

# **Mitochondriale Membrandepolarisation der Thrombozyten bei Patientinnen mit Präeklampsie**

Irina Hennis

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung einer

Doktorin der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Florian Eyer

Prüfende der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Holger Bronger
2. apl. Prof. Dr. Björn Krämer

Die Dissertation wurde am 21.12.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 08.05.2024 angenommen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Rahmen der folgenden Publikation veröffentlicht:

Kraemer, B. F., Hennis, I., Karge, A., Kraemer, A. K., Dreyer, T. F., Kiechle, M., Kuschel, B. and Bronger, H. (2022). "Platelet mitochondrial membrane depolarization reflects disease severity in patients with preeclampsia." *Molecular Medicine* **28**, 51 (2022).

DOI: [10.1186/s10020-022-00472-x](https://doi.org/10.1186/s10020-022-00472-x)

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Präeklampsie .....	1
1.1.1	Epidemiologie und Definition .....	1
1.1.2	Weitere hypertensive Schwangerschaftserkrankungen .....	2
1.1.3	Präeklampsie-Schweregrade und das HELLP-Syndrom .....	3
1.1.4	Pathophysiologie der Präeklampsie.....	4
1.1.5	Der mitochondriale Stoffwechsel bei Präeklampsie.....	5
1.1.6	Screening, Diagnostik und Therapie .....	7
1.2	Thrombozyten .....	8
1.2.1	Allgemeine Zelleigenschaften .....	8
1.2.2	Thrombozytopenie in der Schwangerschaft .....	9
1.2.3	Thrombozyten in der Präeklampsieforschung .....	9
1.2.4	Thrombozytenapoptose .....	10
2	Zielsetzung der Arbeit .....	14
3	Materialien und Methoden.....	15
3.1	Studienpopulation .....	15
3.2	Materialien .....	16
3.2.1	Blutproben .....	16
3.2.2	Chemikalien.....	17
3.2.1	Laborzubehör.....	18
3.2.2	Antikörper.....	19
3.2.3	Puffer .....	19
3.2.4	Geräte.....	20
3.3	Blutentnahme .....	21
3.4	Thrombozytenisolation .....	21
3.5	Färbung mit JC-1.....	22
3.6	Färbung mit Phycoerythrin-gekoppeltem P-Selectin-Antikörper .....	24

3.7	Färbung mit FITC-konjugiertem Annexin V .....	25
3.8	Probenasservierung .....	27
3.9	Durchflusszytometrie .....	27
3.10	Analyse der Daten mit FlowJo .....	30
3.11	Statistische Auswertung .....	32
4	Ergebnisse.....	33
4.1	Charakteristika der Probandinnen .....	33
4.2	Signifikant verminderter Mmp-Index bei Patientinnen mit Präeklampsie.....	39
4.3	Zusammenhang des Mmp-Index mit der Schwere der Erkrankung.....	41
4.4	Erholung des Mmp-Index nach der Entbindung .....	43
4.5	Mmp-Index bei Patientinnen mit isolierter Gestationshypertonie zeigt keine Depolarisation .....	44
4.6	Dynamik des Mmp-Index anhand von Verlaufsmessungen .....	45
4.7	Annexin V-positiver apoptotischer Phänotyp bei schwerer Präeklampsie .....	47
5	Diskussion.....	49
5.1	Mitochondriale Dysfunktion in peripheren Thrombozyten bei Patientinnen mit Präeklampsie .....	49
5.2	Mmp-Index als Marker für die Schwere der Präeklampsie.....	50
5.3	Zusammenhang zwischen mitochondrialem Stress und Inflammation.....	52
5.4	Thrombozytenapoptose bei Präeklampsie.....	53
5.5	Dynamik des Mmp-Index .....	56
5.6	Bewertung des Studiendesigns.....	57
5.7	Schlussfolgerungen .....	58
6	Zusammenfassung .....	59
7	Referenzbereiche der Laborwerte.....	61
8	Abbildungsverzeichnis.....	62
9	Tabellenverzeichnis .....	63
10	Literaturverzeichnis.....	64
11	Danksagung .....	78

## Abkürzungen

ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
ADP	Adenosindiphosphat
AFP	Alpha-Fetoprotein
ALT	Alanin-Aminotransferase
Apaf-1	Apoptose-auslösender Faktor 1
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
DIA	Diastolischer Blutdruckwert
DISC	„Death Inducing Signaling Complex“ (Todesinduzierender Signalkomplex)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	„Fluorescence Activated Cell Sorting“ (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	„Forward Scatter“ (Vorwärtsstreulicht)
GA	Gestationsalter
GH	Gestationshypertonie
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HELLP	„ <b>H</b> aemolysis, <b>E</b> levated <b>L</b> iver Enzymes, <b>L</b> ow <b>P</b> latelet Count“
LDH	Lactatdehydrogenase
Mmp	Mitochondriales Membranpotential
MOMP	„Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation“ (Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran)
mPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
MPV	Mittleres Thrombozytenvolumen
NCCD	„Nomenclature Committee on Cell Death“ (Nomenklatur-Komitee für Zelltod)
PAPP-A	

	„Pregnancy-associated Plasma Protein A“
PBS	(Schwangerschaftsassoziertes Plasmaprotein A)
PDW	„Phosphate Buffered Saline“ (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCE	„Platelet Distribution Width“ (Thrombozyten-Verteilungsbreite)
PE	Phycoerythrin
PIGF	Präeklampsie
PMT	„Placental Growth Factor“ (Plazentarer Wachstumsfaktor)
PRP	Photomultiplier
PS	„Platelet Rich Plasma“ (Thrombozytenreiches Plasma)
RCF	Phosphatidylserin
RIPA	Relative Zentrifugalbeschleunigung
ROS	Radio-Immunpräzipitationsassay
sEng	„Reactive Oxygen Species“ (Reaktive Sauerstoffspezies)
sFlt-1	„Soluble Endoglin“ (Lösliches Endoglin) „Soluble fms-like tyrosinkinase-1“ (Lösliche fms-ähnliche Tyrosinkinase-1)
SSC	Tyrosinkinase-1)
SSW	„Side Scatter“ (Seitwärtsstreulicht)
SYS	Schwangerschaftswochen
TGF- $\beta$	Systolischer Blutdruckwert „Transforming Growth Factor $\beta$ “ (Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ )
VDAC1	„Voltage Dependent Anion Channel 1“ (Spannungsabhängiger Anionenkanal 1)
VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor“ (Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

# 1 Einleitung

## 1.1 Präeklampsie

### 1.1.1 Epidemiologie und Definition

Die Präeklampsie (PE) ist eine Schwangerschaftskomplikation, von der etwa 2-8% der schwangeren Frauen weltweit betroffen sind (Abalos et al., 2013) und die mit hoher Morbidität und Mortalität für Mutter und Kind einhergeht. Ein systematisches Review der Weltgesundheitsorganisation ergab, dass in den Industrienationen gut 16% der mütterlichen Todesfälle in der Peripartalzeit auf hypertensive Schwangerschaftserkrankungen zurückzuführen sind (Khan et al., 2006). Laut einer großen populationsbasierten Kohortenstudie aus Norwegen erhöht sich das Risiko für einen intrauterinen Fruchttod bei Erstgebärenden mit PE in der 34. Schwangerschaftswoche (SSW) gegenüber Schwangerschaften ohne PE um den Faktor sieben (Harmon et al., 2015).

Lange war eine PE als die feste Kombination aus neu aufgetretener Hypertonie und begleitender Proteinurie definiert. Inzwischen wird die PE als eine Systemerkrankung verstanden, die prinzipiell alle Organsysteme betreffen kann und nicht notwendigerweise einer Proteinurie bedarf. Nach den aktuellen Kriterien des American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) fußt die Diagnose heute auf einer neu einsetzenden Hypertonie, die nach der 20. SSW beginnt und von mindestens einem weiteren Endorganschaden begleitet wird. Neben der Nierenbeteiligung in Form einer Proteinurie kommen dabei folgende andere Merkmale in Betracht: Niereninsuffizienz, Thrombozytopenie, Leberfunktionsstörung, Lungenödem, Oberbauchschmerz, Kopfschmerzen oder Sehstörungen (ACOG Practice Bulletin, 2020; Homer et al., 2008). Die Definition der PE in dieser Arbeit beruht auf den genannten ACOG-Kriterien. Entsprechende Grenzwerte für den Blutdruck und die Kriterien zur Feststellung von Endorganschäden sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

**Tabelle 1.1** Diagnosekriterien der Präeklampsie. SYS = systolischer Blutdruck, DIA = diastolischer Blutdruck. Tabelle in Anlehnung an (ACOG Practice Bulletin, 2020).

---

**Hypertonie** mit  
 RR von  $\geq 140$  mmHg SYS oder  $\geq 90$  mmHg DIA (2 x im Abstand von  $\geq 4$  Stunden)  
 oder RR von  $\geq 160$  mmHg SYS oder  $\geq 110$  mmHg DIA ohne zeitliche Limitierung

---

*Und zusätzlich mindestens einer der folgenden Endorganschäden:*

---

**Proteinurie** mit 300 mg/24 h oder Protein-Kreatinin-Ratio von  $\geq 0,3$  mg/dl

**Thrombozytopenie** mit Thrombozytenzahl  $< 100.000/\mu\text{l}$

**Niereninsuffizienz** mit Serumkreatinin  $> 1,1$  mg/dl oder Verdoppelung des Serumkreatinins ohne vorbestehende Nierenerkrankung

**Leberfunktionsstörung** mit Transaminasenerhöhung auf das Zweifache des oberen Normwerts

**Lungenödem**

**Neurologische Auffälligkeiten** mit  
 Neu aufgetretenen Kopfschmerzen, die nicht auf Analgetika ansprechen und nicht anderweitig erklärt werden können oder  
 Sehstörungen

**Oberbauchschmerzen** starker Intensität im rechten oberen Quadranten oder epigastrisch, die nicht durch andere Diagnosen erklärt werden können

---

### 1.1.2 Weitere hypertensive Schwangerschaftserkrankungen

Hypertensive Blutdruckwerte können in der Schwangerschaft zu unterschiedlichen Zeitpunkten und mit mehr oder minder kritischen Begleiterscheinungen auftreten. Die Internationalen Fachgesellschaften und die International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy unterscheiden neben der PE zwischen zwei weiteren Hauptformen hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen: Eine chronische Hypertonie liegt vor, wenn der Bluthochdruck bereits vor der Schwangerschaft besteht oder vor der 20. SSW erstdiagnostiziert wird. Die Gestationshypertonie (GH) setzt hingegen erst nach der 20. SSW neu ein. Weitere laborchemische, klinische oder sonographische Anzeichen einer PE fehlen bei der GH definitionsgemäß (Brown et al., 2018; DGGG, 2019).



Auch das HELLP-Syndrom, auf das im folgenden Abschnitt weiter eingegangen wird, zählt als Sonderform der PE zum Formenkreis der hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen (Brown et al., 2018; DGGG, 2019).

### 1.1.3 Präeklampsie-Schweregrade und das HELLP-Syndrom

Nach ACOG liegt eine PE mit schwerwiegenden Merkmalen vor, wenn mindestens eines der folgenden prognoseverschlechternden Kriterien erfüllt ist (ACOG Practice Bulletin, 2020):

- Systolischer Blutdruck  $\geq 160$  mmHg oder diastolischer Blutdruck  $\geq 110$  mmHg
- Thrombozytopenie  $< 100.000/\mu\text{l}$
- Nicht durch andere Ursachen erklärbares Leberfunktionsstörung mit Transaminasenerhöhung auf über das Zweifache des oberen Normwertes oder anhaltendem rechtsseitigem Oberbauchschmerz
- Serumkreatinin  $> 1,1$  mg/dl oder Verdoppelung des Serumkreatinins ohne vorbestehende Nierenerkrankung
- Lungenödem
- Neu aufgetretene Kopfschmerzen, die nicht auf Analgetika ansprechen und nicht anderweitig erklärt werden können
- Sehstörungen

Das HELLP-Syndrom beschreibt eine schwerwiegende Konstellation von Befunden in der Schwangerschaft, die meist im zweiten oder dritten Trimenon auftritt. Das Akronym wurde erstmals 1982 von Weinstein etabliert und steht für die Kombination aus Hämolyse, erhöhten Leberenzymen und einer niedrigen Thrombozytenzahl (**H**aemolysis, **E**levated **L**iver Enzymes, **L**ow **P**latelet Count, **HELLP**) (Weinstein, 1982). Das Syndrom ist mit einem signifikant erhöhten Risiko für Komplikationen wie mütterlichen Tod, fetale Wachstumsrestriktion und Frühgeburtlichkeit assoziiert (Huang et al., 2022). Weinstein ordnete HELLP als eine schwere Form der PE ein. Obwohl auch die Theorie des Syndroms

als eigenständiges Krankheitsbild zunehmend Anklang findet (Wallace et al., 2018), dominiert bis heute die Einschätzung, dass es sich dabei um eine schwere Form der PE handelt (Brown et al., 2018). Im Gegensatz zur klassischen PE kommt das HELLP-Syndrom in etwa 15% der Fälle auch ohne hypertensive Blutdruckwerte vor (Vollaard et al., 2007; Wallace et al., 2018).

#### **1.1.4 Pathophysiologie der Präeklampsie**

Die Pathophysiologie der PE ist komplex und ihre genaue Ätiologie bis heute nicht abschließend geklärt. Als zentraler Punkt in der Krankheitsentstehung gilt eine abnorme Entwicklung der Plazenta in der frühen Schwangerschaft, die zu einem späteren Zeitpunkt zur Ausprägung des klinischen Syndroms führt (Rana et al., 2019). Zahlreiche internationale Studien haben sich mit den Ursachen für die gestörte Plazentation beschäftigt und legen eine multifaktorielle Entstehung nahe, an der unter anderem genetische Varianten bei Müttern und Feten (Gray et al., 2018; Hansen et al., 2018; McGinnis et al., 2017; Steinhorsdottir et al., 2020), immunologische Faktoren (Zhang & Wei, 2021) und ein erhöhtes Risiko durch vorbestehende Erkrankungen wie Diabetes, Adipositas und vaskuläre Pathologien (Bartsch et al., 2016) beteiligt sein könnten.

Allgemein anerkannt ist, dass es in der frühen Phase der PE-Entstehung zu einer gestörten Invasion von Trophoblastzellen und einem unvollständigen Umbau der Spiralarterien im Myometrium kommt. Daraus resultiert ein eingeschränkter Blutfluss in der utero-plazentaren Einheit mit der Folge von plazerarer Ischämie (Zhou et al., 1997). Vor inzwischen etwa 20 Jahren entdeckten erste Gruppen, dass die Plazentae von Frauen mit PE vermehrt den antiangiogenen Faktor sFlt-1 exprimieren und dass dieser Faktor in Tiermodellen die charakteristischen Merkmale der PE auszulösen vermag (Ahmad & Ahmed, 2004; Lu et al., 2007; Luttun & Carmeliet, 2003; Maynard et al., 2003). Mittlerweile gilt die Dysbalance zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren als etablierter Bestandteil der Pathogenese der PE: Die durch Ischämie geschädigten Plazentae schütten die antiangiogenetischen Faktoren sFlt-1 und lösliches Endoglin (sEng) aus. sFlt-1 und sEng binden und neutralisieren die proangiogenen Faktoren PlGF, VEGF und TGF- $\beta$ . Da PlGF, VEGF und TGF- $\beta$  wichtige Funktionen für die Aufrechterhaltung endothelialer Zellfunktionen und die Angiogenese erfüllen, resultiert aus ihrem Mangel eine endotheliale Dysfunktion, die Schäden in

sämtlichen Organen des Körpers anrichten kann (Erez et al., 2022; Ives et al., 2020; Rana et al., 2022; Torry et al., 1998; Venkatesha et al., 2006).

In jüngerer Vergangenheit wurde das Krankheitsverständnis der PE zudem wesentlich durch die Erkenntnis der Beteiligung inflammatorischer Prozesse beeinflusst: Michalczyk et al. fassen in einem Review aus dem Jahr 2020 umfangreiche Literatur über die Rolle der Inflammation für die Pathogenese der PE zusammen (Michalczyk et al., 2020). Zum einen wird die Ursache der PE darin einer überschießenden Reaktion des mütterlichen Immunsystems auf die Schwangerschaft zugeschrieben. Immunzellen können demnach eine Entzündungsreaktion in der Plazenta stimulieren und so die fehlerhafte Plazentation mitbeeinflussen. Des Weiteren wurde durch die resultierende plazentare Ischämie eine verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der Plazenta beobachtet. Der oxidative Stress triggert über die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Mikropartikeln wiederum eine systemische Entzündungsreaktion, die von verstärkter endothelialer Aktivierung begleitet wird (Aggarwal et al., 2019; Lee et al., 2012; Michalczyk et al., 2020; Tenório et al., 2019).

Neben den genannten, gut untersuchten Aspekten wird fortlaufend auf vielen weiteren Ebenen zur Pathophysiologie der PE geforscht. So gibt es unter anderem Untersuchungen zu Dysfunktionen in Mitochondrien, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird. Studien, die sich auf Veränderungen in Thrombozyten bei PE konzentrieren, werden in Abschnitt 1.2.3 besprochen.

### **1.1.5 Der mitochondriale Stoffwechsel bei Präeklampsie**

Mitochondrien sind Zellorganellen mit einer Doppelmembran, die mit Ausnahme von Erythrozyten in allen menschlichen Zellen vorkommen (Grosso et al., 2017) und eine wichtige Rolle für den Energiestoffwechsel spielen. Aus den Abbauprodukten von Kohlenhydraten, Fettsäuren und Proteinen wird in den Mitochondrien der Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) gewonnen. An der ATP-Gewinnung sind unter anderem die Prozesse der Atmungskette und der ATP-Synthase beteiligt (van der Blik et al., 2017). Beide sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, die durch ihre Einstülpungen, genannt Cristae, eine große Oberfläche bietet (Frey & Mannella, 2000). Die Atmungskette wird von

mehreren Komplexen gebildet. Einige von ihnen bauen durch den Transport von Protonen aus der Matrix in den Membranzwischenraum ein elektrochemisches Potenzial auf: Das mitochondriale Membranpotenzial (Mmp). Der Protonengradient dient der ATP-Synthase schließlich als Antrieb für die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP (Rigoulet et al., 2020; van der Blik et al., 2017). Daraus ergibt sich, dass die lebenswichtige Energiegewinnung in Zellen direkt von intakten mitochondrialen Membranen und einem aufrechten Mmp abhängig ist (Braganza et al., 2020). Neben der Energiegewinnung werden Mitochondrien weitere Funktionen wie die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Kausar et al., 2018), die Regulation der Apoptose (Green & Reed, 1998) und eine maßgebliche Beteiligung an der Calcium-Homöostase (Oxenoid et al., 2016) zugeschrieben.

Untersuchungen von Mitochondrien aus Plazentagewebe konnten Störungen dieser mitochondrialen Funktionen im Zusammenhang mit PE darlegen (Smith et al., 2021). Die Dysfunktionen äußern sich zum Beispiel in morphologischen Abweichungen wie mitochondrialer Schwellung und veränderter Struktur der Cristae (Salgado & Salgado, 2011) oder durch Veränderungen im mitochondrialen Stoffwechsel mit verminderter Effizienz der Atmungskette und Abnahme der ATP-Produktion (Beyramzadeh et al., 2017; Matsubara et al., 1997; Zhou et al., 2017). Auch eine verstärkte mitochondriale Permeabilität mit erhöhter Anfälligkeit für Apoptose wurde in plazentaren Zellen bereits beobachtet (Vishnyakova et al., 2016). Weitere Forschungsergebnisse legen darüber hinaus nahe, dass die mitochondriale Dysfunktion bei PE nicht nur auf die Plazenta beschränkt ist: Vaka et al. konnten in einem Tiermodell zeigen, dass eine Verminderung des uterinen Perfusionsdrucks neben der Plazenta auch in Nierengewebe zu verminderter Aktivität der Atmungskette und vermehrter Produktion von mitochondrialen ROS führt (Vaka et al., 2018). Auch in peripheren Thrombozyten konnten kürzlich Abweichungen der Atmungsfunktion nachgewiesen werden (Bînă et al., 2022; Malinow et al., 2018) (vgl. Abschnitt 1.2.3).

### 1.1.6 Screening, Diagnostik und Therapie

Bislang existiert kein Test, der als alleiniger Parameter eine sichere Früherkennung der PE ermöglicht (Kuc et al., 2011). Zur Risikoevaluation stehen je nach Schwangerschaftstrimenon Kombinationen aus mütterlicher Anamnese, Erhebung bekannter Risikofaktoren, Bestimmung biochemischer und angiogener Marker wie PAPP-A, PlGF und sFlt-1 sowie die dopplersonographische Untersuchung der Arteriae uterinae und regelmäßige Erhebungen von Blutdruck und Urinstatus zur Verfügung (Cnossen et al., 2008; DGGG, 2019; Kuc et al., 2011; Levine et al., 2004; O’Gorman et al., 2016; Wright et al., 2012). Der sFlt-1/PlGF-Quotient bietet dabei insbesondere einen hohen negativen Voraussagewert: Zeisler et al. konnten in der PROGNOSIS-Studie zeigen, dass ein Quotient von  $\leq 38$  das Auftreten einer PE innerhalb einer Risikokohorte in der Folgewoche nahezu ausschließt (negativer prädiktiver Wert 99,3%) (Zeisler et al., 2016).

Die weitergehende Diagnostik der PE beinhaltet neben Blutdruck- und Urinuntersuchungen die Bestimmung der unter 1.1 genannten Laborwerte und die Evaluation des fetalen Zustands mittels Kardiotokographie und Sonographie (DGGG, 2019). Für die Beurteilung von Erkrankungsschwere und Verlauf werden neben den klinischen und laborchemischen Kriterien nach ACOG (vgl. 1.1) derzeit zahlreiche weitere Marker wie AFP, hCG (Taché et al., 2014), MPV (Reddy & Rajendra Prasad, 2019), Fibrinogen, LDH (Duan et al., 2020) und SERPINA1 (Starodubtseva et al., 2020) in Blut und Urin untersucht und diskutiert .

Therapeutisch kann bei manifester PE die Gabe von Antihypertensiva und Magnesiumsulfat vor allem bei schwerer Hypertonie die maternale Komplikationsrate senken (Coetzee et al., 1998; Martin et al., 2005; Schlembach et al., 2015). Die einzige kausale Behandlungsmöglichkeit der PE besteht allerdings nach wie vor in der Entbindung (Nirupama et al., 2021).

## 1.2 Thrombozyten

### 1.2.1 Allgemeine Zelleigenschaften

Thrombozyten sind mit einem Durchmesser von 2-5  $\mu\text{m}$  die kleinsten Blutzellen des Menschen (Gremmel et al., 2016). Sie werden durch Abschnürung von Megakaryozyten freigesetzt, besitzen natürlicherweise keinen Zellkern und zirkulieren mit einer kurzen Lebensdauer von 7-10 Tagen im Blut (Thon & Italiano, 2012; Wright, 1906). Die zentrale Bedeutung der Thrombozyten für Hämostase und Thrombosierung ist bereits seit dem 19. Jahrhundert bekannt (Bizzozero, 1882). Die thrombozytäre Blutstillung beinhaltet dabei klassischerweise die Adhäsion der Zellen an der Gefäßwand, ihre Aktivierung und die Aggregation mehrerer Thrombozyten (Blockmans et al., 1995). Im Rahmen der Aktivierung verändern die Zellen unter Vergrößerung ihrer Oberfläche die Form und setzen wichtige hämostasiefördernde Faktoren aus intrazellulären Granula frei. Die Entleerung der Granula geht mit einer Verlagerung von P-Selectin auf die Zelloberfläche einher (Rubenstein & Yin, 2018; Stenberg et al., 1985). Über die Blutstillung hinaus konnten zwischenzeitlich viele weitere Funktionen von Thrombozyten in physiologischen und pathologischen Prozessen entdeckt werden. So weiß man heute, dass sie auch in der Vermittlung von inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen (Elzey et al., 2003; Jurk & Kehrel, 2008; Lindemann et al., 2007) und außerdem an der Abwehr gegen Pathogene (Fitzgerald et al., 2006), an der Atherogenese (Gawaz, 2006; Lindemann et al., 2007) sowie an Tumorwachstum und Metastasierung beteiligt sind (Gay & Felding-Habermann, 2011).

