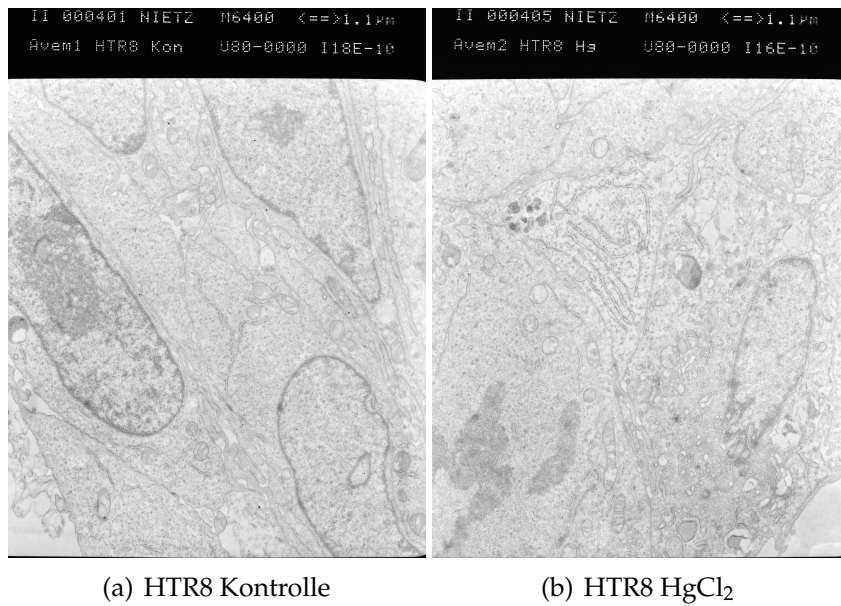


Abb. 6.20.: TEM-Aufnahmen von Zellkulturen von HTR8/SVneo Zellen unbehandelt und unter Zugabe von HgCl₂

Abgebildet sind transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von a) unbehandelten HTR8/SVneo Zellen und b) nach 24 h Inkubation mit 0,01 mM HgCl₂-Kulturlösung. Die Kultivierung der 5×10^4 Zellen erfolgte auf Glasdeckgläschen. (orientierender Versuch, n=1)

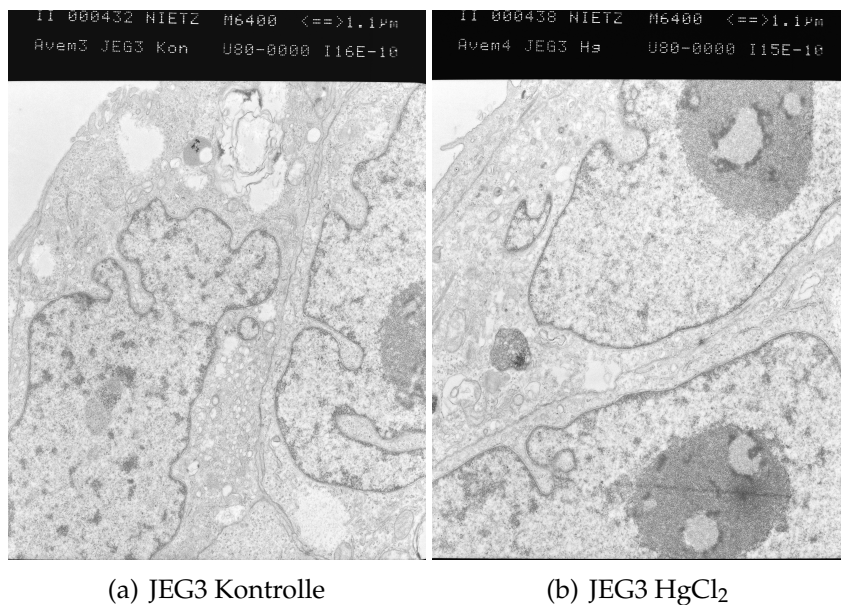


Abb. 6.21.: TEM-Aufnahmen von Zellkulturen von JEG3 Zellen unbehandelt und unter Zugabe von HgCl₂

Abgebildet sind transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von a) unbehandelten JEG3 Zellen und b) nach 24 h Inkubation mit 0,01 mM HgCl₂-Kulturlösung. Die Kultivierung der 5×10^4 Zellen erfolgte auf Glasdeckgläschen. (orientierender Versuch, n=1)

6.2. Ergebnisse der Explantatkultur

Im zweiten Teil des Kapitels Ergebnisse sollen nun die Ergebnisse der Explantatkultur dargestellt werden. Dabei soll zunächst auf die Ergebnisse der unbehandelten Explantatkulturen, welche für die Etablierung der Explantatkultur im Plazentalabor nötig waren, eingegangen werden, bevor der Einfluss einer Inkubation mit Metalllösungen betrachtet wird.

6.2.1. Ergebnisse der unbehandelten Plazentaexplantate

MTS-Assay an unbehandelten Plazentaexplantaten

Im Folgenden sollen die Ergebnisse des MTS-Assays an unbehandelten Plazentaexplantaten (UP1-3) vorgestellt werden.

Die Bestimmung der Vitalität von unbehandelten Plazentaexplantaten mittels MTS-Assay ergab für jede der Durchführungen über die Kulturdauer von 144 h eine zickzackförmige Schwankung von etwa 5 Einheiten um einem im Mittel geradlinigen Verlauf. Es ergibt sich keine klare Tendenz eines Anstiegs oder Abfalls über die Zeit. Lediglich bei UP1 scheint ab 96 h ein Abfall der Vitalität vorzuliegen (vgl. Abb. [6.22](#)).

Überstandsmessung an unbehandelten Explantatkulturen

Es sollen nun die Ergebnisse der Parameterbestimmung im Kulturüberstand an unbehandelten Plazentaexplantaten betrachtet werden. Es wurden die Parameter Glukose, Laktat, β -hCG, Estradiol und Progesteron bestimmt.

Es zeigte sich bei allen gemessenen Proben im Mittel ein über den Zeitverlauf signifikant ansteigender Glukosespiegel im Vergleich zum 24-Stunden-Messwert (vgl. Abb. [6.23](#)). Im Gegensatz dazu ließ sich ein über die Zeit fallender Laktatspiegel nachweisen (vgl. Abb. [6.24](#)).

Die gemessenen Hormonspiegel fielen jeweils nach dem 24-Stunden-Messwert steil ab. Der β -hCG-Spiegel bildete ab 72 h und der Estradiolspiegel ab 120 h ein Plateau (vgl. Abb. [6.25](#) und [6.26](#)). Der Progesteronspiegel fiel ab, bis er ab 96 h nahezu null erreichte (vgl. Abb. [6.27](#)). Dabei anzumerken ist, dass es aufgrund eines Verlustes der Probe keinen realen Messwert des Estradiol- und Progesteronspiegels bei UP3 nach 24 h gibt. Der verwendete Wert wurde mittels der in Abb. [6.26](#) bzw. [6.27](#) in schwarz dargestellten Trendlinie ermittelt. Somit ist die darauf aufbauende Berechnung des p-Wertes unter Annahme der Richtigkeit der Schätzung dieses Wertes zu betrachten.

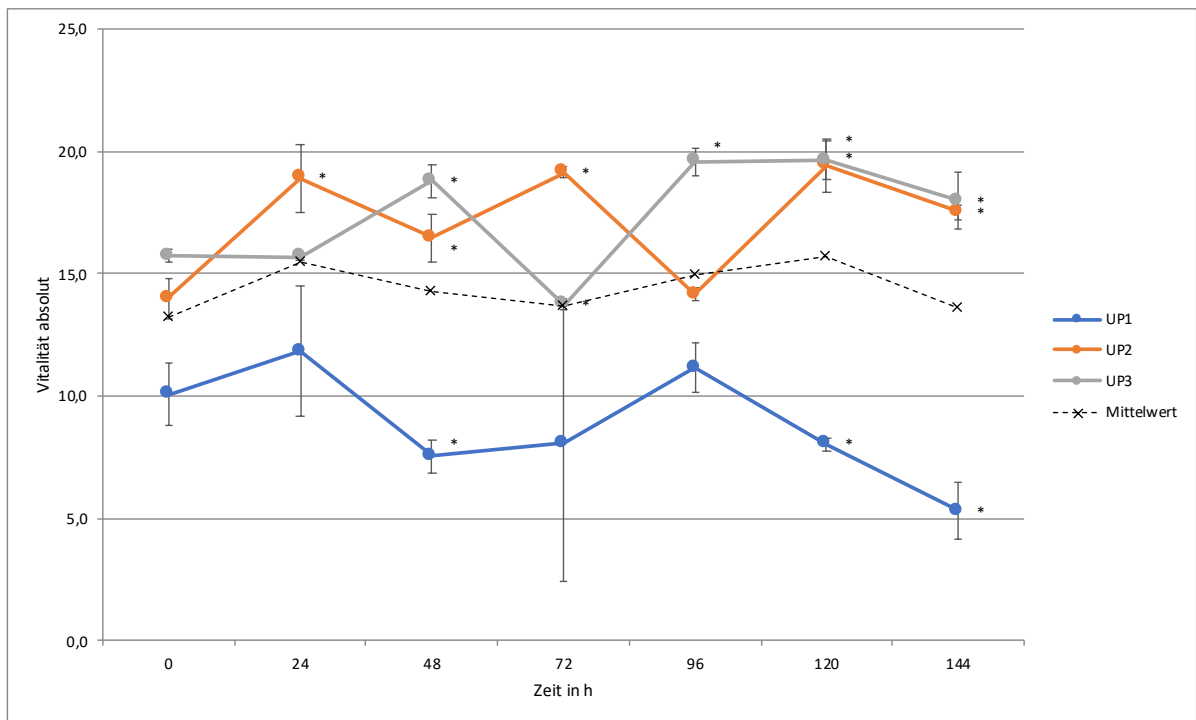


Abb. 6.22.: Vitalität von unbehandelten Plazentaexplantaten gemessen mittels MTS-Assay. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels MTS-Assay ermittelten Vitalität von unbehandelten Plazentaexplantaten über einen Kulturzeitraum von 144 h. Nach Ablauf von je 24 h erfolgte die 4 stündige Inkubation mit DMEM ohne Phenolrot unter Zugabe der MTS-Reagenz. Es erfolgte eine Normierung der Messwerte auf das Gewicht des jeweiligen Explantats. Die gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert aus allen Messwerten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf den 0-h-Messwert. * $p < 0,05$ (Quadruplikate pro Versuchsdurchführung, $n=3$, Mann-Whitney-U-Test, SPSS); UP1-3=unbehandelte Plazenta Nummer 1-3

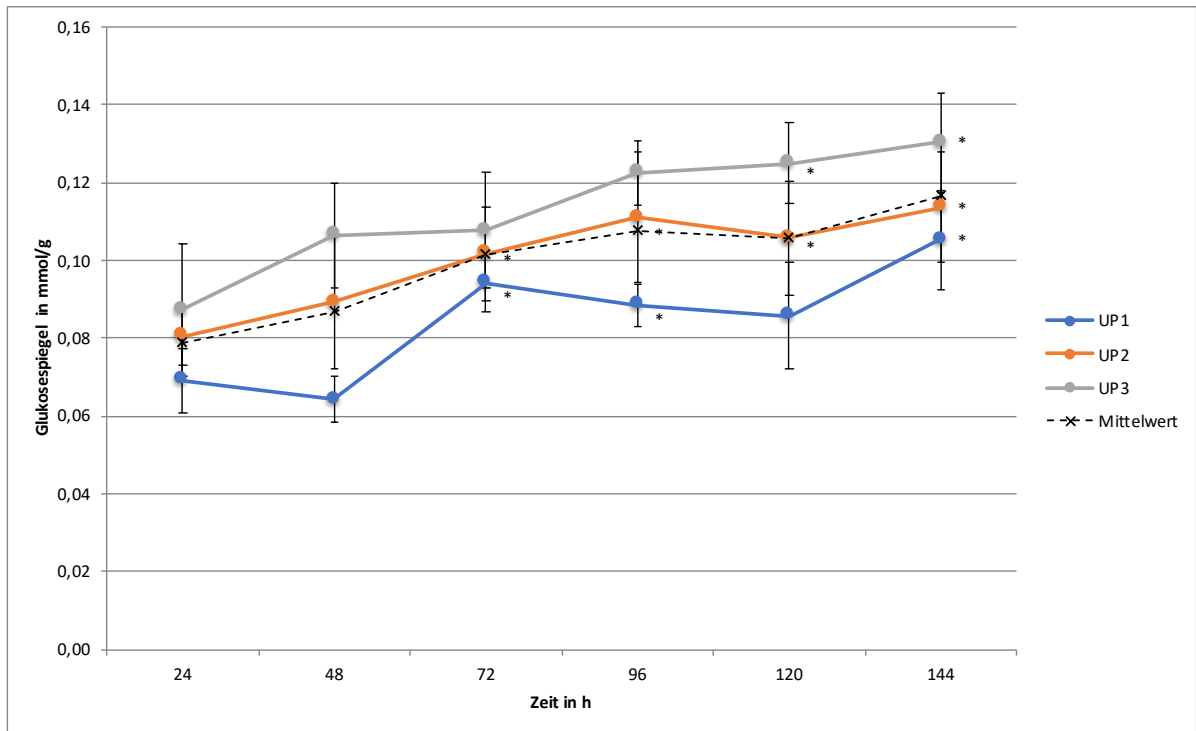


Abb. 6.23.: Glukosespiegel von unbehandelten Plazentaexplantaten gemessen im Kulturüberstand

Dargestellt sind die Mittelwerte des Glukosespiegels von unbehandelten Plazentaexplantaten über einen Kulturzeitraum von 144 h. Ein Wechsel der verwendeten 2 ml Kulturmedium wurde alle 24 h vorgenommen. Der Überstand wurde für die Analyse genutzt. Es erfolgte eine Normierung der Messwerte auf das Gewicht des jeweiligen Explantats. Die gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert aus allen Messwerten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf den 24-h-Messwert. * $p < 0,05$ (Sechsfach-Bestimmung pro Versuchsdurchführung, $n=3$, Mann-Whitney-U-Test, SPSS); UP1-3=unbehandelte Plazenta Nummer 1-3

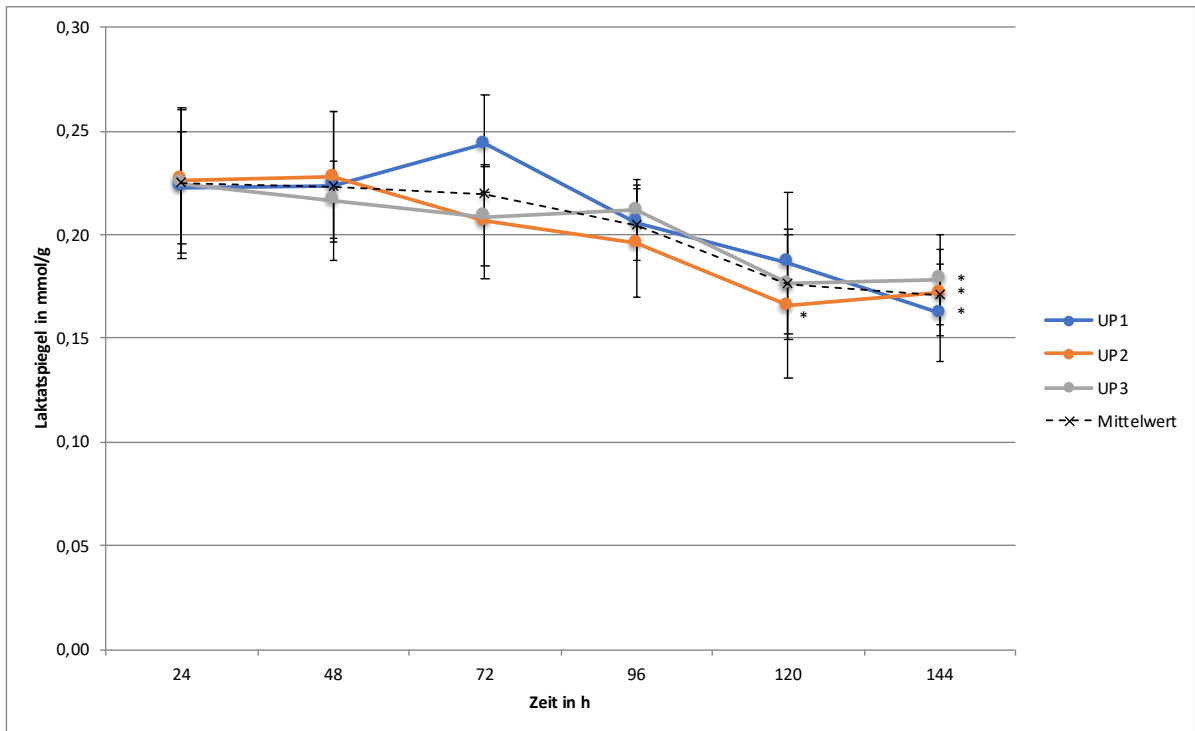


Abb. 6.24.: Laktatspiegel von unbehandelten Plazentaexplantaten gemessen im Kulturüberstand

Dargestellt sind die Mittelwerte des Laktatspiegels von unbehandelten Plazentaexplantaten über einen Kulturzeitraum von 144 h. Ein Wechsel der verwendeten 2 ml Kulturmedium wurde alle 24 h vorgenommen. Der Überstand wurde für die Analyse genutzt. Es erfolgte eine Normierung der Messwerte auf das Gewicht des jeweiligen Explantats. Die gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert aus allen Messwerten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf den 24-h-Messwert. * $p < 0,05$ (Sechsfach-Bestimmung pro Versuchsdurchführung, $n=3$, Mann-Whitney-U-Test, SPSS); UP1-3=unbehandelte Plazenta Nummer 1-3

Der Trend des Kurvenverlaufs mit Abfall der Hormonwerte mit der Zeit bleibt davon jedoch unbeeinflusst. Dieser lässt sich durch die realen Messwerte von Estradiol und Progesteron bei UP3 ab 48 h ebenso nachvollziehen.

