

**Aus dem
Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. J. Knobloch
Sektion Humanparasitologie
Leiter: Professor Dr. P.G. Kremsner**

**Zytoadhärenz
infizierter Erythrozyten bei
maternaler Malaria**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**

**der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Fabian Kaßberger
aus Nürtingen**

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. F. Poets

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Allgemeines zu Malaria tropica	1
1.2. Geschichte der Malaria-Forschung	2
1.3. <i>Plasmodium falciparum</i> - Der Erreger und sein Zyklus	3
1.4. Malaria während der Schwangerschaft	5
1.4.1. Epidemiologische Aspekte und Klinik	5
1.4.2. Sequestration als Korrelat schwerer Erkrankung	6
1.4.3. Die Plazenta – Ein Ort massiver Sequestration	7
1.4.4. Die Suche nach spezifischen Rezeptoren	8
1.4.5. CSA und HA – Rezeptoren in der Plazenta	10
1.4.6. Der Ligand PfEMP1	12
1.4.7. Die Familie der <i>var</i> -Gene	13
1.4.8. Die Ring-Sequestrations-Theorie	15
1.5. Transplazentare Infektion und konnatale Malaria	16
1.6. Zielsetzung	17
2. Patienten und Methoden	18
2.1. Studienaufbau	18
2.1.1. Hintergrund	18
2.1.2. Studienort	18
2.1.3. Studiengruppe	21
2.2. Durchführung der Studie	21
2.2.1. Schematischer Ablauf	21
2.2.2. Probenentnahme	22
2.2.3. Diagnose	23
2.2.4. Parasitenkultur	25
2.2.5. Die Bindungs-Assays	26
2.2.6. PCR-gestützte Diagnose einer Nabelschnurblutinfektion	29
2.2.7. Behandlung der Patienten	30
2.2.8. Statistische Auswertung	30

3. Ergebnisse	31
3.1. Patientenkollektiv	31
3.1.1. Altersverteilung	31
3.1.2. Entbindungen	31
3.1.3. Geburten, Geburtsgewicht, Geburtslänge	32
3.1.4. Parasitämie	35
3.1.5. Hämatologische Parameter	38
3.2. Auswertung der Bindungs-Assays	39
3.2.1. Adhärenz an den verschiedenen Rezeptoren	39
3.2.2. Quantitative Auswertung	42
3.2.3. Auswirkungen des Bindungsverhaltens	43
4. Diskussion	42
4.1. Allgemeine Auswertung	42
4.1.1. Prävalenz	42
4.1.2. Geburtsgewicht	46
4.1.3. Parasitämie	48
4.1.4. Anämie und hämatologische Parameter	49
4.2. Bindungs-Assays	50
4.2.1. Übersicht über bisher durchgeführte Bindungsstudien	50
4.2.2. Adhärenz an den verschiedenen Rezeptoren	51
4.2.3. Quantitative Auswertung	54
4.2.4. Bewertung der Unterschiede in Bindungsprävalenz und Bindungsniveau	55
4.2.5. Bindungseigenschaften der Kontrollgruppe	56
4.2.6. Die Bedeutung des Chondroitinsulfat A als Rezeptor	57
4.2.7. Die Bedeutung der Hyaluronsäure als Rezeptor	58
4.2.8. Auswirkungen des Bindungsverhaltens	59
5. Zusammenfassung	61
6. Literaturverzeichnis	62
7. Danksagung	71
8. Lebenslauf	72

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zur Malaria tropica

Malaria ist eine durch Plasmodien verursachte Protozoeninfektion. Sie gilt als die bedeutendste durch Parasiten verursachte Tropenkrankheit. Die Krankheit wird durch den Stich der Anopheles-Mücke übertragen. Malaria tritt in über 90 Ländern auf und betrifft somit ca. 40% der Weltbevölkerung. Die weltweite Prävalenz der Erkrankung wird auf 300-500 Millionen klinisch manifester Fälle pro Jahr geschätzt, wobei mehr als 90% dieser Fälle auf Länder des tropischen Afrikas entfallen. Die Mortalität liegt bei über zwei Millionen pro Jahr. Malaria nimmt somit – gemessen an der Mortalität – den zweiten Rang der Infektionskrankheiten hinter der Tuberkulose ein (Lang et al., 2000).

Nahezu allein verantwortlich für die Mortalität ist *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica. Überwiegend davon betroffen sind afrikanische Kinder in abgelegenen Gebieten mit schlechtem Zugang zur öffentlichen Gesundheitsversorgung. Nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 12 Tagen zeigen sich erste Symptome wie Fieber und Schüttelfrost. Unbehandelt treten dann rasch Anämie, Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma, gastrointestinale Beschwerden, Hypoglykämie, Azidose und Atemnot hinzu. Haupttodesursachen sind vor allem Organkomplikationen wie zerebrale Malaria, respiratorisches Syndrom, Nierenversagen, schwere Anämie und Stoffwechsellentgleisungen wie Hypoglykämie und Azidose (Lang et al., 2000).

Neben Kindern und Heranwachsenden lassen sich nicht-immune Reisende, Flüchtlinge und schwangere Frauen als weitere Risikogruppen identifizieren. Dagegen sind einheimische Erwachsene in hyperendemischen Malariagebieten durch Ausbildung einer Semi-Immunität teilweise geschützt.