### **1.2.2 Thrombozytopenie in der Schwangerschaft**

Eine Thrombozytopenie liegt grundsätzlich bei Thrombozytenzahlen unter 150.000/ $\mu$ l vor und betrifft bis zu 11% der Frauen in der Schwangerschaft (Boehlen et al., 1999). In etwa 75% der Fälle handelt es sich bei einem schwangerschaftsassozierten Abfall der Thrombozyten um eine harmlose Gestationsthrombozytopenie. Ihre Ursache wird in der Verdünnung des Blutes durch das während der Schwangerschaft physiologisch erhöhte Plasmavolumen und in einem erhöhten Umsatz an Thrombozyten vermutet (Subtil et al., 2020; Valera et al., 2010). Eine niedrige Thrombozytenzahl kann aber auch mit klinisch relevanten Grunderkrankungen in Verbindung stehen und kommt dabei mit etwa 20% am häufigsten in Assoziation mit der PE und ihrer schweren Form des HELLP-Syndroms vor (Bergmann & Rath, 2015; Salnlo et al., 2000). Die Ursache für den Abfall der Thrombozytenzahl bei der PE ist noch nicht vollständig geklärt. Bisher wird insbesondere ein erhöhter Verbrauch von Thrombozyten im Rahmen einer mit der PE einhergehenden thrombotischen Mikroangiopathie angenommen (Jodkowska et al., 2015; Subtil et al., 2020).

### **1.2.3 Thrombozyten in der Präeklampsieforschung**

Thrombozyten liefern mit der Thrombozytopenie einen eigenständigen Parameter für sowohl Diagnosestellung als auch Schweregradeinteilung der PE und spielen damit eine bedeutende Rolle für das Krankheitsbild (ACOG Practice Bulletin, 2020; Brown et al., 2018). In der Forschung zu Thrombozyten bei PE wurde bisher besonders der Frage nach einem veränderten Aktivierungsniveau nachgegangen. Jakobsen et al. fassen in ihrem systematischen Review aus 2019 eine Vielzahl von untersuchten Aktivitätsmarkern zusammen, die in Summe auf ein erhöhtes Maß an Thrombozytenaktivierung bei PE hinweisen. Insbesondere das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) zeigte sich in einer Metaanalyse aus zwölf Studien bei PE-Erkrankten signifikant erhöht (Jakobsen et al., 2019). Auch eine vermehrte Oberflächenexpression von P-Selectin konnte bei Frauen mit PE im Vergleich zu gesunden Schwangeren festgestellt werden (Harlow et al., 2002; Holthe et al., 2004; Konijnenberg et al., 1997; Yoneyama et al., 2001).

Wenige andere Studien beschäftigen sich mit Stoffwechselforgängen in Thrombozyten bei PE und zeigen zum Beispiel einen veränderten Calcium-Metabolismus mit erhöhter

Sensitivität gegenüber Vasopressoren (Zemel et al., 1990) oder Veränderungen im L-Arginin/Stickstoffmonoxid-Stoffwechsel (Pimentel et al., 2013). Bînä et al. und Malinow et al. untersuchten Veränderungen der mitochondrialen Atmungsfunktion in peripheren Thrombozyten bei Patientinnen mit PE. In beiden Studien findet sich eine Veränderung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs bei PE-Patientinnen im Vergleich zu gesunden Schwangeren. Die Ergebnisse unterscheiden sich allerdings dahingehend, ob der Sauerstoffverbrauch bei Patientinnen mit PE im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert (Bînä et al., 2022) oder erhöht ist (Malinow et al., 2018).

Eine Arbeit von Major et al. zeigt darüber hinaus die Beteiligung von Thrombozyten an der Produktion von sFlt-1 über die Bildung von Monozyten-Thrombozyten-Aggregaten (Major et al., 2014).

#### **1.2.4 Thrombozytenapoptose**

Der Begriff Apoptose wurde erstmals 1972 von Kerr, Wyllie und Currie eingeführt und steht für eine kontrollierte, durch Signalwege gesteuerte Form des Zelltods. Als „Gegenspielerin“ der Mitose spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle in der Regulierung von Zellpopulationen (Kerr et al., 1972). Der Prozess ist für kernhaltige Zellen gut ergründet und kann hauptsächlich auf zwei Wegen eingeleitet werden: Dem extrinsischen oder intrinsischen Weg (Igney & Krammer, 2002). Abbildung 1.2 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung dieser Apoptosewege. An der Auslösung der Apoptose ist auf beiden Wegen maßgeblich eine Gruppe von intrazellulär vorkommenden Cysteinproteasen, genannt Caspasen, beteiligt (Nicholson & Thornberry, 1997). Man unterscheidet zwischen den Initiatorcaspasen und den durch sie aktivierten Effektorcaspasen (Cohen, 1997).

Der extrinsische Weg beginnt mit der Bindung von Liganden an Todesrezeptoren in der Zellmembran. Der sich daraufhin bildende Zelltod-induzierende Multienzymkomplex „DISC“ („death-inducing signaling complex“) führt zur Aktivierung von Initiatorcaspasen (Kischkel et al., 1995; Yang, 2015).

Auf dem intrinsischen Weg führen Zellschäden oder zytotoxische Einflüsse zur Freisetzung von proapoptotischen Proteinen wie Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol. Die Freisetzung der proapoptotischen Proteine erfordert eine erhöhte Permeabilität der äußeren



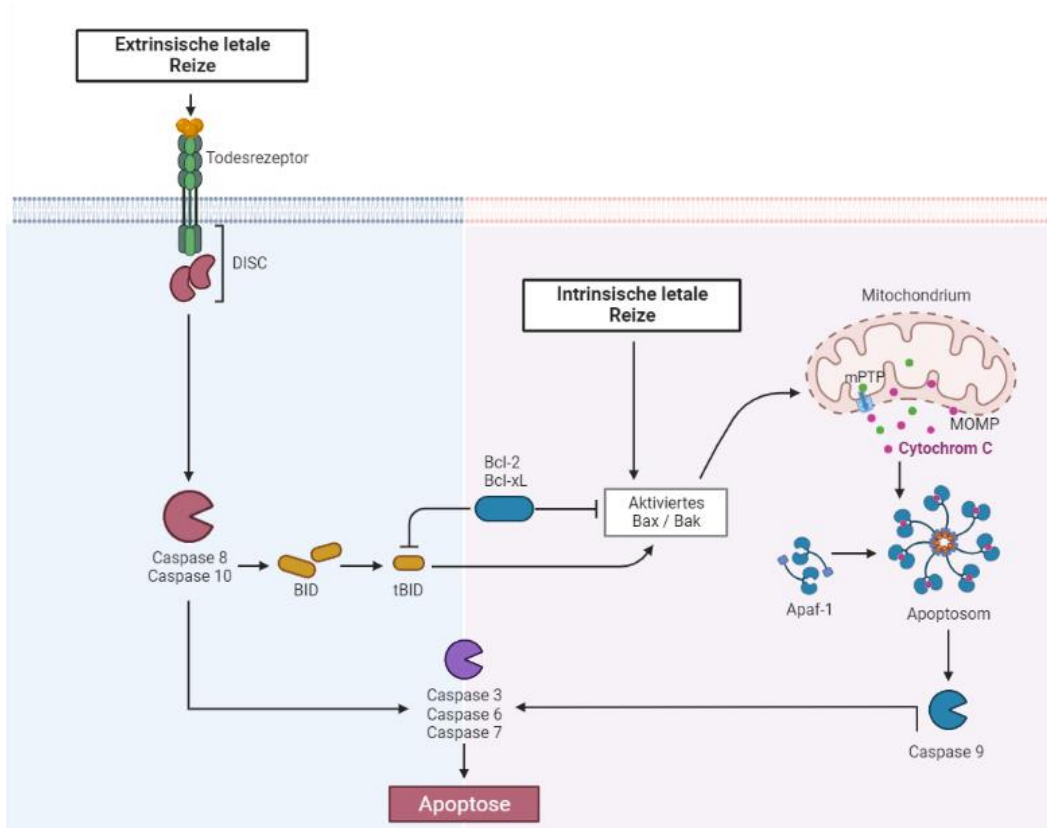
Mitochondrienmembran. Die Steigerung dieser Permeabilität kann ausgelöst werden über das Öffnen der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) mit konsekutiver Depolarisation der mitochondrialen Membran und durch einen Überschuss an proapoptotischen (vor allem Bax und Bak) gegenüber antiapoptotischen (vor allem Bcl-2 und Bcl-xL) Proteinen der Bcl-2-Familie (Castedo et al., 1996; Green & Reed, 1998; Kroemer et al., 2007; Ly et al., 2003; Riley et al., 2018; Tsujimoto & Shimizu, 2000). Im Zytosol folgt durch die Zusammenlagerung von Cytochrom C, dem Apoptose-auslösenden Faktor 1 (Apaf1) und einer Procaspase die Bildung des Apoptosoms und schließlich die Aktivierung der Procaspase zur Initiatorcaspase (Chinnaiyan, 1999).

Die Initiatorcaspasen beider Wege führen nun zur Aktivierung von Effektorcaspasen und leiten damit den gemeinsamen, ausführenden Pfad der Apoptose ein. Die Zellen erfahren in der Folge festgelegte morphologische Veränderungen. Dazu gehören das Schrumpfen und die Fragmentierung des Zellkerns, die Destruktion des Zytoskeletts, das Lösen der Zelle aus dem Zellverband und der Zerfall in apoptotische Partikel (Slee et al., 2001). Am Ende des Prozesses steht die Phagozytose der apoptotischen Zelle, die durch die Expression von Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche als Signal für Makrophagen vermittelt wird (Martin et al., 1995).

Lange wurde davon ausgegangen, dass der Zelltod durch Apoptose kernhaltigen Zellen vorbehalten ist. Im Jahr 1997 konnten Vanags und Kollegen erstmals darlegen, dass auch die physiologischerweise kernlosen Thrombozyten in der Lage sind, Apoptose zu durchlaufen (Vanags et al., 1997). Seitdem wurde die Apoptose in Thrombozyten in einer Vielzahl von Studien untersucht, indem sie beispielweise durch chemische Stimuli, ein hohes Ausmaß an Scherkräften oder das Altern der Zellen *in vivo* oder *in vitro* ausgelöst wurde. Dabei konnte eine Reihe von Schlüsselbestandteilen des oben beschriebenen intrinsischen Apoptosewegs beobachtet werden: Unter anderem die Depolarisation der mitochondrialen Membran, die Bildung der mPTP, die Aktivierung von proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie, die Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol, die Aktivierung der Caspasen 9 und 3 und die Expression von PS auf der Zelloberfläche (Gyulkhandanyan et al., 2014; Leytin, 2012; Leytin et al., 2009; Leytin et al., 2006; Leytin et al., 2004; Leytin & Freedman, 2003; Li et al., 2000). Der Einbruch des Mmps gilt dabei als wesentliches Merkmal apoptotischer Zellen und hat sich als wichtiger Marker für die Thrombozytenapoptose etabliert (Gyulkhandanyan et al.,

2012). Obwohl viele der genannten Apoptosereize in Thrombozyten auch zu einer Aktivierung der Zellen führen können, konnte dargelegt werden, dass Apoptose und Aktivierung verschiedene Prozesse sind, die sich unabhängig voneinander auslösen lassen (Gyulkhandanyan et al., 2013; Leytin et al., 2008).

Eine entscheidende Funktion der Apoptose in Thrombozyten findet sich in der gezielten Regulation ihrer Lebensspanne (Mason et al., 2007). Damit hat sich auch die Sicht auf die Thrombozytopenie verändert, die in Erkrankungen wie der Sepsis mit einer kritischen Prognose assoziiert ist (Vandijck et al., 2010): Es liegt nahe, dass es sich dabei nicht um einen zufälligen Prozess handelt, sondern dass Apoptosemechanismen an der Abnahme der Thrombozytenzellzahl beteiligt sind (Kile, 2009; Mason et al., 2007; Vandijck et al., 2010). Krämer, Grundler und Yamakawa haben mit ihren Gruppen in wichtigen Vorarbeiten zeigen können, dass der intrinsische Apoptoseweg in Thrombozyten im Rahmen der Sepsis aktiviert werden kann (Kraemer et al., 2012) und dass die Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials mit der Schwere der Erkrankung (Grundler et al., 2014; Yamakawa et al., 2013) und dem klinischen Verlauf bei Patient\*innen mit Sepsis korreliert (Grundler et al., 2014).



**Abbildung 1.1: Vereinfachte schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptosewegs.**

Auf dem extrinsischen Weg führt die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren in der Zellmembran zur Zusammenlagerung des Zelltod-induzierenden Multienzymkomplexes „DISC“. In der Folge werden die Initiatorcaspasen 8 und 10 aktiviert, die ihrerseits die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktivieren. Die Caspasen 8 und 10 können zudem den Apoptosevorgang verstärken, indem sie das Protein BID zu tBID spalten und damit zusätzlich den intrinsischen Weg aktivieren. Der intrinsische Weg wird durch Signale im Zellinneren ausgelöst. Durch die Bildung einer mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) und/oder die erhöhte Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane permeabilisation, „MOMP“), die durch Mitglieder der Bcl-2-Familie reguliert wird, können proapoptische Proteine wie Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol austreten. Die Bildung des Apoptosoms aus Cytochrom C, Procaspase 9 und Apoptose-induzierendem Faktor 1 (Apaf-1) führt zur Aktivierung der Initiatorcaspase 9, welche wiederum die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktiviert. Die Effektorcaspasen setzen durch den Abbau von Proteinen die zellulären Apoptosevorgänge in Gang.

Abbildung adaptiert von „Apoptosis Extrinsic and Intrinsic Pathways“ von BioRender.com (2022). Erstellt auf <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Bis heute sind die genauen pathophysiologischen Vorgänge bei der Präeklampsie (PE) nur unzureichend geklärt – darunter auch der Mechanismus, der zur Thrombozytopenie führt. Thrombozyten sind in vivo dem Krankheitsmilieu direkt ausgesetzt. Durch die Thrombozytopenie als Ausprägungsmerkmal und durch die mögliche Beteiligung an der Pathophysiologie über die Bildung von sFlt-1 sind sie vermutlich maßgeblich in das Krankheitsbild der PE involviert. Dies macht sie zu interessanten Forschungsobjekten auf der Suche nach neuen Markern und Erkenntnissen auf dem Weg zu einem besseren Verständnis der Krankheitsentstehung.

Für die Sepsis – eine weitere Erkrankung, die häufig mit Thrombozytopenien einhergeht – konnte bereits gezeigt werden, dass die Depolarisation der mitochondrialen Membran in Thrombozyten mit Schwere und Prognose der Erkrankung korreliert. In Thrombozyten von Frauen mit PE wurden bisher einige Studien zu Aktivitätsmarkern und Stoffwechselfvorgängen durchgeführt. Das mitochondriale Membranpotenzial (Mmp) in lebenden Thrombozyten ist bei Patientinnen mit PE zuvor allerdings noch nicht untersucht worden.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob in den Thrombozyten von Patientinnen mit PE im direkten Vergleich zu gesunden schwangeren Frauen Veränderungen im Mmp vorliegen, ob ein Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung besteht und ob sich der Parameter zu einem zweiten Messzeitpunkt nach der Entbindung verändert.

In der Arbeit soll weiterhin diskutiert werden, wie die Veränderungen im Mmp zum pathophysiologischen Verständnis der PE beitragen können und wie sich das Mmp als thrombozytenbasierter Marker für die Krankheitsaktivität in Patientinnen mit PE eignen könnte.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Studienpopulation

In die Studie wurden 15 Patientinnen mit der Diagnose Präeklampsie (PE) gemäß ACOG-Kriterien eingeschlossen (vgl. Abschnitt 1.2.1). Eine Untergruppe von fünf Frauen litt dabei an schwerer PE. In Abweichung von den ACOG-Kriterien wurde die Erkrankung erst dann als schwere PE eingestuft, wenn mindestens zwei schwerwiegende Merkmale nach ACOG vorhanden waren. Zu diesen Merkmalen zählen: Blutdruckwerte  $\geq 160$  mmHg systolisch oder  $\geq 110$  mmHg diastolisch, Thrombozytopenie  $< 100.000/\mu\text{l}$ , neu aufgetretene Niereninsuffizienz oder Leberfunktionsstörung, Lungenödem und neurologische Störungen (ACOG Practice Bulletin, 2020; Ives et al., 2020).

Die Kontrollgruppen bildeten gesunde nicht-schwangere Probandinnen im gebärfähigen Alter ( $n=15$ ) und gesunde schwangere Probandinnen ohne Anzeichen einer hypertensiven Schwangerschaftserkrankung ( $n=30$ , je 15 Personen als Kontrolle für die prä- und postpartale Messung der PE-Patientinnen). Als separate Gruppe wurden sechs Patientinnen mit isolierter Gestationshypertonie (GH) rekrutiert, die keine weiteren Anzeichen einer PE aufwiesen.

Ausschlusskriterien stellten die Einnahme von Medikamenten mit antiaggregatorischer oder anderweitiger Wirkung auf die Thrombozytenfunktion zum Zeitpunkt der Blutentnahme dar. Auch Frauen mit vorbestehenden Thrombozytenstörungen, Diabetes, Nierenerkrankungen, Zeichen einer Infektion oder vorbestehender Erkrankung von Leber oder Knochenmark wurden von der Studie ausgeschlossen.

Alle Probandinnen wurden zwischen 2020 und 2021 in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde des Klinikums rechts der Isar in die Studie eingeschlossen. Eine schriftliche Einwilligung nach Aufklärung wurde von allen Patientinnen eingeholt. Ein entsprechendes Ethikvotum der Ethikkommission der Technischen Universität München lag vor (Aktenzeichen 104/20S-KH).

## **3.2 Materialien**

### **3.2.1 Blutproben**

Den Probandinnen wurden je 20 ml Blut in Citratmonovetten für die Thrombozytenisolation sowie 2,7 ml Blut in EDTA-Monovetten für die Bestimmung der Thrombozytenzahl abgenommen. Von den 15 Patientinnen mit Diagnose PE wurden sowohl vor als auch nach der Entbindung Blutproben abgenommen und untersucht. Die weiteren Blutproben stammten von 30 gesunden schwangeren Kontrollprobandinnen, 15 nicht-schwangeren Kontrollprobandinnen sowie sechs Schwangeren mit der Diagnose einer isolierten Gestationshypertonie (GH).

### 3.2.2 Chemikalien

**Tabelle 3.1:** Verwendete Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma</b>
Calcium-Ionophor A23187	Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis, MN, USA
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
FACSFlow Hüllflüssigkeit	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Fluoresceinisothiocyanat (FITC) - Annexin V - Assay-Kit	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
MitoPT JC-1 Reagenz	ImmunoChemistry Technologies, Bloomington, MN, USA
Radio-Immunpräzipitationsassay (RIPA) - Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Prostaglandin E1 (PGE1)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA

### 3.2.1 Laborzubehör

**Tabelle 3.2:** Verwendetes Laborzubehör

Zubehör	Firma
Injekt Solo sterile Spritzen	B.Braun SE, Melsungen, Deutschland
Kunststoff-Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Minisart sterile Filter 0.1/0.2 µm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Multifly Kanülen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polystyrol Röhrchen	Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria
Reaktionsgefäße „Eppendorfgefäß“	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße „Falcon“	Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria
Serologische Pipetten	Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria
Sterican Kanülen	B.Braun SE, Melsungen, Deutschland
S-Monovetten Citrat, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovetten EDTA, 2,7 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland



### 3.2.2 Antikörper

Tabelle 3.3: Verwendete Antikörper

Antikörper	Isotyp	Reaktivität	Färbung	Klon	Firma, Katalognummer
CD62P	Maus BALB/c IgG1, $\kappa$	Human	Phycoerythrin (PCE)	AK-4	Becton Dickinson, #555524
IgG Isotyp	Maus IgG1, $\kappa$	n. z.	PCE	MOPC- 21	Becton Dickinson, #555749

### 3.2.3 Puffer

Tabelle 3.4: Eigens hergestellte Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Thrombozytenpuffer (pH 7,35)	138 mM NaCl 2,7 mM KCl 12 mM NaHCO <sub>3</sub> 0,4 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 5 mM D-Glucose 5 mM Hepes

### 3.2.4 Geräte

**Tabelle 3.5:** Benutzte Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Firma</b>
FACS Calibur	FACS	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Herasafe	Werkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
IKA MAG REO	Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
pH-Meter Lab 850	pH-Meter	Schott, Mainz, Deutschland
Rotina 48 R	Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Sartorius basic	Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sartorius BP 1200	Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Vortex Genie 2 <sup>TM</sup>	Vortex-Schüttler	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge 4K15C	Zentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland

### 3.3 Blutentnahme

Für die Thrombozytenisolation wurde den Probandinnen Blut in 10 ml-Citrat-Monovetten abgenommen. Die Blutentnahmen wurden ausschließlich mit Multifly-Kanülen durchgeführt. Um unerwünschte Effekte auf die Thrombozyten durch eine zu lange Stauungszeit zu vermeiden, wurde stets darauf geachtet, den Venenstauschlauch erst unmittelbar vor der Venenpunktion anzubringen und sofort nach Punktion des Blutgefäßes noch vor dem Befüllen der Blutröhrchen wieder zu lösen. Der Stempel der Citrat-Monovetten wurde anschließend langsam und kontinuierlich zurückgezogen, um die Röhrchen ohne zu großen Unterdruck schonend zu befüllen. Nach vorsichtigem Schwenken der befüllten Monovetten wurden die Blutproben ohne weitere Zwischenlagerung und vor Kälte geschützt umgehend zur Weiterverarbeitung ins Labor gebracht. Die Proben der schwangeren und nicht-schwangeren Kontrollpersonen wurden zeitgleich zu den Proben der PE-Probandinnen abgenommen.

### 3.4 Thrombozytenisolation

Die Isolation der Thrombozyten erfolgte wie bereits vorbeschrieben (Grundler et al., 2014; Kraemer et al., 2012): Zunächst wurde den Probandinnen und Kontrollpersonen venöses Blut in 10 ml Citratmonovetten abgenommen. Die Blutproben wurden anschließend umgehend in einer ungekühlten Zentrifuge bei 340 RCF (Beschleunigung 9/ Bremse 0) für 15 Minuten zentrifugiert. Währenddessen wurden in je einem 50 ml Falcon-Röhrchen pro Probandin 15 ml Thrombozytenpuffer (s. Tabelle 3.3) im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt.

Nach Ende der Zentrifugation wurde das sich oben absetzende, plättchenreiche Plasma (PRP) mit Kunststoff-Transferpipetten vorsichtig abgenommen. Hierbei wurde ein Sicherheitsabstand von mindestens 0,5 cm zu den festen Blutbestandteilen eingehalten. Das Plasma wurde dann in die vorbereiteten Falcon-Röhrchen transferiert und das Gesamtvolumen mit weiterem vorgewärmtem Thrombozytenpuffer auf je 30 ml pro Röhrchen aufgefüllt. Prostaglandin E1 (1  $\mu$ M) wurde vor Zentrifugation hinzugefügt und die Röhrchen anschließend vorsichtig geschwenkt. Prostaglandin E1 diente zur Verhinderung einer Thrombozytenaktivierung während des zweiten Zentrifugationsschritts (Braune et al., 2020).