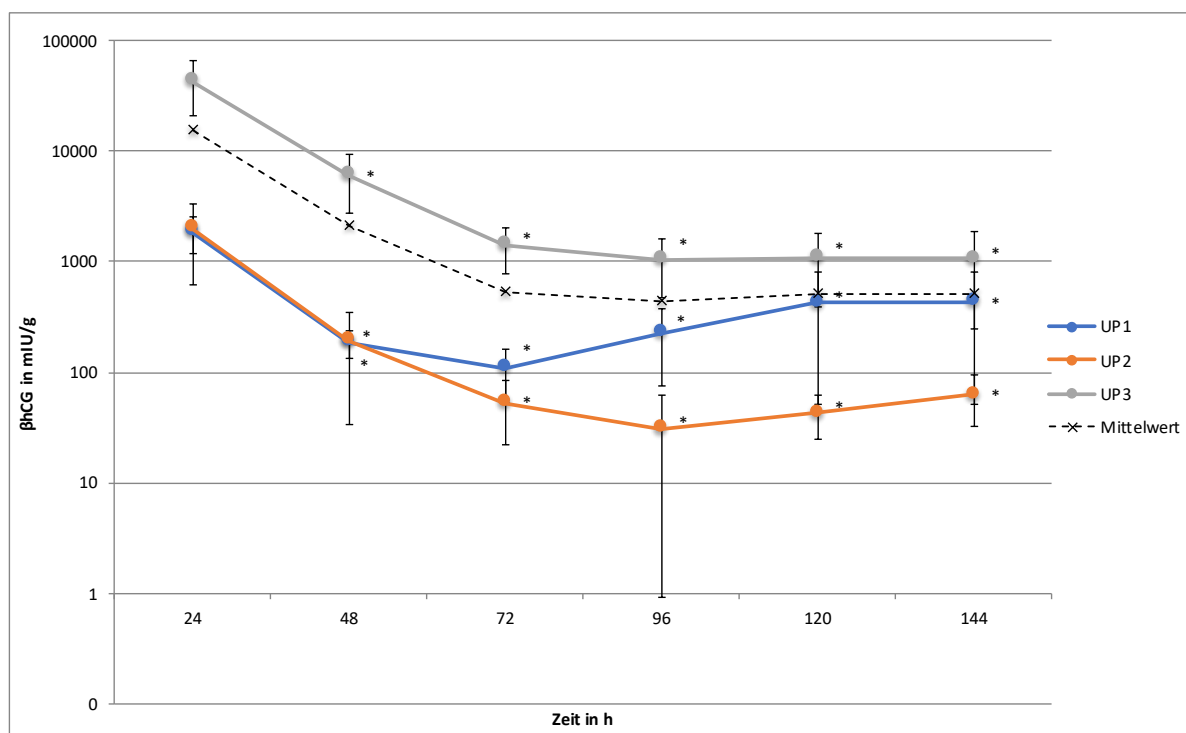


Abb. 6.25.: β -hCG-Spiegel von unbehandelten Plazentaexplantaten gemessen im Kulturüberstand

Dargestellt sind die Mittelwerte des β -hCG-Spiegels von unbehandelten Plazentaexplantaten über einen Kulturzeitraum von 144 h. Ein Wechsel der verwendeten 2 ml Kulturmedium wurde alle 24 h vorgenommen. Der Überstand wurde für die Analyse genutzt. Es erfolgte eine Normierung der Messwerte auf das Gewicht des jeweiligen Explantats. Die gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert aus allen Messwerten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf den 24-h-Messwert. * $p < 0,05$ (Sechsfach-Bestimmung pro Versuchsdurchführung, $n=3$, Mann-Whitney-U-Test, SPSS); UP1-3=unbehandelte Plazenta Nummer 1-3

Vergleich der Ergebnisse zwischen den Versuchswiederholungen an unbehandelten Plazentaexplantaten

Da es sich bei diesen Versuchen an unbehandelten Explantaten um eine Vorbetrachtung zur Protokolletablierung handelt, ist eine möglichst hohe Übereinstimmung zwischen den Versuchsdurchführungen erwünscht. Diese wurde mittels RMSE ermittelt, welcher eine Aussage über die Ähnlichkeit einer Stichprobe erlaubt. Je kleiner der

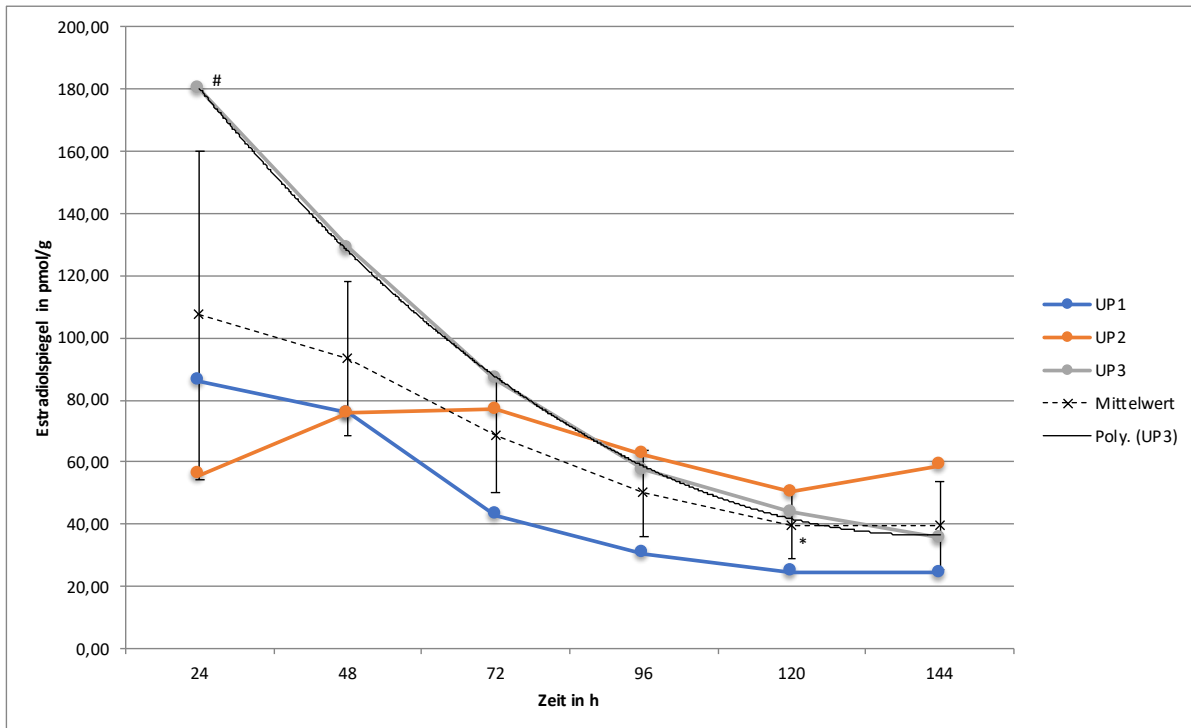


Abb. 6.26.: Estradiolspiegel von unbehandelten Plazentaexplantaten gemessen im Kulturüberstand

Dargestellt sind die Messwerte des Estradiolspiegels von unbehandelten Plazentaexplantaten über einen Kulturzeitraum von 144 h. Ein Wechsel der verwendeten 2 ml Kulturmedium wurde alle 24 h vorgenommen. Der Überstand wurde für die Analyse genutzt. Es erfolgte eine Normierung auf das jeweilige Gewicht des Explantats. Die gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert aus allen Messwerten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf den 24-h-Messwert. * $p < 0,05$ (Einfachbestimmung pro Versuchsdurchführung, $n=3$, Mann-Whitney-U-Test, SPSS); # extrapoliertes Wert bei UP3 bei 24 h aufgrund eines Probenverlustes; UP1-3=unbehandelte Plazenta Nummer 1-3

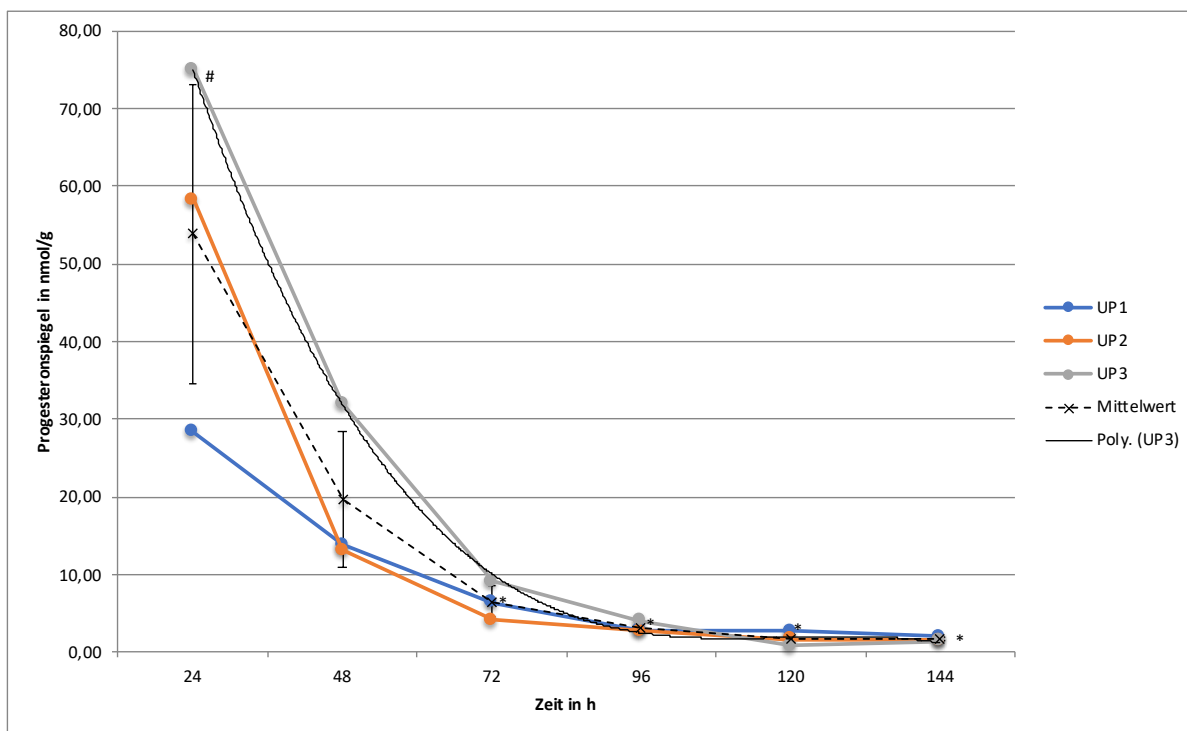


Abb. 6.27.: Progesteronspiegel von unbehandelten Plazentaexplantaten gemessen im Kulturüberstand

Dargestellt sind die Messwerte des Progesteronspiegels von unbehandelten Plazentaexplantaten über einen Kulturzeitraum von 144 h. Ein Wechsel der verwendeten 2 ml Kulturmedium wurde alle 24 h vorgenommen. Der Überstand wurde für die Analyse genutzt. Es erfolgte eine Normierung auf das jeweilige Gewicht des Explantats. Die gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert aus allen Messwerten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf den 24-h-Messwert. * $p < 0,05$ (Einfachbestimmung pro Versuchsdurchführung, $n=3$, Mann-Whitney-U-Test, SPSS); # extrapoliertes Wert bei UP3 bei 24 h aufgrund eines Probenverlustes; UP1-3=unbehandelte Plazenta Nummer 1-3

RMSE, desto ähnlicher sind sich zwei Stichproben. Für die Berechnung des RMSE wurden die Mittelwerte der Rohdaten aus jeder Versuchsdurchführung benutzt. Im Falle der Versuche an Plazentaexplantaten wurden die Rohdaten zuvor auf das Explantatgewicht normiert. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der drei Versuchswiederholungen eine sehr gute Übereinstimmung vor allem bei der Messung von Glukose, Laktat und dem MTS-Assay (vgl. Tab. 6.1). Die größten Abweichungen gab es bei der Bestimmung der Hormonspiegel. Diese unterliegen recht starken interindividuellen Schwankungen. Um diese einordnen zu können, sollte man sich jedoch den Kurvenverlauf zusätzlich betrachten. Dieser verhält sich nichtsdestotrotz recht ähnlich. Nach initial stark erhöhten Werten sinken die Hormonspiegel recht schnell ab, bis sie nach ca. 48 bis 72 h ein Plateau erreichen (vgl. Abb. 6.25, 6.26 und 6.27).

Tabelle 6.1.: RMSE zum Vergleich der Ergebnisse der drei Versuchswiederholungen an un-
behandelten Plazentaexplantaten

Dargestellt ist der RMSE (Root-Mean-Square-Error; dt.: Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme) anhand der Mittelwerte der Rohdaten zum Vergleich der drei Versuchswiederholungen an unbehandelten Plazentaexplantaten (UP1-3) mit verschiedenen Methoden zur Vitalitätsanalyse, die durchgeführt wurden. Werte $\leq 0,3$ wurden als starke, zwischen 0,3 und 0,6 als mittlere und $>0,6$ als schwache Übereinstimmung gewertet.

Parameter	UP1 vs. UP2	UP1 vs. UP3	UP2 vs. UP3
<i>Glukose</i>	0,09	0,12	0,04
<i>Laktat</i>	0,08	0,08	0,04
<i>β-hCG</i>	0,76	0,70	0,12
<i>Estradiol</i>	0,50	0,12	0,56
<i>Progesteron</i>	0,58	0,31	0,36
<i>MTS</i>	0,30	0,28	0,19

6.2.2. Einfluss der Metallbehandlung auf Plazentaexplantate

Es folgen die Ergebnisse der Plazentaexplantate, welche mit Metalllösungen kultiviert wurden.

Ergebnisse des MTS-Assays

Der folgende Abschnitt beschreibt den Einfluss der Metallbehandlung von Plazentaexplantaten auf die Ergebnisse im MTS-Assay. Es erfolgt die Darstellung der Ergebnisse zum 48 h Gesamtkulturdauer, d.h. nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen.

Die 24 h Inkubation mit MgSO_4 ergab über den gesamten Konzentrationsbereich keinen relevanten Abfall der Vitalität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung mit NiCl_2 führte wiederum mit steigender Konzentration zu einem raschen Absinken der Vitalität. Dies zeigte sich ebenso für die Behandlung mit MnSO_4 und HgCl_2 , welche schon bei der niedrigsten verwendeten Konzentration von 0,1 mM eine relevante Einschränkung der Vitalität aufwiesen (vgl. Abb. 6.28).

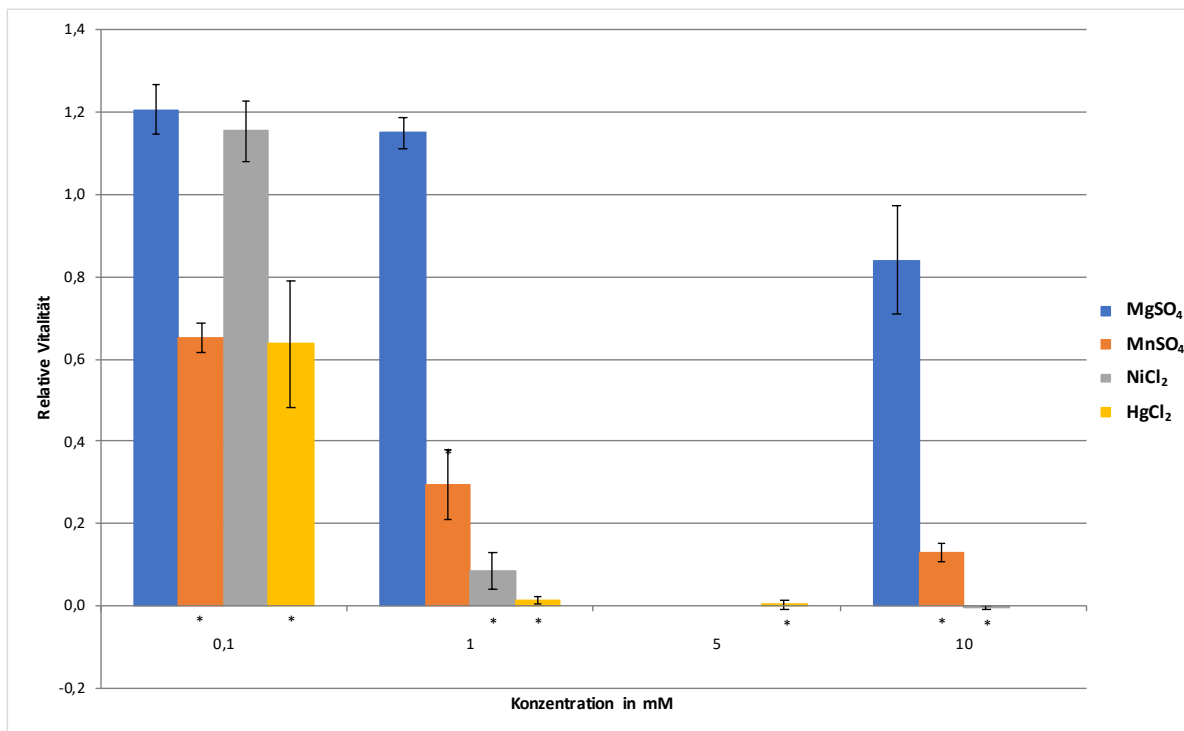


Abb. 6.28.: Relative Vitalität von Plazentaexplantaten nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen mittels MTS-Assay

Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels MTS-Assay ermittelten Vitalität von Plazentaexplantaten nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentration. Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl_2 mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Nach einer Erholungsphase von 24 h wurde das unveränderte Kulturmedium erneuert bzw. durch Kulturmedium mit Zusatz der gewünschten Konzentration Metallsalz ausgetauscht. Die Inkubation mit den Metalllösungen wurde nach weiteren 24 h beendet. Dann folgte die 4 h Inkubation mit DMEM ohne Phenolrot unter Zugabe der MTS-Reagenz. Es wurde eine Normierung der Messwerte auf das Gewicht des jeweiligen Explantats sowie auf die stets mitgeführte unbehandelte Kontrolle vorgenommen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. * $p < 0,05$ (Quadruplikate pro Versuchsdurchführung, $n=3$, Mann-Whitney-U-Test, SPSS)

Ergebnisse der Parameterbestimmung aus dem Kulturüberstand

Im Kulturüberstand der mit metallinkubierten Plazentaexplantate wurden wiederum die Parameter Glukose, Laktat, β -hCG, Estradiol und Progesteron bestimmt. Es erfolgt die Betrachtung der Messwerte nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen, welches einer Gesamtkulturdauer von 48 h entspricht.

Es zeigte sich ein Anstieg des Glukosespiegels mit steigender Konzentration der Metalllösung bei MnSO_4 , NiCl_2 und HgCl_2 , wobei dieser für MnSO_4 und NiCl_2 nur bei 10 mM signifikant unterschiedlich zur Kontrolle war. Für die höchste Konzentration von HgCl_2 vom 5 mM zeigte sich wiederum ein steiler Abfall des Glukosespiegels (vgl. Abb. 6.29). Dieses Verhalten war analog zu den behandelten JEG3 Zellen (siehe Abb. 6.8).

Für die Behandlung mit MgSO_4 ließ sich kein Unterschied zur Kontrolle und keine Unterschiede zwischen den verwendeten Konzentrationen feststellen (vgl. Abb. 6.29). Für MnSO_4 und NiCl_2 ließ sich ein tendenziell sinkender Laktatspiegel mit steigender Konzentration messen, wobei der Unterschied nur bei 10 mM signifikant war. Eine Behandlung mit HgCl_2 führte mit steigender Konzentration zu einem signifikant abfallenden Laktatspiegel (vgl. Abb. 6.30).

Es zeigte sich kein eindeutiger Unterschied zur Kontrolle oder eine deutliche Tendenz zum Anstieg oder Abfall des β -hCG-Spiegels über den verwendeten Konzentrationsbereich. Es ließ sich lediglich für die Inkubation mit 1 mM HgCl_2 ein signifikant erhöhter β -hCG-Spiegel nachweisen (vgl. Abb. 6.31).