Zur Behandlung der Malaria tropica stehen mehrere effektive Arzneimittel zur Verfügung. Dennoch wird die Behandlung dieser Erkrankung in den letzten Jahren zunehmend durch Resistenzentwicklungen gegen diese Chemotherapeutika erschwert. Daher konzentriert sich die Forschung der letzten Jahre neben der Suche nach neuen Wirkstoffen vor allem auf die Suche und Entwicklung eines geeigneten Impfstoffes. Neben der Sicherheit der Behandlung spielen hier auch ökonomische Erwägungen eine Schlüsselrolle, da die Malaria tropica vor allem die arme Landbevölkerung Afrikas betrifft.

1.2 Geschichte der Malaria-Forschung

1880 fand Laveran als erster Plasmodien im menschlichen Blut. Er wurde 1907 für diese Entdeckung mit dem Nobelpreis geehrt. Im Jahr 1886 gelang es Golgi, den Zusammenhang zwischen dem Malaria-Fieber und den Malaria-Parasiten nachzuweisen.

Der Übertragungsweg wurde 1897 von Ronald Ross anhand von Blutfütterungen an Anopheles-Mücken sowie Tierversuchen mit Vögeln aufgedeckt. Manson konnte 1900 diese sogenannte „Moskito-Malaria-Theorie“ durch Infektion freiwilliger Probanden bestätigen.

In den folgenden Jahrzehnten gelang die genaue Aufschlüsselung des Zyklus der Plasmodien in Mensch und Überträgermücke sowie die Entdeckung und Entwicklung zahlreicher Chemotherapeutika.

Die Entwicklung wirksamer Insektizide wie DDT sowie neuer, wirksamer Chemotherapeutika veranlaßten die WHO Mitte des letzten Jahrhunderts zur Durchführung eines weltweiten Eradikationsprogrammes, welches 1978 offiziell als für gescheitert erklärt wurde. Das Auftreten neuer Resistenzen gegen Insektizide wie Chemotherapeutika sowie politische und administrative Schwierigkeiten bei der Umsetzung standen der Ausrottung dieser Krankheit im Wege.

Ein Durchbruch auf dem Gebiet der zellbiologischen Malariaforschung stellte die erstmalige *in vitro*-Kultivierung von *Plasmodium falciparum* im Jahre 1976 dar (Trager and Jensen, 1976). Neue Methoden wie die Herstellung monoklonaler Antikörper und gentechnische Verfahren machten erste Schritte in der Entwicklung eines Impfstoffes möglich. So starteten Ende der achtziger Jahre erste Feldversuche mit Vakzinen gegen asexuelle Stadien. Gegenwärtig wird über ein Dutzend potentieller Impfstoffe getestet. Der erhoffte Durchbruch auf diesem Gebiet steht allerdings aus.

In den letzten Jahren eröffneten moderne gentechnische Verfahren die Möglichkeit zur Entschlüsselung des Genoms von *Plasmodium falciparum*. Neue molekularbiologische und immunologische Methoden erlauben einen immer tieferen Einblick in die Biologie des Parasiten und tragen so zum zunehmenden Verständnis pathogenetischer Zusammenhänge bei. Ein weiterer Forschungsschwerpunkt der letzten Jahre stellt die Entwicklung und Weiterentwicklung sinnvoller Prophylaxemaßnahmen für besonders betroffene Risikogruppen wie Reisende aus nichtendemischen Gebieten und Schwangere dar.

Trotz aller Fortschritte auf dem Gebiet der Malariaforschung sowie mehrerer gesundheitspolitischer Kampagnen ist es bislang nicht gelungen, dieser Infektionskrankheit ihre Gefährlichkeit zu nehmen.

1.3 *Plasmodium falciparum* - Der Erreger und sein Zyklus

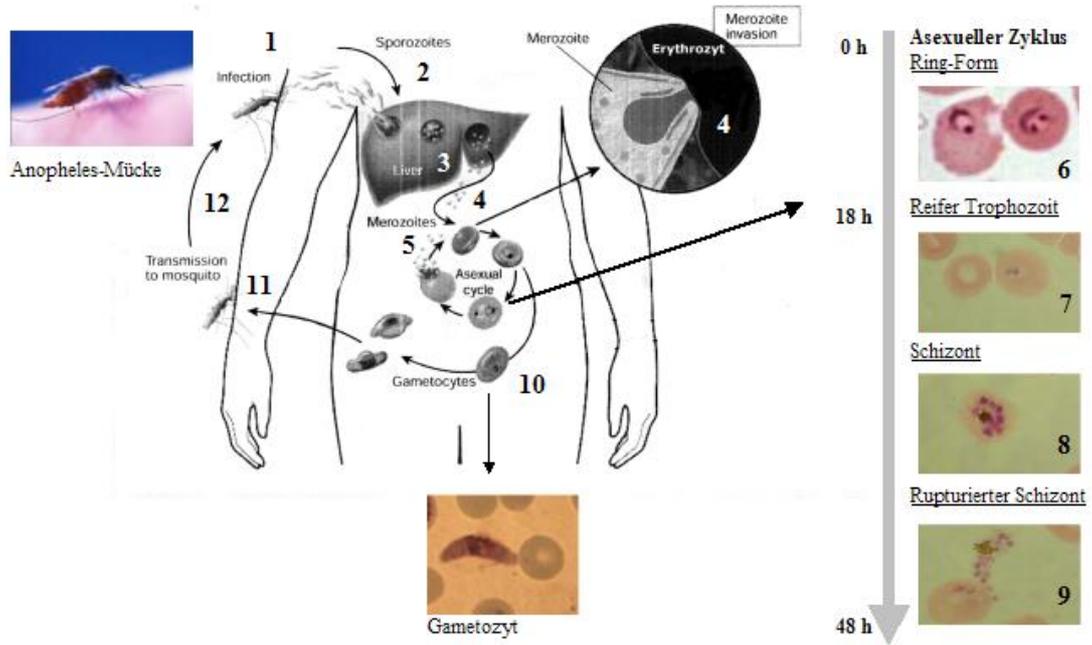
(Abbildung 1).