Im nächsten Schritt erfolgte eine erneute Zentrifugation in ungekühlter Zentrifuge bei 600 RCF (Beschleunigung 9/ Bremse 5). Dabei bildete sich am Boden jedes Falcon-Röhrchens ein Thrombozytenpellet. Die Überstände über diesen Pellets wurden abgekippt und die Thrombozyten daraufhin in vorgewärmtem Thrombozytenpuffer vorsichtig resuspendiert.

### **3.5 Färbung mit JC-1**

Mitochondrien besitzen eine Doppelmembran mit einem inneren und einem äußeren Anteil. Über der mitochondrialen Innenmembran entsteht durch den von der Atmungskette angetriebenen Transport von Protonen aus der Matrix in den Membranzwischenraum ein Spannungsgradient, das mitochondriale Membranpotenzial (Mmp). Daraus resultiert auf der Innenseite der Innenmembran eine negative und auf der Außenseite eine positive Ladung (Chen, 1988; Mitchell, 1966).

Bei JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanid) handelt es sich um einen fluoreszierenden Carbozyanin-Farbstoff, der es ermöglicht, Veränderungen in diesem Membranpotenzial sichtbar zu machen (Reers et al., 1991). Der hydrophobe, kationische Farbstoff ist dazu in der Lage, Membranen zu passieren. Aufgrund seiner delokalisierten positiven Ladung sammelt er sich im Inneren der Zelle insbesondere in negativ geladenen Bereichen an. So diffundiert JC-1 entlang des mitochondrialen Membranpotenzials (Mmp) in die Mitochondrienmatrix und akkumuliert dort (Ehrenberg et al., 1988). Zu den besonderen Eigenschaften des Farbstoffes gehört, dass er je nach Konzentration entweder in seiner monomeren Form oder als sogenannte J-Aggregate aneinandergelagert vorliegen kann (Jelley, 1937). Diese beiden Formen unterscheiden sich in ihrem Emissionsspektrum: Wird JC-1 durch einen Laser mit einer Intensität um 490 nm angeregt, fluoresziert die monomere Form mit einem Maximum bei 527 nm Wellenlänge im grünen Spektrum. J-Aggregate, die sich bilden, wenn der Farbstoff in hoher Konzentration vorliegt, zeigen hingegen einen deutlichen Shift der maximalen Fluoreszenz in den orange-roten Bereich zu 590 nm (Cossarizza et al., 1993; Smiley et al., 1991).

Die beschriebenen Verhältnisse führen dazu, dass sich JC-1 nach dem Anfärben von Zellen mit stabilem Mmp zum einen als Monomer im Zytosol und zum anderen in Aggregatform

im Inneren der Mitochondrien ansammelt. Diese Zellen fluoreszieren bei Anregung daher sowohl intensiv grün als auch orange-rot. Wenn die mitochondriale Membran nun depolarisiert und die Innenseite im Vergleich zur Außenseite an negativer Ladung verliert, wandert weniger JC-1 in die Mitochondrien. In der Konsequenz verbleibt mehr Farbstoff in seiner monomeren Form im Zytosol und die Zellen verlieren anteilig orange-rote Fluoreszenz (Mathur et al., 2000).

Für die Färbung der Thrombozyten mit JC-1 gemäß Herstellerangaben (Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN, USA) wurde der Inhalt des Reagenzes für 400 Tests initial mit 1 ml DMSO aufbereitet und somit eine 200X Stock Lösung hergestellt. Diese wurde in 10 µl umfassende Anteile aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Unmittelbar vor Verwendung wurde der Farbstoff im Dunkeln portionsweise aufgetaut und auf 4X verdünnt, indem 490 µl PBS zu 10 µl 200X Stock Farblösung zugegeben wurden.

Für jede Patientin mit PE, sowie für jede schwangere und nicht-schwangere Kontrollprobandin wurden Thrombozytenfärbungen in dreifacher Ausführung angesetzt. Hierfür wurden je 50 µl der 4X JC-1 Lösung in ein FACS-Röhrchen mit 150 µl der jeweiligen Thrombozytensuspension (siehe 3.4) gegeben. Zur Qualitätskontrolle der Methode wurden außerdem Negativ- sowie Positivkontrollen erstellt. Für die Negativkontrollen wurden in 150 µl Zellsuspension anstelle des Farbstoffs lediglich 50 µl Thrombozytenpuffer pipettiert. Zur Erstellung der Positivkontrollen wurden die Thrombozyten fünf Minuten vor Färbung mit 100 mikromolarem Calcium-Ionophor (A23187) versetzt, was zu einer raschen Depolarisation des mitochondrialen Membranpotenzials führt (Binet & Volfin, 1975). Tabelle 3.6 zeigt eine Übersicht aller Ansätze für eine PE-Patientin und ihre Kontrollgruppen. Zur Vorbereitung der Studie wurde die Methodik in Anlehnung an Vorarbeiten (Grundler et al., 2014) für die Diagnostik bei Patientinnen mit Präeklampsie und Schwangeren etabliert und angepasst.

Nach der Zugabe von JC-1 zur Thrombozytensuspension folgte eine 20-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln. Da eine erneute Zentrifugation der Zellen in Testdurchläufen zu erhöhten Apoptose- und Aktivierungsraten führte, wurde dieser Schritt nach Ablauf der Inkubationszeit durch die Zugabe von je 2 ml Thrombozytenpuffer in jedes

FACS-Röhrchen ersetzt. Die Messung im Durchflusszytometer erfolgte stets nach weiteren 40 Minuten Zwischenlagerung bei Raumtemperatur im Dunkeln.

### **3.6 Färbung mit Phycoerythrin-gekoppeltem P-Selectin-Antikörper**

Bei P-Selectin (CD62P) handelt es sich um ein etwa 140 kDa großes Transmembranprotein in Thrombozyten. In nicht aktivierten Zellen befindet es sich hauptsächlich innerhalb der Membranen der  $\alpha$ -Granula. Ihr Inhalt wird bei Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt. Dabei fusioniert die Granula-Membran mit der Zellmembran und CD62P wird an die Zelloberfläche verlagert (Stenberg et al., 1985).

Für diese Arbeit wurde mit einem Phycoerythrin (PCE)-gekoppelten Maus anti-Human IgG-Antikörper gegen CD62P gearbeitet. Für jede Probe mit 100  $\mu$ l Thrombozytensuspension wurden dafür gemäß Herstellerangaben (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 20  $\mu$ l unverdünntes Anti-CD62P-Reagenz verwendet. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden in jedes Probenröhrchen 200  $\mu$ l Thrombozytenpuffer zugegeben und alles anschließend für 10 Minuten bei 450 RCF (Beschleunigung 9/ Bremse 5) zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes erfolgte eine Resuspension in 500  $\mu$ l PBS.

Auch diese Färbung wurde für jede erkrankte Probandin zusätzlich an Thrombozyten einer gesunden schwangeren sowie einer nicht-schwangeren Kontrollprobandin durchgeführt.

Um die Zuverlässigkeit der Antikörperfärbung zu überprüfen, wurde erneut für jeden Durchlauf des Experiments eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle gemessen (vergleiche Tabelle 3.6). Für die Positivkontrolle wurden 90  $\mu$ l Thrombozytensuspension vor der Färbung mit 10  $\mu$ l Calcium-Ionophor (A23187) aktiviert (Binet & Volfin, 1975). Um eine Negativkontrolle zu erhalten, wurde anstelle des CD62P-Antikörpers eine PCE-gekoppelte Maus IgG Isotyp-Kontrolle (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet.

### 3.7 Färbung mit FITC-konjugiertem Annexin V

Biologische Membranen bestehen hauptsächlich aus Phospholipiden, die sich zu einer Phospholipid-Doppelschicht anordnen (Bretscher & Raff, 1975). Zu ihnen zählt Phosphatidylserin (PS), welches sich im Normalfall allerdings nur in der inneren Lipidschicht befindet. Es konnte gezeigt werden, dass PS im Rahmen der Apoptose von der inneren in die äußere Membranschicht diffundiert und damit einen entscheidenden Marker dieses programmierten Zelltods darstellt (Martin et al., 1995). Bei Annexin V handelt es sich um ein calciumabhängiges Phospholipid-bindendes Protein. Es bindet besonders stark an PS und kann durch Konjugation mit FITC in der Durchflusszytometrie messbar gemacht werden (Zhang et al., 1997).

Für die Färbung mit FITC-konjugiertem Annexin V wurden jeweils 50 µl Thrombozytensuspension einer Probandin der PE-Gruppe, sowie einer gesunden Schwangeren und einer nicht-schwangeren Kontrollperson mit je 50 µl 1X Annexin V Bindungspuffer (siehe Tabelle 3.3) vermengt. Daraufhin wurden den Herstellerangaben folgend (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 5 µl FITC Annexin V hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend wurden in jedes Röhrchen weitere 400 µl Bindungspuffer zugegeben.

Eine Positivkontrolle wurde durch vorherige Aktivierung der Thrombozyten mit 5 µl 100 mikromolarem Calcium-Ionophor (A23187) durchgeführt. Für die Negativkontrolle wurde auf die Färbung mit FITC - Annexin V verzichtet und lediglich Bindungspuffer zur Thrombozytensuspension gegeben.

**Tabelle 3.6:** Übersicht über die Ansätze für eine Patientin und ihre Kontrollgruppen.

Blau = Negativkontrollen, rot = Positivkontrollen

<b>Färbung</b>	<b>Fallgruppe</b>	<b>Kontrollgruppe schwanger</b>	<b>Kontrollgruppe nicht-schwanger</b>
<b>JC-1</b>	Ungefärbt 3 x gefärbt	Ungefärbt 3 x gefärbt Calcium-Ionophor + JC-1	Ungefärbt 3 x gefärbt
<b>PCE-CD62P-Antikörper</b>	Gefärbt	IgG-Isotyp Gefärbt Calcium-Ionophor + P-Selectin	Gefärbt
<b>FITC-Annexin V</b>	Gefärbt	Ungefärbt Gefärbt Calcium-Ionophor + Annexin V	Gefärbt



### 3.8 Probenasservierung

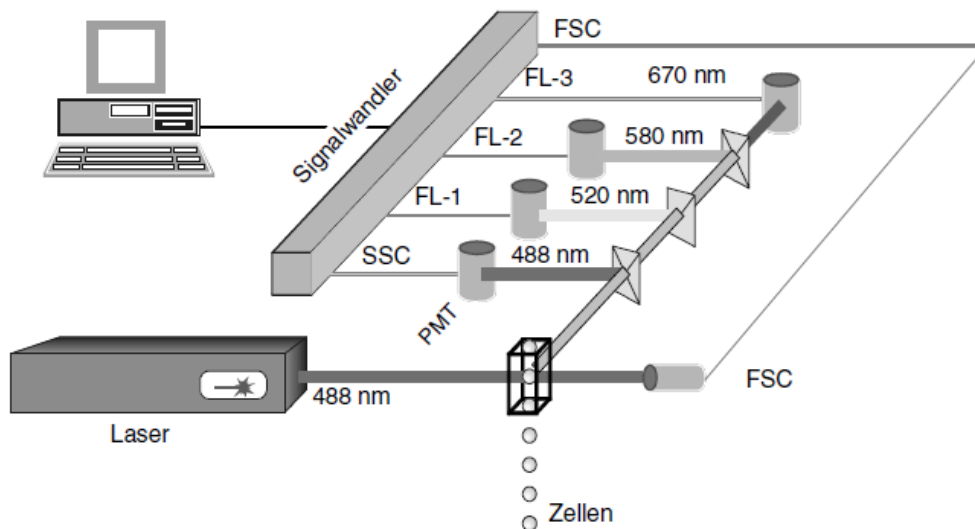
Überschüssige Thrombozyten wurden für mögliche spätere Untersuchungen asserviert. Dafür wurde die übrige Thrombozytensuspension der PE-Proben und schwangeren Kontrollproben in 15 ml Falcon-Röhrchen mit 1000 RCF (Beschleunigung 9/ Bremse 9) für 15 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurden die Thrombozytenpellets in 50 µl RIPA-Puffer lysiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  asserviert.

### 3.9 Durchflusszytometrie

Für die Messungen wurde das Durchflusszytometer FACS Calibur der Firma Becton Dickinson (FACS) verwendet. Im FACS können Zellen anhand ihrer Größe und molekularen Eigenschaften sortiert und quantifiziert werden. Dafür werden die zu untersuchenden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom aus Hüllflüssigkeit nacheinander einzeln in eine Messkammer eingesogen (Rothe, 2007). In dieser Messkammer trifft der Laserstrahl eines 488-nm-Argon-Lasers im  $90^{\circ}$ -Winkel auf die Zellen und wird entsprechend ihrer Größe und Granularität abgelenkt. Das entstandene Streulicht wird dann an zwei Stellen gemessen: Zum einen als Vorwärtsstreulicht (FSC) in nahezu der ursprünglichen Ausrichtung des Lasers, zum anderen als Seitwärtsstreulicht (SSC) ca.  $90^{\circ}$  zur ursprünglichen Laserausrichtung. Die Intensität des FSC ist dabei vor allem abhängig von der Größe der ablenkenden Zellen, die des SSC von ihren intrazellulären Bestandteilen (Holmes et al., 2002; Rothe, 2007).

Zusätzlich können weitere Zelleigenschaften im FACS dargestellt werden, indem sie mit fluoreszierenden Färbungen markiert werden. Der Laserstrahl regt die fluoreszierenden Marker dann zur Emission eigenen Lichts unterschiedlicher Wellenlängen an. Dieses emittierte Licht wird ebenso wie das Streulicht durch Photomultiplier (PMT)-Detektoren erfasst. Die erfassten Ereignisse werden durch die PMTs in elektrische Signale umgewandelt, verstärkt und an einen Computer gesendet. Den FL1-FL3-Detektoren sind Filter vorgeschaltet, die die Fluoreszenzen nach Wellenlängen auftrennen. Bei Verwendung eines 488-nm-Anregungslasers, wie im FACS Calibur, detektiert der FL1-Kanal grünes, der FL2-Kanal orange-rotes und der FL3-Kanal rotes Licht (Holmes et al., 2002; Rothe, 2007).

Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus eines FACS-Gerätes.



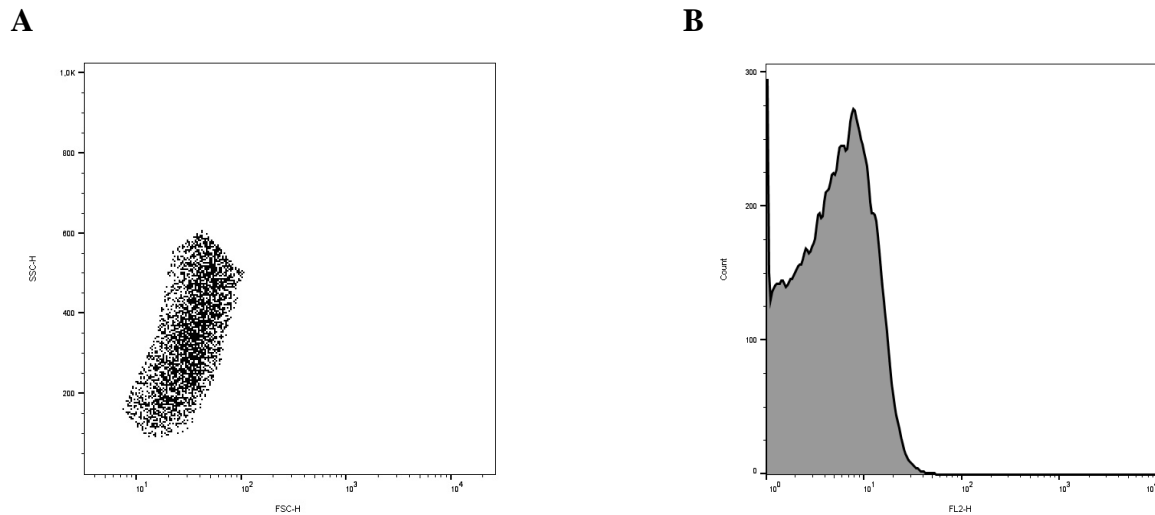
**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines FACS-Gerätes.** Die Zellen werden im Flüssigkeitsstrom einzeln an einem 488-nm-Anregungslaser vorbeigeführt. Das durch die Zellen abgelenkte Streulicht wird als Vorwärtsstreuung (FSC) in einer Linie mit dem Laserstrahl und als Seitwärtsstreuung (SSC) im 90°-Winkel zum ursprünglichen Laserstrahl von Photomultipliern (PMT) detektiert. Die übrigen PMT-Detektoren FL1-FL3 nehmen die Leuchtintensität von fluoreszenzmarkierten Zellen auf. Den PMTs sind Filter zur Auftrennung der Fluoreszenzen nach Wellenlängen vorgeschaltet. Die erfasste Signalintensität wird von den Detektoren in elektrische Signale umgewandelt, verstärkt und zur Analyse an einen Computer gesendet. Abbildung aus (Rothe, 2007).

Zum Einlesen der Proben im FACS wurde anfangs in der FSC/SSC-Darstellung ein Gate um den dichtesten Bereich der Thrombozytenpopulation gezogen. Anschließend wurde jede Probe so lange eingelesen, bis genau 20.000 Ereignisse im Inneren dieses Gates aufgenommen worden sind (s. Abbildung 3.2 A).

Auf diese Weise wurden zuerst die Röhrchen mit JC-1 gefärbten Thrombozyten sowie deren Kontrollen unter den in Tabelle 3.7 dargestellten Einstellungen analysiert.

Zur Messung der Anti-CD62P-markierten Zellen wurde vorerst die Negativkontrolle (Maus IgG Isotyp-Kontrolle) eingelesen. Die Spannung im FL-2 Kanal wurde nun so eingestellt,

dass sich der Signalpeak auf der FL2-Achse in der Histogramm-Darstellung im Bereich um  $10^1$  befand (s. Abbildung 3.2 B, vgl. Tabelle 3.8). Dies diente als Kalibrierung für alle weiteren CD62P-Messungen des entsprechenden Versuchsdurchlaufs.



**Abbildung 3.2: A Eingelesene JC-1-Probe im FACS in der FSC/SSC-Darstellung.** Es wurden 20.000 Ereignisse aufgenommen. Der Aufnahmebereich wurde zuvor durch ein Gate definiert.

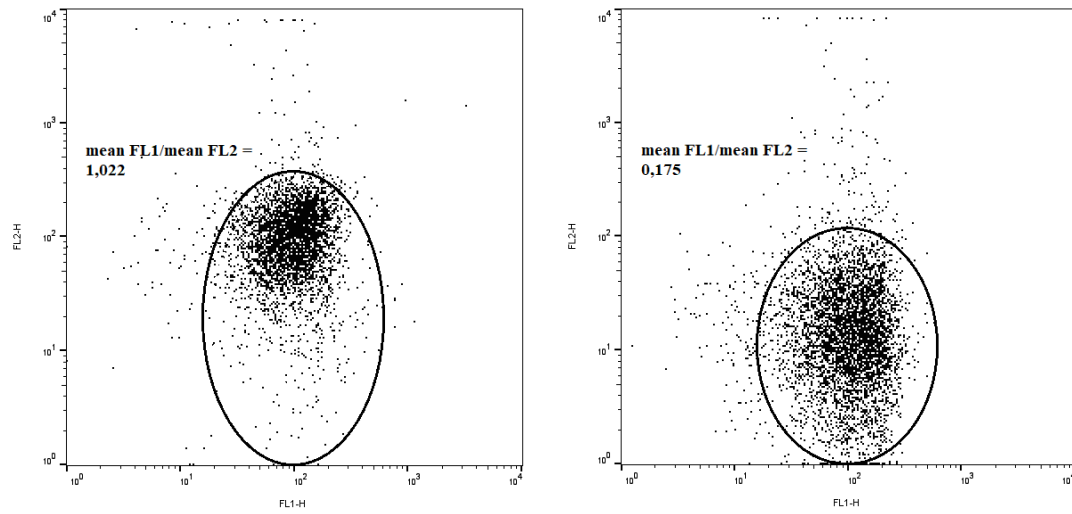
**B Maus IgG-Isotyp-Kontrolle für CD62P im FACS.** Die Einstellungen wurden zur Kalibrierung so gewählt, dass sich der Signalpeak auf der X-Achse im Bereich um  $10^1$  befindet.

Die Annexin-Proben wurden zunächst unter den in Tabelle 3.9 gezeigten Einstellungen gemessen. Bei diesen Parametern lag der Signalpeak der ungefärbten Negativkontrolle auf der FL1-Achse bei einer Spannung von 850 bereits im gewünschten Bereich um  $10^1$ . Um eventuelle Unterschiede zwischen den mit Annexin V markierten Proben der gesunden Schwangeren und der PE-Patientinnen besser erkennen zu können, wurden in einem zweiten Messdurchlauf Änderungen an den Einstellungen vorgenommen. Hier diente nun die Annexin V - markierte Probe der gesunden schwangeren Probandin als Negativkontrolle. Mit dieser Probe wurde die Spannung im FL1-Kanal erneut so eingestellt, dass sich der Signalpeak im Bereich um  $10^1$  befand.

### 3.10 Analyse der Daten mit FlowJo

Wie in Abschnitt 3.5 erklärt, kann JC-1 konzentrationsabhängig in monomerer Form oder als J-Aggregate vorliegen. Da das Verhältnis von J-Aggregaten zu Monomeren abhängig vom Mmp ist, kann der Quotient der beiden Größen als Indikator des Mmps dienen. Dieser im Folgenden Mmp-Index genannte Quotient wurde so bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Grundler et al., 2014; Verhoeven et al., 2005), um das mitochondriale Membranpotential vergleichend per Durchflusszytometrie zu untersuchen.

Zur Analyse der FACS-Messungen wurde die FlowJo™ V10 Software (BD Life Sciences) verwendet. Das von JC-Monomeren emittierte grüne Licht wird vom Zytometer im FL1-Kanal erfasst. Die orange-rote Fluoreszenz der Aggregate wird hingegen im FL2-Kanal gemessen (Holmes et al., 2002). Mithilfe der FlowJo Software konnte das Verhältnis von orange-rotem zu grünem Licht nach der Messung quantifiziert werden. Dafür wurde, wie in Abbildung 3.3 gezeigt, in der FL1/FL2-Darstellung ein Gate um die Zellpopulation gezogen. Mit Hilfe der FlowJo Software ließ sich daraufhin der Mittelwert (mean) des FL2- und FL1-Signals bestimmen. Anschließend konnte aus dem Quotienten beider Größen der Mmp-Index  $[\text{mean FL2}/\text{mean FL1}]$  gebildet werden. Die Einstellungen des FACS wurden so gewählt, dass sich der Mmp-Index von Thrombozyten mit aufrechtem Mmp im Bereich um 1 bewegte. Eine Depolarisation der mitochondrialen Membran führte somit zu einer Abnahme des Mmp-Index auf Werte kleiner 1, wie in Abbildung 3.3 für eine Patientenprobe mit PE gezeigt ist.



**Abbildung 3.3:** Darstellung der Thrombozytenproben einer gesunden schwangeren Probandin (li.) und einer Patientin mit PE (re.) in der FlowJo-Auswertemaske. Es wurde ein Gate um die Zellpopulationen gezogen und anschließend der Mmp-Index als Quotient der im Gate enthaltenen mittleren Intensitäten an FL2- und FL1-Signal berechnet.