Für HgCl_2 zeigte sich ein mit steigender Konzentration signifikant erniedrigter Estradiolspiegel. Auch für NiCl_2 ließ sich ein gesunkener Estradiolspiegel bei 0,1 und 10 mM nachweisen. Bei 1 mM wiederum gab es keinen messbaren Unterschied zur Kontrolle. Für MgSO_4 und MnSO_4 gab es über den gesamten Konzentrationsbereich keinen signifikanten Effekt (vgl. Abb. 6.32).

Der gemessene Progesteronspiegel lag bei allen Behandlungen niedriger als bei der Kontrolle, wobei der gemessene Unterschied nur bei MgSO_4 in 0,1 und 1 mM und bei NiCl_2 in 10 mM signifikant war. Entgegen den Erwartungen zeigte sich für HgCl_2 in allen Konzentrationen von allen Metallen der geringste Unterschied zur Kontrolle und für MgSO_4 in niedrigen Konzentrationen der größte (vgl. Abb. 6.33).

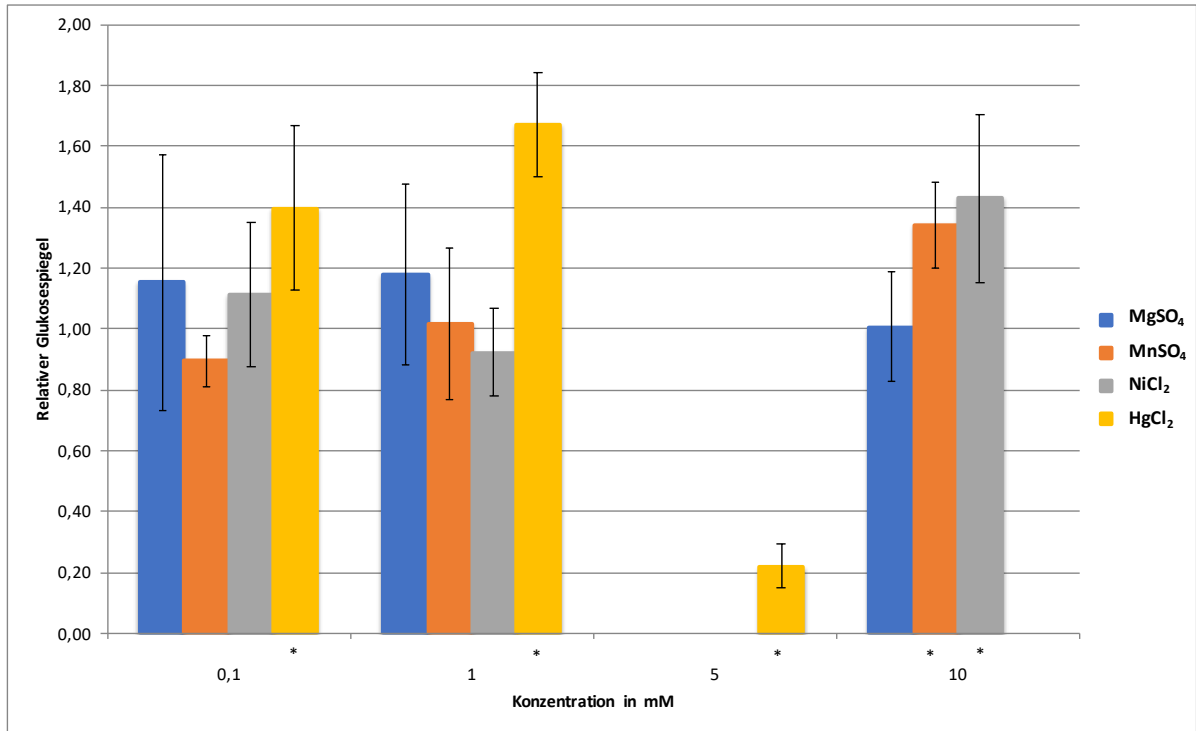


Abb. 6.29.: Relativer Glukosespiegel von Plazentaexplantaten nach 24 h Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand

Dargestellt sind die Mittelwerte des Glukosespiegels von Plazentaexplantaten nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentrationen. Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl₂ mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Nach einer Erholungsphase von 24 h wurde das unveränderte Kulturmedium durch Kulturmedium mit Zusatz der gewünschten Konzentration Metallsalz ausgetauscht. Die Inkubation mit den Metalllösungen wurde nach weiteren 24 h beendet und die Analyse des Glukosespiegels erfolgte aus dem Kulturüberstand. Es erfolgte eine Normierung auf das jeweilige Explantatgewicht und zur stets mitgeführten unbehandelten Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. *p<0,05 (Duplikate für alle Behandlungen & Quadruplikate für die unbehandelte Kontrolle pro Versuchsdurchführung, n=3, Mann-Whitney-U-Test, SPSS)

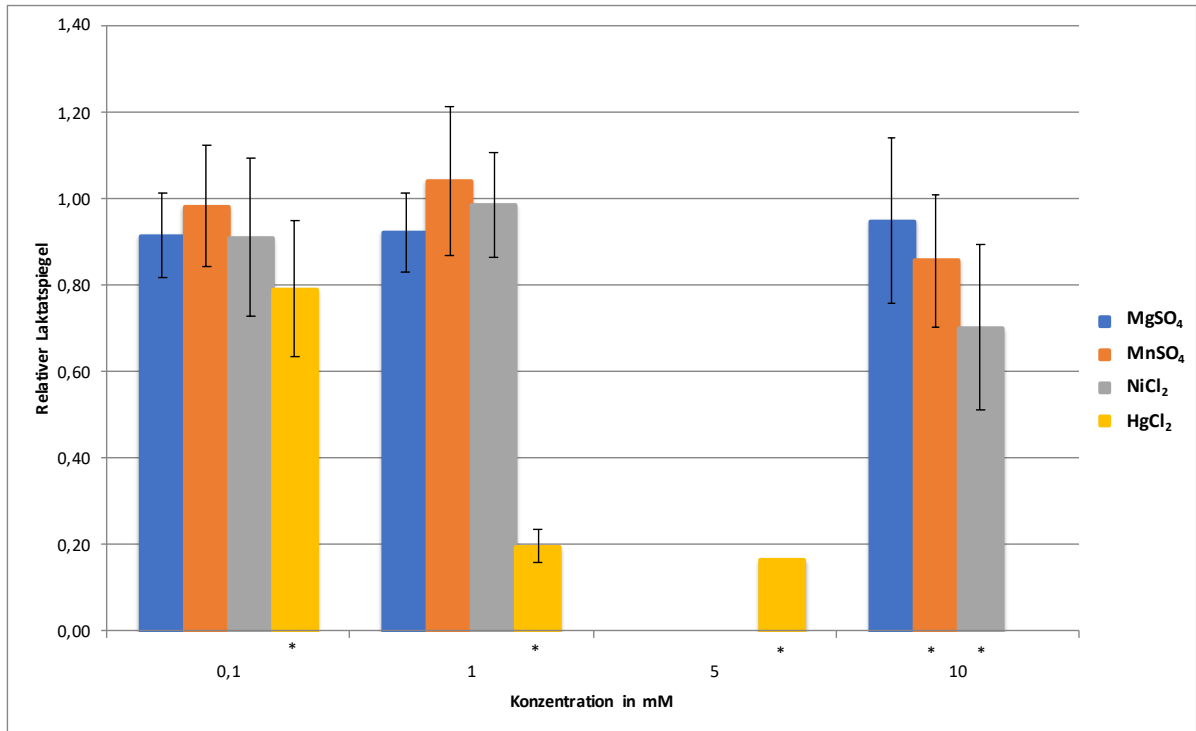


Abb. 6.30.: Relativer Laktatspiegel von Plazentaexplantaten nach 24 h Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand

Dargestellt sind die Mittelwerte des Laktatspiegels von Plazentaexplantaten nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentrationen. Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl₂ mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Nach einer Erholungsphase von 24 h wurde das unveränderte Kulturmedium durch Kulturmedium mit Zusatz der gewünschten Konzentration Metallsalz ausgetauscht. Die Inkubation mit den Metalllösungen wurde nach weiteren 24 h beendet und die Analyse des Laktatspiegels erfolgte aus dem Kulturüberstand. Es erfolgte eine Normierung auf das jeweilige Explantatgewicht und zur stets mitgeführten unbehandelten Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. *p<0,05 (Duplikate für alle Behandlungen & Quadruplikate für die unbehandelte Kontrolle pro Versuchsdurchführung, n=3, Mann-Whitney-U-Test, SPSS)

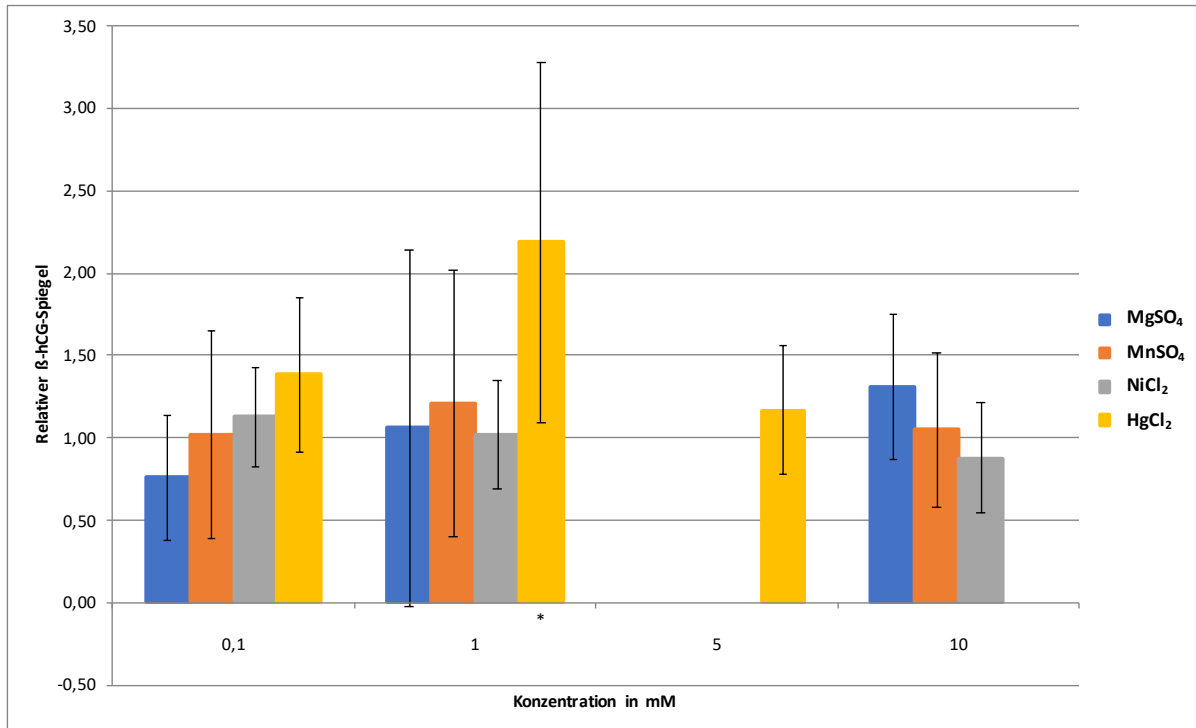


Abb. 6.31.: Relativer β -hCG-Spiegel von Plazentaexplantaten nach 24 h Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand

Dargestellt sind die Mittelwerte des β -hCG-Spiegels von Plazentaexplantaten nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentrationen. Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl₂ mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Nach einer Erholungsphase von 24 h wurde das unveränderte Kulturmedium durch Kulturmedium mit Zusatz der gewünschten Konzentration Metallsalz ausgetauscht. Die Inkubation mit den Metalllösungen wurde nach weiteren 24 h beendet und die Analyse des β -hCG-Spiegels erfolgte aus dem Kulturüberstand. Es erfolgte eine Normierung auf das jeweilige Explantatgewicht und zur stets mitgeführten unbehandelten Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. * $p < 0,05$ (Duplikate für alle Behandlungen & Quadruplikate für die unbehandelte Kontrolle pro Versuchsdurchführung, $n=3$, Mann-Whitney-U-Test, SPSS)

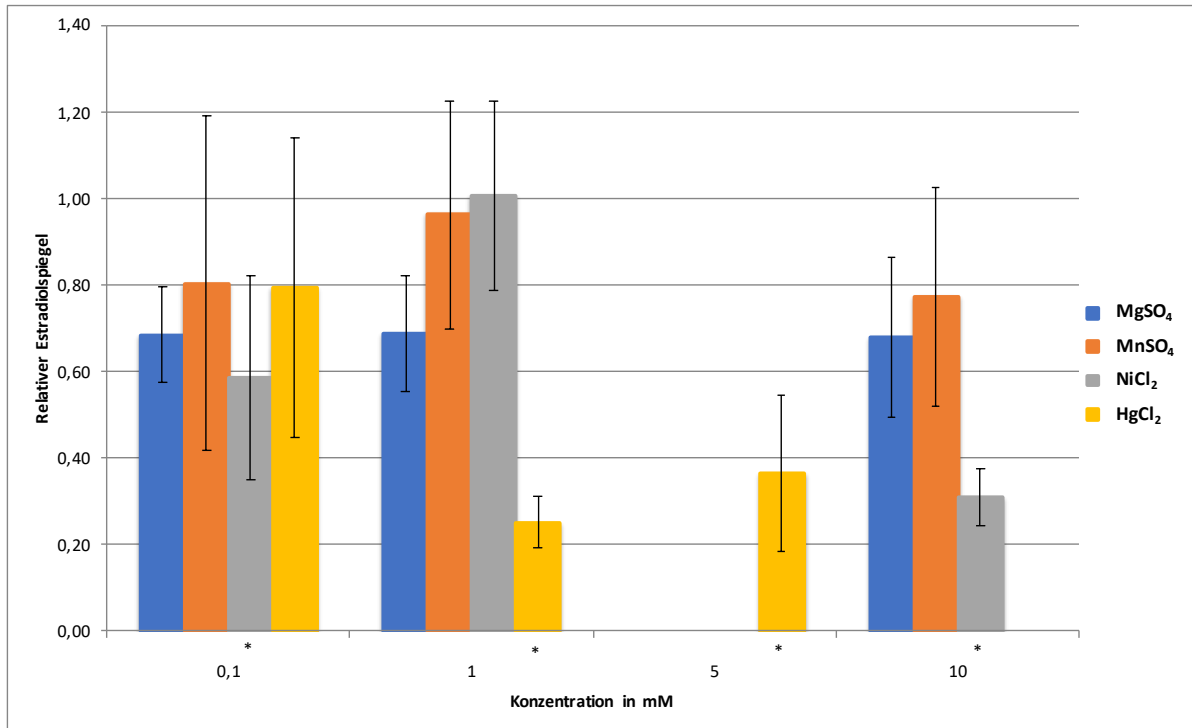


Abb. 6.32.: Relativer Estradiolspiegel von Plazentaexplantaten nach 24 h Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand

Dargestellt sind die Mittelwerte des Estradiolspiegels von Plazentaexplantaten nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentrationen. Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl₂ mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Nach einer Erholungsphase von 24 h wurde das unveränderte Kulturmedium durch Kulturmedium mit Zusatz der gewünschten Konzentration Metallsalz ausgetauscht. Die Inkubation mit den Metalllösungen wurde nach weiteren 24 h beendet und die Analyse des Estradiolspiegels erfolgte aus dem Kulturüberstand. Es erfolgte eine Normierung auf das jeweilige Explantatgewicht und zur stets mitgeführten unbehandelten Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. *p<0,05 (Duplikate für alle Behandlungen & Quadruplikate für die unbehandelte Kontrolle pro Versuchsdurchführung, n=3, Mann-Whitney-U-Test, SPSS)

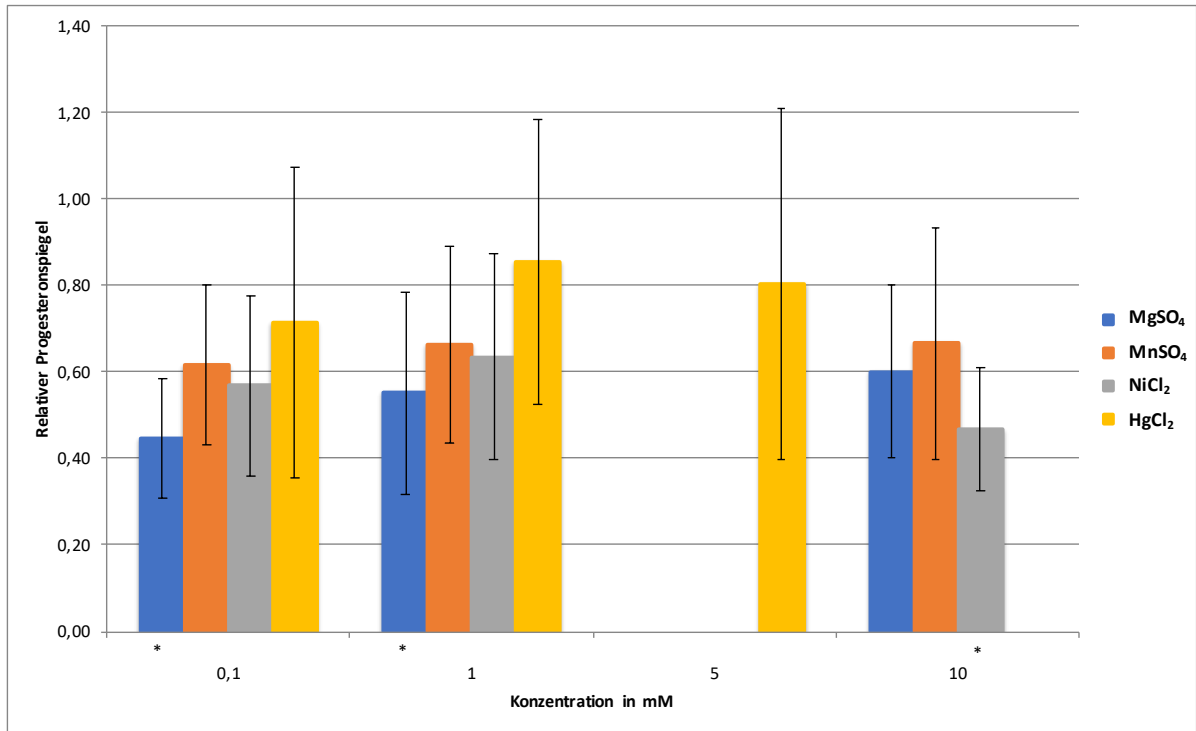


Abb. 6.33.: Relativer Progesteronspiegel von Plazentaexplantaten nach 24 h Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand

Dargestellt sind die Mittelwerte des Progesteronspiegels von Plazentaexplantaten nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentrationen. Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl₂ mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Nach einer Erholungsphase von 24 h wurde das unveränderte Kulturmedium durch Kulturmedium mit Zusatz der gewünschten Konzentration Metallsalz ausgetauscht. Die Inkubation mit den Metalllösungen wurde nach weiteren 24 h beendet und die Analyse des Progesteronspiegels erfolgte aus dem Kulturüberstand. Es erfolgte eine Normierung auf das jeweilige Explantatgewicht und zur stets mitgeführten unbehandelten Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. *p<0,05 (Duplikate für alle Behandlungen & Quadruplikate für die unbehandelte Kontrolle pro Versuchsdurchführung, n=3, Mann-Whitney-U-Test, SPSS)

Ergebnisse der Immunhistochemischen Färbungen

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 und dem Apoptosemarker cleavedPARP dargestellt werden.