Es existieren vier humanpathogene Plasmodienarten: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae*. Der Erreger der Malaria tropica ist *Plasmodium falciparum*. Der Zyklus der Plasmodien verläuft als sexuelle Phase (Sporogonie) in der Überträgermücke (Anopheles) und als asexuelle Phase im Menschen (Schizogonie). Durch den Stich einer infizierten, weiblichen Anopheles-Mücke (siehe Abbildung 1, Punkt 1) gelangen Sporozoiten in die menschliche Blutbahn (Punkt 2). Diese dringen in Hepatozyten ein und werden dort zu (exoerythrozytären) Schizonten (3). Nach der Ruptur der Leberzellen werden massenhaft Merozoiten in die Blutbahn freigesetzt. Die Merozoiten befallen die Erythrozyten und führen zur Parasitämie (4). In den Erythrozyten entwickeln sich die Merozoiten zu Ringformen (6), welche rasch zu Trophozoiten heranreifen (7). Die letzte erythrozytäre Entwicklungsstufe ist dann der Schizont (8), der bei *Plasmodium falciparum* bis zu 32 Merozoiten enthalten kann (8). Durch die Ruptur des Erythrozyten in diesem Stadium (9) gelangen erneut Merozoiten in das Blutplasma und infizieren noch unbefallene Erythrozyten (5). Zwischen Merozoiten-Invasion in den Erythrozyten bis zu dessen Ruptur vergehen in der Regel etwa 48 Stunden.

Eine geringe Anzahl von Merozoiten entwickelt sich zu den Geschlechtsformen. Werden beim Stich der Anopheles-Mücke diese Gametozyten aufgenommen (11), kann sich in der Mücke die sexuelle Phase des Zyklus (Sporogonie) entwickeln (12), die mit der Abgabe der Sporozoiten bei der Blutmahlzeit endet (1).

Im Gegensatz zu anderen humanpathogenen Plasmodienarten können *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium malariae* keine Hypnozoiten in der Leber bilden. Daher kommt es bei erfolgreich behandelter Malaria tropica zu keinen chronischen Verläufen.

Abbildung 1: Der Zyklus von *Plasmodium falciparum*
Nummerierung bezieht sich auf Kapitel 1.3



1.4 Malaria während der Schwangerschaft

1.4.1 Epidemiologische Aspekte und Klinik

Das Phänomen der schwangerschaftsbezogenen Malaria wurde erstmals 1937 von Wickaramsuriya beschrieben (Wickaramsuriya et al., 1937). Er beobachtete während einer Malariaepidemie in Sri Lanka die verheerenden Auswirkungen einer Infektion auf Schwangere sowie ihre Feten.

Hauptsymptome einer Schwangerschafts-assoziierten Malaria sind Anämie der Mutter (Shulman et al., 1996), intrauterine Wachstumsretardierung (McGregor et al., 1983) und ein erhöhtes Risiko von Frühgeburten (Sullivan et al., 1999). Das dadurch bedingte erniedrigte Geburtsgewicht gilt als wesentlicher Mortalitätsfaktor für Neugeborene.

Bei jährlich ca. 50 Millionen Schwangerschaften in für Malaria endemischen Gebieten wird die Zahl der durch Schwangerschafts-assoziierte Malaria verursachten Todesfälle auf 75 000 bis 200 000 pro Jahr geschätzt (Steketee et al., 2001).

Die Auswirkungen einer *Plasmodium falciparum*-Infektion während der Schwangerschaft hängen von der epidemiologischen Situation im betrachteten Gebiet, der Immunitätslage der Schwangeren sowie der Anzahl der durchgemachten Schwangerschaften ab.

In Gebieten mit niedriger Transmission ist Malaria eine wichtige Ursache maternaler Mortalität. Schwere und tödliche Verläufe der Krankheit sind hier bei infizierten Schwangeren häufiger zu beobachten als bei nichtschwangeren Frauen. Fehl- und Frühgeburten sowie niedriges Geburtsgewicht stehen dabei ebenfalls im Zusammenhang mit einer *Plasmodium falciparum*-Infektion (Menon, 1972; Nosten et al., 1991).

In hyperendemischen Gebieten wird eine *Plasmodium falciparum*-Infektion bei Schwangeren häufig beobachtet, jedoch sind schwere oder gar tödliche Verläufe selten. In diesen Gebieten sind maternale Anämie sowie reduziertes Geburtsgewicht infolge intrauteriner Retardierung und Frühgeburtslichkeit Hauptfolgen einer Infektion (McGregor et al., 1983).

Schwangere Frauen, insbesondere Erststgebärende, erkranken häufiger an Malaria tropica als nichtschwangere Frauen. Auch der Krankheitsverlauf ist – verglichen mit Nichtschwangeren – schwerer und komplikationsreicher (Brabin, 1983). Die Prävalenz ist am höchsten in Erstgebärenden und nimmt in den folgenden Schwangerschaften ab (Brabin, 1983).