### 3.11 Statistische Auswertung

Für die Auswertungen wurde GraphPad Prism in der Version 8.0.1 verwendet. Die Vergleiche zwischen der PE-Gruppe und den Kontrollgruppen wurden mit dem Wilcoxon Vorzeichen-Rang Test für abhängige Stichproben durchgeführt. Dabei wurden die Messwerte der Patientinnen mit PE mit den korrespondierenden, simultan gemessenen Werten der Kontrollprobandinnen gepaart. Auch die Unterschiede im Mmp-Index innerhalb der PE-Gruppe vor und nach Entbindung wurden mit dem Wilcoxon Vorzeichen-Rang Test berechnet. Der Mann-Whitney-U-Test, ein nichtparametrischer Test für unverbundene Stichproben, wurde für den Vergleich von Alter, Gestationsalter, Blutdruckwerten und Thrombozytenzahlen herangezogen. Die Korrelationen zwischen Mmp-Index und Alter, Gestationsalter und sFlt-1/PIGF-Quotient wurden mittels Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman untersucht. Sofern nicht anders angegeben, sind die Ergebnisse in dieser Arbeit als Median mit Interquartilsabstand dargestellt.

Zur Interpretation der Ergebnisse wurde der Signifikanzwert  $p$  für die Ablehnung der Nullhypothese auf  $<0,05$  festgelegt und ein Ergebnis mit  $p < 0,05$  damit als statistisch signifikant gedeutet. Dabei steht  $p$  für folgende Wahrscheinlichkeit: Sollte die Nullhypothese (kein Unterschied zwischen den Gruppen) wahr sein und würde das eigene Experiment in großer Zahl wiederholt werden, so würde bei einem  $p$ -Wert von  $<0,05$  in weniger als 5% der Fälle trotzdem ein Unterschied zwischen den Gruppen erkannt werden, der so groß wie der Unterschied im eigenen Experiment oder noch größer ist (Andrade, 2019).

## 4 Ergebnisse

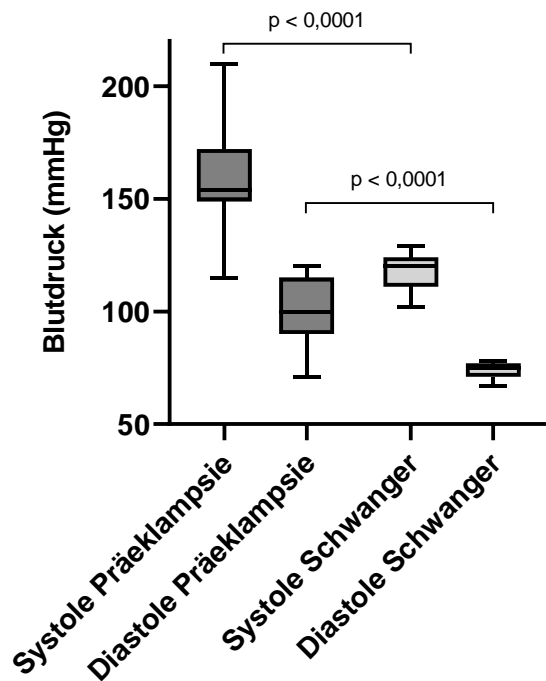
### 4.1 Charakteristika der Probandinnen

In die Studie wurden drei Gruppen eingeschlossen: Patientinnen mit Präeklampsie (PE, n=15), gesunde schwangere Kontrollprobandinnen (n=30, je 15 als Kontrollen für die Messungen vor und nach Entbindung) und nicht-schwangere Kontrollprobandinnen (n = 15).

In den Tabellen 4.1, 4.3 und 4.4 sind die grundlegenden Charakteristika der PE-Patientinnen und der gesunden schwangeren Kontrollprobandinnen dargestellt. In der PE-Gruppe zeigten zwölf Frauen eine Kombination aus Hypertonie und Proteinurie. Bei zwei Frauen fehlte die Proteinurie, sie wurden gemäß ACOG-Kriterien aufgrund erhöhter Transaminasen in die Studie eingeschlossen (ACOG Practice Bulletin, 2020). Eine weitere Probandin litt unter einem HELLP-Syndrom und wurde daher trotz fehlender Hypertonie in die Fallgruppe aufgenommen (Brown et al., 2018; Wallace et al., 2018).

Die PE-Patientinnen waren im Median 31 Jahre alt mit einem Interquartilsabstand von [28; 35]. Das mediane Alter der gesunden Schwangeren lag bei 34 [29; 39] und unterschied sich nicht signifikant von der Fallgruppe ( $p=0,52$ ). In der nicht-schwangeren Kontrollgruppe betrug das Alter 24 Jahre [24; 26]. Das Gestationsalter (GA) in Schwangerschaftswochen (SSW) war zum Zeitpunkt der Messung in der PE-Gruppe mit 34 [29; 37] niedriger als in der schwangeren Kontrollgruppe mit 39 [36; 40] ( $p=0,0009$ ). Alter oder Gestationsalter korrelierten in keiner der Gruppen signifikant mit dem Mmp-Index: Korrelation zwischen Mmp-Index und Alter PE ( $r(13) = -0,38$ ,  $p=0,17$ ), Korrelation zwischen Mmp-Index und Gestationsalter PE ( $r(13) = -0,21$ ,  $p=0,45$ ), Korrelation zwischen Mmp-Index und Alter schwangere Kontrollen ( $r(13) = -0,28$ ,  $p=0,31$ ), Korrelation zwischen Mmp-Index und Gestationsalter schwangere Kontrollen ( $r(13) = 0,0018$ ,  $p=0,99$ ), Korrelation zwischen Mmp-Index und Alter nicht-schwangere Kontrollen ( $r(13) = 0,36$ ,  $p=0,19$ ).

Patientinnen mit PE hatten erwartungsgemäß einen signifikant höheren Blutdruck als die schwangeren Kontrollprobandinnen. Wie in Abbildung 4.1 zu sehen, lag die mediane Systole dabei bei 154 mmHg (PE) gegen 120 mmHg (Kontrollen), die Diastole bei 100 mmHg (PE) gegen 75 mmHg (Kontrollen) ( $p < 0,0001$ ).



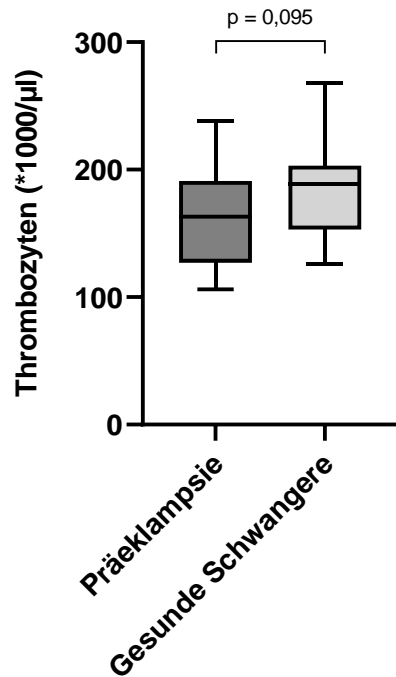
**Abbildung 4.1: Erhöhte Blutdruckwerte bei Patientinnen mit PE.** Die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte von Patientinnen mit PE lagen signifikant über den Werten von gesunden schwangeren Kontrollprobandinnen ( $p < 0,0001$ ). Mediane Werte und Interquartilsabstände in mmHg: Systole PE-Gruppe 154 [149; 172], Systole gesunde schwangere Kontrollgruppe 120 [111; 124]; Diastole PE-Gruppe 100 [90; 115], Diastole gesunde schwangere Kontrollgruppe 75 [71; 77].

In der PE-Gruppe wurde zusätzlich der sFlt-1/PIGF-Quotient erhoben, ein Marker aus angiogenetischen Faktoren, der bei Patientinnen mit drohender und manifester PE in der Regel erhöht ist und sich zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit einer baldigen PE etabliert hat (Levine et al., 2004; Zeisler et al., 2016). Der sFlt-1/PIGF-Quotient lag bei den PE-Patientinnen im Median bei 147 [121; 334], es bestand jedoch keine signifikante Korrelation mit dem Mmp-Index ( $r(13) = 0,33$ ,  $p = 0,24$ ).

Zum Zeitpunkt der Blutentnahme für die präpartale Messung des Mmp-Index fand sich bei keiner Probandin eine Thrombozytopenie mit Thrombozytenzahlen unter  $100.000/\mu\text{l}$ . Der Unterschied der Thrombozytenzahlen zwischen Patientinnen mit PE und gesunden Schwangeren war nicht signifikant, wobei eine Tendenz zu niedrigeren Thrombozytenzahlen unter den PE-Patientinnen vorhanden war (Abbildung 4.2; PE:  $163.000$  [ $127.000$ ;  $191.000$ ],



schwängere Kontrollen: 189.000 [153.000; 203.000],  $p = 0,095$ ). Zwei Probandinnen entwickelten im Verlauf ein HELLP-Syndrom mit minimalen Thrombozytenzahlen von 95.000/ $\mu\text{l}$  und 76.000/ $\mu\text{l}$  (Tabelle 4.2).



**Abbildung 4.2: Thrombozytenzahlen bei Schwangeren mit und ohne PE.** Patientinnen mit PE zeigten zum Zeitpunkt der Blutentnahme für die erste, präpartale Messung des Mmp-Index eine niedrigere mediane Thrombozytenzahl (163.000/ $\mu\text{l}$ ) als gesunde schwängere Kontrollprobandinnen (189.000/ $\mu\text{l}$ ), wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant war ( $p=0,095$ ).

In der Gruppe der PE-Patientinnen erfolgte eine weitere Unterteilung in Patientinnen mit schwerer PE und Patientinnen ohne schwere PE. Die PE wurde in dieser Studie als schwer eingestuft, wenn mindestens zwei schwerwiegende Merkmale nach ACOG vorlagen. Zu den Merkmalen zählen Blutdruckwerte  $\geq 160$  mmHg systolisch oder  $\geq 110$  mmHg diastolisch, Thrombozytopenie  $< 100.000/\mu\text{l}$ , neu aufgetretene Niereninsuffizienz oder Leberfunktionsstörung, Lungenödem und neurologische Störungen (ACOG Practice Bulletin, 2020). Fünf Patientinnen erfüllten die Kriterien und bildeten die Untergruppe „schwere PE“, zwei davon entwickelten im Verlauf ein vollständiges HELLP-Syndrom

(Tabelle 4.2). Die übrigen zehn Patientinnen gehörten der Untergruppe „nicht-schwere PE“ an (vgl. Tabelle 4.4).

In Ergänzung zum Studienkollektiv wurde zusätzlich eine separate Gruppe von sechs Probandinnen mit isolierter Gestationshypertonie (GH) eingeschlossen (Tabelle 4.1). Diese Patientinnen wiesen einen Hypertonus auf, der nach der 20. SSW begann: Median systolisch 159 mmHg [154; 168], Median diastolisch 93 mmHg [91; 99]. Abgesehen davon zeigten sie definitionsgemäß weder eine Proteinurie noch sonstige klinische oder laborchemische Anzeichen einer PE (Brown et al., 2018).

**Tabelle 4.1:** Übersicht über die grundlegenden Charakteristika der Probandinnen nach Gruppen. Angegeben sind Median und Interquartilsabstand. Die p-Werte beziehen sich auf den Vergleich zwischen Patientinnen mit PE und den gesunden schwangeren Kontrollen.

Gruppe	Präeklampsie	Gesunde Schwangere	Nicht - Schwangere	p-Werte	Gestationshypertonie
Anzahl Probandinnen	15	15	15		6
Alter (Jahre)	31 [28; 35]	34 [29; 39]	24 [24; 26]	0,52	36 [33; 38]
Gestationsalter (SSW)	34 [29; 37]	39 [36; 40]		0,0009	37 [36; 38]
Blutdruck systolisch	154 [149; 172]	120 [111; 124]		< 0,0001	159 [154; 168]
Blutdruck diastolisch	100 [90; 115]	75 [71; 77]		< 0,0001	93 [91;99]
Thrombozytenzahl (*1000/ $\mu$ l)	163 [127; 191]	189 [153; 203]		0,11	172 [162; 175]
sFlt-1/PIGF	147 [121; 334]				

**Tabelle 4.2:** Laborwerte zweier Probandinnen mit HELLP-Syndrom. Zugrunde liegende Normwerte s. Abschnitt 7.

Nr.	AST/GOT (U/l)	ALT/GPT (U/l)	Thrombozyten- zahl (/µl)	LDH (U/l)	Haptoglobin (mg/dl)	Bilirubin (mg/dl)	Proteine im Urin (mg/g Kreatinin)
5	589	471	95.000	689	< 10	1,2	602
7	339	273	76.000	737	< 10	0,7	3104

**Tabelle 4.3:** Einzelwerte der klinischen Charakteristika der gesunden schwangeren Kontrollprobandinnen. SYS = Systole, DIA = Diastole. Gestationsalter gerundet.

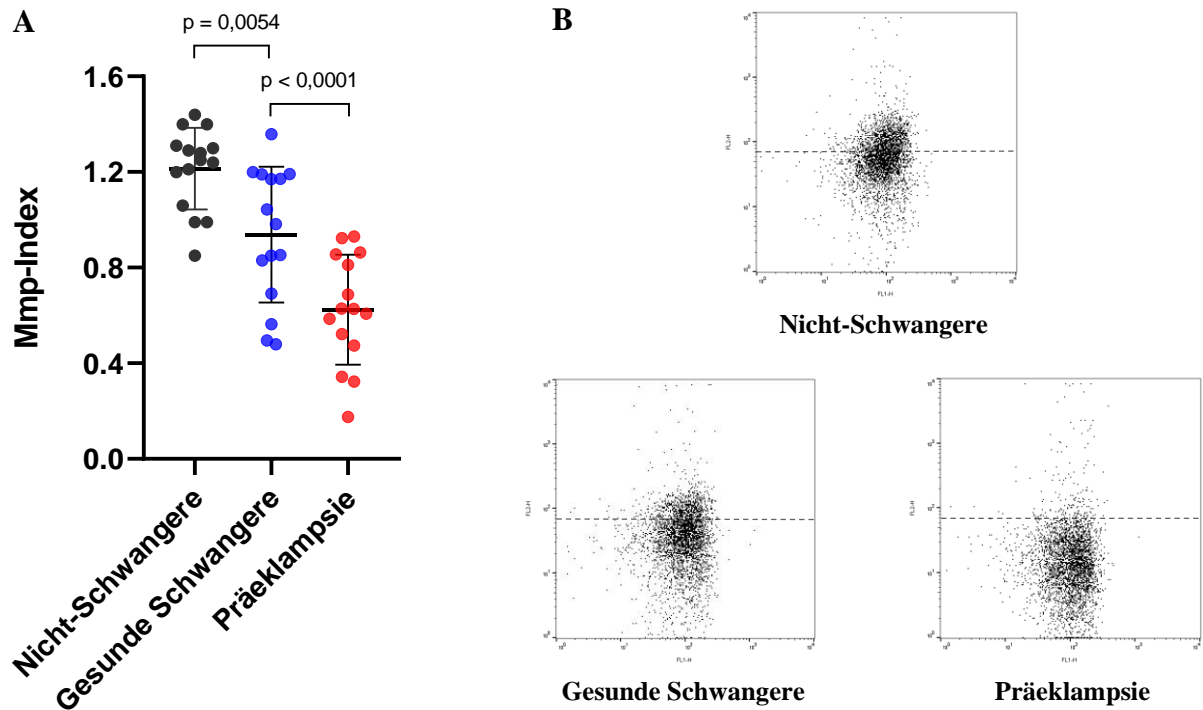
Nr.	Alter	GA (SSW)	Blutdruck SYS/DIA (mmHg)	Thrombozytenzahl (/µl)
1	42	39	102/71	127.000
2	39	39	120/73	202.000
3	34	38	102/67	181.000
4	31	40	111/78	193.000
5	43	38	129/70	136.000
6	26	24	116/77	154.000
7	32	40	118/78	126.000
8	40	39	124/75	195.000
9	37	36	103/72	245.000
10	30	36	115/78	203.000
11	29	40	126/76	153.000
12	26	39	121/70	209.000
13	19	39	126/76	268.000
14	34	32	124/75	188.000
15	37	41	120/77	189.000

**Tabelle 4.4:** Einzelwerte der Charakteristika von Patientinnen mit PE. Proteinurie: (+)=300 mg/g Kreatinin bis 2000 mg/g Kreatinin; (++)=über 2000 mg/g Kreatinin. Transaminasen: (+)=2- bis 3-fache Erhöhung über die obere Norm; (++)=über 3-fache Erhöhung. Rot = schwere PE.

Nr.	Alter	GA (SSW)	Blutdruck SYS/DIA (mmHg)	Proteinurie	Thrombozytenzahl (/ $\mu$ l)	Transaminasen	sFlt-1/PIGF	Klinische Symptome
1	38	34	150/95	+	193.000	-	154	-
2	33	37	210/120	++	144.000	-	73	Starke Kopfschmerzen, Neurologische Defizite
3	43	29	150/102	-	131.000	+	334	-
4	28	37	180/120	++	117.000	-	209	-
5	31	38	115/71	+	106.000	++	121	Übelkeit, Erbrechen, Oberbauchschmerzen
6	23	33	150/100	+	191.000	-	147	Leichte Kopfschmerzen, Schwindel, keine Neurologie
7	39	36	160/90	++	140.000	++	71	-
8	24	29	147/90	+	238.000	-	609	-
9	30	35	150/100	+	113.000	-	82	Leichte Kopfschmerzen, keine Neurologie
10	32	34	170/95	+	176.000	+	123	-
11	35	37	155/97	-	127.000	+	131	-
12	30	37	153/92	+	169.000	-	138	-
13	35	26	180/115	++	223.000	-	612	-
14	31	35	172/117	++	163.000	-	182	-
15	27	28	168/112	++	180.000	++	502	-

## **4.2 Signifikant verminderter Mmp-Index bei Patientinnen mit Präeklampsie**

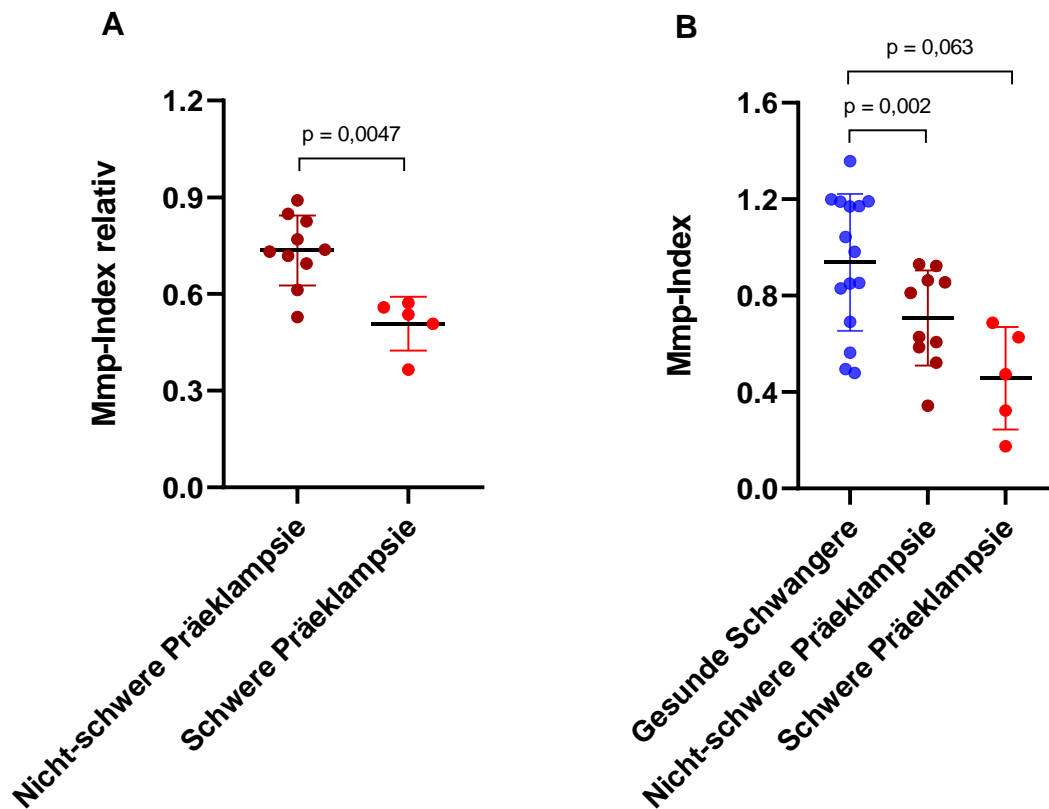
Die absoluten Mmp-Indizes der 15 Patientinnen mit PE wurden präpartal mit den zeitgleich gemessenen gesunden schwangeren Kontrollen (n=15) und nicht-schwangeren Kontrollen (n=15) verglichen. Die Methodik der Mmp-Index-Quantifizierung bei Patientinnen mit PE im simultanen Vergleich mit schwangeren Kontrollpatientinnen war zuvor im Rahmen der Doktorarbeit ebenfalls etabliert worden. PE-Patientinnen zeigten mit 0,63 [0,47; 0,86] signifikant niedrigere mediane Mmp-Indizes als gesunde schwangere Probandinnen mit 0,98 [0,69; 1,19] ( $p < 0,0001$ ; Abbildung 4.3). Darüber hinaus waren auch die Mmp-Indizes der gesunden Schwangeren gegenüber nicht-schwangeren Frauen (1,25 [1,06; 1,31]) signifikant vermindert ( $p = 0,0054$ ).



**Abbildung 4.3: A Absolute Werte der Mmp-Indizes von Patientinnen mit PE vor der Entbindung (n = 15), gesunden Schwangeren (n = 15) und nicht-schwangeren Frauen (n = 15). Die Mmp-Indizes von Patientinnen mit PE liegen signifikant unterhalb der Werte der gesunden Schwangeren ( $p < 0,0001$ ). Auch gesunde Schwangere zeigen signifikant verminderte Mmp-Indizes im Vergleich zu nicht-schwangeren Frauen ( $p = 0,0054$ ). B Beispiel der Thrombozytenpopulationen einer nicht-schwangeren Frau, einer gesunden schwangeren Probandin und einer Patientin mit PE in der FACS-Analyse. Die Abnahme des Mmps zeigt sich durch verringerte Intensitäten der Fluoreszenz im FL2-Kanal (Y-Achse).**

### 4.3 Zusammenhang des Mmp-Index mit der Schwere der Erkrankung

Unter den Patientinnen mit PE litten nach ACOG-Kriterien fünf Betroffene an einer schweren PE (ACOG Practice Bulletin, 2020) (hier bei Vorliegen zweier Kriterien, vgl. Abschnitte 1.2.2 und 4.1). Die anderen zehn Frauen wurden als Patientinnen mit „nicht-schwerer PE“ eingestuft. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen mitochondrialem Membranpotenzial und Schwere der Erkrankung zu untersuchen, wurden die relativen Mmp-Indizes beider Untergruppen verglichen. Sie ergaben sich jeweils aus dem Verhältnis des Wertes der PE-Patientin zum Wert ihrer korrespondierenden schwangeren Kontrolle des gleichen Tages ( $Mmp\ Index\ (rel.) = \frac{Mmp\ Index\ (PE)}{Mmp\ Index\ (Gesunde\ Schwangere)}$ ). Dabei zeigten die Patientinnen mit schwerer PE einen signifikant niedrigeren relativen Mmp-Index als die Patientinnen mit nicht-schwerer PE (schwere PE 0,54 [0,44; 0,57], nicht-schwere PE 0,73 [0,67; 0,83],  $p=0,0047$ , Abbildung 4.4). In den absoluten Werten ergab sich ebenfalls ein signifikant geringerer Mmp-Index bei Frauen mit nicht-schwerer PE gegenüber den gesunden schwangeren Kontrollen (nicht-schwere PE 0,72 [0,57; 0,88], gesunde Schwangere 0,98 [0,69; 1,19],  $p=0,002$ ). Zwischen den Patientinnen mit schwerer PE und den schwangeren Kontrollen war ein deutlicher Unterschied zu sehen, der allerdings statistisch aufgrund der kleinen Fallzahl noch nicht signifikant war (schwere PE 0,47 [0,25; 0,66],  $p=0,063$ ). Nach Einschluss weiterer Probandinnen im Rahmen des Veröffentlichungsprozesses zeigte sich schließlich ein signifikanter Unterschied zwischen den Untergruppen (Kraemer et al., 2022).