Zum Ausschluss unspezifischer Färbung wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, welche keine Antikörperfärbung aufwies (vgl. Abb. 6.34).

Es konnten keine positiv gefärbten Zellen in den Präparaten detektiert werden. Somit ließ sich aus der Färbung mit den verwendeten Antikörpern kein auswertbares Ergebnis erzielen (vgl. Abb. 6.35).

Aufgrund der fehlenden Auswertbarkeit der vorhandenen Schnitte bezüglich einer Färbung mit den verwendeten Antikörpern Ki-67 und cleavedPARP wurden die Aufnahmen stattdessen anhand der Morphologie beurteilt. Die Morphologie des Gewebes konnte aufgrund der Gegenfärbung mit saurem Hämalaun zum Teil beurteilt werden. Aufgrund der fehlenden vollständigen HE-Färbung sind dies jedoch nur grobe Tendenzen. Eine genaue histologische Untersuchung und statistische Auswertbarkeit ist damit nicht möglich. Bei Betrachtung der Schnitte zeigte sich eine teilweise Ablösung des Synzytiotrophoblasten. Diese schien bei einer Behandlung mit HgCl_2 5 mM am stärksten und bei einer Behandlung mit MgSO_4 am schwächsten ausgeprägt zu sein, was eine stärkere Gewebeschädigung durch HgCl_2 nahelegt (vgl. Abb. 6.36).

Es fanden sich in den Präparaten mit HgCl_2 5 mM, NiCl_2 10 mM und MnSO_4 10 mM zum Teil schwarze, körnige Ansammlungen, welche eine Akkumulation des verwendeten Metalls vermuten lässt. Es könnte sich jedoch auch um Proliferationsknoten handeln, welche ein weiteres mögliches Beurteilungskriterium einer histologischen Auswertung anhand einer HE-Färbung wären (vgl. Abb. 6.37).

Für eine ausreichende Beurteilbarkeit der Gewebemorphologie zum Beispiel entsprechend des von Fröhlich und Turowski etablierten Scoringssystems ((Frohlich et al. 2016)) bedarf es allerdings einer HE-Färbung. Es werden dabei neben der Ablösung des Synzytiotrophoblast auch die Trophoblastenzellkerne, die Trophoblastenmembran, Fibrinablagerungen sowie das Auftreten von Proliferationsknoten beurteilt.

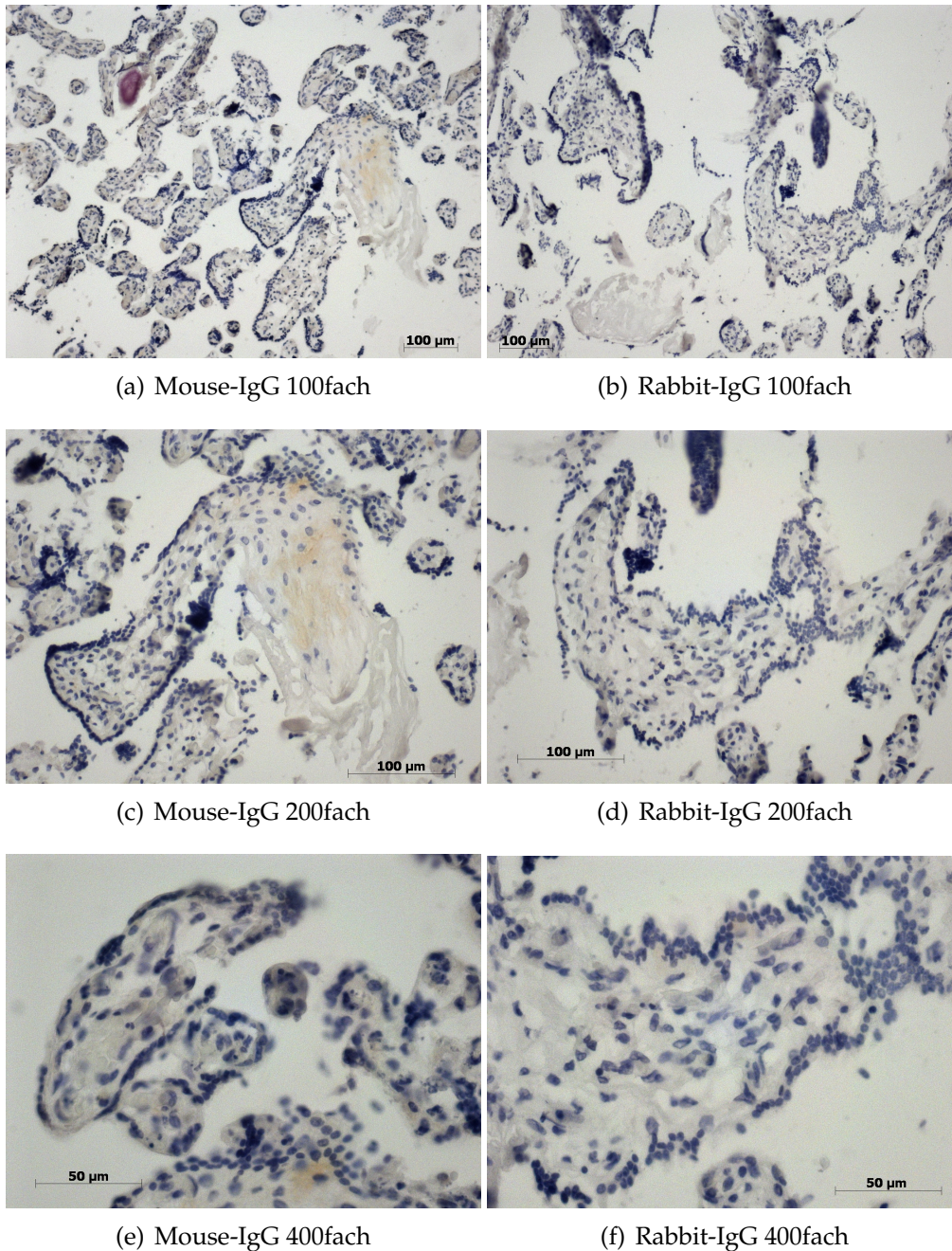


Abb. 6.34.: Negativkontrolle der Färbungen mit Ki-67 (Mouse-IgG) (linke Spalte) und cleavedPARP (Rabbit-IgG) (rechte Spalte) in 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung
 Dargestellt sind die Negativkontrollen der Färbung mit Ki-67 (Mouse-IgG) (linke Spalte) und cleavedPARP (Rabbit-IgG) (rechte Spalte) in verschiedenen Vergrößerungen. Die Gegenfärbung erfolgte mit saurem Hämalaun. Die Färbungen wurde an Gewebe, welches für 24 h mit 10 mM MgSO₄ inkubiert wurde, durchgeführt. Es war keine unspezifische Färbung in der Negativkontrolle nachweisbar.

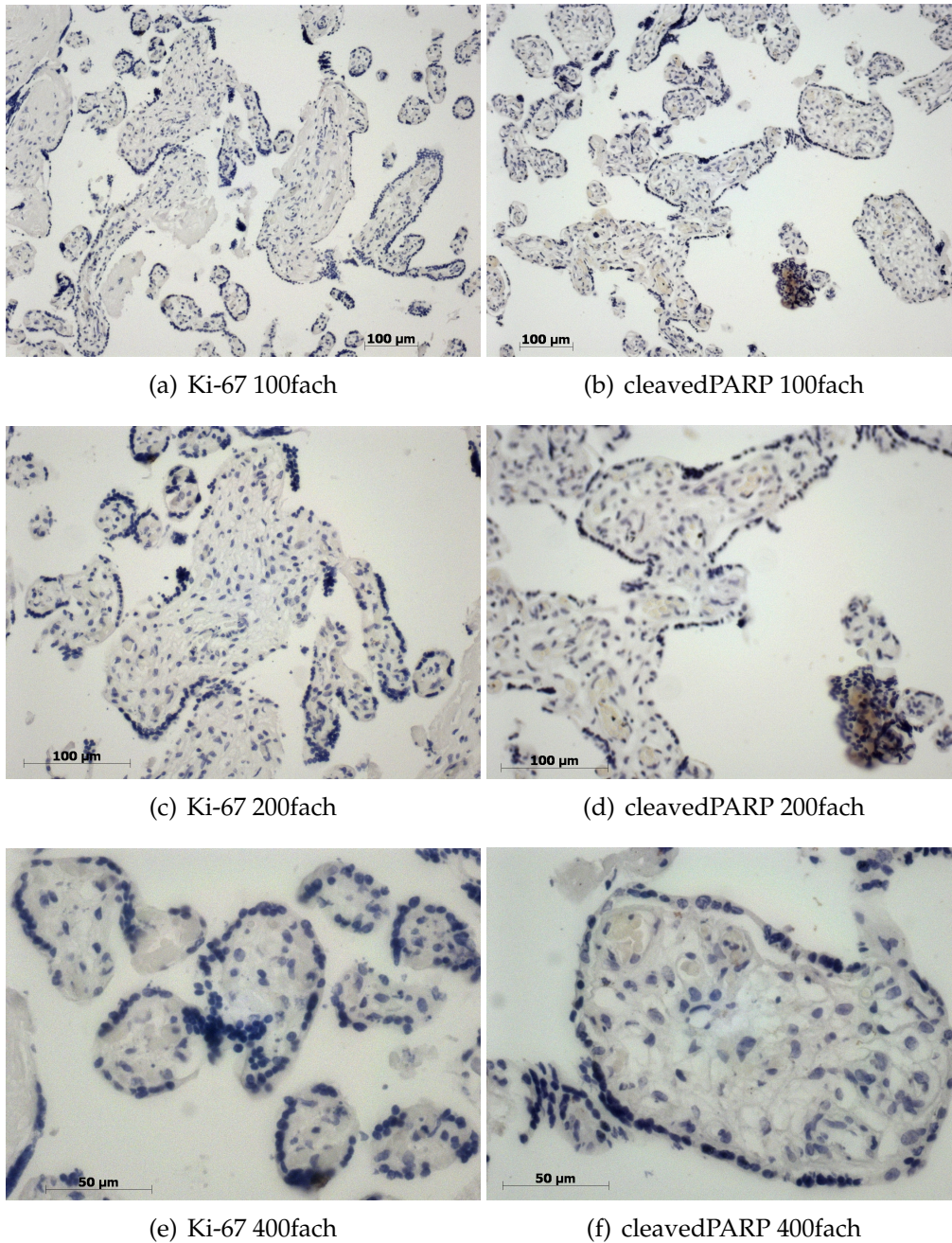


Abb. 6.35.: Färbungen von Plazentaexplantaten mit dem Proliferationsmarker Ki-67 (linke Spalte) und dem Apoptosemarker cleavedPARP (rechte Spalte) in 100-, 200-, 400-facher Vergrößerung

Dargestellt sind Gewebeschnitte von Plazentaexplantaten nach Färbung mit Ki-67 (linke Spalte) und cleaved PARP (rechte Spalte) in verschiedenen Vergrößerungen. Die Gegenfärbung wurde mit saurem Hämalaun vorgenommen. Die Färbung mit Ki-67 erfolgte an Gewebe, welches für 24 h mit 10 mM $MgSO_4$ inkubiert wurde. Die Färbung mit cleavedPARP erfolgte an Gewebe, welches für 24 h mit 5 mM $HgCl_2$ inkubiert wurde. Das Gewebe erschien komplett negativ sowohl für Ki-67 als auch für cleavedPARP.

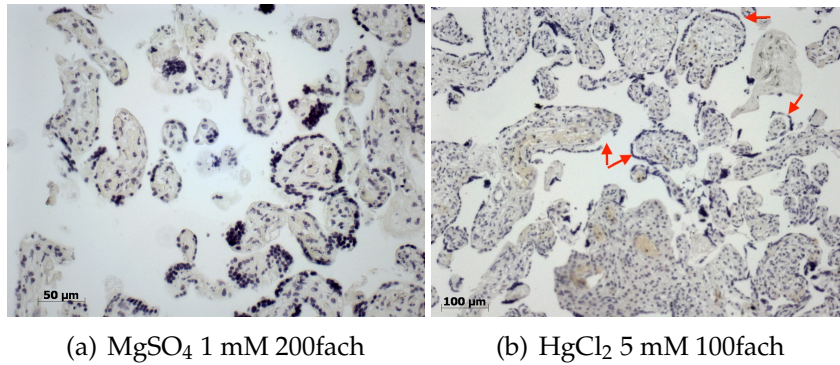


Abb. 6.36.: Ablösung des Synzytiotrophoblasten

Dargestellt ist ein Vergleich der Ablösung des Synzytiotrophoblasten nach Behandlung mit a) MgSO_4 1 mM und b) HgCl_2 5 mM für jeweils 24 h. a) wurde mit Ki-67 inkubiert. b) ist ein Präparat der Negativkontrolle cleavedPARP (Rabbit-IgG). Die Gegenfärbung erfolgte mit saurem Hämalaun. a) zeigt einen intakten Synzytiotrophoblasten wohingegen b) deutliche Ablösungen aufweist.

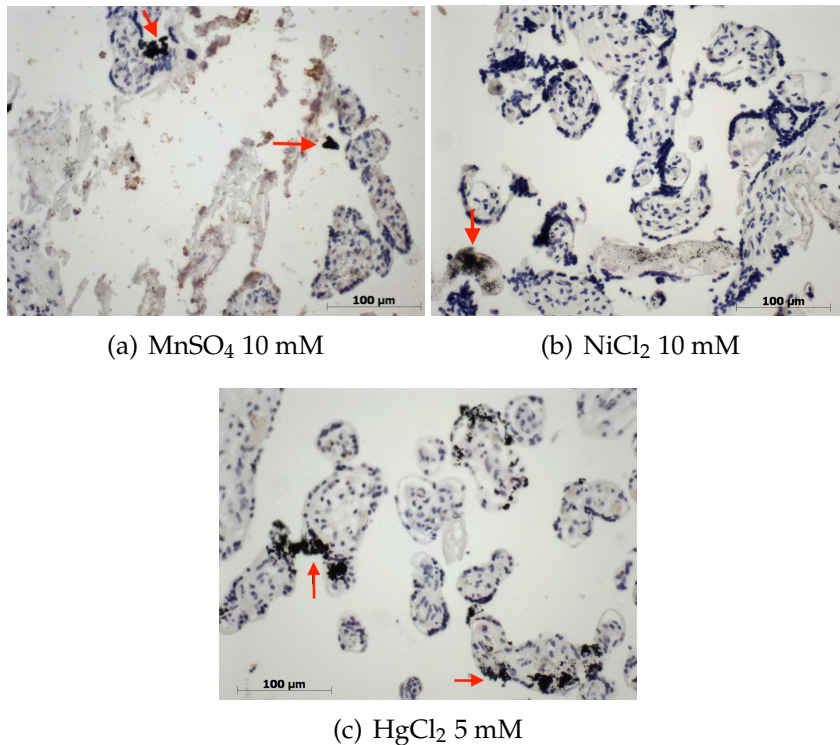


Abb. 6.37.: Körnige Ansammlungen von Metall im histologischen Bild in 200facher Vergrößerung

Dargestellt sind Beispiele für schwarze, körnige Ansammlungen in den Gewebeschnitten nach Behandlung mit a) MnSO_4 10 mM, b) NiCl_2 10 mM sowie c) HgCl_2 5 mM für jeweils 24 h. a) und b) wurden mit cleavedPARP inkubiert. c) ist ein Präparat der Negativkontrolle cleavedPARP (Rabbit-IgG). Die Gegenfärbung erfolgte mit saurem Hämalaun.

6.3. Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Methoden

Im Folgenden sollen zur Übersichtlichkeit die Ergebnisse der Arbeit zusammengefasst werden und die unterschiedlichen Methoden miteinander verglichen werden.

6.3.1. Vergleich der verschiedenen Methoden zur Ermittlung der Vitalität von unbehandelten Plazentaexplantaten

Zu Überprüfung der Übereinstimmung der Ergebnisse der verschiedenen Methoden zur Einschätzung der Vitalität von Plazentaexplantaten erfolgte wiederum mittels Berechnung der RMSE. Je kleiner der RMSE-Wert, desto ähnlicher sind sich die Ergebnisse der zu vergleichenden Methode. Insgesamt zeigt sich ein gemischtes Bild von sehr guten bis sehr schwachen Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen der einzelnen Methoden. Es finden sich gute Übereinstimmungen zwischen den Parametern Glukose, Laktat und dem MTS-Assay. Mittlere bis schwache Übereinstimmungen gibt es im Vergleich mit der Bestimmung der Hormonspiegel von β -hCG, Estradiol und Progesteron. Die Hormonspiegel zeigen nach anfänglich sehr hohen Messwerten einen starken Abfall schon nach 48 h wohingegen die Werte der anderen Parameter sich über die Zeit eher konstant auf einem Niveau halten. Dies ist durch eine anfänglich starke Freisetzung an gespeicherten Hormonen durch die in der Präparation der Explantate begründete Zerstörung von Zellen des Synzytiotrophoblasten zu erklären. Die intakt verbleibenden Zellen erhalten ebenso eine relativ konstante Hormonproduktion von β -hCG und Estradiol. Nur der Progesteronspiegel sinkt im Zeitverlauf weiter stark ab. Insgesamt sprechen die Ergebnisse für über den Kulturzeitraum vital erhaltene Explantate (vgl. Tab. 6.2).

6.3.2. Vergleich der Ergebnisse der Zelllinien und Plazentaexplantate nach Metallinkubation

Zu Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden die beobachteten Effekte in tabellarischer Form zusammengefasst (vgl. Tab. 6.3).

Zum Vergleich der Ergebnisse verschiedener Methoden miteinander wurde der RMSE berechnet. Dieser ergibt eine insgesamt gute Übereinstimmung aller Methoden zur Vitalitätsanalyse bei den HTR8/SVneo Zellen (vgl. Tab. 6.4). Der Glukosemetabo-

Tabelle 6.2.: RMSE zum Vergleich der Ergebnisse der verwendeten Methoden zur Vitalitätsbestimmung an unbehandelten Plazentaexplantaten

Dargestellt ist der RMSE (Root-Mean-Square-Error; dt.: Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme), welcher anhand des Mittelwertes der drei Versuchswiederholungen der verschiedenen Methoden zur Vitalitätsanalyse an unbehandelten Plazentaexplantaten (UP1-3) errechnet wurde. Es erfolgte zuvor eine Normierung auf das Explantatgewicht. Werte $\leq 0,3$ wurden als starke, zwischen 0,3 und 0,6 als mittlere und $>0,6$ als schwache Übereinstimmung gewertet.