1.4.2 Sequestration als Korrelat schwerer Erkrankung

Das pathologische Hauptkennzeichen einer schweren Infektion mit *Plasmodium falciparum* ist die fast vollständige Sequestration infizierter Erythrozyten am Endothel von postkapillären Venolen unterschiedlicher Organe (Luse and Miller, 1971). Der Mechanismus der Sequestration kann - in Abhängigkeit der Lokalisation – schwere Organkomplikationen verursachen (zerebrale Malaria, Plazentainsuffizienz etc.). Die anderen drei humanpathogenen Plasmodienarten besitzen diese Eigenschaft nicht. Auch führen *Plasmodium falciparum*-Stämme, die diese Eigenschaft nicht aufweisen, offenbar nur zu milden und unkomplizierten Infektionen.

Die Sequestration induziert inflammatorische Reaktionen von Endothelzellen und von benachbart adhären Leukozyten. Auch kommt es, assoziiert mit der Parasitendichte, zu einer Durchflussstörung mit Sauerstoffverminderung und Azidose (MacPherson et al., 1985). Welcher der Mechanismen für die Organkomplikationen letztlich verantwortlich ist, ist bisher nicht ausreichend geklärt (Beeson et al., 2001).

Durch mikroskopische Untersuchungen konnte früh gezeigt werden, dass die Voraussetzung zur Sequestration mit dem Stadium der Plasmodien in den Erythrozyten zusammenhängt: Nur Erythrozyten, die reife Plasmodienformen tragen, adhären am Endothel unterschiedlicher Organe und entziehen sich somit der Blutzirkulation. Bei der Malaria tropica findet man daher auch bei hoher Parasitämie fast nur Ringformen im peripheren Blut und keine oder nur wenige reife Trophozoiten oder Schizonten.

In früheren Studien wurde davon ausgegangen, dass die Ursache der Sequestration in der rein mechanischen „Verstopfung“ der Kapillaren mit den weniger deformierbaren infizierten Erythrozyten liegt (Cranston et al., 1984). Allerdings kann dadurch die unterschiedlich ausgeprägte Intensität der Sequestration in unterschiedlichen Kapillarstromgebieten (Organotropismus) ebenso wenig erklärt werden wie die Anhäufung infizierter Erythrozyten in postkapillären Venolen (MacPherson et al., 1985). Die Entdeckung spezifischer Interaktionen zwischen Endothel und infizierten Erythrozyten führten zur Hypothese, dass der Sequestration ein rezeptorvermittelter Adhäsionsmechanismus zugrunde liegen muss.

1.4.3 Die Plazenta – Ein Ort massiver Sequestration

Postpartal durchgeführte, histologische Untersuchungen der Plazenta zeigen, dass Malaria während der Schwangerschaft mit einer Akkumulation infizierter Erythrozyten im intervillösen Raum der Plazenta assoziiert ist (Walter et al., 1982). Blutausstriche von Plazentablut weisen dabei infizierte Erythrozyten auf, die vor allem reife Trophozoiten und Schizonten enthalten. Die Parasitämie in der Plazenta ist meist um ein Vielfaches höher als im peripheren Blut und übersteigt bisweilen 50% (Brabin, 1983; Bulmer et al., 1993). Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die massive Sequestration von infizierten Erythrozyten im intervillösen Raum der Plazenta das morphologische Korrelat einer Malaria bei einer Schwangeren darstellt. Unmittelbare Folge einer Sequestration scheinen lokale Hypoxämie und die Induktion von Entzündungsreaktionen bis hin zur chronischen Intervillositis zu sein. Letztere äußert sich histologisch u.a. durch Akkumulation von Makrophagen im intervillösen Raum, Schädigung des Synzytiotrophoblasten sowie einer Verdickung der Trophoblasten-Basalmembran (Walter et al., 1982).

Zunächst vermutete man – ähnlich wie bei zerebraler Malaria - eine mechanische Obstruktion der weniger deformierbaren infizierten Erythrozyten als Ursache dieser Sequestration. Eine andere Hypothese sah indes in der generalisierten, unspezifischen Immunsuppression während der ersten Schwangerschaften, verbunden mit erhöhten Cortisolspiegeln, die Ursache für die Anfälligkeit schwangerer Frauen, an Malaria zu erkranken (Brabin, 1985). Später ging man davon aus, dass die Plazenta in den ersten Schwangerschaften ein Ort verminderter Immunantwort darstellt und somit dem Parasit das Überleben im Wirt ermöglicht. Verschiedene lokale, hormonelle und immunologische Faktoren wurden dafür verantwortlich gemacht (Watkinson et al., 1985).

Nähere histologische Betrachtungen zeigen die infizierten Erythrozyten teils direkt am Synzytiotrophoblasten anliegend, teils frei im intervillösen Raum liegend (Bulmer et al., 1993). Schon bald wurde aufgrund der Beobachtung, dass sich infizierte Erythrozyten z.T. eng an die Zellen anlagern, vermutet, dass es spezifische molekulare Interaktionen zwischen Erythrozyten und Kapillarendothel im Sinne eines Zytoadhärenzmechanismus geben muß. Die Fähigkeit, sich so der peripheren Zirkulation und ihren Abwehrmechanismen zu entziehen, scheint den Parasiten einen bedeutenden Überlebensvorteil zu sichern.