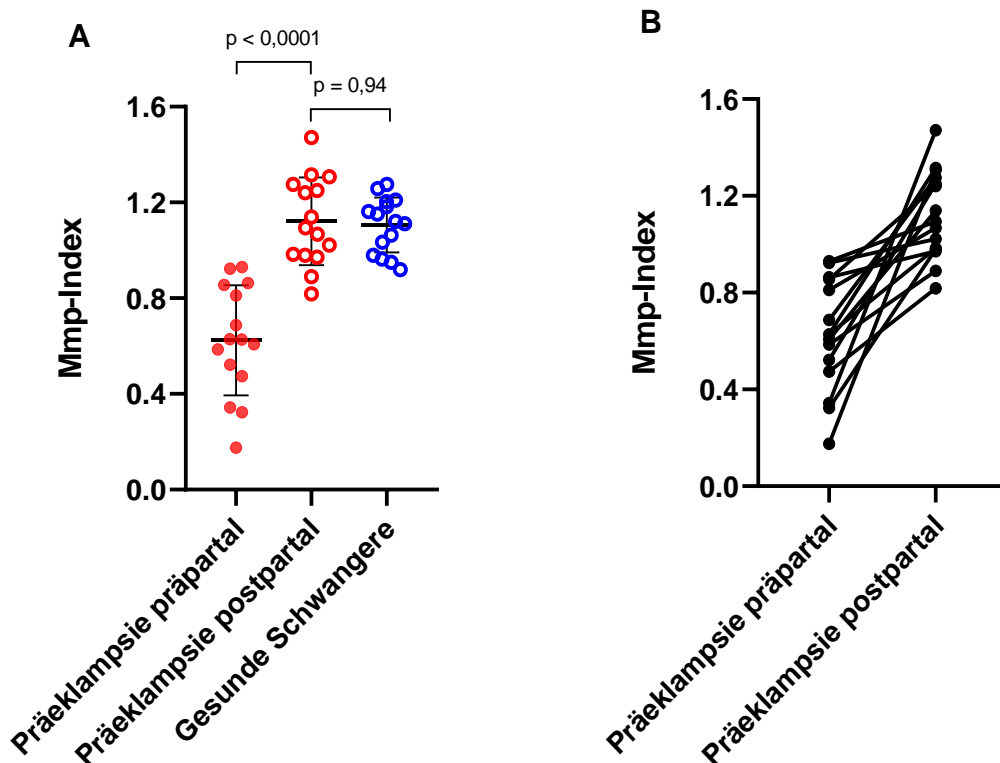


**Abbildung 4.4: Das Mmp weist einen Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung bei Patientinnen mit PE auf. A** Der relative Mmp-Index (verglichen mit den korrespondierenden schwangeren Kontrollen des gleichen Tages) von Patientinnen mit schwerer PE ( $n = 5$ ) ist signifikant niedriger als bei Patientinnen mit nicht-schwerer PE ( $n = 10$ ;  $p = 0,0047$ ). **B** Im absoluten Mmp-Index weisen Patientinnen mit nicht-schwerer PE einen signifikant niedrigeren Wert auf als gesunde Schwangere. Zwischen Frauen mit schwerer PE und gesunden Schwangeren ist ebenfalls ein deutlicher Unterschied sichtbar (aufgrund der kleinen Fallzahl  $p = 0,063$ ).



#### 4.4 Erholung des Mmp-Index nach der Entbindung

Die Mmp-Indizes der PE-Patientinnen (n=15) wurden postpartal erneut erhoben und wiederum mit je einer korrespondierenden schwangeren Kontrollprobandin (n=15) verglichen. Die PE-Patientinnen zeigten wenige Tage nach der Entbindung (durchschnittlich 2,4 Tage (Median 2 Tage, Spannweite 1-4 Tage)) eine signifikante Erhöhung bzw. Erholung des Mmp-Index (PE präpartal 0,63 [0,47; 0,86], PE postpartal 1,09 [0,98; 1,28],  $p < 0,0001$ ). Die postpartalen Werte unterschieden sich dabei nicht mehr signifikant von denen gesunder Schwangerer (gesunde Schwangere 1,12 [0,98; 1,20],  $p = 0,94$ ).



**Abbildung 4.5: Das depolarisierte Membranpotential in Thrombozyten von Patientinnen mit PE erholt sich nach der Entbindung.** A Postpartal unterscheidet sich der Mmp-Index bei PE-Patientinnen nicht mehr signifikant vom Niveau gesunder schwangerer Kontrollprobandinnen ( $p = 0,94$ ). B Dargestellt ist die individuelle Veränderung der Mmp-Indizes der PE-Patientinnen zwischen der prä- und postpartalen Messung.

#### 4.5 Mmp-Index bei Patientinnen mit isolierter Gestationshypertonie zeigt keine Depolarisation

Die zusätzlich rekrutierte Gruppe der Patientinnen mit isolierter GH (n=6) unterschied sich hinsichtlich des Mmp-Index nicht von den entsprechenden schwangeren Kontrollen (n=6): GH 1,09 [1,04; 1,17], gesunde Schwangere 1,15 [1,07; 1,18], p=0,844.

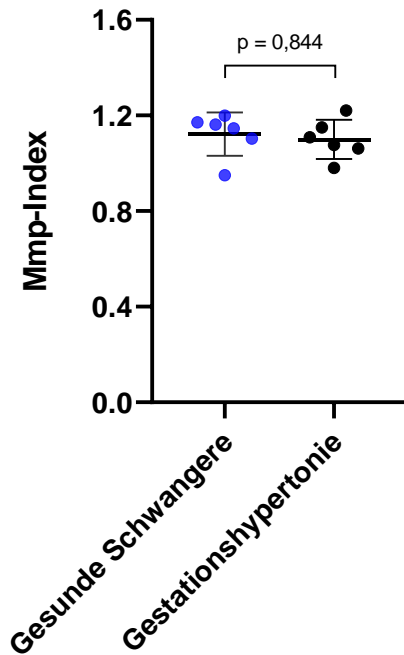


Abbildung 4.6: Mmp-Index von Patientinnen mit isolierter GH im Vergleich zu gesunden schwangeren Kontrollprobandinnen. Es ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ( $p = 0,844$ ).

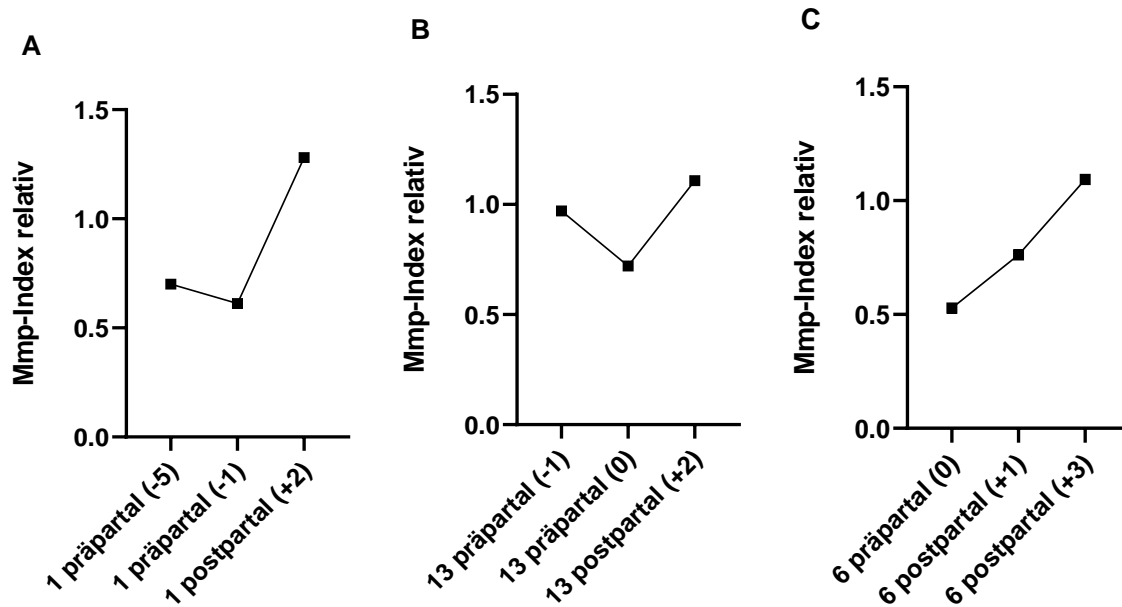
## 4.6 Dynamik des Mmp-Index anhand von Verlaufsmessungen

Das Mmp der Thrombozyten wurde von jeder Patientin mit PE sowohl vor als auch nach der Entbindung erhoben. Bei drei Patientinnen mit nicht-schwerer PE wurde der Mmp-Index in der Etablierungsphase zusätzlich zu einem dritten Zeitpunkt gemessen, um die Dynamik des Markers zu untersuchen. In Abbildung 4.7 sind die relativen Mmp-Indizes der Probandinnen zu den drei Messzeitpunkten abgebildet. Der relative Mmp-Index ergibt sich aus dem Vergleich zur jeweiligen schwangeren Kontrollprobandin, bei einem Wert von 1 besteht folglich kein Unterschied zwischen PE-Patientin und schwangerer Kontrolle.

Probandin 1 (vgl. Tabelle 4.4) präsentierte sich in der 34. SSW mit Hypertonie und Proteinurie ohne weitere klinische Symptomatik. Die erste Messung ergab einen relativen Mmp-Index von 0,7. Vier Tage später wurde der Mmp-Index erneut erhoben, die Patientin war zu diesem Zeitpunkt nach wie vor schwanger und sowohl klinisch als auch laborchemisch unverändert stabil. Es resultierte ein mäßig veränderter Wert von 0,61. Zwei Tage nach der Entbindung lag das Mmp schließlich über dem Niveau der schwangeren Kontrollprobandin (relativer Mmp-Index 1,28).

Bei Probandin 13 wurden ebenfalls zwei präpartale Messungen durchgeführt. Die Patientin wurde in der 26. SSW mit Hypertonie und Proteinurie aufgenommen und war initial subjektiv symptomfrei. Der relative Mmp-Index der ersten Messung lag bei 0,97. Am Folgetag verschlechterte sich der klinische Zustand der Patientin, sie entwickelte Ödeme und eine Hyperreflexie und klagte über Übelkeit. Die erneute Erhebung des Mmp-Index ergab eine Abnahme des Membranpotentials mit einem relativen Wert von 0,72. Einen Tag postpartal hatte sich der Mmp-Index auf 1,11 erholt.

Auch Probandin 6 stellte sich mit Hypertonie und Proteinurie vor und gab zusätzlich Kopfschmerzen und Schwindel an. Der relative Mmp-Index betrug 0,53 bei Aufnahme in der 33. SSW. Noch am gleichen Tag erfolgte die Entbindung per Sectio. Am Folgetag wurde eine erste postpartale Messung durchgeführt, während sich die Patientin mit Übelkeit, Schwindel und Ohrensausen noch immer symptomatisch zeigte. Der Mmp-Index lag in dieser Messung bei 0,76. Am dritten Tag nach der Entbindung hatte sich das mitochondriale Membranpotenzial bei nun auch subjektiv symptomfreier Patientin auf einen relativen Wert von 1,1 normalisiert.



**Abbildung 4.7: Der relative Mmp-Index von drei Probandinnen (Nr 1, 13 und 6) im Verlauf.** Der Zeitpunkt der Messung in Bezug auf die Entbindung ist in Klammern angegeben, wobei „0“ dem Tag der Entbindung entspricht. (-) bedeutet Tage vor Entbindung, (+) bedeutet Tage nach Entbindung. Gezeigt sind die relativen Mmp-Index-Werte bezogen auf die schwangere Kontrollperson. A: Probandin 1: relative Mmp-Index-Entwicklung 5 Tage vor, 1 Tag vor und 2 Tage nach Entbindung. B: relative Mmp-Index-Entwicklung 1 Tag vor Entbindung, am Entbindungstag und 2 Tage nach Entbindung. C: relative Mmp-Index-Entwicklung am Entbindungstag, 1 Tag nach und 3 Tage nach Entbindung.

#### **4.7 Annexin V-positiver apoptotischer Phänotyp bei schwerer Präeklampsie**

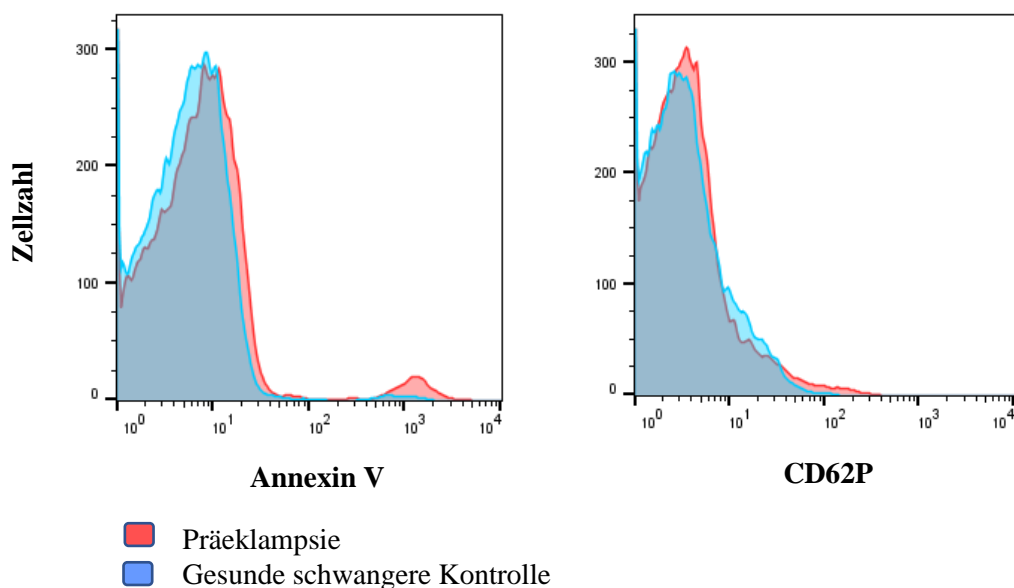
Leytin, Gyulkhandanyan et al. haben die Vorgänge der Apoptose und Aktivierung in Thrombozyten umfangreich untersucht. Sie konnten herausarbeiten, dass es sich dabei um jeweils eigenständige Prozesse handelt, die separat voneinander ablaufen können. Auch haben sie Wege aufgezeigt, diese mit entsprechenden Markern messbar zu machen (Gyulkhandanyan et al., 2012, 2013; Leytin et al., 2007; Leytin et al., 2008; Leytin et al., 2000). Die Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der Außenseite der Zellen zählt demnach auch in Thrombozyten zu den klassischen späten Apoptosemerkmalen (Gyulkhandanyan et al., 2012; Leytin et al., 2009; Martin et al., 1995). Bei aktivierten Thrombozyten wird P-Selectin (CD62P) auf der Zelloberfläche nachweisbar (Leytin et al., 2007; Leytin et al., 2000; Stenberg et al., 1985).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Oberflächenexpression von PS und CD62P bei zwölf der 15 Patientinnen mit PE und ihren gesunden schwangereren Kontrollprobandinnen mithilfe von FITC-konjugiertem Annexin V und PCE-gekoppeltem Anti-CD62P-Antikörper untersucht (vgl. Abschnitte 3.6 und 3.7). Basierend auf den Erkenntnissen von Leytin, Gyulkhandanyan et al. wurden Thrombozyten, die neben der mitochondrialen Membrandepolarisation PS exponierten, aber keine Überexpression von CD62P zeigten, als apoptotisch definiert (Annexin V (+)/ CD62P (-)). Sowohl Annexin- als auch CD62P-positive Zellen charakterisierten einen gemischt apoptotischen und aktivierten Phänotyp (Gyulkhandanyan et al., 2013; Leytin et al., 2007).

Vier der fünf Patientinnen mit schwerer PE sowie eine Patientin mit nicht-schwerer PE zeigten Annexin-positive, aber P-Selectin-negative Populationen entsprechend eines apoptotischen Phänotyps (Annexin V (+)/ CD62P (-)). Die übrige Patientin mit schwerer sowie zwei Patientinnen mit nicht-schwerer PE wiesen einen Mischtyp aus Apoptose und Aktivierung auf (Annexin V (+)/ CD62P (+)). In der Gruppe der nicht-schweren PE erwiesen sich die restlichen vier Patientinnen als weder Annexin- noch CD62P-positiv (Annexin V (-)/ CD62P (-)). Tabelle 4.5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse, Abbildung 4.8. zeigt das Beispiel einer Thrombozytenprobe mit Annexin-positiver, apoptotischer Population in der FACS-Analyse.

**Tabelle 4.5:** Überblick über die Oberflächenexpression von Phosphatidylserin (über Annexin V) und P-Selectin (CD62P) auf Thrombozyten bei PE. Schwarz = nicht-schwere PE, Rot = schwere PE. Drei Patientinnen weisen einen gemischt apoptotischen und aktivierten Phänotyp auf (Annexin V (+)/CD62P (+)). Bei fünf Patientinnen finden sich isoliert apoptotische Merkmale mit Expression von PS (Annexin V (+)/CD62P (-)), vier Patientinnen zeigen lediglich einen verminderten Mmp-Index (Annexin V (-)/CD62P (-)).

Probandin	2	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Annexin V	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
CD62P	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+



**Abbildung 4.8:** Darstellung von Thrombozyten bei Präeklampsie mit apoptotischem Phänotyp (Annexin V (+)/CD62P (-)) mittels FACS-Analyse

## 5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Thrombozyten von Frauen mit Präeklampsie (PE) im direkten Vergleich mit schwangeren Kontrollpatientinnen auf eine Depolarisation der mitochondrialen Membran untersucht und die hierzu erforderliche Methodik etabliert. Es wurde gezeigt, dass der Mmp-Index – als Maßeinheit für das mitochondriale Membranpotential (Mmp) – bei Patientinnen mit PE im Vergleich zu gesunden schwangeren Frauen signifikant vermindert ist. Darüber hinaus ergaben die Untersuchungen einen nochmals niedrigeren Mmp-Index bei Patientinnen, die an einer schweren Form der PE litten. Kein signifikanter Unterschied konnte hingegen zwischen Probandinnen mit isolierter Gestationshypertonie (GH) im Vergleich zu gesunden Schwangeren nachgewiesen werden. Wenige Tage nach der Entbindung erholte sich der Mmp-Index der PE-Patientinnen auf das Niveau der gesunden schwangeren Kontrollprobandinnen. Die Färbung mit gekoppeltem Annexin V und P-Selectin (CD62P)-Antikörper zeigte bei einem Großteil der Patientinnen mit schwerer PE einen apoptotischen Phänotyp.

### 5.1 Mitochondriale Dysfunktion in peripheren Thrombozyten bei Patientinnen mit Präeklampsie

Mit dieser Studie konnte erstmals eine Abnahme des Mmps in Thrombozyten bei Frauen mit PE gezeigt werden. Ein erhaltenes Membranpotential spielt in Mitochondrien eine zentrale Rolle für die reguläre Ausführung ihrer Funktionen (Zorova et al., 2018) und die Depolarisation der mitochondrialen Membran stellt einen sensiblen Marker für mitochondriale Dysfunktion dar. Mitochondriale Dysfunktionen sind schon mehrfach mit der Pathophysiologie der PE in Zusammenhang gebracht worden, wie Smith et al. in ihrem Review zusammenfassen (Smith et al., 2021). Insbesondere in der humanen Plazenta, aber auch in anderen von PE betroffenen Strukturen wie der Niere oder dem Endothel aus Tiermodellen, konnten dabei Abnahmen der mitochondrialen Funktion und eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beobachtet werden (McCarthy & Kenny, 2016; Smith et al., 2021; Vaka et al., 2018). Bînä et al. stellten kürzlich sogar in peripheren Thrombozyten von Patientinnen mit PE eine Abnahme aller untersuchten Parameter der

mitochondrialen Atmung fest (Bîñă et al., 2022). Davon abweichend haben Malinow et al. bei vergleichbaren Untersuchungen eine Abnahme des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs in Thrombozyten von gesunden Schwangeren gesehen, die bei Frauen mit PE ausblieb. Die Autoren erklären in ihrer Arbeit, dass alle eingeschlossenen PE-Patientinnen prophylaktisch Magnesiumsulfat erhielten und es nicht auszuschließen sei, dass die beobachteten Effekte in der PE-Gruppe auf die Magnesiumgabe zurückzuführen sind (Malinow et al., 2018). In der Studie von Bîñă et al. galt eine Therapie mit Magnesiumsulfat hingegen als Ausschlusskriterium, was als mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse herangezogen wurde. In Summe konnten beide Studien bei PE-Erkrankten Abweichungen von der normalen mitochondrialen Atmungsfunktion gesunder Schwangerer darlegen. Da die Funktionalität der Atmungskette direkt vom Mmp und von der Unversehrtheit der mitochondrialen Membranen abhängig ist (Braganza et al., 2020), stehen diese Ergebnisse insgesamt im Einklang mit den hier vorliegenden Daten. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem erstmals das mitochondriale Membranpotential in lebenden Thrombozyten und in einer Verlaufsbeobachtung untersucht.

## **5.2 Mmp-Index als Marker für die Schwere der Präeklampsie**

Der relative Mmp-Index von Patientinnen mit schwerer PE war im Vergleich zu Patientinnen mit nicht-schwerer PE nochmals signifikant vermindert. Patientinnen wurden in dieser Arbeit als schwer betroffen eingestuft, wenn sie mindestens zwei der entsprechenden Kriterien nach ACOG erfüllten (ACOG Practice Bulletin, 2020). Der Mmp-Index, als Abbild der mitochondrialen Funktion, scheint also die Schwere der Erkrankung widerzuspiegeln und könnte damit als neuer Marker für die Erkrankungsschwere bei PE fungieren.

Einige Marker in Serum oder Urin werden bereits auf ihre Eignung als Prädiktoren und Reflektoren der Erkrankungsschwere bei PE diskutiert, darunter lösliches Endoglin (sEng) (Grill et al., 2009), LDH, D-Dimere und Fibrinogen (Duan et al., 2020), das  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Peptid SERPINA1 (Starodubtseva et al., 2020), AFP, HCG oder Inhibin (Taché et al., 2014). Thrombozyten betreffend konnten insbesondere das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) und die Thrombozyten-Verteilungsbreite (PDW) eine Korrelation mit Schwere und Prognose der Erkrankung bei PE zeigen (Dadhich et al., 2012; Reddy & Rajendra Prasad, 2019; Tesfay



et al., 2019), wobei es auch Arbeiten gibt, die diesen Zusammenhang nicht bestätigen (Duan et al., 2020). Mitochondrien-basierte Parameter des Thrombozyten-Metabolismus, wie in der hier vorliegenden Studie, wurden bisher noch nicht auf die Schwere einer PE hin untersucht.