Parameter	RMSE	RMSE ab 48 h
Glukose		
<i>Laktat</i>	0,22	0,20
<i>β-hCG</i>	1,79	0,84
<i>Estradiol</i>	0,52	0,43
<i>Progesteron</i>	1,41	0,81
<i>MTS</i>	0,16	0,13
Laktat		
<i>β-hCG</i>	1,63	0,75
<i>Estradiol</i>	0,30	0,24
<i>Progesteron</i>	1,23	0,66
<i>MTS</i>	0,12	0,13
β-hCG		
<i>Estradiol</i>	1,41	0,65
<i>Progesteron</i>	0,52	0,35
<i>MTS</i>	1,66	0,77
Estradiol		
<i>Progesteron</i>	0,96	0,46
<i>MTS</i>	0,39	0,35
Progesteron		
<i>MTS</i>	1,27	0,72

Tabelle 6.3.: Übersicht über die Ergebnisse der Zelllinien und Plazentaexplantate nach Metallinkubation

Die Pfeile symbolisieren die Effektrichtung. Die Effektstärke wird durch die Anzahl der Pfeile dargestellt (1-3 Pfeile... schwacher, mittlerer, starker Effekt). Die Effektstärke wurde anhand einer Rangfolge des gemessenen Einflusses des Metalls festgelegt. Nicht eindeutig unterscheidbare Einflüsse erhielten die gleiche Effektstärke. N.a. = nicht auswertbar, *konzentrationsabhängiger Effekt

	Methode	Einfluss auf	Zelllinie	MgSO ₄	MnSO ₄	NiCl ₂	HgCl ₂
Zellkultur	MTS-Assay	metabolische Aktivität	JEG3	→	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓ ↓
			HTR8/SVneo	→	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓ ↓
	Trypanblaufärbung	Zelltodrate	HTR8/SVneo	→	↑	↑ ↑	↑ ↑ ↑
	FACS	Zelltodrate	JEG3	→	↑	↑ ↑	↑ ↑ ↑
			HTR8/SVneo	→	↑	↑ ↑	↑ ↑ ↑
	Glukose	Konzentration		→	↑ ↑	↑	↓ *
	Laktat		JEG3	→	↓	↓	↓ ↓ ↓
	βhCG			→	↓	↓	↓ ↓
	Sphäroide	Morphologie	JEG3	→	↓	↓	↓ ↓ ↓
			HTR8/SVneo	→	↓	↓	↓ ↓ ↓
Explantate	MTS-Assay	metabolische Aktivität		→	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓ ↓
	Glukose			→	↑	↑	↓ *
	Laktat			→	↓	↓	↓ ↓ ↓
	βhCG	Konzentration		→	→	→	↓ *
	Estradiol			→	↓ *	↓ *	↓ ↓
	Progesteron			→	→	→	→
	IH	gefärbter Zellen			n.a.	n.a.	n.a.

lismus gemessen im MTS-Assay stimmt sehr gut mit der im FACS (Durchflusszytometrie) ermittelten Vitalität der Zellen überein. Lediglich unter der Behandlung mit NiCl₂ trat eine eher schwache Übereinstimmung zwischen der Trypanblau-Färbung und dem MTS-Assay bzw. der FACS-Analyse auf. Die Trypanblau-Färbung konnte die Einschränkung in der Vitalität weniger sensitiv wiedergeben.

Tabelle 6.4.: RMSE der verwendeten Methoden zur Vitalitätsanalyse bei HTR8/SVneo Zellen

Dargestellt ist der RMSE (Root-Mean-Square-Error; dt.: Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme), welcher anhand des Mittelwertes der drei Versuchswiederholungen der verschiedenen Methoden zur Vitalitätsanalyse an HTR8/SVneo Zellen errechnet wurde. Dieser dient dem Vergleich der verschiedenen Methoden zur Vitalitätsanalyse, die für die HTR8/SVneo Zellen durchgeführt wurden. Werte $\leq 0,3$ wurden als starke, zwischen 0,3 und 0,6 als mittlere und $>0,6$ als schwache Übereinstimmung gewertet.

	Metalle			
	MgSO ₄	MnSO ₄	NiCl ₂	HgCl ₂
<i>MTS/FACS</i>	0,02	0,37	0,19	0,11
<i>MTS/Trypanblau</i>	0,03	0,14	0,69	0,22
<i>FACS/Trypanblau</i>	0,03	0,34	0,70	0,23

Der RMSE der bei den JEG3 Zellen verwendeten Methoden ist Tab. 6.5 zu entnehmen. Die beste Übereinstimmung ergab sich zwischen der FACS-Analyse und dem Laktatspiegel unabhängig mit welchem Metall die Zellen behandelt wurden. Die schlechtesten Übereinstimmungen fanden sich beim Glukosespiegel im Vergleich mit einer beliebigen anderen Methode. Um dies einordnen zu können, sollte man sich die Kurvenverläufe im Diagramm noch einmal vergleichend anschauen. Exemplarisch sei dafür die Abb. 6.38. Dabei fällt auf, dass es sich um einen entgegengesetzten Kurvenverlauf handelt. Schwache Übereinstimmungswerte müssen unter Zuhilfenahme der bildlichen Darstellung gewertet werden und liegen häufig in reziproken Kurvenverläufen begründet, welche ebenso einen Zusammenhang charakterisieren. Die Glukosemessung ergab entgegengesetzt aller anderen verwendeten Methoden mit steigender Konzentration erhöhte Werte, was für einen sinkenden Glukosemetabolismus und steigende Toxizität spricht und somit wiederum zu den Ergebnissen der restlichen Methoden insbesondere dem MTS-Assay passt.

Unter Berücksichtigung dieses Zusammenhangs ergeben sich für die bei den JEG3 Zellen verwendeten Methoden insgesamt starke bis mittlere Übereinstimmungen.

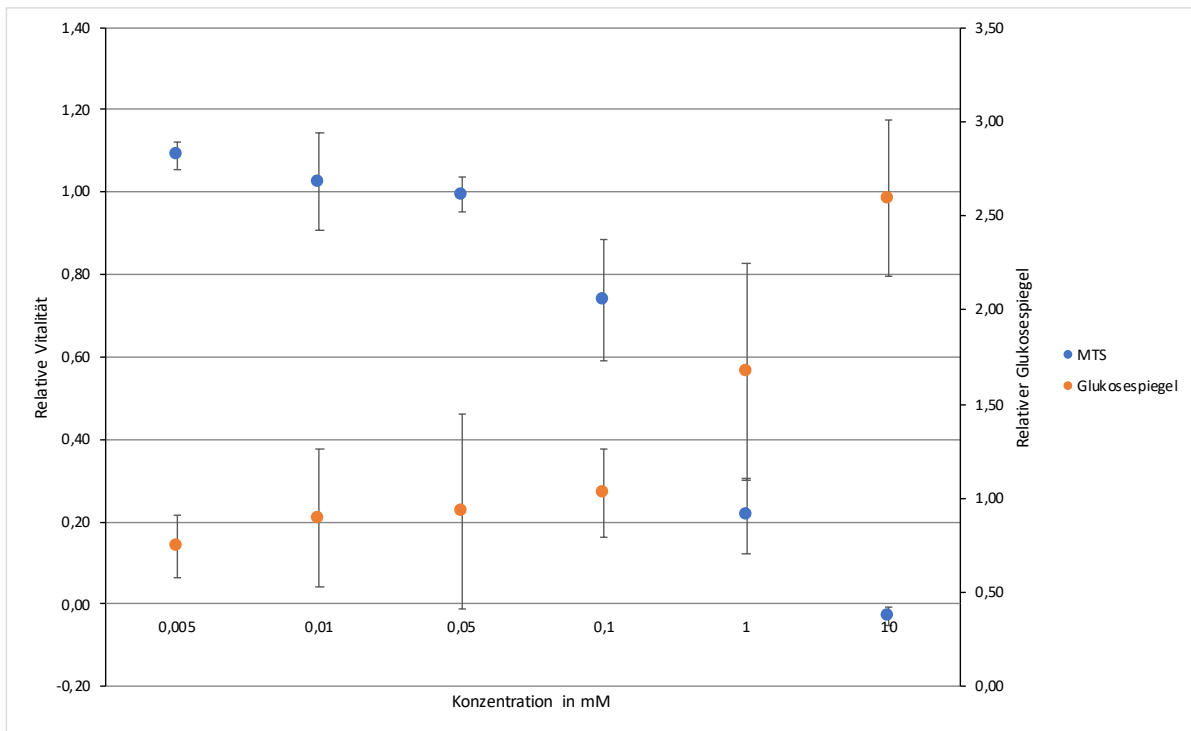


Abb. 6.38.: Vergleich der Ergebnisse des MTS-Assays und der Messung des Glukosespiegels im Kulturüberstand nach Inkubation mit $MnSO_4$ an Zellkulturen von JEG3 Zellen
 Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Vitalität gemessen mittels MTS-Assay sowie des Glukosespiegels gemessen im Kulturüberstand nach Inkubation von JEG3 Zellen mit $MnSO_4$ in verschiedenen Konzentrationen für 24 h. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Es wurde eine Normierung auf die unbehandelte Kontrolle vorgenommen (n=3).

Tabelle 6.5.: RMSE der verwendeten Methoden zur Vitalitätsanalyse bei JEG3 Zellen

Dargestellt ist der RMSE (Root-Mean-Square-Error; dt.: Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme), welcher anhand des Mittelwertes der drei Versuchswiederholungen der verschiedenen Methoden zur Vitalitätsanalyse an JEG3 Zellen errechnet wurde. Dieser dient dem Vergleich der verschiedenen Methoden zur Vitalitätsanalyse, die für die JEG3 Zellen durchgeführt wurden. Werte $\leq 0,3$ wurden als starke, zwischen 0,3 und 0,6 als mittlere und $>0,6$ als schwache Übereinstimmung gewertet.

	Metalle			
	MgSO₄	MnSO₄	NiCl₂	HgCl₂
MTS				
<i>FACS</i>	0,11	0,59	0,45	0,60
<i>Glukose</i>	0,21	1,12	0,88	1,32
<i>Laktat</i>	0,11	0,49	0,38	0,41
<i>β-hCG</i>	0,07	0,21	0,06	0,36
FACS				
<i>Glukose</i>	0,11	0,54	0,44	0,85
<i>Laktat</i>	0,06	0,16	0,11	0,30
<i>β-hCG</i>	0,07	0,48	0,42	0,66
Glukose				
<i>Laktat</i>	0,14	0,69	0,53	0,95
<i>β-hCG</i>	0,18	1,00	0,84	1,31
Laktat				
<i>β-hCG</i>	0,10	0,39	0,36	0,48

Die im Vergleich zu den HTR8/SVneo Zellen geringere Übereinstimmung zwischen MTS-Assay und FACS-Analyse scheint mit einer stärkeren morphologischen Veränderung der JEG3 Zellen durch die Metallbehandlung begründet. Zelltrümmer werden als Artefakte im FACS zum Teil nicht mit erfasst und es ergibt sich eine vermeintlich hohe Vitalität. Zwischen den beiden verwendeten Zelllinien ergaben sich insgesamt eine sehr gute Übereinstimmung der verwendeten Methoden (vgl. Tab. 6.6).

Die RMSE-Werte des Methodenvergleichs bei den metallbehandelten Plazentaexplantaten ergab eine eher schwache Übereinstimmung des MTS-Assays mit allen anderen Methoden (vgl. Tab. 6.7). Bei Betrachtung der entsprechenden Diagramme zeigte sich das MTS-Assay als sensitivere Methode, um einen toxischen Effekt durch die Behandlung nachzuweisen. Exemplarisch seien in Abb. 6.39 die Diagramme des

Tabelle 6.6.: RMSE der verwendeten Methoden zur Vitalitätsanalyse zum Vergleich von JEG3 und HTR8/SVneo Zellen

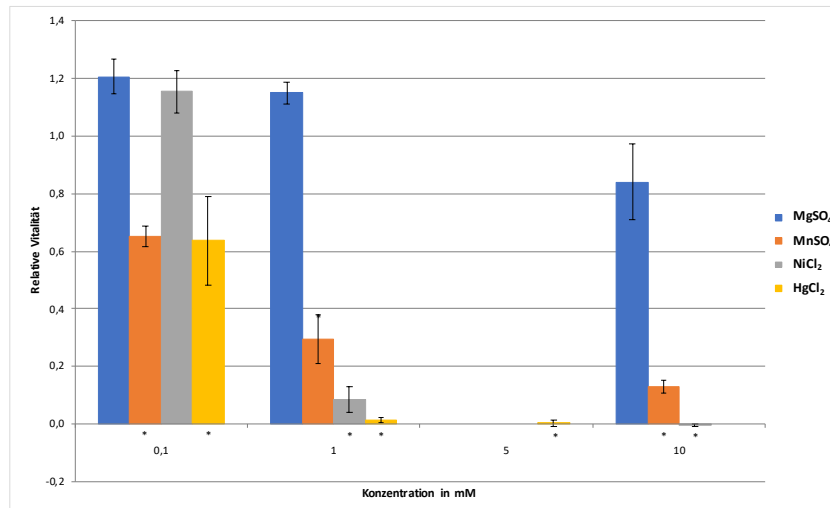
Dargestellt ist der RMSE (Root-Mean-Square-Error; dt.: Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme) der verschiedenen Methoden zur Vitalitätsanalyse zum Vergleich der beiden Zelllinien JEG3 und HTR8/SVneo. Der RMSE wurde anhand des Mittelwertes der drei Versuchswiederholungen pro Methode errechnet. Werte $\leq 0,3$ wurden als starke, zwischen 0,3 und 0,6 als mittlere und $>0,6$ als schwache Übereinstimmung gewertet.

	Metalle			
	MgSO ₄	MnSO ₄	NiCl ₂	HgCl ₂
MTS	0,10	0,26	0,04	0,32
FACS	0,01	0,09	0,28	0,55

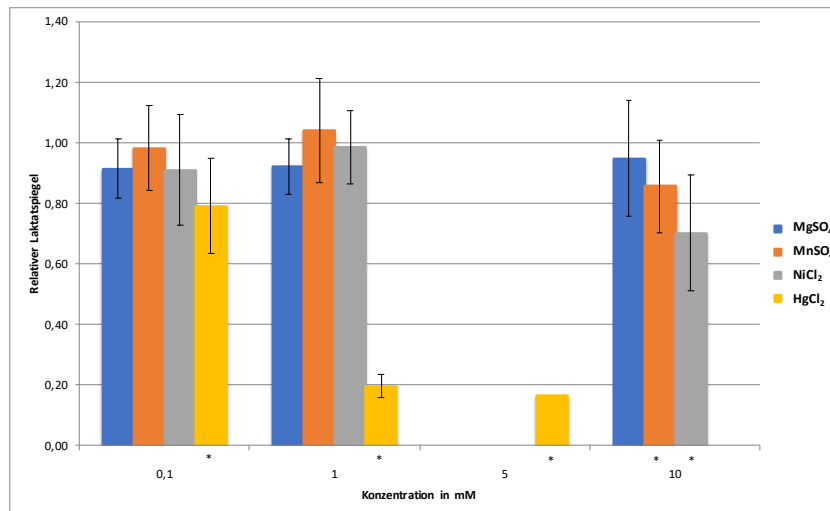
MTS-Assays und des Laktatspiegels noch einmal gegenübergestellt. Das MTS-Assay konnte beispielsweise im Gegensatz zum Laktatspiegel einen deutlichen Effekt durch die Behandlung mit MnSO₄ und NiCl₂ nachweisen.

Die verschiedenen Parameter, welche aus dem Kulturüberstand bestimmt wurden, zeigten insgesamt eine gute Übereinstimmung. Keiner der Parameter konnte einen deutlichen Effekt der Behandlung nachweisen.

Der Vergleich der Ergebnisse der Zellkulturversuche mit denen der Explantatkultur zeigt eine mittlere bis schwache Übereinstimmung (vgl. Tab. 6.8). Die Zelllinien reagieren sensibler auf die Metallbehandlung als der Gewebeverband der Plazentaexplantate. Um ähnlich starke Effekte bei den resistenteren Plazentaexplantaten zu erzeugen, bedarf es noch höherer Konzentrationen der verwendeten Metalle. Die Tendenzen der beobachteten Effekte stimmen jedoch bei Vergegenwärtigung der Diagramme überein. Exemplarisch seien die Ergebnisse des MTS-Assays an den Zelllinien und Plazentaexplantaten noch einmal gegenübergestellt (vgl. Abb. 6.40).