1.4.4 Die Suche nach spezifischen Rezeptoren

Die oben erwähnten mikroskopischen Beobachtungen der Sequestration in unterschiedlichen Organen führten Anfang der achtziger Jahre zu ersten Zytoadhärenzversuchen mit Zellkulturlinien. So konnte Udeinya et al. in vitro Adhärenz infizierter Erythrozyten an C32-Melanomzellen, Makrophagen und humanen Nabelschnur-Endothelzellen nachweisen (Udeinya et al., 1981).

1987 gelang die Identifikation des CD36 als spezifischer Rezeptor für infizierte Erythrozyten (Panton et al., 1987). In darauffolgenden in vitro-Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der frisch isolierten Parasiten direkt an CD36 bindet. Bis heute ist die klinische Bedeutung dieser durch CD36 vermittelten Adhärenz nicht geklärt. Ein Zusammenhang zwischen CD36-Bindungsphänotyp und Schwere der Erkrankung konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

Nach der Entdeckung des TSP (Thrombospondin) als fraglichen Bindungspartner gelang es Berendt et al. 1989, *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) als weiteren Rezeptor zu identifizieren (Berendt et al., 1989). Dieses als CD54 bekannte Protein dient auch als natürlicher Rezeptor für Leukozyten und auch bei Rhinoviren-Infektionen und scheint vor allem bei zerebraler Malaria eine wichtige pathogenetische Rolle zu spielen. So konnte Newbold et al. in einer klinischen Studie zum Adhärenzverhalten von *Plasmodium falciparum* bei Patienten mit zerebraler Malaria ein signifikant höhere Bindungsrate für ICAM-1 gegenüber anderen Patientengruppen nachweisen (Newbold et al., 1997).

Nach der Entdeckung weiterer, in ihrer Bedeutung weitgehend unklarer Rezeptoren (Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1, Vascular Cell Adhesion Molecule 1, CD31) gelang 1995 die Identifikation des Glykoaminoglykans Chondroitinsulfat A (CSA) als potentieller Rezeptor für die Zytoadhärenz infizierter Erythrozyten (Rogerson et al., 1995). 2000 wurde mit Hyaluronsäure ein weiterer Bindungspartner beschrieben (Beeson et al., 2000). Einen Überblick der bislang identifizierten Rezeptoren und ihre Bedeutung gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Überblick Rezeptoren

Rezeptor	Ligand (Domäne)	Klinische Bedeutung, Bemerkungen
CD36	PfEMP1 (CIDR1 α)	Beobachtet bei unkomplizierten wie schweren Verläufen. Häufigster Bindungsphenotyp bei Nichtschwangeren (Newbold et al., 1997). Keine Assoziation mit Schwere der Erkrankung. Geringe Expression in Gefäßen des ZNS (Turner et al., 1994). Auch als Rosetting-Rezeptor identifiziert (Handunetti et al., 1992). Bindung an CSA schließt Bindung an CD36 aus (Gamain et al., 2001).
TSP	PfEMP1	Physiologische Bedeutung unklar, da signifikante Bindung nur in statischen Versuchen.
ICAM-1 (CD54)	PfEMP1 (DBL2 β + C2)	Häufiger Bindungsphenotyp bei zerebraler Malaria. Kaum Bindung bei aus der Plazenta gewonnenen Isolaten. Assoziation mit Schwere der Erkrankung berichtet, aber fraglich (Newbold et al., 1997). Synergistische Effekte bei gleichzeitiger CD36-Bindung beobachtet (McCormick et al. 1997). Expression u.a. durch TNF stimuliert, welcher bei Malaria-Patienten erhöht ist (Grau et al., 1989). Möglicher Schutz vor schweren Verläufen durch Polymorphismus des ICAM-1-Gens in afrikanischer Bevölkerung (McGuire et al., 1994).
CSA	PfEMP1 (DBL3 γ)	Schlüsselrezeptor bei maternaler Malaria (Fried and Duffy, 1996). Isolate aus Plazenta weisen überwiegend CSA-Bindung auf (Beeson et al., 1999). Periphere Isolate von Schwangeren binden nur zum Teil an CSA (Beeson et al., 1999). Berichte über CSA-abhängige Bindung an Endothelzellen von Lunge und Gehirn (Robert et al., 1995).
HA	?	Isolate aus Plazenta weisen häufig HA-Bindung auf (Beeson et al., 2000). Bedeutung noch unklar. HA-Bindung meist kombiniert mit CSA-Bindung.
Rosetting- Rezeptoren	Rosettine	Bindung zwischen nicht-infizierten und infizierten Erythrozyten ermöglicht Rosetting. Rosettine als mögliche Liganden. Assoziation mit schweren Verläufen berichtet (Carlson et al., 1990)
ELAM-1, VCAM-1		Geringe Bindung, Expression evtl. erhöht bei zerebraler Malaria (Turner et al., 1994). Expression durch Zytokine reguliert (Ockenhouse et al., 1991).
CD 31		Bedeutung als direkter Bindungspartner gering (Newbold et al., 1997).

1.4.5 CSA und HA – Rezeptoren in der Plazenta

Nachdem es gelang, spezifische Zytoadhärenzmechanismen bei *Plasmodium falciparum*-Infektionen zu identifizieren und auch molekular zu charakterisieren (siehe Seite 12), wurde in verschiedenen Studien nach spezifischen Rezeptoren in der Plazenta gefahndet.