Als allgemein bedeutendster PE-Marker gilt derzeit der sFlt-1/PIGF-Quotient. Der Quotient aus anti- und proangiogenetischen Faktoren bietet insbesondere gute prädiktive Erkenntnisse zur Eintrittswahrscheinlichkeit einer PE (Zeisler et al., 2016), wird in der Literatur aber auch vielfach mit der Erkrankungsschwere in Zusammenhang gebracht (Levine et al., 2004; March et al., 2015; Maynard et al., 2003; Müller et al., 2019; Rana et al., 2018; Soundararajan et al., 2021). In der hier vorliegenden Studie reflektierte der Mmp-Index die Schwere der Erkrankung, zwischen Mmp-Index und sFlt-1 fand sich in der Fallgruppe allerdings keine signifikante Korrelation. Die Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen könnte sich dadurch erklären lassen, dass die betrachteten Studien zu sFlt-1/PIGF und Erkrankungsschwere eine hohe Heterogenität im Studiendesign aufweisen und sich der Großteil kaum mit den Untersuchungen dieser Arbeit vergleichen lässt. So korreliert der sFlt-1/PIGF-Quotient bei Müller et al. nicht mit mütterlichen Kriterien für eine schwere PE wie nach ACOG, sondern mit Frühgeburtlichkeit, niedrigem Geburtsgewicht und niedrigem APGAR-Score (Müller et al., 2019). Bei Soundararajan et al. besteht die Fallgruppe zum Zeitpunkt des Einschlusses gänzlich aus Patientinnen mit vorbestehender chronischer Hypertonie oder GH und damit anderen hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen als der PE (Soundararajan et al., 2021). Rana et al. schließen in die Vergleichsgruppe zu Patientinnen mit schwerer PE neben Frauen mit nicht-schwerer PE auch solche ohne jegliche hypertensive Schwangerschaftserkrankung, mit chronischer Hypertonie oder mit GH ein (Rana et al., 2018) und Levine et al. testen die Gruppe der schweren PE statistisch nur gegen die gesunde Kontrollgruppe (Levine et al., 2004). Zu beachten ist auch, dass der sFlt-1/PIGF-Quotient in früher „Early-Onset-PE“ vor der 34. Schwangerschaftswoche besonders hohe Werte zeigt (Levine et al., 2004; March et al., 2015). In der Studie zu dieser Arbeit ergab sich keine Korrelation zwischen Gestationsalter und Mmp-Index und eine Unterteilung in früh und spät einsetzende PE wurde nicht vorgenommen. Andere Untersuchungen von Levine et al. und Robinson et al. ergaben zudem, dass der sFlt-1/PIGF-Quotient zwischen milder PE und schwerer PE keinen signifikanten Unterschied zeigt (Levine et al., 2006) oder dass nur PIGF, nicht aber sFlt-1, mit der Schwere der Erkrankung zusammenhängt (Robinson et al., 2006).

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse damit nur eingeschränkt vergleichen, weisen aber darauf hin, dass der Mmp-Index zusätzlich zum sFlt-1/PlGF-Quotienten ergänzende Informationen über den aktuellen Erkrankungszustand der Schwangeren liefern könnte.

Passend zu der Annahme, dass der Mmp-Index die Schwere einer PE widerspiegelt, zeigte sich der Wert bei Patientinnen mit isolierter GH ohne weitere Symptome einer PE nicht betroffen, sondern war vergleichbar mit den Werten gesunder Schwangerer. Dieses Ergebnis legt zusätzlich nahe, dass tatsächlich die manifeste PE zur Depolarisation der mitochondrialen Membran führt und nicht andere, mit einer Hypertonie assoziierte Faktoren ursächlich sind. Auch andere bei PE beobachtete Thrombozytenmarker, insbesondere das zusätzlich mit der Erkrankungsschwere in Zusammenhang stehende MPV, konnten bei isolierter GH nicht vermehrt nachgewiesen werden (Karalis et al., 2005; Valera et al., 2010; Walker et al., 1989).

### **5.3 Zusammenhang zwischen mitochondrialem Stress und Inflammation**

Bei Frauen mit PE wurde der Mmp-Index in Thrombozyten in dieser Studie zum ersten Mal erhoben. Eine wichtige Grundlage für die Arbeit legten Grundler et al. und Yamakawa et al., die mithilfe von JC-1-Färbung bereits vor einigen Jahren eine Abnahme des Mmps in Thrombozyten bei Patient\*innen mit Sepsis zeigen konnten (Grundler et al., 2014; Yamakawa et al., 2013). Eine niedrige Thrombozytenzahl (Thrombozytopenie) geht bei Sepsis-Erkrankten in hohem Ausmaß mit schwerwiegenden Verläufen einher (Vandijck et al., 2010) und auch in den oben genannten Arbeiten konnte die Depolarisation der thrombozytären mitochondrialen Membran die Schwere der Erkrankung (Grundler et al., 2014; Yamakawa et al., 2013) und darüber hinaus das klinische Outcome (Grundler et al., 2014) wiedergeben. Während die Sepsis eine schwere systemische Entzündungsreaktion auf eine Infektion darstellt (Gotts & Matthay, 2016), ist auch an der PE ein inflammatorisches Milieu beteiligt (Aggarwal et al., 2019; Michalczyk et al., 2020; Tenório et al., 2019). Sahin et al. konnten zudem darlegen, dass die Entzündungsreaktion bei schwerer PE nochmals verstärkt zu beobachten ist (Sahin et al., 2015). Die genannten Erkenntnisse legen nahe, dass bei Patient\*innen mit Sepsis und PE möglicherweise ähnliche Mechanismen des inflammatorischen Milieus in die mitochondriale Stressreaktion involviert sein könnten.

Passend dazu ist bekannt, dass mitochondriale Dysfunktionen in vielen Erkrankungen mit dem Auslösen und Verstärken von inflammatorischen Prozessen assoziiert sind (Smith et al., 2021; West, 2017). Auch Thrombozyten im Allgemeinen wird eine Beteiligung an inflammatorischen Prozessen nachgesagt, indem sie mit Immunzellen, Chemokinen und Zytokinen interagieren (Jurk & Kehrel, 2008; Lindemann et al., 2007).

Die Hypothese einer Beziehung zwischen mitochondrialem Stress und Inflammation wird weiter unterstützt durch das hier vorgestellte Ergebnis, dass der Mmp-Index auch bei gesunden schwangeren Frauen gegenüber nicht-Schwangeren vermindert ist – denn auch eine Schwangerschaft *per se* geht früheren Erkenntnissen zufolge bereits mit einer gewissen Inflammation einher (Palm et al., 2013). Am Beispiel der Sepsis, PE und gesunden Schwangerschaft gezeigt, korreliert die Dimension der mitochondrialen Depolarisation darüber hinaus mit dem Ausmaß des üblicherweise beteiligten inflammatorischen Status: So konnte bei Patient\*innen mit schwerer Sepsis ein massiver, bei Patientinnen mit schwerer PE ein moderater und bei gesunden schwangeren Frauen ein milder Abfall des Mmp-Index beobachtet werden.

#### **5.4 Thrombozytenapoptose bei Präeklampsie**

Seit nunmehr über 20 Jahren ist bekannt, dass auch in kernlosen Thrombozyten ein kontrollierter Zelltod in Form von Apoptose möglich ist (Vanags et al., 1997), wodurch die Lebensspanne der Zellen intrinsisch reguliert werden kann (Mason et al., 2007). Gruppen um Leytin, Gyulhandanyan et al. haben sich seitdem in umfangreicher Forschungsarbeit mit dem Phänomen beschäftigt. Inzwischen ist der intrinsische, mitochondriale Apoptoseweg für Thrombozyten gut entschlüsselt (Leytin, 2012). Die Depolarisation der mitochondrialen Innenmembran stellt dabei einen frühen Bestandteil des Apoptoseprozesses dar und kann über das Öffnen der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore, die Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol und die Aktivierung proapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie schließlich zu finalen, irreversiblen Apoptoseschritten wie morphologischen Zellveränderungen und der Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche führen (Gyulhandanyan et al., 2017; Leytin et al., 2009). Die Abnahme des Mmps ist durch die Färbung mit kationischen Farbstoffen wie das in dieser Arbeit verwendete JC-1 leicht zu erheben (Cossarizza et al., 1993). Es hat sich damit als häufig eingesetzter Apoptosemarker

in Thrombozyten etabliert, der sich bereits in einer frühen apoptotischen Phase erfassen lässt (Gyulkhandanyan et al., 2012; Kroemer & Reed, 2000; Leytin et al., 2009; Leytin et al., 2006). Die Exposition von PS, messbar durch das PS-bindende Protein Annexin V, findet sich erst auf terminal apoptotischen Zellen (Leytin et al., 2009; Leytin et al., 2006) in der Spätphase der Apoptose. Leytin, Gyulkhandanyan et al. haben weiterhin erkannt, dass Apoptose und Aktivierung von Thrombozyten jeweils eigene Prozesse darstellen. Im Zuge dessen definierten sie eine Abnahme des Mmps, beziehungsweise in fortgeschrittener Apoptose eine Exposition von PS, bei gleichzeitig ausbleibender Überexpression des Aktivierungsmarkers CD62P in Thrombozyten als apoptotischen Phänotyp (Gyulkhandanyan et al., 2013; Leytin et al., 2008).

Alle Patientinnen mit PE zeigten in dieser Studie einen im Vergleich zur tagesaktuellen gesunden schwangeren Kontrollprobandin verminderten Mmp-Index (vgl. relativer Mmp-Index in Abschnitt 4.3/Abbildung 4.4). Bei vier von fünf Patientinnen mit schwerer PE sowie bei einer Patientin mit nicht-schwerer PE wurden darüber hinaus Thrombozytenpopulationen mit Annexin-positivem apoptotischem Phänotyp gefunden (Annexin V (+)/CD62P (-)). Eine Patientin mit schwerer und zwei Patientinnen mit nicht-schwerer PE zeigten Populationen mit einem Mischtyp aus Apoptose und Aktivierung (Annexin V (+)/ CD62P (+)). Die Thrombozyten der restlichen vier Patientinnen mit nicht-schwerer PE waren Annexin- und CD62P-negativ (Annexin V (-)/ CD62P (-)) und wiesen damit lediglich den verminderten Mmp-Index auf, was entsprechend der Definition von Gyulkhandanyan, Leytin et al. ebenfalls als apoptotischer Phänotyp in einem frühen Stadium interpretiert werden kann. In Summe sprechen die Ergebnisse dafür, dass die PE vermutlich eng mit Apoptosevorgängen in Thrombozyten assoziiert sein könnte. Es wird damit ein mögliches Erklärungsmodell für einen weiteren Mechanismus hinter der bei PE häufig auftretenden Thrombozytopenie geliefert. Diese wurde bisher vor allem mit thrombotischer Mikroangiopathie in Zusammenhang gebracht (Subtil et al., 2020) und ist vermutlich multifaktoriell bedingt. Nach der erläuterten Definition befanden sich die Zellen in der hier dargestellten Untersuchung bei nicht-schwerer PE hauptsächlich in einem frühen (pro)apoptotischen Stadium, während der Apoptoseprozess in Subpopulationen bei schwerer PE bereits weiter fortgeschritten war. Passend dazu wird eine Thrombozytopenie in Frauen mit PE besonders bei schweren Fällen beobachtet und stellt sogar eines der Kriterien zur Einstufung der Erkrankung als schwere

PE dar (ACOG Practice Bulletin, 2020). In dieser Arbeit wies keine der Patientinnen zum Zeitpunkt der Messungen eine Thrombozytenzahl unter 100.000/ $\mu$ l auf. Auch dies passt dazu, dass sich die Zellen hauptsächlich in einem frühen (pro)apoptotischen Stadium befinden könnten, welches im Verlauf zu komplettem Zelltod fortschreiten und zu einer Verminderung der Zellzahl führen könnte. Dass drei Patientinnen zusätzlich zu apoptotischen Zellen auch aktivierte Thrombozytenpopulationen aufwiesen, überrascht nicht, da ein erhöhtes Maß an Thrombozytenaktivierung bei PE bereits mehrfach vorbeschrieben wurde (Harlow et al., 2002; Holthe et al., 2004).

Einschränkend ist zu beachten, dass die Depolarisation der mitochondrialen Membran kein Alleinstellungsmerkmal für Apoptose darstellt und insbesondere in unbekanntem Zusammenhang nicht als universeller Apoptosemarker dienen kann (Gyulkhandanyan et al., 2017). In den zu Anfang genannten Studien zur Thrombozytenapoptose wurde der Zelltod durch chemische oder mechanische Reize gezielt ausgelöst, woraufhin eine Abnahme des Mmps und konsekutiv weitere Apoptosemarker beobachtet werden und der Apoptose sicher zugeordnet werden konnten (Leytin, 2012; Leytin et al., 2004). In einer anderen Untersuchung von Gyulkhandanyan et al. hingegen führte die Behandlung von Thrombozyten mit Valinomycin zwar auch zu einer starken Depolarisation der mitochondrialen Innenmembran, es folgten aber keine weiteren Manifestationen der Apoptose (Gyulkhandanyan et al., 2017).

Die hohe Rate an Annexin-positiven apoptotischen Populationen bei Patientinnen mit schwerer PE in dieser Arbeit machen die Vermutung, dass der zusätzlich niedrige Mmp-Index ein frühes apoptotisches Stadium in der Patientinnenpopulation mit Präeklampsie anzeigt, dennoch wahrscheinlich. Auch Grundler et al. vermuteten in ihrer Sepsis-Studie, dass das verminderte Mmp, die durch eine verminderte Expression von Bcl-xL angezeigte Apoptose in Thrombozyten und die niedrigen Thrombozytenzahlen nicht zufällig gemeinsam im septischen Milieu auftraten (Grundler et al., 2014). Wie bereits erörtert, ist auch an der PE in geringerem Maße ein inflammatorisches Milieu beteiligt. Zusätzlich konnte auch in Zellen der Plazentae präeklampsischer Frauen im Rahmen mitochondrialer Dysfunktion bereits eine erhöhte Anfälligkeit für Apoptose gezeigt werden: Vishnyakova et al. wiesen erhöhte Level des spannungsabhängigen Ionenkanals VDAC1 nach (Vishnyakova et al.,

2016), der als Regulator der mitochondrialen Permeabilität als Schlüsselprotein des mitochondrialen Apoptosewegs gilt (Shoshan-Barmatz et al., 2010).

Um Fehleinschätzungen in der Untersuchung apoptotischer Zellen zu minimieren, sollte gemäß des Internationalen Nomenklatur-Komitees für Zelltod (NCCD), wo immer möglich, eine Erhebung mindestens zweier Apoptosemarker erfolgen (Kroemer et al., 2009). Eine Kombination des Mmp-Index mit anderen frühen „Up-Stream-Apoptosemarkern“ wie Proteinen der Bcl-2-Familie, Cytochrom C oder der Initiatorcaspase 9 (Gyulkhandanyan et al., 2012) könnte in zukünftigen Untersuchungen daher sinnvoll sein, um der Vermutung weiter nachzugehen, dass der verminderte Mmp-Index insbesondere in Annexin-negativen Thrombozyten ein frühes apoptotisches Stadium anzeigen könnte.

## 5.5 Dynamik des Mmp-Index

Aus einer erneuten Erhebung des Mmp-Index bei PE-Patientinnen nach der Entbindung ging hervor, dass sich der Wert im Durchschnitt bereits 2,4 Tage postpartal wieder auf das Niveau der gesunden schwangeren Kontrollprobandinnen erholt hatte. Dies unterstreicht zum einen die hohe Dynamik des Markers und bestärkt zum anderen die Vermutung, dass tatsächlich das durch den pathologischen Schwangerschaftsverlauf entstandene PE-Milieu im mütterlichen Organismus ursächlich für die mitochondriale Stressreaktion ist. Es ist gut denkbar, dass Faktoren, die in Zusammenhang mit der geschädigten Plazenta in die Blutbahn ausgeschüttet werden und dort bis wenige Tage nach Entbindung zirkulieren, eine systemische mitochondriale Stressreaktion auslösen können. Auch ein erhöhter sFlt-1/PlGF-Quotient, der bei PE bekanntermaßen infolge der placentaren Ischämie vermehrt freigesetzt wird (Rana et al., 2022), normalisiert sich typischerweise innerhalb von zwei bis drei Tagen nach der Entbindung (Maynard et al., 2003).

Der Mmp-Index war darüber hinaus nicht nur bei Patientinnen mit schwerer PE niedriger als bei nicht schwer betroffenen Frauen, sondern veränderte sich in den Verlaufsmessungen von drei Probandinnen auch dynamisch: Bei einer Patientin, deren klinischer Zustand über zwei Tage stabil blieb, änderte sich der Mmp-Index von einem Tag auf den nächsten nur mäßig. Eine andere Patientin erfuhr unter Verschlechterung ihrer klinischen Situation einen deutlicheren Abfall des Mmp-Index. Bei einer dritten Patientin stieg der Mmp-Index am

ersten postpartalen Tag zwar an, erholte sich aber bei noch vorhandenen Symptomen zunächst nicht vollständig. Am dritten postpartalen Tag war der Wert mit Besserung der klinischen Situation wieder komplett über das Niveau der gesunden schwangeren Kontrollprobandin gestiegen. Diese Beobachtungen machen deutlich, dass der Mmp-Index nicht nur die Schwere der Erkrankung abbildet, sondern sich darüber hinaus äußerst dynamisch entsprechend der aktuellen klinischen Situation verhält und damit potenziell Informationen zur aktuellen Krankheitsaktivität liefern könnte.

## 5.6 Bewertung des Studiendesigns

In den grundlegenden Patientinnencharakteristika bestanden keine unerwarteten Unterschiede: Thrombozytenzahlen und Alter unterschieden sich nicht signifikant zwischen Patientinnen mit und ohne PE. Das Gestationsalter war in der PE-Gruppe im Median um 5 Wochen geringer, zeigte aber ebenso wie das Alter keine Korrelation zum Mmp-Index. Der Blutdruck fiel in der PE-Gruppe erwartungsgemäß signifikant höher aus, da er das Hauptkriterium der Diagnose PE darstellt (ACOG Practice Bulletin, 2020). Insgesamt besteht kein Anhalt dafür, dass die Ergebnisse trotz der kleinen Fallzahl nicht als grundsätzlich repräsentativ für die Gesamtbevölkerung gesehen werden könnten.

Systematische Fehler in Form von Medikamenteninteraktionen wurden ausgeschlossen, indem die Blutentnahmen vor dem möglichen Beginn einer medikamentösen Therapie durchgeführt wurden und Patientinnen mit antiaggregatorischer und sonstiger thrombozytenwirksamer Medikation von der Studie ausgeschlossen wurden. Auch Patientinnen mit Vorerkrankungen wie Thrombozytenstörungen, Diabetes, Nierenerkrankungen, Erkrankungen von Leber oder Knochenmark oder Zeichen einer Infektion konnten nicht an der Studie teilnehmen, um das Risiko für Fehldiagnosen und Fehlinterpretationen zu minimieren.

Eine große Stärke der hier präsentierten Studie besteht in der Untersuchung lebender, unfixierter Thrombozyten, die bis zur Blutentnahme unmittelbar zuvor dem systemischen Milieu bei PE ausgesetzt waren und direkt von der Erkrankung mitbetroffen sind. Mit der Messung des Mmp-Index mittels JC1-Färbung wurde eine unkomplizierte Methodik verwendet, die sich als diagnostisches Mittel mit schnell verfügbarem Ergebnis tatsächlich auch für den klinischen Einsatz eignen könnte.

Mit 15 Probandinnen mit PE und ihren zugehörigen schwangeren und nicht-schwangeren Kontrollprobandinnen wurde insgesamt nur eine kleine Fallzahl an Patientinnen eingeschlossen. Dass dennoch signifikante Verminderungen im Mmp-Index nachgewiesen werden konnten, spricht für die Stärke des untersuchten Effekts. Dennoch ist für Folgeuntersuchungen eine höhere Zahl an Patientinnen nötig, um den Effekt zu bestätigen und Cut-Off-Werte zu etablieren. Auch wurden nur an wenigen Patientinnen mehrere Verlaufsmessungen durchgeführt. Messungen in definierten Zeitabständen sind zukünftig sinnvoll, um die Dynamik des Markers noch besser beurteilen zu können. Wie bereits erwähnt, könnte das Einbeziehen zusätzlicher früher Apoptosemarker hilfreich sein, um die Bedeutung der Membrandepolarisation als frühes Anzeichen für Apoptose bei PE zu bestärken.

## **5.7 Schlussfolgerungen**

Der Mmp-Index stellt einen sensitiven Marker für mitochondrialen Stress und einen frühen Apoptosemarker in Thrombozyten dar. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass die mitochondriale Dysfunktion bei PE als Zeichen eines frühen Apoptosestadiums an der Entstehung der Thrombozytopenie beteiligt sein könnte und liefern damit neue zusätzliche Erkenntnisse zur Pathophysiologie der Erkrankung. Es ist wahrscheinlich, dass Mediatoren im Rahmen des inflammatorischen Milieus bei PE den mitochondrialen Stress und den möglichen Zellverlust durch Apoptose auslösen. Der Mmp-Index spiegelte in unseren Untersuchungen die Schwere der Erkrankung wider und reagierte zudem in Verlaufsmessungen sensibel und kurzfristig auf Veränderungen der klinischen Situation der Patientinnen. In Summe könnte sich der Mmp-Index daher als leicht zu messender, wenig invasiver biologischer Sensor für den inflammatorischen Status des gesamten Organismus bei PE eignen und Informationen über die aktuelle Krankheitsaktivität auf Basis von Thrombozyten liefern. Zahlreiche Studien zeigen bereits, dass bei vielen systemischen Erkrankungen das Ausmaß bioenergetischer mitochondrialer Dysfunktion in peripheren Blutzellen mit der Schwere der Erkrankung und der Dimension von Schäden in unterschiedlichen betroffenen Geweben korreliert (Braganza et al., 2020).

Welche Faktoren genau die mitochondriale Stressreaktion in Thrombozyten bei PE auslösen, bleibt zu untersuchen.



## 6 Zusammenfassung

Die Präeklampsie (PE) stellt eine schwerwiegende Schwangerschaftserkrankung dar, die weltweit zahlreiche Schwangerschaften verkompliziert und deren einzige kausale Therapie bis heute in der Entbindung liegt. Ein häufiges Merkmal der PE, das zugleich insbesondere schwere Fälle charakterisiert, ist die Thrombozytopenie. Der genaue Mechanismus hinter dem Abfall der Thrombozytenzahl ist noch nicht vollständig geklärt. Einzelne Studien fanden bereits Veränderungen der mitochondrialen Funktionen in Thrombozyten bei PE. Eine andere Untersuchung bei Patient\*innen mit Sepsis – ein Krankheitsbild, das in besonderem Umfang ebenso mit Thrombozytopenien assoziiert ist – konnte in den Blutplättchen eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials (Mmp) zeigen, die zudem mit Schwere und Prognose der Erkrankung assoziiert ist.