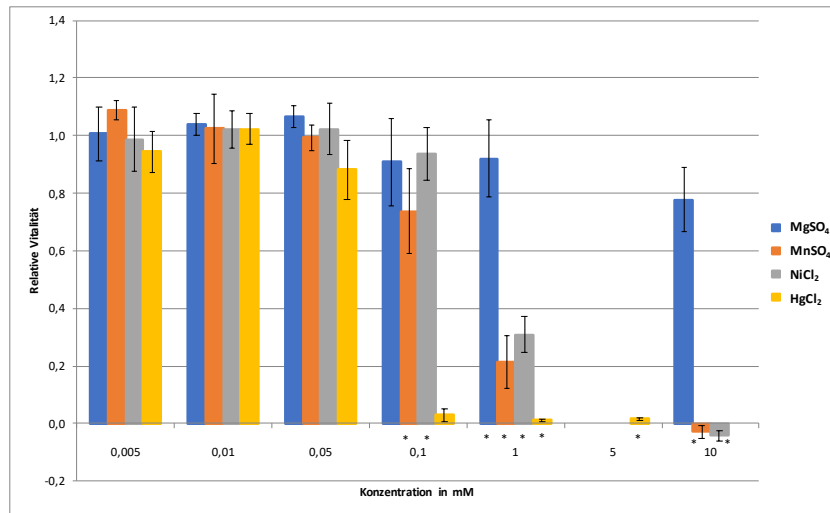
(a) MTS-Assay



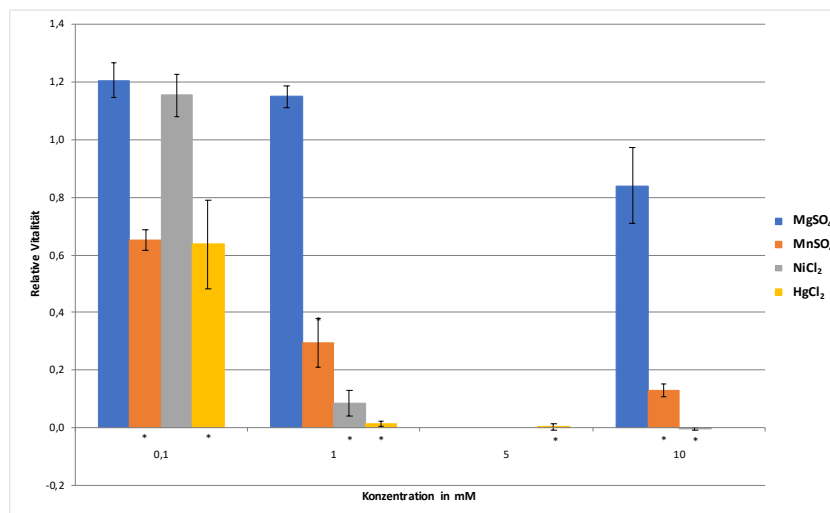
(b) Laktatspiegel

Abb. 6.39.: Gegenüberstellung der Ergebnisse von MTS-Assay und relativem Laktatspiegel an Plazentaexplantaten nach Inkubation mit Metallsalzen

Gegenübergestellt sind die Ergebnisse des MTS-Assays a) und der Messung des Laktatspiegels im Kulturüberstand von Plazentaexplantaten b) nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentrationen. Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl₂ mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Nach einer Erholungsphase von 24 h wurde das unveränderte Kulturmedium durch Kulturmedium mit Zusatz der gewünschten Konzentration Metallsalz ausgetauscht. Die Inkubation mit den Metalllösungen wurde nach weiteren 24 h beendet. Es erfolgte eine Normierung auf das jeweilige Explantatgewicht und zur stets mitgeführten unbehandelten Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. *p<0,05 (Duplikate für alle Behandlungen & Quadruplikate für die unbehandelte Kontrolle pro Versuchsdurchführung, n=3, Mann-Whitney-U-Test, SPSS)



(a) MTS-Assay JEG3 Zellen



(b) MTS-Assay Plazentaexplantate

Abb. 6.40.: Gegenüberstellung der Ergebnisse des MTS-Assays an JEG3 Zellen und an Plazentaexplantaten nach Inkubation mit Metallsalzen

Gegenübergestellt sind die Ergebnisse des MTS-Assays an JEG3 Zellen a) und an Plazentaexplantaten b) nach 24 h Inkubation mit Metalllösungen unterschiedlicher Konzentrationen. Aufgrund der hohen Toxizität wurde HgCl₂ mit 5 mM statt 10 mM als höchste Konzentration verwendet. Nach 24 h Kulturdauer wurde das unveränderte Kulturmedium durch Kulturmedium mit Zusatz der gewünschten Konzentration Metallsalz ausgetauscht. Die Inkubation mit den Metalllösungen wurde nach weiteren 24 h beendet. Im Falle der Plazentaexplantate erfolgte eine Normierung auf das jeweilige Explantatgewicht und zur mitgeführten unbehandelten Kontrolle. Im Falle der JEG3 Zellen erfolgte lediglich eine Normierung auf die unbehandelte Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus allen Messwerten. Die Signifikanzberechnungen beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle. *p<0,05 (Duplikate für alle Behandlungen & Quadruplikate für die unbehandelte Kontrolle der Explantate pro Versuchsdurchführung, n=3, Mann-Whitney-U-Test, SPSS)

Tabelle 6.7.: RMSE der verwendeten Methoden zur Vitalitätsanalyse bei Plazentaexplantaten nach Metallinkubation

Dargestellt ist der RMSE (Root-Mean-Square-Error; dt.: Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme) zum Vergleich der verschiedenen Methoden zur Vitalitätsanalyse, die für die Plazentaexplantate nach Metallinkubation durchgeführt wurden. Der RMSE wurde anhand des Mittelwertes der drei Versuchswiederholungen pro Methode errechnet. Zuvor erfolgte eine Normierung auf das Explantatgewicht. Werte $\leq 0,3$ wurden als starke, zwischen 0,3 und 0,6 als mittlere und $>0,6$ als schwache Übereinstimmung gewertet.

	Metalle			
	MgSO₄	MnSO₄	NiCl₂	HgCl₂
MTS				
<i>Glukose</i>	0,09	0,77	1,32	1,27
<i>Laktat</i>	0,17	0,57	1,24	0,61
<i>β-hCG</i>	0,36	0,64	1,19	1,47
<i>Estradiol</i>	0,15	0,62	1,37	0,88
<i>Progesteron</i>	0,26	0,64	1,26	1,42
Glukose				
<i>Laktat</i>	0,08	0,24	0,32	0,75
<i>β-hCG</i>	0,27	0,20	0,26	0,39
<i>Estradiol</i>	0,06	0,23	0,63	0,70
<i>Progesteron</i>	0,17	0,15	0,30	0,58
Laktat				
<i>β-hCG</i>	0,20	0,07	0,09	0,87
<i>Estradiol</i>	0,02	0,05	0,33	0,29
<i>Progesteron</i>	0,11	0,10	0,02	0,82
β-hCG				
<i>Estradiol</i>	0,22	0,03	0,41	0,68
<i>Progesteron</i>	0,10	0,06	0,09	0,24

Tabelle 6.8.: RMSE der verwendeten Methoden zur Vitalitätsanalyse zum Vergleich zwischen Zelllinien und Plazentaexplantaten

Dargestellt ist der RMSE (Root-Mean-Square-Error; dt.: Wurzel der mittleren Fehlerquadratsumme) der verschiedenen Methoden zur Vitalitätsanalyse zum Vergleich der beiden Zelllinien JEG3 und HTR8/SVneo mit den Plazentaexplantaten nach Metallinkubation (BP). Der RMSE wurde anhand des Mittelwertes der drei Versuchswiederholungen pro Methode errechnet. Im Falle der Plazentaexplantate erfolgte zuvor eine Normierung auf das Explantatgewicht. Werte $\leq 0,3$ wurden als starke, zwischen 0,3 und 0,6 als mittlere und $>0,6$ als schwache Übereinstimmung gewertet.

	Metalle			
	MgSO₄	MnSO₄	NiCl₂	HgCl₂
MTS				
<i>HTR8/BP</i>	0,14	0,50	0,82	1,55
<i>JEG3/BP</i>	0,12	0,56	0,86	1,65
Glukose				
<i>JEG3/BP</i>	0,18	0,47	0,31	0,36
Laktat				
<i>JEG3/BP</i>	0,05	0,22	0,21	0,76
β-hCG				
<i>JEG3/BP</i>	0,30	0,56	0,61	0,95

7. Diskussion

Die menschliche Plazenta ist ein sehr komplexes Organ, dessen Entwicklung, Struktur und Funktionsmechanismen noch immer nicht vollständig verstanden sind (Guttmacher et al. 2014). Sie liefert die Grundlage zur erfolgreichen Reproduktion durch die erstaunlichen Mechanismen der begrenzten Invasion ins mütterliche Endometrium ähnlich dem Verhalten von Tumorzellen und ermöglicht die Symbiose zwischen zwei nicht identischen Organismen durch Immuntoleranz (Buse et al. 2014). Mit der Versorgung des Fetus mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie ihrer Entgiftungsfunktion von Stoffwechselendprodukten, toxischen Substanzen und Medikamenten ermöglicht sie die gesunde Entwicklung neuen menschlichen Lebens (Syme et al. 2004). Die Komplexität dieser Vorgänge bietet eine breite Palette an möglichen Pathologien, die für Mutter und Kind nicht nur kurzfristige sondern auch lebenslange Folgen haben können. Beispielhaft seien die Präeklampsie, intrauterine Wachstumsrestriktion, Frühgeburtlichkeit und mütterliche Insulinresistenz bis zum Gestationsdiabetes genannt (John und Hemberger 2012). Mit dem Human Placenta Project gibt es Bestrebungen, das fehlende Wissen unter in vivo-Bedingungen zu erlangen und non-invasive Marker für Schwangerschaftspathologien zu entwickeln. Damit sollen diese zukünftig frühzeitig erkannt bzw. bei Risikokonstellationen präventiv entgegengesteuert werden (Guttmacher und Spong 2015). Eine Vervollständigung des Wissens über die menschliche Plazenta dient nicht nur zur Prävention von schwangerschaftsassozierten Erkrankungen und deren Folgen für Mutter und Kind. Die Plazenta birgt ebenso ein großes Potenzial zur in vitro-Simulation komplexer Bedingungen und Wirkungen auf den menschlichen Organismus und könnte zukünftig präklinische Tests in Form von Tierversuchen ergänzen und möglicherweise vermeiden. Auch können zusätzliche Informationen über die Wirkung toxischer Substanzen während der Schwangerschaft gewonnen werden, die aufgrund ethischer Aspekte nicht durch klinische Studien an Schwangeren durchgeführt werden können und lediglich auf empirischen Daten und Fallberichten basieren. Die Plazenta verfügt über vielfältige Mechanismen zur Erstellung der Plazentaschranke und Entgiftung zum

Schutz des Fötus vor toxischen Substanzen, wie aktive Transporter in Form von p-Glykoproteinen oder Enzymen zum Substanzabbau wie Cytochrom P-450. Die Erkenntnisse der letzten Jahre ergaben, dass trotz dieser Schutzmechanismen Substanzen zu einem gewissen Anteil in den kindlichen Kreislauf übertreten (Syme et al. 2004). Diese Mechanismen und Wirkungen lassen sich aufgrund der hohen Artspezifität von Plazenten anhand von Tierversuchen zum Beispiel an Mäusen nur unzureichend auf den Menschen übertragen (Schmidt et al. 2015). Dies kann mit der menschlichen Plazenta als Modellorgan umgangen werden. Kein anderes gesundes Organ steht nach der Entnahme regelmäßig in einer höheren Anzahl zur Verfügung. Die Bereitschaft die Plazenta nach der Entbindung für wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung zu stellen und sie damit noch einen weiteren Zweck erfüllen zu lassen, ist im allgemeinen sehr hoch (Halkoaho et al. 2010).

Für toxikologische Tests an der menschlichen Plazenta stehen unterschiedlich komplexe Methoden zur Verfügung, welche in einer hierarchischen Testkaskade durchführbar sind (Göhner et al. 2014). Diese reichen über die Nutzung von Zelllinien über Gewebeexplantate und isolierten Primärzellen bis zur ein- oder zweiseitigen Plazentaperfusion. Je komplexer das Testverfahren, desto besser simuliert man an die in vivo-Bedingungen. Es reduziert sich allerdings gleichzeitig die Anzahl an möglichen Versuchen pro Zeitfenster. Während mittels Zelllinien eine hohe Zahl an Versuchswiederholungen und gleichzeitige Testung verschiedener Substanzen und Konzentrationen möglich ist, wird bei einer Perfusion eine Plazenta eingesetzt, um eine oder wenige Substanzen zu testen. Ebenso ist die Reproduzierbarkeit von Zellkulturversuchen auch im Vergleich zwischen verschiedenen Forschungseinrichtungen sehr hoch. Die Nutzung von Plazentagewebe unterliegt indes immer interindividuellen Schwankungen und ist somit nur begrenzt übertragbar. Dieser Umstand wird durch das Fehlen von standardisierten Kulturbedingungen und Versuchsprotokollen erschwert. Ziel dieser Arbeit war es für das Plazentalabor standardisierte Protokolle für die Kultur von Plazentaexplantaten und für verschiedene Testverfahren an Zelllinien und Plazentaexplantaten zu erarbeiten und diese nach Effektivität zu beurteilen.

Die an den immortalisierten Zelllinien JEG3 und HTR8/SVneo in der 2D-Zellkultur durchgeführten Versuche sind lange verwendete und gut etablierte Methoden. Sie ermöglichen die Generierung eines hohen Datenvolumens in kurzer Zeit mit gut reproduzierbaren Ergebnissen, welche auch zwischen verschiedenen Forschungslaboren vergleichbar sind (Kapałczyńska et al. 2018). Gleichzeitig ist die Simulation von in

vivo-Bedingungen mit diesen Methoden leider begrenzt. In komplexeren Versuchsaufbauten wie der 3D-Kultur kommen Aspekte wie die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion besser zum Tragen (Friedrich et al. 2007, Kunz-Schughart et al. 2004). Auch entspricht das Verhalten der Zellen durch die Transformierung und Immortalisierung nicht mehr ihrem natürlichen (Bilban et al. 2010, Morales-Prieto et al. 2012). Mit zunehmender Passagennummer besteht eine immer größere Wahrscheinlichkeit, dass der Charakter der Zellen sich zu ihrem ursprünglichen weiter verändert. Jedoch behalten die JEG3 Zellen anders als die HTR8/SVneo Zellen ihre Fähigkeit zur Hormonproduktion, weshalb sich Hormone als Parameter verwenden lassen (Hemberger et al. 2019).

MTS-Assay als toxikologisches Verfahren

Das MTS-Assay stellt eine einfache und schnelle Möglichkeit dar, die Vitalität von Zellen anhand des Glukoseumsatzes zu messen (Astashkina et al. 2012). Es werden relativ wenig Zellen bzw. Gewebe pro Probe benötigt, was eine hohe Anzahl an Proben pro Versuchsdurchführung ermöglicht und somit eine hohe Datenmenge generieren kann. Es ist ein weit verbreitetes, häufig genutztes Assay, was gut reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse mit einer hohen Genauigkeit liefert. Verglichen mit anderen Assays wird die Sensitivität des MTS-Assays etwas geringer angegeben bei einer guten Spezifität (Malich et al. 1997, Astashkina et al. 2012). Es ist mit standardisierten Protokollen als Screeningtest für toxikologische Fragestellungen gut geeignet. Es ließ sich eine deutliche Beeinträchtigung der Vitalität durch toxische Metalle wie HgCl_2 im Gegensatz zu MgSO_4 nachweisen. Jedoch war keine deutliche Unterscheidbarkeit von Substanzen mit recht ähnlich toxischem Potenzial wie NiCl_2 und MnSO_4 gegeben.

Da es sich um eine photospektrometrische Methode handelt, muss mit einer Beeinflussung der Ergebnisse durch die Färbung der Metalle an sich gerechnet werden. Die mit 10 mM MnSO_4 behandelten Zellen erscheinen lichtmikroskopisch zum Beispiel deutlich braun, was eine Erklärung für die vermeintliche Zunahme der Vitalität der HTR8/SVneo Zellen bei dieser Konzentration bietet. Komponenten des Kulturmediums mit 10 % FKS wie Albumin können die Ergebnisse verfälschen (Huang et al. 2004). Auch der Glukosegehalt und die verwendeten Zellen beeinflussen das Ergebnis des Assays, weshalb die Nutzung eines Standardprotokolls essentiell ist (Vistica et al. 1991). Um Einflüsse durch das verwendete Kulturmedium auszuschließen,

wurde während des Versuchs serumfreies Medium ohne Phenolrot verwendet. Auch Luftblasen, Volumenunterschiede in den Wells oder Gewebereste der Explantate führen zu einer Verfälschung der Messergebnisse, weshalb besondere Sorgfalt in der Versuchsdurchführung geboten ist.

Trypanblaufärbung als toxikologisches Verfahren

Zur Verifizierung der Ergebnisse des MTS-Assays wurde eine Färbung mittels Trypanblau vorgenommen, wodurch nicht vitale Zellen blau erscheinen. Dies ist eine einfach durchzuführende Methode. Es werden jedoch wesentlich mehr Zellen pro Probe benötigt und es ist mit einem erheblichen zeitlichen Aufwand verbunden, da es sich um eine lichtmikroskopische Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer handelt. Es ist somit nicht möglich ein vergleichbar hohes Datenvolumen wie mittels MTS-Assay zu generieren und die Methode ist stark abhängig vom Durchführenden ([Astashkina et al. 2012](#)). Stoll ([Stoll et al. 2008](#)) verglich die Methode der Trypanblaufärbung mit einem MTT-Assay zur Bestimmung der Rate an vitale Zellen nach Kryokonservierung und erhielt eine um 20 % höhere Rate an vermeintlich vitalen Zellen nach Trypanblaufärbung, als nach Rekultivierung tatsächlich proliferierten. Diese Methode eignet sich somit nur sehr eingeschränkt zur effektiven Ergänzung eines toxikologischen Screenings.

FACS-Analyse nach Färbung mit Ann V und PJ

Anders ist es bei der FACS-Analyse nach Färbung der Proben mit Ann V und PJ. Dafür werden zwar pro Probe auch eine relativ hohe Zellzahl benötigt, weshalb in einer Durchführung nur eine begrenzte Zahl an Proben möglich ist, die Analyse erfolgt jedoch vollautomatisch am Durchflusszytometer. Es ergeben sich somit direkt quantitativ auswertbare Daten, die gut reproduzierbar und vergleichbar sind. Es lässt sich die Zelltodrate anhand der Ann V und PJ positiv gefärbten Zellen ermitteln. Diese Färbung kann kombiniert werden mit einer Färbung mit Tetramethylrhodamine-Methylester (TMRM), welches sich in aktivierten Mitochondrien anreichert und somit lebende Zellen färbt. Eine weiterführende Unterscheidung zwischen verschiedenen Formen des Zelltods ist ebenfalls möglich. Apoptotische Zellen erscheinen dann TMRM negativ, Ann V positiv und PJ negativ, wohingegen nekrotische Zellen TMRM

negativ und Ann V und PJ positiv gefärbt werden. Lebendige Zellen werden TMRM positiv und Ann V und PJ negativ gefärbt (Wallberg et al. 2016).

Sowohl die Färbung mit Trypanblau als auch die FACS-Analyse konnte die Ergebnisse des MTS-Assays in weiten Teilen bestätigen. Es gelang eine gute Diskriminierung zwischen stark unterschiedlich toxischen Substanzen wie HgCl_2 und MgSO_4 , jedoch eine weniger gute Unterscheidung zwischen MnSO_4 und NiCl_2 . Laut den Versuchsergebnissen scheint es eine geringe bzw. sogar abnehmende Toxizität von MnSO_4 in der höchsten verwendeten Konzentration von 10 mM zu geben. Die Zellen müssen für beide Methoden mittels Trypsin aus dem Well gelöst und vereinzelt werden. Dies war nach der Behandlung mit 10 mM MnSO_4 nur sehr schwer möglich. MnSO_4 scheint in hohen Konzentrationen ein starres Gerüst zu bilden, welches eine Trypsinierung erschwert und somit falsch niedrige Zelltodraten ergibt. Ein weiterer Einflussfaktor kann eine starke Zerstörung der Zellen unter Inkubation mit hohen Konzentrationen von HgCl_2 darstellen, welche sich in der FACS-Analyse bei 5 mM zeigt. Hier scheint es zu einem Anstieg der Vitalität im Vergleich zu einer Behandlung mit 1 mM HgCl_2 zu kommen. Jedoch liegt die Vermutung nahe, dass die entstandenen Zelltrümmer vom Durchflusszytometer nicht mehr als Zellen sondern als Verunreinigung gewertet wurden (Wallberg et al. 2016). Dieser Effekt scheint bei JEG3 Zellen stärker ausgeprägt zu sein als bei HTR8/SVneo Zellen. Diese Annahme wird bestärkt durch das Fehlen eben jenen Effektes bei der Färbung mit Trypanblau. Insgesamt reagierte das MTS-Assay bereits bei niedrigeren Konzentrationen auf die Metallbehandlung als die anderen Methoden. Der Glukosemetabolismus scheint somit früher eingeschränkt, als es zum Zelltod kommt. Die Annahme der Übertragbarkeit eines niedrigen Glukoseumsatzes auf die Zelltodrate ist damit nicht völlig gegeben.