Rogerson et al. konnten für Chondroitinsulfat A (CSA) Bindungseigenschaften in vitro mit infizierten Erythrozyten nachweisen (Rogerson et al., 1995). CSA ist ein Glykosaminoglykan (GAG), bestehend aus sich abwechselnd wiederholenden Glucuronsäureeinheiten und N-Acetyl-Galaktosaminen. Mit dieser Struktur weist es Verwandtschaft zu Heparansulfat und Heparin auf. Ebenso wie diese gut charakterisierten Glycosaminoglykane liegt CSA meist proteingebunden vor und lässt sich – allerdings in geringer Konzentration - im Blutplasma nachweisen (Volpi et al., 1995). Darüber hinaus kommt CSA auf der Zelloberfläche des Synzytiotrophoblasten der Plazenta und auf Endothelzellen der Lunge, dem Gehirn und der Nabelschnur vor (Robert et al., 1995; Silamut et al., 1999).

Die Bedeutung des CSA in der Pathogenese der Malaria wurde bald darauf entdeckt: Eine in vitro-Bindungsstudie in Kenia mit Parasiten aus schwangeren Frauen zeigte signifikante Bindung von aus der Plazenta gewonnenen infizierten Erythrozyten an CSA (Fried and Duffy, 1996). Parasiten aus nichtschwangeren Frauen oder Kindern wiesen diese Bindungseigenschaft nicht bzw. seltener auf (Beeson et al., 1999). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass die spezifische Bindung an CSA für die Sequestration der Parasiten in der Plazenta verantwortlich ist.

Die Annahme, dass es sich bei diesen Parasiten um eine Subpopulation mit eigenen antigenetischen Eigenschaften handelt, die sich von den Parasiten in nichtschwangeren Erwachsenen unterscheidet, wurde durch Agglutinationsversuche bestärkt: Sera semi-immuner Erwachsener weisen - als Zeichen zurückliegender Infektionen - die Fähigkeit auf, Parasitenisolate von infizierten Kindern zu agglutinieren. Jedoch können sie Parasitenisolate aus schwangeren Frauen nicht agglutinieren (Beeson et al., 1999). Sera aus Frauen, die mehrere Schwangerschaften durchgemacht haben, weisen diese Agglutinationseigenschaft gegenüber Parasitenisolaten aus Schwangeren hingegen auf. Auch konnte gezeigt werden, dass Sera schwangerer Frauen die Adhärenz an CSA in Abhängigkeit der Parität hemmen. Hierbei zeigen Sera von Erstgebärenden nur geringe inhibitorische Aktivität (Fried et al., 1998).

Die Spezifität der CSA-vermittelten Adhäsion konnte durch unterschiedliche Experimente nachgewiesen werden: So konnte durch Zugabe von löslichem CSA zu Plazentagewebe die Bindung infizierter Erythrozyten inhibiert werden (Gysin et al., 1999). Auch verhinderte die Behandlung mit CSA-spaltenden Enzymen Adhäsion an dieses Gewebe.

Die Beobachtung, dass Sera von Schwangeren aus unterschiedlichen Regionen die Bindung von infizierten Erythrozyten an CSA hemmen können (Fried et al., 1998), setzt eine konservierte CSA-spezifische Bindungsregion des Liganden voraus, die in genetisch unterschiedlichen Plasmodienpopulationen identisch sein muss. Der Nachweis dieser spezifischen Region gelang 1999 durch Expressionsversuche mit CHO-Zellen (Buffet et al., 1999).

Ein Jahr darauf entdeckten Beeson et al. in Hyaluronsäure (HA) einen weiteren Rezeptor in der Plazenta, der spezifische Bindungseigenschaften aufweist (Beeson et al., 2000). Es handelt sich dabei ebenfalls um ein Mitglied der GAG-Familie mit einem wesentlich größeren Molekulargewicht als CSA. Es besteht aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten (N-Acetyl-Glucosamin und Glucuronsäure) und unterscheidet sich von anderen Glycosaminoglykanen durch seine fehlende Sulfatierung. Es kann unter anderem auf der Oberfläche von Synzytiotrophoblasten nachgewiesen werden (Sunderland et al., 1985).

Seine Bedeutung ist noch weitgehend unklar. Die Beobachtung, dass die meisten CSA-bindenden Parasiten auch an HA binden und es kaum zur alleinigen Bindung an HA kommt, führten zur Annahme, dass HA an der Zytoadhärenz beteiligt ist, sie aber nicht allein vermitteln kann.

1.4.6 Der Ligand PfEMP1

Elektronenmikroskopische Studien ergaben, dass an der Zytoadhäsion sowohl Strukturen von Zelloberflächen der Gefäßwände als auch ein Parasitenantigen beteiligt sind. Dieses auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten lokalisierte Antigen ist mit sogenannten „knobs“ assoziiert: Eine knopfartige Vorwölbung der Erythrozytenmembran, die unter dem Elektronenmikroskop als elektronendichte Struktur imponiert. Diese „Knobs“ dienen als Anheftungsstellen infizierter Erythrozyten im vaskulären Bett (Luse and Miller, 1971). Beobachtungen von „Knobs“-negativer Zytoadhärenz legten allerdings die Vermutung nahe, dass die „Knobs“ zwar an dem Mechanismus der Zytoadhärenz beteiligt sind, jedoch nicht als direkter Ligand aufgefasst werden können (Biggs et al., 1990).