Daraus ergab sich die Hypothese, dass auch bei Frauen mit PE eine Abnahme des Mmps vorliegen und an der Entstehung von Thrombozytopenien beteiligt sein könnte. Diese Arbeit hatte daher zum Ziel, das Mmp in Thrombozyten von Patientinnen mit PE zu untersuchen und einen möglichen Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung aufzudecken. Dafür wurden Thrombozyten aus den Blutproben von 15 betroffenen Frauen sowie gesunden schwangeren und nicht-schwangeren Kontrollprobandinnen isoliert. Anschließend wurden die Zellen mit JC-1 gefärbt, um das Mmp in der Durchflusszytometrie messbar zu machen und als Mmp-Index zu quantifizieren. Zu einem zweiten Zeitpunkt nach der Entbindung wurde die Messung an den PE-Patientinnen wiederholt und mit weiteren gesunden schwangeren Kontrollprobandinnen verglichen. Da die Abnahme des Mmps vielfach als früher Apoptosemarker eingesetzt wird, wurden zur weiteren Einordnung der Ergebnisse zusätzlich Annexin V und ein P-Selectin-Antikörper als Marker für Apoptose und Aktivierung verwendet.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der Mmp-Index in Thrombozyten bei Patientinnen mit PE im Vergleich zu gesunden Schwangeren signifikant vermindert ist – und zwar bereits bei normwertigen Thrombozytenzahlen. Darüber hinaus konnte der Mmp-Index die Schwere der Erkrankung widerspiegeln und erholte sich nach der Entbindung binnen weniger Tage auf das Niveau der gesunden schwangeren Kontrollprobandinnen. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass das Milieu im mütterlichen

System bei einer PE zu mitochondrialer Dysfunktion in peripheren Thrombozyten führt. Vermutlich ist an dieser mitochondrialen Stressreaktion die erhöhte inflammatorische Aktivität beteiligt, die inzwischen als wichtiger pathophysiologischer Bestandteil bei PE verstanden wird. Die Mehrzahl der Patientinnen mit schwerer PE wiesen zusätzlich zum verminderten Mmp-Index Subpopulationen an Thrombozyten mit apoptotischem Phänotyp in der Annexin-V-Messung auf. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Membrandepolarisation ein frühes Apoptosestadium abbildet, das im weiteren Verlauf zum irreversiblen Zelltod führen und damit zum pathophysiologischen Verständnis der Thrombozytopenie bei PE beitragen kann.

Insgesamt wurde mit dem Mmp-Index erstmals ein wenig invasiver, leicht zu messender und sensibel reagierender Marker für mitochondrialen Stress und Apoptose in Thrombozyten bei Frauen mit PE erhoben. Dabei konnte im Rahmen der Dissertation sowohl die Methodik für die Herausforderungen einer zeitgleichen Untersuchung von schwangeren Patientinnen und Kontrollen etabliert und angepasst werden als auch erstmals auf das Krankheitsbild der Präeklampsie angewandt werden. In zahlreichen akuten und chronischen Erkrankungen konnten bioenergetische Dysfunktionen in den Mitochondrien peripherer Blutzellen bereits eine Korrelation mit der Schwere der Grunderkrankung und der Dimension von Schäden in unterschiedlichen betroffenen Geweben zeigen. Dies legt nahe, dass sich der Mmp-Index als thrombozytenbasierter Marker für die Krankheitsaktivität und den inflammatorischen Status bei PE eignen könnte.

Für die Zukunft werden umfangreichere Folgestudien, die auf dieser Arbeit aufbauen, mit höheren Fallzahlen notwendig sein, um ursächliche Faktoren für die Vermittlung der mitochondrialen Dysfunktion in Thrombozyten zu identifizieren und um Cut-Off-Werte für einen möglichen klinischen Einsatz des Mmp-Index zu etablieren.

## **7 Referenzbereiche der Laborwerte**

Proteine im Urin < 150 mg/g Kreatinin

Thrombozytenzahl 150.000-450.000/ $\mu$ l

LDH < 244 U/l

Haptoglobin 30-200 mg/dl

Bilirubin < 1,2 mg/dl

AST 10-35 U/l

ALT 10-35 U/l

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Vereinfachte schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptosewegs.....	13
<b>Abbildung 3.1:</b> Schematische Darstellung des Aufbaus eines FACS-Gerätes .....	28
<b>Abbildung 3.2:</b> <b>A</b> Eingelesene JC-1-Probe im FACS in der FSC/SSC-Darstellung. <b>B</b> Maus IgG-Isotyp-Kontrolle für CD62P im FACS .....	29
<b>Abbildung 3.3:</b> <b>A</b> Darstellung der Thrombozytenprobe einer gesunden schwangeren Probandin und einer Patientin mit PE in der FlowJo-Auswertemaske.....	31
<b>Abbildung 4.1:</b> Erhöhte Blutdruckwerte bei Patientinnen mit PE. ....	34
<b>Abbildung 4.2:</b> Thrombozytenzahlen bei Schwangeren mit und ohne PE.....	35
<b>Abbildung 4.3:</b> <b>A</b> Absolute Werte der Mmp-Indizes von Patientinnen mit PE vor der Entbindung, gesunden Schwangeren und nicht-schwangeren Frauen. <b>B</b> Beispiel der Thrombozytenpopulationen einer nicht-schwangeren Frau, einer gesunden schwangeren Probandin und einer Patientin mit Präeklampsie in der FACS-Analyse .....	40
<b>Abbildung 4.4:</b> Das Mmp zeigt einen Zusammenhang mit der Schwere der Erkrankung bei Patientinnen mit PE .....	42
<b>Abbildung 4.5:</b> Das Mmp in Thrombozyten von Patientinnen mit PE erholt sich nach der Entbindung .....	43
<b>Abbildung 4.6:</b> Mmp-Index von Patientinnen mit isolierter GH im Vergleich zu gesunden schwangeren Kontrollprobandinnen. ....	44
<b>Abbildung 4.7:</b> Der relative Mmp-Index von drei Probandinnen im Verlauf... ..	46
<b>Abbildung 4.8:</b> Darstellung von Thrombozyten mit apoptotischer Population .....	48

## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1:</b> Diagnosekriterien der Präeklampsie .....	2
<b>Tabelle 3.1:</b> Verwendete Chemikalien .....	17
<b>Tabelle 3.2:</b> Verwendetes Laborzubehör .....	18
<b>Tabelle 3.3:</b> Verwendete Antikörper .....	19
<b>Tabelle 3.4:</b> Eigens hergestellte Puffer .....	19
<b>Tabelle 3.5:</b> Benutzte Geräte .....	20
<b>Tabelle 3.6:</b> Übersicht über die Ansätze für eine Patientin und ihre Kontrollgruppen.....	26
<b>Tabelle 4.1:</b> Übersicht über die grundlegenden Charakteristika der Probandinnen nach Gruppen .....	36
<b>Tabelle 4.2:</b> Laborwerte zweier Probandinnen mit HELLP-Syndrom .....	37
<b>Tabelle 4.3:</b> Einzelwerte der klinischen Charakteristika der gesunden schwangeren Kontrollprobandinnen.....	37
<b>Tabelle 4.4:</b> Einzelwerte der Charakteristika von Patientinnen mit PE.....	38
<b>Tabelle 4.5:</b> Überblick über die Oberflächenexpression von Phosphatidylserin (über Annexin V) und P-Selectin (CD62P) auf Thrombozyten bei PE .....	48

## 10 Literaturverzeichnis

- Abalos, E., Cuesta, C., Grosso, A. L., Chou, D., & Say, L. (2013). Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 170(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.05.005>
- ACOG Practice Bulletin. (2020). Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin Summary, Number 222. *Obstet Gynecol*, 135(6), 1492-1495. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003892>
- Aggarwal, R., Jain, A. K., Mittal, P., Kohli, M., Jawanjal, P., & Rath, G. (2019). Association of pro- and anti-inflammatory cytokines in preeclampsia. *J Clin Lab Anal*, 33(4), e22834. <https://doi.org/10.1002/jcla.22834>
- Ahmad, S., & Ahmed, A. (2004). Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res*, 95(9), 884-891. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000147365.86159.f5>
- Andrade, C. (2019). The P Value and Statistical Significance: Misunderstandings, Explanations, Challenges, and Alternatives. *Indian J Psychol Med*, 41(3), 210-215. [https://doi.org/10.4103/ijpsym.Ijpsym\\_193\\_19](https://doi.org/10.4103/ijpsym.Ijpsym_193_19)
- Bartsch, E., Medcalf, K. E., Park, A. L., & Ray, J. G. (2016). Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: systematic review and meta-analysis of large cohort studies. *Bmj*, 353, i1753. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1753>
- Bergmann, F., & Rath, W. (2015). The Differential Diagnosis of Thrombocytopenia in Pregnancy. *Dtsch Arztebl Int*, 112(47), 795-802. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2015.0795>
- Beyramzadeh, M., Dikmen, Z. G., Erturk, N. K., Tuncer, Z. S., & Akbiyik, F. (2017). Placental respiratory chain complex activities in high risk pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 30(24), 2911-2917. <https://doi.org/10.1080/14767058.2016.1268594>
- Bînă, A. M., Aburel, O. M., Avram, V. F., Lelcu, T., Lința, A. V., Chiriac, D. V., Mocanu, A. G., Bernad, E., Borza, C., Craina, M. L., Popa, Z. L., Muntean, D. M., & Crețu, O. M. (2022). Impairment of mitochondrial respiration in platelets and placentas: a pilot study in preeclamptic pregnancies. *Mol Cell Biochem*, 477(7), 1987-2000. <https://doi.org/10.1007/s11010-022-04415-2>
- Binet, A., & Volfin, P. (1975). Effect of the A23187 ionophore on mitochondrial membrane Mg<sup>2++</sup> and Ca<sup>2+</sup>. *FEBS Lett*, 49(3), 400-403. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80795-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80795-2)
- Bizzozero, J. (1882). Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 90(2), 261-332. <https://doi.org/10.1007/BF01931360>
- Blockmans, D., Deckmyn, H., & Vermylen, J. (1995). Platelet activation. *Blood Rev*, 9(3), 143-156. [https://doi.org/10.1016/0268-960x\(95\)90020-9](https://doi.org/10.1016/0268-960x(95)90020-9)

- Boehlen, F., Hohlfeld, P., Extermann, P., & de Moerloose, P. (1999). Maternal antiplatelet antibodies in predicting risk of neonatal thrombocytopenia. *Obstet Gynecol*, *93*(2), 169-173. [https://doi.org/10.1016/s0029-7844\(98\)00390-1](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(98)00390-1)
- Braganza, A., Annarapu, G. K., & Shiva, S. (2020). Blood-based bioenergetics: An emerging translational and clinical tool. *Mol Aspects Med*, *71*, 100835. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.100835>
- Braune, S., Kupper, J. H., & Jung, F. (2020). Effect of Prostanoids on Human Platelet Function: An Overview. *Int J Mol Sci*, *21*(23). <https://doi.org/10.3390/ijms21239020>
- Bretscher, M. S., & Raff, M. C. (1975). Mammalian plasma membranes. *Nature*, *258*(5530), 43-49. <https://doi.org/10.1038/258043a0>
- Brown, M. A., Magee, L. A., Kenny, L. C., Karumanchi, S. A., McCarthy, F. P., Saito, S., Hall, D. R., Warren, C. E., Adoyi, G., Ishaku, S., & International Society for the Study of Hypertension in, P. (2018). Hypertensive Disorders of Pregnancy: ISSHP Classification, Diagnosis, and Management Recommendations for International Practice. *Hypertension*, *72*(1), 24-43. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10803>
- Castedo, M., Hirsch, T., Susin, S. A., Zamzami, N., Marchetti, P., Macho, A., & Kroemer, G. (1996). Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol*, *157*(2), 512-521. <https://www.jimmunol.org/content/157/2/512.long>
- Chen, L. B. (1988). Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol*, *4*, 155-181. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.04.110188.001103>
- Chinnaiyan, A. M. (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, *1*(1), 5-15. <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900003>
- Cnossen, J. S., Morris, R. K., ter Riet, G., Mol, B. W., van der Post, J. A., Coomarasamy, A., Zwinderman, A. H., Robson, S. C., Bindels, P. J., Kleijnen, J., & Khan, K. S. (2008). Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *Cmaj*, *178*(6), 701-711. <https://doi.org/10.1503/cmaj.070430>
- Coetzee, E. J., Dommissie, J., & Anthony, J. (1998). A randomised controlled trial of intravenous magnesium sulphate versus placebo in the management of women with severe pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, *105*(3), 300-303. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1998.tb10090.x>
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, *326* ( Pt 1)(Pt 1), 1-16. <https://doi.org/10.1042/bj3260001>
- Cossarizza, A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G., & Franceschi, C. (1993). A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun*, *197*(1), 40-45. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2438>

- Dadhich, S., Agrawal, S., Soni, M., Choudhary, R., Jain, R., Sharma, S., & Saini, S. L. (2012). Predictive value of platelet indices in development of preeclampsia. *J SAFOG*, 4(1), 17-21. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10006-1164>
- DGGG, S., OEGGG. (2019). Hypertensive Schwangerschaftserkrankungen: Diagnostik und Therapie. 2019(015/018). Retrieved 08.09.2022, from <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/015-018.html>
- Duan, Z., Li, C., Leung, W. T., Wu, J., Wang, M., Ying, C., & Wang, L. (2020). Alterations of Several Serum Parameters Are Associated with Preeclampsia and May Be Potential Markers for the Assessment of PE Severity. *Dis Markers*, 2020, 7815214. <https://doi.org/10.1155/2020/7815214>
- Ehrenberg, B., Montana, V., Wei, M. D., Wuskell, J. P., & Loew, L. M. (1988). Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J*, 53(5), 785-794. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(88\)83158-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(88)83158-8)
- Elzey, B. D., Tian, J., Jensen, R. J., Swanson, A. K., Lees, J. R., Lentz, S. R., Stein, C. S., Nieswandt, B., Wang, Y., Davidson, B. L., & Ratliff, T. L. (2003). Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity*, 19(1), 9-19. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00177-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00177-8)
- Erez, O., Romero, R., Jung, E., Chaemsaitong, P., Bosco, M., Suksai, M., Gallo, D. M., & Gotsch, F. (2022). Preeclampsia and eclampsia: the conceptual evolution of a syndrome. *Am J Obstet Gynecol*, 226(2s), S786-s803. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.12.001>
- Fitzgerald, J. R., Foster, T. J., & Cox, D. (2006). The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol*, 4(6), 445-457. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1425>
- Frey, T. G., & Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 25(7), 319-324. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01609-1](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01609-1)
- Gawaz, M. (2006). Platelets in the onset of atherosclerosis. *Blood Cells Mol Dis*, 36(2), 206-210. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.12.022>
- Gay, L. J., & Felding-Habermann, B. (2011). Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*, 11(2), 123-134. <https://doi.org/10.1038/nrc3004>
- Gotts, J. E., & Matthay, M. A. (2016). Sepsis: pathophysiology and clinical management. *Bmj*, 353, i1585. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1585>
- Gray, K. J., Saxena, R., & Karumanchi, S. A. (2018). Genetic predisposition to preeclampsia is conferred by fetal DNA variants near FLT1, a gene involved in the regulation of angiogenesis. *Am J Obstet Gynecol*, 218(2), 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.11.562>
- Green, D. R., & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381), 1309-1312. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1309>
- Gremmel, T., Frelinger III, A. L., & Michelson, A. D. (2016). Platelet physiology. *Seminars in thrombosis and hemostasis*,



- Grill, S., Rusterholz, C., Zanetti-Dallenbach, R., Tercanli, S., Holzgreve, W., Hahn, S., & Lapaire, O. (2009). Potential markers of preeclampsia--a review. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 70. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-70>
- Grosso, R., Fader, C. M., & Colombo, M. I. (2017). Autophagy: A necessary event during erythropoiesis. *Blood Rev*, 31(5), 300-305. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.04.001>
- Grundler, K., Angstwurm, M., Hilge, R., Baumann, P., Annecke, T., Crispin, A., Sohn, H. Y., Massberg, S., & Kraemer, B. F. (2014). Platelet mitochondrial membrane depolarization reflects disease severity in patients with sepsis and correlates with clinical outcome. *Crit Care*, 18(1), R31. <https://doi.org/10.1186/cc13724>
- Gyulkhandanyan, A. V., Allen, D. J., Mykhaylov, S., Lyubimov, E., Ni, H., Freedman, J., & Leytin, V. (2017). Mitochondrial Inner Membrane Depolarization as a Marker of Platelet Apoptosis : Disclosure of Nonapoptotic Membrane Depolarization. *Clin Appl Thromb Hemost*, 23(2), 139-147. <https://doi.org/10.1177/1076029616665924>
- Gyulkhandanyan, A. V., Mutlu, A., Allen, D. J., Freedman, J., & Leytin, V. (2014). BH3-mimetic ABT-737 induces strong mitochondrial membrane depolarization in platelets but only weakly stimulates apoptotic morphological changes, platelet shrinkage and microparticle formation. *Thromb Res*, 133(1), 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.10.041>
- Gyulkhandanyan, A. V., Mutlu, A., Freedman, J., & Leytin, V. (2012). Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *J Thromb Thrombolysis*, 33(4), 397-411. <https://doi.org/10.1007/s11239-012-0688-8>
- Gyulkhandanyan, A. V., Mutlu, A., Freedman, J., & Leytin, V. (2013). Selective triggering of platelet apoptosis, platelet activation or both. *Br J Haematol*, 161(2), 245-254. <https://doi.org/10.1111/bjh.12237>
- Hansen, A. T., Bernth Jensen, J. M., Hvas, A. M., & Christiansen, M. (2018). The genetic component of preeclampsia: A whole-exome sequencing study. *PLoS One*, 13(5), e0197217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197217>
- Harlow, F. H., Brown, M. A., Brighton, T. A., Smith, S. L., Trickett, A. E., Kwan, Y. L., & Davis, G. K. (2002). Platelet activation in the hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 187(3), 688-695. <https://doi.org/10.1067/mob.2002.125766>
- Harmon, Q. E., Huang, L., Umbach, D. M., Klungsøyr, K., Engel, S. M., Magnus, P., Skjærven, R., Zhang, J., & Wilcox, A. J. (2015). Risk of fetal death with preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 125(3), 628-635. <https://doi.org/10.1097/aog.0000000000000696>
- Holmes, K. L., Otten, G., & Yokoyama, W. M. (2002). Flow cytometry analysis using the Becton Dickinson FACS Calibur. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 5, Unit 5.4. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0504s49>
- Holthe, M. R., Staff, A. C., Berge, L. N., & Lyberg, T. (2004). Different levels of platelet activation in preeclamptic, normotensive pregnant, and nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol*, 190(4), 1128-1134. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2003.10.699>

- Homer, C. S., Brown, M. A., Mangos, G., & Davis, G. K. (2008). Non-proteinuric pre-eclampsia: a novel risk indicator in women with gestational hypertension. *J Hypertens*, *26*(2), 295-302. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e3282f1a953>
- Huang, H., Liu, B., Gao, X., & Wang, Y. (2022). Clinical Classification, Pregnancy Outcomes and Risk Factors Analysis of Severe Preeclampsia Complicated With HELLP Syndrome. *Front Surg*, *9*, 859180. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2022.859180>
- Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, *2*(4), 277-288. <https://doi.org/10.1038/nrc776>
- Ives, C. W., Sinkey, R., Rajapreyar, I., Tita, A. T. N., & Oparil, S. (2020). Preeclampsia-Pathophysiology and Clinical Presentations: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*, *76*(14), 1690-1702. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.08.014>
- Jakobsen, C., Larsen, J. B., Fuglsang, J., & Hvas, A. M. (2019). Platelet function in preeclampsia - a systematic review and meta-analysis. *Platelets*, *30*(5), 549-562. <https://doi.org/10.1080/09537104.2019.1595561>
- Jelley, E. E. (1937). Molecular, Nematic and Crystal States of I: I-Diethyl--Cyanine Chloride. *Nature*, *139*, 631-632.
- Jodkowska, A., Martynowicz, H., Kaczmarek-Wdowiak, B., & Mazur, G. (2015). Thrombocytopenia in pregnancy - pathogenesis and diagnostic approach. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, *69*, 1215-1221. <https://doi.org/10.5604/17322693.1179649>
- Jurk, K., & Kehrel, B. E. (2008). Die Rolle von Thrombozyten bei Hämostase, Thrombose, Immunabwehr und Entzündung. *Dtsch Med Wochenschr*, *133*(21), 1130-1135. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1077228>
- Karalis, I., Nadar, S. K., Al Yemeni, E., Blann, A. D., & Lip, G. Y. (2005). Platelet activation in pregnancy-induced hypertension. *Thromb Res*, *116*(5), 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2005.01.009>
- Kausar, S., Wang, F., & Cui, H. (2018). The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases. *Cells*, *7*(12). <https://doi.org/10.3390/cells7120274>
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, *26*(4), 239-257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Khan, K. S., Wojdyla, D., Say, L., Gülmezoglu, A. M., & Van Look, P. F. (2006). WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*, *367*(9516), 1066-1074. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(06\)68397-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(06)68397-9)
- Kile, B. T. (2009). The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death. *J Thromb Haemost*, *7 Suppl 1*, 214-217. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03366.x>
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-

- inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo j*, 14(22), 5579-5588.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00245.x>
- Konijnenberg, A., Stokkers, E. W., van der Post, J. A., Schaap, M. C., Boer, K., Bleker, O. P., & Sturk, A. (1997). Extensive platelet activation in preeclampsia compared with normal pregnancy: enhanced expression of cell adhesion molecules. *Am J Obstet Gynecol*, 176(2), 461-469. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(97\)70516-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(97)70516-7)
- Kraemer, B. F., Campbell, R. A., Schwertz, H., Franks, Z. G., Vieira de Abreu, A., Grundler, K., Kile, B. T., Dhakal, B. K., Rondina, M. T., Kahr, W. H., Mulvey, M. A., Blaylock, R. C., Zimmerman, G. A., & Weyrich, A. S. (2012). Bacteria differentially induce degradation of Bcl-xL, a survival protein, by human platelets. *Blood*, 120(25), 5014-5020.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-420661>
- Kraemer, B. F., Hennis, I., Karge, A., Kraemer, A. K., Dreyer, T. F., Kiechle, M., Kuschel, B., & Bronger, H. (2022). Platelet mitochondrial membrane depolarization reflects disease severity in patients with preeclampsia. *Molecular Medicine*, 28(1), 51.  
<https://doi.org/10.1186/s10020-022-00472-x>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 87(1), 99-163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., . . . Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16(1), 3-11.  
<https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Kroemer, G., & Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, 6(5), 513-519.  
<https://doi.org/10.1038/74994>
- Kuc, S., Wortelboer, E. J., van Rijn, B. B., Franx, A., Visser, G. H., & Schielen, P. C. (2011). Evaluation of 7 serum biomarkers and uterine artery Doppler ultrasound for first-trimester prediction of preeclampsia: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv*, 66(4), 225-239.  
<https://doi.org/10.1097/OGX.0b013e3182227027>
- Lee, S. M., Romero, R., Lee, Y. J., Park, I. S., Park, C. W., & Yoon, B. H. (2012). Systemic inflammatory stimulation by microparticles derived from hypoxic trophoblast as a model for inflammatory response in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 207(4), 337.e331-338.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2012.06.047>
- Levine, R. J., Lam, C., Qian, C., Yu, K. F., Maynard, S. E., Sachs, B. P., Sibai, B. M., Epstein, F. H., Romero, R., Thadhani, R., & Karumanchi, S. A. (2006). Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, 355(10), 992-1005.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa055352>
- Levine, R. J., Maynard, S. E., Qian, C., Lim, K. H., England, L. J., Yu, K. F., Schisterman, E. F., Thadhani, R., Sachs, B. P., Epstein, F. H., Sibai, B. M., Sukhatme, V. P., & Karumanchi, S. A. (2004). Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*, 350(7), 672-683. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031884>