Glukose- und Laktatspiegel im Kulturüberstand als Maß für toxische Effekte

Ein weiterer Vorteil der FACS-Analyse ist, dass sich im gleichen Versuchsansatz die Überstandsanalysen durchführen lassen. Das Volumen des Kulturüberstandes einer Probe reicht aus, damit alle Messungen vorgenommen werden können ohne eine Pooling aus mehreren vornehmen zu müssen. Glukose- und Laktatspiegel im Kulturüberstand sind kostengünstig zu bestimmende Parameter, welche zur Einschätzung eines toxischen Effektes durch eine Substanz genutzt werden können. Ein hoher

Glukosespiegel lässt auf eine verminderte Vitalität der Zellen schließen. Eine geringere Anzahl lebender Zellen benötigt weniger Glukose aus dem Kulturmedium, die gemessene Glukosekonzentration im Kulturüberstand steigt an. Nach Behandlung mit den Metalllösungen ergab sich ab einer Konzentration von 0,1 mM ein deutlich erkennbarer Anstieg des Glukosespiegels in der Kultur von JEG3 Zellen. Eine Abstufung zwischen den verwendeten Metallen war gegeben. MgSO₄ war deutlich am wenigsten toxisch, HgCl₂ am meisten. Bei 5 mM HgCl₂ ließ sich jedoch in allen Versuchswiederholungen sowohl in der Zellkultur wie auch in der Explantatkultur ein sehr niedriger Glukosespiegel messen. Es scheint zu einem stark erhöhten Glukoseverbrauch aufgrund einer massiven Apoptose der Zellen gekommen zu sein. Analog zum Anstieg des Glukosespiegels mit steigender Toxizität konnte ein Abfall des Laktatspiegels gemessen werden, was in einer verminderten Verstoffwechslung von Glukose zu Laktat mit steigender Toxizität begründet ist. Die Bestimmung des Glukose- und Laktatspiegels in der Explantatkultur zeigte geringere Unterschiede zwischen den verwendeten Metallen und Konzentrationen. Dies verdeutlicht die höhere Resistenz eines Gewebeverbandes im Vergleich zu einer uniformen Zellkultur und die bessere Annäherung an in vivo-Bedingungen durch komplexere Modelle (Miller et al. 2005). Tendenziell scheint auch in der Explantatkultur der Glukosespiegel reziprok zum Laktatspiegel zu verlaufen. Jedoch kommt es zwischen den einzelnen Plazenten zu relativ starken individuellen Schwankungen in der Höhe des Spiegels (Holzman et al. 1979), sodass eine Ausweitung des Konzentrationsbereichs der verwendeten Metalle und weitere Versuchswiederholungen nötig sind, um den Zusammenhang zu belegen.

Die LDH-Aktivität als Maß für toxische Effekte

Ein weiterer Parameter für die Toxizität einer Behandlung ist die LDH-Aktivität gemessen im Kulturüberstand (Parhamifar et al. 2019). Diese lieferte jedoch keine auswertbaren Ergebnisse. Anscheinend lag der mögliche, untere Messbereich der angewendeten Methode zur Bestimmung der LDH-Aktivität nicht niedrig genug, um auswertbare Ergebnisse zu erhalten. Eine andere Erklärung wäre eine zu lange Lagerungsdauer der Probe vor Bestimmung der Enzymaktivität und damit Inaktivierung der LDH. Um dies auszuschließen ist eine sofortige Messung nach Probenentnahme sinnvoll. Weiterhin könnte man die absolute Menge des Enzyms mittels Westernblot bestimmen.

Hormonspiegel von β -hCG, Estradiol und Progesteron als toxikologische Testparameter

Aus dem Kulturüberstand der JEG3 Zellen und Plazentaexplantate lässt sich weiterhin das primatenspezifische β -hCG bestimmen, welches eine entscheidende Rolle während der Plazentation einnimmt und nur unzureichend am Tiermodell untersucht werden kann (Cole 2012). Es stellt einen wichtigen Marker für die Plazentafunktion dar, da es durch einen intakten Synzytiotrophoblasten synthetisiert wird (Watson et al. 1995). β -hCG ist ein potentieller Marker für einen subletalen toxischen Einfluss, der in toxikologischen Screenings bisher wenig erfasst wird (Astashkina et al. 2012). In der Zellkultur der JEG3 Zellen ließ sich ein deutlicher Einfluss der Metallbehandlung auf den β -hCG-Spiegel schon im subletalen Konzentrationsbereich v.a. von HgCl_2 nachweisen. In der Explantatkultur war zu Beginn des Kulturzeitraums ein extrem hoher β -hCG-Spiegel messbar. Da die Inkubation mit den Metalllösungen erst nach einem Erholungszeitraum von 24 h erfolgte, ist der hohe β -hCG-Spiegel nach 24 h nicht durch Einfluss der Metalle begründet. Vermutlich kommt es im Zuge der Präparation zu einem β -hCG-Peak aufgrund nekrotischer Prozesse bzw. mechanische Zerstörung von Synzytiotrophoblastzellen und entspricht in dem Fall nicht einer vermeintlich hohen Vitalität (Watson et al. 1995, Miller et al. 2005). Nach der Degeneration und Ablösung des Synzytiotrophoblasten nach in Kulturnahme kommt es zu einer teilweisen Regeneration mit Aufrechterhaltung der β -hCG-Produktion, was sich in der Kultur unbehauelter Plazentaexplantate abbilden ließ (Palmer et al. 1997, Sooranna et al. 1999). Nach vier Tagen scheint es zur Bildung einer neuen Synzytiotrophoblastenschicht mit einer stabilen β -hCG-Produktion zu kommen (Simán et al. 2001). Um die Kinetik der β -hCG-Produktion erfassen zu können, sollte, anders als bei der Inkubation mit Metalllösungen, eine Kultur der Explantate über vier Tage hinaus erfolgen. Es ist nötig mehrere unbehauelte Explantate zur Kontrolle der Regeneration des Gewebes mitzuführen. Es bleibt zu diskutieren, ob der Erholungszeitraum für die Explantatkultur von 24 h ebenfalls auf vier Tage ausgedehnt werden sollte. Eine Behandlung mit den Metalllösungen nach 24 h erbrachte keine Diskriminierung zwischen verschiedenen toxischen Substanzen anhand des β -hCG-Spiegels. Ein weiteres Problem ist der naturgemäß hohe Schwankungsbereich von β -hCG. Die sehr starken individuellen Schwankungen in der Höhe des β -hCG-Spiegels werden in der Weite des Normbereichs von β -hCG in Serumproben widerspiegelt (Cole 2012). Diese Schwankungen waren auch in den Kulturüberständen messbar, sodass

es zu hohen Standardabweichungen bei diesen Experimenten kommt. Möglicherweise könnte dies durch eine Bestimmung des Serumspiegels der Schwangeren zur Geburt und der anschließenden relativen Betrachtung der Spiegel ausgeglichen werden. Die Parameter Estradiol und Progesteron, welche in der Explantatkultur ermittelt wurden, weisen eine ähnliche Kinetik wie β -hCG auf. Der initiale Peak nach 24 h ist jedoch schwächer ausgeprägt. Auch hier kommt es nach ca. vier Tagen zu einer Erholung des Spiegels in der unbehandelten Explantatkultur, was wiederum für eine längere Erholungsphase vor Behandlung mit einer toxischen Substanz sprechen würde. Insgesamt sollten die Überstandsanalysen nur in der Gesamtheit und in Kombination mit anderen Methoden gewertet werden, um Fehlinterpretationen wie zum Beispiel hohe β -hCG-Spiegel durch Nekrose statt Produktion zu vermeiden.

Immunhistochemische Färbungen mit cleavedPARP und Ki-67 für toxikologische Fragestellungen

Um die Ergebnisse der Überstandsmessungen zu untermauern, wurde als weitere Methode die immunhistochemische Färbung mittels cleavedPARP und Ki-67 in der Explantatkultur durchgeführt. Dabei konnten entgegen der Erwartungen keine auswertbaren Ergebnisse erzielt werden. Es wurde weder eine Proliferation anhand von Ki-67 positiven Zellen noch der Zelltod anhand von cleavedPARP positiven Zellen mikroskopisch nachgewiesen. Für die Ki-67-Färbung war möglicherweise die Kulturzeit der gefärbten Explantate zu kurz, wenn man von einer Neubildung des Synzytiotrophoblasten nach ca. vier Tagen ausgeht (Simán et al. 2001). Eine fehlende Färbung mit cleavedPARP kann durch Ablösung des Synzytiotrophoblasten nach kurzer Zeit erklärt werden (Watson et al. 1995). Durch das methodisch notwendige Umbetten in Einbettkassetten scheint es zum Verlust von nicht mehr vitalen Trophoblastzellen zu kommen, die dann im histologischen Präparat fehlen. Eine Anpassung des Protokolls mit einer längeren Inkubation der Antikörper, zum Beispiel über Nacht, kann ebenfalls versucht werden. Ergänzend kann eine HE-Färbung und Auswertung dieser anhand eines Scoring-Systems durchgeführt werden (Fröhlich et al. 2016a). Generell handelt es sich bei diesen histologischen Untersuchungen im Vergleich zur FACS-Analyse in der Zellkultur um zeitaufwändigere Methoden, die durch mehrere Personen ausgewertet werden müssen, um reliable, quantifizierbare Ergebnisse zu erzielen. Sie liefern jedoch auch gute Informationen über den Zustand des Ge-

webes. Eine Anpassung des Protokolls und ggf. Test von weiteren Antikörpern wie HIF-1 oder p27Kip, sowie zusätzliche HE-Färbung muss Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben. Eine Anfärbung von β -hCG und damit Markierung der Synzyotrophoblastenschicht wäre ebenfalls möglich.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Explantatkulturen wurden zur morphologischen Betrachtung auch elektronenmikroskopisch untersucht. Watson ([Watson et al. 1995](#)) konnte dabei die Degeneration des Synzyotrophoblasten sowie eine verminderte Ausbildung der Mikro villi sichtbar machen. Bei den im Rahmen dieser Arbeit entstandenen, elektronenmikroskopischen Aufnahmen handelt es sich zwar um Bilder der Zellkultur, diese zeigen jedoch scheinbar eine Zunahme von Zellfortsätzen nach Inkubation mit HgCl_2 in subletaler Konzentration. Eine Detektion des Metalls in einem Zellkompartiment gelang nicht. Generell handelt es sich um sehr aufwändige und kostenintensive Methoden, welche somit nur für spezielle Fragestellungen nicht jedoch zu Screeningzwecken geeignet sind.

3D-Sphäroidkultur als Brücke zwischen konventioneller 2D-Zellkultur und Explantatkultur

Eine Brücke zwischen der 2D-Zellkultur und Versuchen an Gewebe mittels Plazentaexplanten stellt die 3D-Sphäroidkultur dar. Diese ermöglicht eine bessere Simulation von in vivo-Bedingungen wie beispielsweise ein ähnliches Invasionsverhalten und ein verändertes Genexpressionsmuster ([Rai und Cross 2015](#)). Sphäroide in Ko-Kultur mit Plazentagewebe simulieren das in vivo-Verhalten von Tumoren ([Froehlich et al. 2018](#)) und können zur Erforschung von Stammzeleigenschaften genutzt werden ([Weber et al. 2013](#)). Innerhalb dieser Arbeit gelang die Generierung von Sphäroiden aus HTR8/SVneo und JEG3 Zellen unter Einfluss der Metalllösungen. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch anhand der Morphologie. Eine Diskriminierung zwischen ähnlich toxischen Substanzen wie NiCl_2 und MnSO_4 gelang nicht. Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte eine Ausweitung der Analysen der 3D-Zellkultur zum Beispiel durch Bestimmung von Parametern wie Glukose, Laktat und β -hCG im Kulturüberstand oder ein ergänzendes MTS-Assay sein ([Fröhlich et al. 2016b](#)).

Für immunhistochemische Analysen geeignete Schnitte der Sphäroide zu erhalten, ist aufgrund der geringen Größe der Sphäroide schwierig. Eine FACS-Analyse wäre nur mit einer ausreichenden Zellzahl pro Sphäroid bzw. eines Poolings aus mehreren umsetzbar. Neben erweiterten Analysen bieten sich weiterhin die Möglichkeiten, Sphäroide aus Primärzellen (Nandi et al. 2018) oder sogar verschiedenen Zelltypen wie zum Beispiel Fibroblasten und Trophoblasten (Muoth et al. 2016, Mehta et al. 2012) zu generieren und somit eine noch bessere Simulation von in vivo-Bedingungen zu schaffen. Eine erleichterte Sphäroidbildung, höhere Vitalität und schnellere Proliferation scheint durch die Nutzung von humanem Serum anstatt FKS zu gelingen (Mazlyam et al. 2008). Um eine realistischere Simulation der in vivo-Bedingungen zu ermöglichen, ist die Nutzung humanem Serums eine ergänzende Möglichkeit. Dies schließt einen Einfluss von nicht humanen Bestandteilen wie Proteinen auf die Ergebnisse von toxikologischen Tests aus und verbessert somit die oft mangelnde Aussagekraft präklinischer Testverfahren (Hartung 2013). Weitere Versuche zur realitätsgetreueren Umsetzung von Testverfahren sind neben der 3D-Kultur in Form von Sphäroiden Bestrebungen der Etablierung von Organs-on-chips (Huh et al. 2011). Diese sollen als organspezifische Modelle aus verschiedenen Zelltypen mit fluider Kulturumgebung realistischere in vitro-Modelle bereitstellen. Neben einem Placenta-on-a-chip Modell von Lee (Lee et al. 2016) oder Blundell (Blundell et al. 2016) sind Modelle für jedes weitere Organ ebenso denkbar. Diese vielfältigen Möglichkeiten eröffnen ein weites Feld für weitere Forschungsarbeiten, denn trotz aller Bestrebungen ist ein optimales Modell der in vivo bestehenden Bedingungen bisher nicht etabliert.

8. Schlußfolgerungen

Es gibt weitreichende Bestrebungen einer Verbesserung präklinischer, toxikologischer Testverfahren mit potentieller Einsparung von Tierversuchen bei gleichzeitig besserer Vorhersagekraft der in-vitro Wirkung einer Substanz. Die Plazenta bietet als ein regelmäßig in ausreichender Stückzahl und in gesundem Zustand zur Verfügung stehendes, menschliches Organ einzigartige Möglichkeiten für vielfältige toxikologische Untersuchungen. Dafür sind standardisierte Protokolle einer Kaskade an Versuchsmethoden nötig. Ziel dieser Arbeit war es, für das Plazentalabor verschiedene Methoden im Bereich der Zellkultur und Explantatkultur zu evaluieren. Im Zuge dessen wurde ein Protokoll für die Inkulturnahme von Plazentaexplantaten entwickelt, welches Voraussetzung für die Durchführung aller weiteren Versuche an den Explantaten war. Es zeigte sich, dass verschiedene Methoden sowohl in der Zellkultur als auch der Explantatkultur durchführbar sind. Als Screeningtest geeignet, um toxische Effekte zu messen, erwies sich dabei das MTS-Assay. Dieser zeigte sich in Kombination mit der Messung verschiedener Parametern im Kulturüberstand wie Glukose, Laktat und β -hCG als vielversprechend. Potentiell können weitere Parameter wie Estradiol und Progesteron oder die LDH-Aktivität bestimmt werden, welche unter Umständen einen Zugewinn an Informationen bieten. Die im Rahmen dieser Arbeit gemessene LDH-Aktivität erbrachte jedoch keine auswertbaren Ergebnisse. Die genannten Methoden lassen sich sowohl in der 2D-Zellkultur als auch der Explantatkultur durchführen und ermöglichen somit einen Vergleich der Ergebnisse zwischen den verschiedenen komplexen Versuchen der Simulation von in vitro-Bedingungen. Ebenso stellt die 3D-Zellkultur in Form von Sphäroiden als Brücke zwischen den zuvor genannten Verfahren eine interessante Variante dar. Es gelang aus den beiden verwendeten Zelllinien HTR8/SVneo und JEG3 stabile Sphäroide zu generieren und diese anhand der Morphologie mikroskopisch zu untersuchen. Weiterführende Versuche zur Etablierung des MTS-Assays und der Bestimmung der Parameter im Kulturüberstand der 3D-Kultur müssen als nächster Schritt umgesetzt werden.

Als ergänzende Methoden, welche nur jeweils bei einem Teil der Kulturen möglich ist, wurde in der 2D-Zellkultur die FACS-Analyse mit Ann V und PJ und in der Explantatkultur eine immunhistochemische Färbung mit cleavedPARP und Ki-67 durchgeführt. Die FACS-Analyse stellte sich als gute Ergänzung zu den anderen Methoden in der 2D-Zellkultur heraus. Die histologische Untersuchung der Explantate ergab mit dem verwendeten Protokoll keine auswertbaren Ergebnisse. Hier ist eine Anpassung des Protokolls oder die Verwendung anderer Antikörper eine Möglichkeit zur Verbesserung des Resultats. Ebenso ist eine morphologische Untersuchung und Scoring nach HE-Färbung eine erstrebenswerte Fortführung. Die Methode der visuellen Ermittlung der Zelltodrate nach Trypanblau-Färbung zeigte sich mit einem ungünstigen Aufwand-Nutzen-Verhältnis als ungeeignet. Für spezielle Fragestellungen steht auch die Elektronenmikroskopie als weitere Möglichkeit zur Verfügung. Eine Detektion von Metallakkumulation in den Zellen gelang dabei jedoch nicht. Für den routinemäßigen Einsatz als Screeningtest sind diese Verfahren aufgrund von Aufwand und Kosten nicht geeignet.

Resümierend gelang mittels der verwendeten Methoden eine Abstufung von deutlich unterschiedlich toxischen Substanzen wie $MgSO_4$ und $HgCl_2$. Eine weitere Verbesserung der Diskriminierung zwischen relativ ähnlichem toxischen Potenzial wie $MnSO_4$ und $NiCl_2$ ist jedoch nötig.

Insgesamt gelang es eine Batterie von aufeinander abgestimmten Methoden als Grundlage einer toxikologischen Testkaskade zu etablieren. Eine Ausweitung auf verschiedene, weitere Stufen wie die Nutzung von Primärzellen oder die Plazentaperfusion sowie der Ausbau der 3D-Kulturtechnik ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Das entwickelte Protokoll für die Plazentaexplantatkultur bedarf zur Standardisierung weiterer Durchführungen und eventueller, anschließender Verbesserung nach Auswertung. Eine Verlängerung der Erholungszeit vor Inkubation mit einer zu testenden toxischen Substanz deutete sich als möglicherweise gewinnbringende Korrektur an. Die Plazenta im Rahmen einer toxikologischen Kaskade für Screeningtests zu verwenden ist ein vielversprechender Ansatz, welcher jedoch komplexer Betrachtungen bedarf. Diese Arbeit konnte einen Grundstein für die Etablierung der vollständigen Kaskade für das Plazentalabor legen.