In an Malaria erkrankten Menschen zirkulieren die mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten (IE) nur während des ersten Teils ihres Zyklus', dem sogenannten Ringstadium. Etwa 14-18 Stunden nach Invasion der Merozoiten in die Erythrozyten erreichen die Plasmodien das pigmentierte Trophozoitenstadium, sie werden dann als sogenannte reife Trophozoiten bezeichnet (s.o.). Es konnte gezeigt werden, dass sich dieses Stadium durch die Expression eines großen, sehr variablen Antigens auf der Oberfläche des Erythrozyten auszeichnet. Dieses Protein wird als *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1* (PfEMP1) bezeichnet (Baruch et al., 1995; Leech et al., 1984).

Diese Entdeckung, dass reife Trophozoiten von *Plasmodium falciparum* Proteine wie das PfEMP1 produzieren und diese sich unter der Oberfläche der Erythrozyten im Bereich der „Knobs“ (siehe oben) anlagern, führten zur Identifikation des PfEMP1 als Ligand der Zytoadhärenz (Howard, 1988): Dieses 200 bis 350 kDa schwere Molekül zeigt sowohl eine hohe antigenetische Variabilität - welche es ermöglicht, die Immunantwort des Wirtes zu umgehen - als auch die oben erwähnten Adhäsionseigenschaften, die in zahlreichen Studien nachgewiesen wurden (Baruch et al., 1995; Smith et al., 1995)

Die durch PfEMP1 vermittelte Zytoadhärenz und Antigenvariabilität ermöglicht es den Plasmodien offenbar, eine chronische Infektion zu etablieren (Rogerson and Beeson, 1999). Wenngleich die komplexe Funktion des PfEMP1 bislang nicht vollständig verstanden wird, so ist die Expression des PfEMP1 assoziiert mit ernststen Organkomplikationen und daher als ein wichtiger Virulenzfaktor einer *Plasmodium falciparum*-Infektion anzusehen.

Es wird inzwischen angenommen, dass PfEMP1 das bedeutendste Oberflächenantigen darstellt, da es die Antigenstruktur einer Plasmodium-Population festlegt (Gilbert et al., 1998).

1.4.7 Die Familie der *var*-Gene

Das PfEMP1 ist ein Ziel der körpereigenen Immunabwehr (Bull et al., 1998). *Plasmodium falciparum* ist in der Lage, nach erneuter Erythrozyteninvasion spontan unterschiedliche PfEMP1-Moleküle zu exprimieren. Diese Fähigkeit zur antigenen Variabilität ermöglicht eine Umgehung der Wirtsantwort und somit eine persistierende Infektion. Auch die Änderung der Adhäsionseigenschaften innerhalb einer Parasitenlinie ist somit möglich. Man schätzt die Häufigkeit einer solchen antigenetischen Variation *in vitro* auf etwa 2% pro Generation (Roberts et al., 1992).

Die parasiteneigene Genfamilie (*var*-Gene), die das PfEMP-1 kodiert, besteht aus mindestens 50 Genen pro haploidem Genom und ist hoch variabel. Die Gene sind vor allem in den subtelomerischen Regionen der Chromosomen lokalisiert und bilden etwa 6% des gesamten Genoms von *Plasmodium falciparum*. Es wird angenommen, dass nur jeweils ein Gen aus dieser Gruppe auf der Oberfläche des jeweils infizierten Erythrozyten exprimiert wird und somit dieses Gen die Antigenitäts- und Adhäsionseigenschaften des Erythrozyten determiniert (Rowe et al., 1997). Alle *var*-Gene weisen eine ähnliche strukturelle Organisation auf: Die Gene dieser Familie bestehen aus je zwei Exons. Exon I kodiert für den extrazellulären, die Zytoadhärenz vermittelnden Teil des PfEMP1, während Exon II die Aminosäuresequenz für den intrazellulären Anteil liefert. Dieser konservierte intrazelluläre Anteil verankert das PfEMP1 mit den oben erwähnten elektronendichten „Knobs“ (Waller et al., 1999).

Exon I kodiert für zwei bis sieben Cystein-reiche, sogenannte Duffy binding-like (DBL) domains und eine „cysteine-rich interdomain region“ (CIDR) (Su et al., 1995). Es konnten fünf unterschiedliche Klassen von DBL-Domänen und drei Klassen von CIDR-Domänen auf dem PfEMP1 klassifiziert werden (Smith et al., 2000).

1998 gelang die Identifikation und Isolation eines *var*-Genes, welches für ein spezifisches, ausschließlich CSA-bindendes PfEMP1 kodiert: Es konnte gezeigt werden, dass nur eine DBL-Domäne (DBL- γ) die Adhärenz an CSA vermittelt (Buffet et al., 1999). Auch wurde klar, dass die Adhärenz an andere Rezeptoren wie CD36 und ICAM-1 durch andere Domänen vermittelt wird (siehe Abbildung 2b). Die genauen Regulationsmechanismen der *var*-Gen-Expression sind nicht bekannt. Jedoch ließen sich durch die oben erwähnte Zuweisung von PfEMP1-Domänen zu spezifischen Rezeptoren die beobachtete Adhärenz an mehr als einen Rezeptor bei nur einem exprimiertem PfEMP1 ebenso erklären wie sich ausschließende Adhärenzphänotypen. So ist es bisher nicht gelungen, ein PfEMP1 zu identifizieren, welches gleichermaßen Bindung zu CSA und CD36 vermittelt (Gamain et al., 2001).