- Leytin, V. (2012). Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Rev*, 26(2), 51-63. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2011.10.002>
- Leytin, V., Allen, D. J., Lyubimov, E., & Freedman, J. (2007). Higher thrombin concentrations are required to induce platelet apoptosis than to induce platelet activation. *Br J Haematol*, 136(5), 762-764. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06503.x>
- Leytin, V., Allen, D. J., Mutlu, A., Gyulkhandanyan, A. V., Mykhaylov, S., & Freedman, J. (2009). Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *Lab Invest*, 89(4), 374-384. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.13>
- Leytin, V., Allen, D. J., Mutlu, A., Mykhaylov, S., Lyubimov, E., & Freedman, J. (2008). Platelet activation and apoptosis are different phenomena: evidence from the sequential dynamics and the magnitude of responses during platelet storage. *Br J Haematol*, 142(3), 494-497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07209.x>
- Leytin, V., Allen, D. J., Mykhaylov, S., Lyubimov, E., & Freedman, J. (2006). Thrombin-triggered platelet apoptosis. *J Thromb Haemost*, 4(12), 2656-2663. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02200.x>
- Leytin, V., Allen, D. J., Mykhaylov, S., Mis, L., Lyubimov, E. V., Garvey, B., & Freedman, J. (2004). Pathologic high shear stress induces apoptosis events in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, 320(2), 303-310. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.166>
- Leytin, V., & Freedman, J. (2003). Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models. *Transfus Apher Sci*, 28(3), 285-295. [https://doi.org/10.1016/s1473-0502\(03\)00048-x](https://doi.org/10.1016/s1473-0502(03)00048-x)
- Leytin, V., Mody, M., Semple, J. W., Garvey, B., & Freedman, J. (2000). Flow cytometric parameters for characterizing platelet activation by measuring P-selectin (CD62) expression: theoretical consideration and evaluation in thrombin-treated platelet populations. *Biochem Biophys Res Commun*, 269(1), 85-90. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2255>
- Li, J., Xia, Y., Bertino, A. M., Coburn, J. P., & Kuter, D. J. (2000). The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion*, 40(11), 1320-1329. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2000.40111320.x>
- Lindemann, S., Krämer, B., Seizer, P., & Gawaz, M. (2007). Platelets, inflammation and atherosclerosis. *J Thromb Haemost*, 5 Suppl 1, 203-211. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02517.x>
- Lu, F., Longo, M., Tamayo, E., Maner, W., Al-Hendy, A., Anderson, G. D., Hankins, G. D., & Saade, G. R. (2007). The effect of over-expression of sFlt-1 on blood pressure and the occurrence of other manifestations of preeclampsia in unrestrained conscious pregnant mice. *Am J Obstet Gynecol*, 196(4), 396.e391-397; discussion 396.e397. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.12.024>
- Luttun, A., & Carmeliet, P. (2003). Soluble VEGF receptor Flt1: the elusive preeclampsia factor discovered? *J Clin Invest*, 111(5), 600-602. <https://doi.org/10.1172/jci18015>

- Ly, J. D., Grubb, D. R., & Lawen, A. (2003). The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi(m)$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis*, 8(2), 115-128. <https://doi.org/10.1023/a:1022945107762>
- Major, H. D., Campbell, R. A., Silver, R. M., Branch, D. W., & Weyrich, A. S. (2014). Synthesis of sFlt-1 by platelet-monocyte aggregates contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 210(6), 547 e541-547. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.01.024>
- Malinow, A. M., Schuh, R. A., Alyamani, O., Kim, J., Bharadwaj, S., Crimmins, S. D., Galey, J. L., Fiskum, G., & Polster, B. M. (2018). Platelets in preeclamptic pregnancies fail to exhibit the decrease in mitochondrial oxygen consumption rate seen in normal pregnancies. *Biosci Rep*, 38(3). <https://doi.org/10.1042/bsr20180286>
- March, M. I., Geahchan, C., Wenger, J., Raghuraman, N., Berg, A., Haddow, H., McKeon, B. A., Narcisse, R., David, J. L., Scott, J., Thadhani, R., Karumanchi, S. A., & Rana, S. (2015). Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Adverse Outcomes among Haitian Women with Preeclampsia. *PLoS One*, 10(5), e0126815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126815>
- Martin, J. N., Jr., Thigpen, B. D., Moore, R. C., Rose, C. H., Cushman, J., & May, W. (2005). Stroke and severe preeclampsia and eclampsia: a paradigm shift focusing on systolic blood pressure. *Obstet Gynecol*, 105(2), 246-254. <https://doi.org/10.1097/01.Aog.0000151116.84113.56>
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., & Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, 182(5), 1545-1556. <https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1545>
- Mason, K. D., Carpinelli, M. R., Fletcher, J. I., Collinge, J. E., Hilton, A. A., Ellis, S., Kelly, P. N., Ekert, P. G., Metcalf, D., Roberts, A. W., Huang, D. C., & Kile, B. T. (2007). Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell*, 128(6), 1173-1186. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.037>
- Mathur, A., Hong, Y., Kemp, B. K., Barrientos, A. A., & Erusalimsky, J. D. (2000). Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 46(1), 126-138. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(00\)00002-x](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00002-x)
- Matsubara, S., Minakami, H., Sato, I., & Saito, T. (1997). Decrease in cytochrome c oxidase activity detected cytochemically in the placental trophoblast of patients with pre-eclampsia. *Placenta*, 18(4), 255-259. [https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(97\)80059-8](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(97)80059-8)
- Maynard, S. E., Min, J. Y., Merchan, J., Lim, K. H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T. A., Morgan, J. P., Sellke, F. W., Stillman, I. E., Epstein, F. H., Sukhatme, V. P., & Karumanchi, S. A. (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*, 111(5), 649-658. <https://doi.org/10.1172/jci17189>
- McCarthy, C., & Kenny, L. C. (2016). Therapeutically targeting mitochondrial redox signalling alleviates endothelial dysfunction in preeclampsia. *Sci Rep*, 6, 32683. <https://doi.org/10.1038/srep32683>

- McGinnis, R., Steinhorsdottir, V., Williams, N. O., Thorleifsson, G., Shooter, S., Hjartardottir, S., Bumpstead, S., Stefansdottir, L., Hildyard, L., Sigurdsson, J. K., Kemp, J. P., Silva, G. B., Thomsen, L. C. V., Jääskeläinen, T., Kajantie, E., Chappell, S., Kalsheker, N., Moffett, A., Hiby, S., . . . Morgan, L. (2017). Variants in the fetal genome near FLT1 are associated with risk of preeclampsia. *Nat Genet*, 49(8), 1255-1260. <https://doi.org/10.1038/ng.3895>
- Michalczyk, M., Celewicz, A., Celewicz, M., Woźniakowska-Gondek, P., & Rzepka, R. (2020). The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Mediators Inflamm*, 2020, 3864941. <https://doi.org/10.1155/2020/3864941>
- Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 41(3), 445-502. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1966.tb01501.x>
- Müller, A., Horvat, V., Vulin, M., Mandić, S., Šerić, V., & Vidosavljević, D. (2019). The soluble fms-like tyrosin kinase-1 (sFLT-1) to placental growth factor (PIGF) ratio as a possible indicator for the severity of preeclampsia - single institution experience. *Med Glas (Zenica)*, 16(1), 53-59. <https://doi.org/10.17392/994-19>
- Nicholson, D. W., & Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 22(8), 299-306. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(97\)01085-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(97)01085-2)
- Nirupama, R., Divyashree, S., Janhavi, P., Muthukumar, S. P., & Ravindra, P. V. (2021). Preeclampsia: Pathophysiology and management. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*, 50(2), 101975. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101975>
- O'Gorman, N., Nicolaides, K. H., & Poon, L. C. (2016). The use of ultrasound and other markers for early detection of preeclampsia. *Womens Health (Lond)*, 12(2), 199-207. <https://doi.org/10.2217/whe.15.95>
- Oxenoid, K., Dong, Y., Cao, C., Cui, T., Sancak, Y., Markhard, A. L., Grabarek, Z., Kong, L., Liu, Z., Ouyang, B., Cong, Y., Mootha, V. K., & Chou, J. J. (2016). Architecture of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 533(7602), 269-273. <https://doi.org/10.1038/nature17656>
- Palm, M., Axelsson, O., Wernroth, L., Larsson, A., & Basu, S. (2013). Involvement of inflammation in normal pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 92(5), 601-605. <https://doi.org/10.1111/aogs.12093>
- Pimentel, A. M., Pereira, N. R., Costa, C. A., Mann, G. E., Cordeiro, V. S., de Moura, R. S., Brunini, T. M., Mendes-Ribeiro, A. C., & Resende, A. C. (2013). L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress in plasma and platelets of patients with pre-eclampsia. *Hypertens Res*, 36(9), 783-788. <https://doi.org/10.1038/hr.2013.34>
- Rana, S., Burke, S. D., & Karumanchi, S. A. (2022). Imbalances in circulating angiogenic factors in the pathophysiology of preeclampsia and related disorders. *Am J Obstet Gynecol*, 226(2s), S1019-s1034. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.10.022>
- Rana, S., Lemoine, E., Granger, J. P., & Karumanchi, S. A. (2019). Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ Res*, 124(7), 1094-1112. <https://doi.org/10.1161/circresaha.118.313276>

- Rana, S., Salahuddin, S., Mueller, A., Berg, A. H., Thadhani, R. I., & Karumanchi, S. A. (2018). Angiogenic biomarkers in triage and risk for preeclampsia with severe features. *Pregnancy Hypertension*, *13*, 100-106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.05.008>
- Reddy, S. G., & Rajendra Prasad, C. S. B. (2019). Significance of platelet indices as severity marker in nonthrombocytopenic preeclampsia cases. *J Lab Physicians*, *11*(3), 186-191. [https://doi.org/10.4103/jlp.Jlp\\_161\\_18](https://doi.org/10.4103/jlp.Jlp_161_18)
- Reers, M., Smith, T. W., & Chen, L. B. (1991). J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, *30*(18), 4480-4486. <https://doi.org/10.1021/bi00232a015>
- Rigoulet, M., Bouchez, C. L., Paumard, P., Ransac, S., Cuvellier, S., Duvezin-Caubet, S., Mazat, J. P., & Devin, A. (2020). Cell energy metabolism: An update. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, *1861*(11), 148276. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148276>
- Riley, J. S., Quarato, G., Cloix, C., Lopez, J., O'Prey, J., Pearson, M., Chapman, J., Sesaki, H., Carlin, L. M., Passos, J. F., Wheeler, A. P., Oberst, A., Ryan, K. M., & Tait, S. W. (2018). Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis. *Embo j*, *37*(17). <https://doi.org/10.15252/emboj.201899238>
- Robinson, C. J., Johnson, D. D., Chang, E. Y., Armstrong, D. M., & Wang, W. (2006). Evaluation of placenta growth factor and soluble Fms-like tyrosine kinase 1 receptor levels in mild and severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, *195*(1), 255-259. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.12.049>
- Rothe, G. (2007). Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In *Zelluläre Diagnostik* (pp. 27-70). Karger Publishers.
- Rubenstein, D. A., & Yin, W. (2018). Platelet-Activation Mechanisms and Vascular Remodeling. *Compr Physiol*, *8*(3), 1117-1156. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170049>
- Sahin, S., Ozakpinar, O. B., Eroglu, M., Tulunay, A., Ciraci, E., Uras, F., & Tetik, S. (2015). The impact of platelet functions and inflammatory status on the severity of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*, *28*(6), 643-648. <https://doi.org/10.3109/14767058.2014.927860>
- Salgado, S. S., & Salgado, M. K. R. (2011). Structural changes in pre-eclamptic and eclamptic placentas--an ultrastructural study. *J Coll Physicians Surg Pak*, *21*(8), 482-486.
- Salnlo, S., Kekomäki, R., Rllkonen, S., & Teramo, K. (2000). Maternal thrombocytopenia at term: a population-based study. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, *79*(9), 744-749. <https://doi.org/10.1080/00016340009169188>
- Schlembach, D., Homuth, V., & Dechend, R. (2015). Treating Hypertension in Pregnancy. *Curr Hypertens Rep*, *17*(8), 63. <https://doi.org/10.1007/s11906-015-0572-y>
- Shoshan-Barmatz, V., Keinan, N., Abu-Hamad, S., Tyomkin, D., & Aram, L. (2010). Apoptosis is regulated by the VDAC1 N-terminal region and by VDAC oligomerization: release of cytochrome c, AIF and Smac/Diablo. *Biochim Biophys Acta*, *1797*(6-7), 1281-1291. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.003>

- Slee, E. A., Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, 276(10), 7320-7326. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008363200>
- Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G. D., Jr., & Chen, L. B. (1991). Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(9), 3671-3675. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3671>
- Smith, A. N., Wang, X., Thomas, D. G., Tatum, R. E., Booz, G. W., & Cunningham, M. W. (2021). The Role of Mitochondrial Dysfunction in Preeclampsia: Causative Factor or Collateral Damage? *Am J Hypertens*, 34(5), 442-452. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpab003>
- Soundararajan, R., Suresh, S. C., Mueller, A., Heimberger, S., Avula, S., Sathyanarayana, C., Mahesh, S., Madhuprakash, S., & Rana, S. (2021). Real life outpatient biomarker use in management of hypertensive pregnancies in third trimester in a low resource SeTting: ROBUST study. *Pregnancy Hypertens*, 23, 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2020.11.010>
- Starodubtseva, N., Nizyaeva, N., Baev, O., Bugrova, A., Gapaeva, M., Muminova, K., Kononikhin, A., Frankevich, V., Nikolaev, E., & Sukhikh, G. (2020). SERPINA1 Peptides in Urine as A Potential Marker of Preeclampsia Severity. *Int J Mol Sci*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030914>
- Steinthorsdottir, V., McGinnis, R., Williams, N. O., Stefansdottir, L., Thorleifsson, G., Shooter, S., Fadista, J., Sigurdsson, J. K., Auro, K. M., Berezina, G., Borges, M. C., Bumpstead, S., Bybjerg-Grauholm, J., Colgiu, I., Dolby, V. A., Dudbridge, F., Engel, S. M., Franklin, C. S., Frigge, M. L., . . . Morgan, L. (2020). Genetic predisposition to hypertension is associated with preeclampsia in European and Central Asian women. *Nat Commun*, 11(1), 5976. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19733-6>
- Stenberg, P. E., McEver, R. P., Shuman, M. A., Jacques, Y. V., & Bainton, D. F. (1985). A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*, 101(3), 880-886. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.880>
- Subtil, S. F. C., Mendes, J. M. B., Areia, A., & Moura, J. (2020). Update on Thrombocytopenia in Pregnancy. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 42(12), 834-840. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1721350> (Atualização sobre trombocitopenia na gravidez.)
- Taché, V., Baer, R. J., Currier, R. J., Li, C. S., Towner, D., Waetjen, L. E., & Jelliffe-Pawlowski, L. L. (2014). Population-based biomarker screening and the development of severe preeclampsia in California. *Am J Obstet Gynecol*, 211(4), 377.e371-378. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.03.026>
- Tenório, M. B., Ferreira, R. C., Moura, F. A., Bueno, N. B., de Oliveira, A. C. M., & Goulart, M. O. F. (2019). Cross-Talk between Oxidative Stress and Inflammation in Preeclampsia. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 8238727. <https://doi.org/10.1155/2019/8238727>
- Tesfay, F., Negash, M., Alemu, J., Yahya, M., Teklu, G., Yibrah, M., Asfaw, T., & Tsegaye, A. (2019). Role of platelet parameters in early detection and prediction of severity of preeclampsia: A comparative cross-sectional study at Ayder comprehensive specialized and



- Mekelle general hospitals, Mekelle, Tigray, Ethiopia. *PLoS One*, 14(11), e0225536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225536>
- Thon, J. N., & Italiano, J. E. (2012). Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol*(210), 3-22. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5_1)
- Torry, D. S., Wang, H. S., Wang, T. H., Caudle, M. R., & Torry, R. J. (1998). Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am J Obstet Gynecol*, 179(6 Pt 1), 1539-1544. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(98\)70021-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(98)70021-3)
- Tsujimoto, Y., & Shimizu, S. (2000). Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett*, 466(1), 6-10. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01761-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01761-5)
- Vaka, V. R., McMaster, K. M., Cunningham, M. W., Jr., Ibrahim, T., Hazlewood, R., Usry, N., Cornelius, D. C., Amaral, L. M., & LaMarca, B. (2018). Role of Mitochondrial Dysfunction and Reactive Oxygen Species in Mediating Hypertension in the Reduced Uterine Perfusion Pressure Rat Model of Preeclampsia. *Hypertension*, 72(3), 703-711. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.118.11290>
- Valera, M. C., Parant, O., Vayssiere, C., Arnal, J. F., & Payrastre, B. (2010). Physiologic and pathologic changes of platelets in pregnancy. *Platelets*, 21(8), 587-595. <https://doi.org/10.3109/09537104.2010.509828>
- van der Blik, A. M., Sedensky, M. M., & Morgan, P. G. (2017). Cell Biology of the Mitochondrion. *Genetics*, 207(3), 843-871. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300262>
- Vanags, D. M., Orrenius, S., & Aguilar-Santelises, M. (1997). Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. *Br J Haematol*, 99(4), 824-831. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.4813284.x>
- Vandijck, D. M., Blot, S. I., De Waele, J. J., Hoste, E. A., Vandewoude, K. H., & Decruyenaere, J. M. (2010). Thrombocytopenia and outcome in critically ill patients with bloodstream infection. *Heart Lung*, 39(1), 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.hrtlng.2009.07.005>
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y. M., Bdolah, Y., Lim, K. H., Yuan, H. T., Libermann, T. A., Stillman, I. E., Roberts, D., D'Amore, P. A., Epstein, F. H., Sellke, F. W., Romero, R., Sukhatme, V. P., Letarte, M., & Karumanchi, S. A. (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*, 12(6), 642-649. <https://doi.org/10.1038/nm1429>
- Verhoeven, A. J., Verhaar, R., Gouwerok, E. G., & de Korte, D. (2005). The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. *Transfusion*, 45(1), 82-89. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.04023.x>
- Vishnyakova, P. A., Volodina, M. A., Tarasova, N. V., Marey, M. V., Tsvirkun, D. V., Vavina, O. V., Khodzhaeva, Z. S., Kan, N. E., Menon, R., Vysokikh, M. Y., & Sukhikh, G. T. (2016). Mitochondrial role in adaptive response to stress conditions in preeclampsia. *Sci Rep*, 6, 32410. <https://doi.org/10.1038/srep32410>
- Vollaard, E., Zeeman, G., Alexander, J. A., McIntire, D. D., & Cunningham, F. G. (2007). "Delta Eclampsia" - A hypertensive Encephalopathy of Pregnancy in "Normotensive" Women.

- American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 197(6), 140.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.10.552>
- Walker, J. J., Cameron, A. D., Bjornsson, S., Singer, C. R., & Fraser, C. (1989). Can platelet volume predict progressive hypertensive disease in pregnancy? *Am J Obstet Gynecol*, 161(3), 676-679. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(89\)90378-5](https://doi.org/10.1016/0002-9378(89)90378-5)
- Wallace, K., Harris, S., Addison, A., & Bean, C. (2018). HELLP Syndrome: Pathophysiology and Current Therapies. *Curr Pharm Biotechnol*, 19(10), 816-826.  
<https://doi.org/10.2174/1389201019666180712115215>
- Weinstein, L. (1982). Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 142(2), 159-167.  
[https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(16\)32330-4](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(16)32330-4)
- West, A. P. (2017). Mitochondrial dysfunction as a trigger of innate immune responses and inflammation. *Toxicology*, 391, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.07.016>
- Wright, D., Akolekar, R., Syngelaki, A., Poon, L. C., & Nicolaides, K. H. (2012). A competing risks model in early screening for preeclampsia. *Fetal Diagn Ther*, 32(3), 171-178.  
<https://doi.org/10.1159/000338470>
- Wright, J. H. (1906). The Origin and Nature of the Blood Plates. *The Boston Medical and Surgical Journal*, 154(23), 643-645. <https://doi.org/10.1056/nejm190606071542301>
- Yamakawa, K., Ogura, H., Koh, T., Ogawa, Y., Matsumoto, N., Kuwagata, Y., & Shimazu, T. (2013). Platelet mitochondrial membrane potential correlates with severity in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J Trauma Acute Care Surg*, 74(2), 411-417; discussion 418. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31827a34cf>
- Yang, J. K. (2015). Death effector domain for the assembly of death-inducing signaling complex. *Apoptosis*, 20(2), 235-239. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1060-6>
- Yoneyama, Y., Suzuki, S., Sawa, R., Kiyokawa, Y., Power, G. G., & Araki, T. (2001). Plasma adenosine levels and P-selectin expression on platelets in preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 97(3), 366-370. [https://doi.org/10.1016/s0029-7844\(00\)01184-4](https://doi.org/10.1016/s0029-7844(00)01184-4)
- Zeisler, H., Llurba, E., Chantraine, F., Vatish, M., Staff, A. C., Sennstrom, M., Olovsson, M., Brennecke, S. P., Stepan, H., Allegranza, D., Dilba, P., Schoedl, M., Hund, M., & Verlohren, S. (2016). Predictive Value of the sFlt-1:PIGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N Engl J Med*, 374(1), 13-22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1414838>
- Zemel, M. B., Zemel, P. C., Berry, S., Norman, G., Kowalczyk, C., Sokol, R. J., Standley, P. R., Walsh, M. F., & Sowers, J. R. (1990). Altered platelet calcium metabolism as an early predictor of increased peripheral vascular resistance and preeclampsia in urban black women. *N Engl J Med*, 323(7), 434-438. <https://doi.org/10.1056/nejm199008163230702>
- Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R., & Yan, G. (1997). Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques*, 23(3), 525-531.  
<https://doi.org/10.2144/97233pf01>

- Zhang, X., & Wei, H. (2021). Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications. *Front Immunol*, 12, 728291. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.728291>
- Zhou, X., Han, T. L., Chen, H., Baker, P. N., Qi, H., & Zhang, H. (2017). Impaired mitochondrial fusion, autophagy, biogenesis and dysregulated lipid metabolism is associated with preeclampsia. *Exp Cell Res*, 359(1), 195-204. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.07.029>
- Zhou, Y., Damsky, C. H., & Fisher, S. J. (1997). Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest*, 99(9), 2152-2164. <https://doi.org/10.1172/jci119388>
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., Babenko, V. A., Zorov, S. D., Balakireva, A. V., Juhaszova, M., Sollott, S. J., & Zorov, D. B. (2018). Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem*, 552, 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009>

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Holger Bronger und meinem Mentor Prof. Dr. Björn Krämer für die hervorragende Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit danken. Eure durchgehende Erreichbarkeit, die Flexibilität und konstruktive Lösungsfindung in Pandemiezeiten und nicht zuletzt die stets freundschaftliche und wertschätzende Zusammenarbeit mit Euch weiß ich sehr zu schätzen.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Gynäkologische Tumorimmunologie für die freundliche Aufnahme in eure Reihen, die gute Arbeitsatmosphäre und die ein oder andere Thrombozytenspende bedanken. Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Tobias Dreyer für alle Hilfe am FACS und darüber hinaus.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. Anne Karge und allen anderen Mitarbeiter\*innen der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar, die mich tatkräftig in der Rekrutierung von Patientinnen und Kontrollprobandinnen unterstützt haben und an der Publikation unserer Ergebnisse beteiligt waren.

Außerdem möchte ich von Herzen meiner Familie danken. Danke, dass ihr nicht nur während meines gesamten Studiums und meiner Promotion immer für mich da wart und seid. Danke insbesondere Dir, Konstantin, für die Hilfe in wissenschaftlichen Fragen und das Durchsehen der Arbeit und Dir, Robert, für jegliche Unterstützung in Form von Fahrdiensten, Verköstigung, lösungsorientiertem Zuhören und dafür, dass Du immer an mich glaubst.