Literaturverzeichnis

- Astashkina AI, Mann BK, Grainger DW. 2012. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology and Therapeutics*.
- Aumüller G. 2007. *Anatomie: 208 Tabellen ; [mit CD-ROM zum Präp-Kurs]. Duale Reihe Anatomie*. Thieme.
- Bahn RS, Worsham A, Speeg KV, Ascoli M, Rabin D. 1981. Characterization of steroid production in cultured human choriocarcinoma cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.
- Bilban M, Tauber S, Haslinger P, Pollheimer J, Saleh L, Pehamberger H, Wagner O, Knöfler M. 2010. Trophoblast invasion: Assessment of cellular models using gene expression signatures. *Placenta*.
- Blundell C, Tess ER, Schanzer AS, Coutifaris C, Su EJ, Parry S, Huh D. 2016. A microphysiological model of the human placental barrier. *Lab on a Chip*.
- Buse E, Häeger JD, Svensson-Arvelund J, Markert UR, Faas MM, Ernerudh J, Dixon D, Cline JM, Pfarrer C. 2014. *The Placenta in Toxicology. Part I. Toxicologic Pathology*.
- Cole LA. 2009. hCG and hyperglycosylated hCG in the establishment and evolution of hemochorial placentation. *Journal of Reproductive Immunology*.
- Cole LA. 2010. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reproductive Biology and Endocrinology*.
- Cole LA. 2012. HCG, the wonder of today's science. *Reproductive Biology and Endocrinology*.
- Cole LA. 2014. The hCG Group: the Key Molecules in Human Evolution, Human Life, and Human Death. *Current Obstetrics and Gynecology Reports*.

- De Oliveira Gomes A, De Oliveira Silva DA, Silva NM, De Freitas Barbosa B, Silva Franco P, Angeloni MB, Fermino ML, Roque-Barreira MC, Bechi N, Paulesu LR, Dos Santos MC, Mineo JR, Ferro EAV. 2011. Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with toxoplasma gondii depends on gestational age. *American Journal of Pathology*.
- Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. 2007. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids - Old hat or new challenge? *International Journal of Radiation Biology*.
- Froehlich K, Stensheim H, Markert UR, Turowski G. 2018. Breast carcinoma in pregnancy with spheroid-like placental metastases a case report. *APMIS*.
- Frohlich K, Heger J, Schmidt A, Heimann Y, Al-Kawlani B, Lupp A, Turowski G. 2016. Effects of therapeutic drugs on human placenta explant cultures. *Placenta*.
- Fröhlich K, Heger J, Schmidt A, Heimann Y, Al-Kawlani B, Lupp A, Turowski G, Markert UR. 2016a. Effects of therapeutic drugs on human placenta explant cultures. *Placenta*.
- Fröhlich K, Schmidt A, Avemarg S, Heger J, Morgner S, Lupp A, Mrowka R, Turowski G, Markert UR. 2016b. Toxicological testing on placenta-derived cells cultured as monolayer, multicellular spheroids or ex vivo explants. *Journal of Reproductive Immunology*.
- Göhner C, Svensson-Arvelund J, Pfarrer C, Häger JD, Faas M, Ernerudh J, Cline JM, Dixon D, Buse E, Markert UR. 2014. The Placenta in Toxicology. Part IV: Battery of Toxicological Test Systems Based on Human Placenta. *Toxicologic Pathology*.
- Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, Macdougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK. 1993. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Experimental Cell Research*.
- Gude NM, Roberts CT, Kalionis B, King RG. 2004. Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*.
- Gutmacher AE, Maddox YT, Spong CY. 2014. The Human Placenta Project: Placental structure, development, and function in real time. *Placenta*.

- Guttmacher AE, Spong CY. 2015. The human placenta project: It's time for real time. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.
- Halkoaho A, Pietilä AM, Dumez B, Van Damme K, Heinonen S, Vähäkangas K. 2010. Ethical aspects of human placental perfusion: Interview of the mothers donating placenta. *Placenta*.
- Hartung T. 2013. Food for thought; Look back in anger - What clinical studies tell us about preclinical work. *Altex*.
- Hemberger M, Hanna CW, Dean W. 2019. Mechanisms of early placental development in mouse and humans. *Nature Reviews Genetics*.
- Holzman IR, Philipps AF, Battaglia FC. 1979. Glucose metabolism, lactate, and ammonia production by the human placenta In vitro. *Pediatric Research*.
- Huang KT, Chen YH, Walker AM. 2004. Inaccuracies in MTS assays: Major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids. *BioTechniques*.
- Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. 2011. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology*.
- John R, Hemberger M. 2012. A placenta for life. In: *Reproductive BioMedicine Online*.
- Kämmerer U, von Wolff M, Markert UR. 2004. Immunology of human endometrium. *Immunobiology*.
- Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K. 2018. 2D and 3D cell cultures a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*.
- Kohler PO, Bridson WE. 1971. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.
- Korff T, Krauss T, Augustin HG. 2004. Three-dimensional spheroidal culture of cytotrophoblast cells mimics the phenotype and differentiation of cytotrophoblasts from normal and preeclamptic pregnancies. *Experimental Cell Research*.
- Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. 2004. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: The multicellular spheroid model.

- Lee JS, Romero R, Han YM, Kim HC, Kim CJ, Hong JS, Huh D. 2016. Placenta-on-a-chip: a novel platform to study the biology of the human placenta. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 29(7):1046–1054. PMID: 26075842.
- Lee YL, Fong SW, Chen AC, Li T, Yue C, Lee CL, Ng EH, Yeung WS, Lee KF. 2015. Establishment of a novel human embryonic stem cell-derived trophoblastic spheroid implantation model. *Human Reproduction*.
- Magon N, Kumar P. 2012. Hormones in pregnancy. *Nigerian Medical Journal*.
- Malassiné A, Cronier L. 2002. Hormones and human trophoblast differentiation: A review. *Endocrine*.
- Malich G, Markovic B, Winder C. 1997. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*.
- Markert UR, Morales-Prieto DM, Fitzgerald JS. 2011. Understanding the link between the IL-6 cytokine family and pregnancy: implications for future therapeutics. *Expert Review of Clinical Immunology*, 7(5):603–609.
- Mazlyzam AL, Aminuddin BS, Saim L, Ruszymah BHI. 2008. Human Serum Is an Advantageous Supplement for Human Dermal Fibroblast Expansion: Clinical Implications for Tissue Engineering of Skin. *Archives of Medical Research*.
- Mehta G, Hsiao AY, Ingram M, Luker GD, Takayama S. 2012. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*.
- Miller RK, Genbacev O, Turner MA, Aplin JD, Caniggia I, Huppertz B. 2005. Human placental explants in culture: Approaches and assessments. *Placenta*.
- Morales-Prieto DM, Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S, Schneider U, Herrmann J, Gruhn B, Markert UR. 2012. MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta*.
- Muoth C, Wichser A, Monopoli M, Correia M, Ehrlich N, Loeschner K, Gallud A, Kucki M, Diener L, Manser P, Jochum W, Wick P, Buerki-Thurnherr T. 2016. A 3D co-culture microtissue model of the human placenta for nanotoxicity assessment. *Nanoscale*.

- Murphy VE, Smith R, Giles WB, Clifton VL. 2006. Endocrine regulation of human fetal growth: The role of the mother, placenta, and fetus. *Endocrine Reviews*.
- Nandi P, Lim H, Torres-Garcia EJ, Lala PK. 2018. Human trophoblast stem cell self-renewal and differentiation: Role of decorin. *Scientific Reports*.
- Palmer ME, Watson AL, Burton GJ. 1997. Morphological analysis of degeneration and regeneration of syncytiotrophoblast in first trimester placental villi during organ culture. *Human Reproduction*.
- Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Parhamifar L, Andersen H, Moghimi SM. 2019. Lactate Dehydrogenase Assay for Assessment of Polycation Cytotoxicity. New York, NY: Springer New York, 291–299.
- Pötgens AJ, Gaus G, Frank HG, Kaufmann P. 2001. Characterization of trophoblast cell isolations by a modified flow cytometry assay. *Placenta*.
- Rai A, Cross JC. 2015. Three-dimensional cultures of trophoblast stem cells autonomously develop vascular-like spaces lined by trophoblast giant cells. *Developmental Biology*.
- Sadler T, Langman J. 2008. *Medizinische Embryologie, German Language*:. Thieme.
- Schmidt A, Morales-Prieto DM, Pastuschek J, Fröhlich K, Markert UR. 2015. Only humans have human placentas: Molecular differences between mice and humans. *Journal of Reproductive Immunology*.
- Schröpfer A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Feix S, Anacker J. 2010. Expression pattern of matrix metalloproteinases in human gynecological cancer cell lines. *BMC Cancer*.
- Simán CM, Sibley CP, Jones CJP, Turner MA, Greenwood SL. 2001. The functional regeneration of syncytiotrophoblast in cultured explants of term placenta. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(4):R1116–R1122. PMID: 11247834.

- Sölder E, Böckle BC, Nguyen VA, Fürhapter C, Obexer P, Erdel M, Stössel H, Romani N, Sepp NT. 2012. Isolation and characterization of CD133+CD34+VEGFR-2+CD45- fetal endothelial cells from human term placenta. *Microvascular Research*.
- Sooranna SR, Oteng-Ntim E, Meah R, Ryder TA, Bajoria R. 1999. Characterization of human placental explants: Morphological, biochemical and physiological studies using first and third trimester placenta. *Human Reproduction*.
- Speckmann E, Hescheler J, Köhling R. 2008. *Physiologie*. Elsevier Health Sciences Germany.
- Stoll C, Hofmann N, Bernemann I, Glasmacher B. 2008. 109. Systematic optimisation of parameters for cryopreservation of human pulmonal endothelial cells (HP-MEC): Difference in cell survival rates analyzed by recultivation vs. trypanblue staining. *Cryobiology*.
- Syme MR, Paxton JW, Keelan Ja. 2004. *Human Placenta*. *Clinical Pharmacokinetics*.
- Troen P, Gordon EE. 1958. Perfusion studies of the human placenta. I. Effect of estradiol and human chorionic gonadotropin on citric acid metabolism. *The Journal of clinical investigation*.
- Ulfig N, Brand-Saberi B. 2017. *Kurzlehrbuch Embryologie*. *Kurzlehrbuch*. Thieme.
- Vistica DT, Monks A, Pittman A, Boyd MR. 1991. Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Research*.
- Wallberg F, Tenev T, Meier P. 2016. Analysis of apoptosis and necroptosis by fluorescence-activated cell sorting. *Cold Spring Harbor Protocols*.
- Watson AL, Palmer ME, Burton G. 1995. Pregnancy: Human chorionic gonadotrophin release and tissue viability in placental organ culture. *Human Reproduction*.
- Weber M, Knoefler I, Schleussner E, Markert UR, Fitzgerald JS. 2013. HTR8/SVneo cells display trophoblast progenitor cell-like characteristics indicative of self-renewal, repopulation activity, and expression of stemness-associated transcription factors. *BioMed Research International*.

Anhang

A. Abbildungsverzeichnis

2.1. 12 Tage alte Blastozyste	14
2.2. Plazentazotten in verschiedenen Stadien	15
2.3. Aufbau der Plazenta	16
2.4. Geborene Plazenta	17
2.5. Hormonkonzentrationen im Plasma der Mutter im Verlauf der Schwangerschaft.	18
5.1. Übersichtsschema zu den verwendeten Methoden	29
5.2. Zellkulturen von a) HTR8/SVneo und b) JEG3 Zellen	32
5.3. Hanging Drop Methode	38
6.1. Übersichtsschema zu den verwendeten Methoden	44
6.2. Relative Vitalität von HTR8/SVneo Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen mittels MTS-Assay.	45
6.3. Relative Vitalität von JEG3 Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen mittels MTS-Assay.	46
6.4. Orientierender Versuch zur relativen Vitalität von JEG3 Zellen bei verschiedenen pH-Werten gemessen mittels MTS-Assay.	48
6.5. Orientierender Versuch zur Ermittlung der Zelltodrate von HTR8/SVneo Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen mittels Trypanblaufärbung	49
6.6. Zelltodrate von HTR8/SVneo Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen in der Durchflusszytometrie nach Färbung mit PJ und Ann V.	51
6.7. Zelltodrate von JEG3 Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen in der Durchflusszytometrie nach Färbung mit PJ und Ann V.	52
6.8. Relativer Glukosespiegel von JEG3 Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand.	53
6.9. Relativer Laktatspiegel von JEG3 Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand.	54

6.10. Relativer β -hCG-Spiegel von JEG3 Zellen nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand.	56
6.11. Sphäroid von HTR8/SVneo Zellen und JEG3 Zellen ohne Zusatz von Metalllösungen.	57
6.12. Sphäroide von HTR8/SVneo Zellen	58
6.13. Sphäroide von JEG3 Zellen	59
6.14. Schnittbilder von Sphäroiden von HTR8/SVneo Zellen	60
6.15. Schnittbilder von Sphäroiden von JEG3 Zellen	61
6.16. REM-Aufnahmen von Zellkulturen von HTR8/SVneo Zellen und JEG3 Zellen	62
6.17. REM-Aufnahmen von Zellkulturen von HTR8/SVneo Zellen und JEG3 Zellen	63
6.18. REM-Aufnahmen von Zellkulturen von HTR8/SVneo Zellen unbehandelt und unter Zugabe von HgCl_2	64
6.19. REM-Aufnahmen von Zellkulturen von JEG3 Zellen unbehandelt und unter Zugabe von HgCl_2	65
6.20. TEM-Aufnahmen von Zellkulturen von HTR8/SVneo Zellen unbehandelt und unter Zugabe von HgCl_2	66
6.21. TEM-Aufnahmen von Zellkulturen von JEG3 Zellen unbehandelt und unter Zugabe von HgCl_2	66
6.22. Vitalität von unbehandelten Plazentaexplantaten gemessen mittels MTS-Assay.	68
6.23. Glukosespiegel von unbehandelten Plazentaexplantaten gemessen im Kulturüberstand.	69
6.24. Laktatspiegel von unbehandelten Plazentaexplantaten gemessen im Kulturüberstand.	70
6.25. β -hCG-Spiegel von unbehandelten Plazentaexplantaten gemessen im Kulturüberstand.	71
6.26. Estradiolspiegel von unbehandelten Plazentaexplantaten gemessen im Kulturüberstand.	72
6.27. Progesteronspiegel von unbehandelten Plazentaexplantaten gemessen im Kulturüberstand.	73
6.28. Relative Vitalität von Plazentaexplantaten nach Behandlung mit Metalllösungen gemessen mittels MTS-Assay.	75

6.29. Relativer Glukosespiegel von Plazentaexplantaten nach 24 h Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand	77
6.30. Relativer Laktatspiegel von Plazentaexplantaten nach 24 h Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand	78
6.31. Relativer β -hCG-Spiegel von Plazentaexplantaten nach 24 h Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand	79
6.32. Relativer Estradiolspiegel von Plazentaexplantaten nach 24 h Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand	80
6.33. Relativer Progesteronspiegel von Plazentaexplantaten nach 24 h Behandlung mit Metalllösungen gemessen im Kulturüberstand	81
6.34. Negativkontrolle der Färbungen mit Ki-67 (Mouse-IgG) (linke Spalte) und cleavedPARP (Rabbit-IgG) (rechte Spalte) in 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung	83
6.35. Färbungen von Plazentaexplantaten mit dem Proliferationsmarker Ki-67 (linke Spalte) und dem Apoptosemarker cleavedPARP (rechte Spalte) in 100-, 200-, 400-facher Vergrößerung	84
6.36. Ablösung des Synzytiotrophoblasten	85
6.37. Körnige Ansammlungen von Metall im histologischen Bild in 200-facher Vergrößerung	85
6.38. Vergleich der Ergebnisse des MTS-Assays und der Messung des Glukosespiegels im Kulturüberstand nach Inkubation mit $MnSO_4$ an Zellkulturen von JEG3 Zellen	90
6.39. Gegenüberstellung der Ergebnisse von MTS-Assay und relativem Laktatspiegel an Plazentaexplantaten nach Inkubation mit Metallsalzen	93
6.40. Gegenüberstellung der Ergebnisse des MTS-Assays an JEG3 Zellen und an Plazentaexplantaten nach Inkubation mit Metallsalzen	94

B. Tabellenverzeichnis

5.1. LD50-Werte der verwendeten Metalle	30
5.2. In den Versuchen verwendete Metallsalzkonzentrationen	30
5.3. Bei der Sphäroidbildung verwendete Metallsalzkonzentrationen.	38
5.4. 10faches PBS in 1000 ml dH2O	41
6.1. RMSE zum Vergleich der Ergebnisse der drei Versuchswiederholungen an unbehandelten Plazentaexplantaten	74
6.2. RMSE zum Vergleich der Ergebnisse der verwendeten Methoden zur Vitalitätsbestimmung an unbehandelten Plazentaexplantaten	87
6.3. Übersicht über die Ergebnisse der Zelllinien und Plazentaexplantate nach Metallinkubation	88
6.4. RMSE der verwendeten Methoden zur Vitalitätsanalyse bei HTR8/SVneo Zellen	89
6.5. RMSE der verwendeten Methoden zur Vitalitätsanalyse bei JEG3 Zellen	91
6.6. 53_Tabelle-HTR8vs_JEG3-RMSE	92
6.7. RMSE der verwendeten Methoden zur Vitalitätsanalyse bei Plazenta- explantaten nach Metallinkubation	95
6.8. RMSE der verwendeten Methoden zur Vitalitätsanalyse zum Vergleich zwischen Zelllinien und Plazentaexplantaten	96

C. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich beim Anfertigen dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Udo Markert für die Überlassung des Themas, die weiten Freiräume in der Umsetzung desselben und die guten fachlichen Hinweise.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. André Schmidt für die Unterstützung in methodischen Fragen und einige kritische Denkanstöße. Mein besonderer Dank gilt Julia Heger, die mir mittlerweile zu einer guten Freundin geworden ist, für manch aufmunternden Kommentar und die Hilfe während der gesamten Promotion. Ich danke auch den anderen Mitarbeitern des Plazentalabors für die gute Zusammenarbeit insbesondere Jana Pastuschek, Christin Bär und Karolin Fröhlich. Vivien Serbent und Elisabeth Preußger danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche. Ganz besonderer Dank gilt Konstanze Olschewski, ohne deren Hilfe wohl nie Ordnung in das Zahlenchaos gekommen wäre und die sich trotz übervollem Terminkalender für mich Zeit genommen hat.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie und bei meinen guten Freunden für die Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken, auf die ich mich stets verlassen kann. Ich danke meinem Mann Steffen für die Motivation, für den Ehrgeiz, den er in mir geweckt hat, für seine Liebe, seine Geduld, den Trost, den er mir gespendet hat, sowie die Unterstützung in allen Technikfragen. Ich danke ihm ebenso für die liebevolle Betreuung unserer Tochter, die mir den Freiraum ermöglicht hat, diese Schrift zu verfassen. Du bist der beste Papa der Welt!

D. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials, bei der Herstellung des Manuskripts sowie durch Korrekturlesen unterstützt haben: Konstanze Olschewski, Steffen Avemarg, Udo Markert, Julia Heger,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, am 24. April 2021

Sarah Elisa Avemarg, Verfasser