Die Entdeckung der CSA-bindenden Domäne DBL- γ drei Jahre nach den Bindungsstudien in Kenia machte es möglich, das Erklärungsmodell von Fried et al. bezüglich maternaler Malaria auf molekularer Ebene zu erweitern: Wie oben erwähnt, sind Schwangere aus holoendemischen Gebieten bis zum Eintritt in ihre erste Schwangerschaft selten von schweren Infektionen betroffen. Man nimmt an, dass sie durch permanente Infektionen im Laufe der Kindheit und Jugend ein Repertoire an Anti-PfEMP1-Antikörpern (sog. „variant-specific antibodies“) ausgebildet haben, jedoch keine Antikörper gegen den oben beschriebenen spezifisch CSA-bindenden PfEMP1-Genotyp besitzen. Die Schwangerschaft eröffnet nun dem Parasiten eine neue Nische, in die er sich durch „Switch“ auf den CSA-Genotyp zurückziehen kann. Dieser Wechsel in der Genexpression des PfEMP1, der den Parasiten die Sequestration in der Plazenta erlaubt, wird inzwischen als molekularer Schlüsselmechanismus der Infektion in der Schwangerschaft angesehen. Die genauen Mechanismen, die zu diesem „Switch“ führen, sind bisher nicht bekannt.

Abbildung 2: Var-Gene und PfEMP1

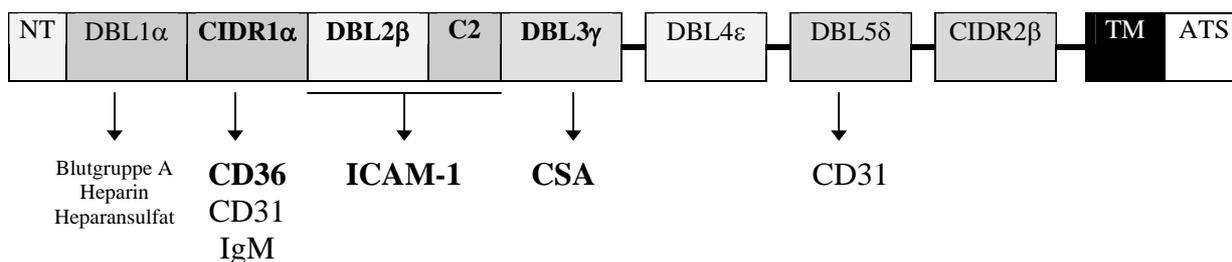
a) Strukturellen Organisation der *var*-Gene. *SL* Silencer, Größe in kb.

b) Strukturelle Organisation des PfEMP1. Darstellung der Domänen sowie ihrer Bindungspartner. *DBL* Duffy binding-like domain, *CIDR* Cysteine rich inter-domain region, *TM* Hydrophobes Transmembransegment, *NT* N-terminales Segment, *ATS* Acidic Terminal Sequence.

a)



b)



1.4.8 Die Ring-Sequestrations-Theorie

Die Bindungsstudien aus Kenia sowie eine Studie aus Malawi (Beeson et al., 1999) zeigten unterschiedliches Bindungsverhalten zwischen Isolaten aus dem Peripherblut der Schwangeren und solchen aus dem Plazentablut. So wird den Isolaten aus dem Plazentablut eine vorwiegende Bindung an CSA bei mangelnder oder fehlender CD36-Bindung zugeschrieben, während die Isolate aus dem Peripherblut vorwiegend an CD36 und nur teilweise oder gar nicht an CSA binden.

Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass es sich bei den Isolaten der Plazenta um eine Subpopulation handeln muss, die durch ihren CSA-bindenden Phänotyp in der Lage ist, sich dem peripheren Blut zu entziehen und so eine chronische Infektion zu etablieren. Da die PfEMP1-Expression und somit die Bindung an CSA erst im Stadium reifer Trophoziten stattfindet, wurde nach CSA-unabhängigen Mechanismen gefahndet, die es den Ringstadien der Plazenta-Isolate ermöglicht, sich der peripheren Zirkulation zu entziehen. Dieser Mechanismus könnte den beobachteten Unterschied der Bindungseigenschaften zwischen Isolaten aus dem Peripherblut und dem Plazentablut erklären.

Im Jahr 2000 gelang es Pouvelle et al., einen solchen CSA-unabhängigen Bindungsmechanismus zu charakterisieren: Es konnte gezeigt werden, dass bereits vier Stunden nach Merozoiten-Invasion infizierte Erythrozyten in der Lage sind, auf der Oberfläche von Synzytiotrophoblasten zu binden und nach Erreichen des reifen Trophozitenstadiums einen exklusiv CSA-bindenden Genotyp auszubilden. Rezeptoren, die diese Bindung vermitteln, sind bislang nicht identifiziert worden. Jedoch wird angenommen, dass es sich bei zwei neu entdeckten Proteinen auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten im Ringstadium, den sog. „Ring-Surface-Proteins“ RSP1 und RSP2, um die Liganden dieses Zytoadhärenzmechanismus' handelt.

Diese Beobachtung, dass spezifische Bindung an Plazentagewebe über die gesamte Dauer des asexuellen Zyklus möglich ist und nicht allein von der PfEMP1-Expression abhängt, führte zur vorläufigen Bestätigung der Annahme, dass eine nicht-zirkulierende, sogenannte „kryptische“ Subpopulation in der Plazenta infizierter Schwangeren vorliegen muss.

1.5 Transplazentare Infektion und konnatale Malaria

In hyperendemischen Gebieten scheint die konnatale Infektion mit *Plasmodium falciparum* ein seltenes Ereignis zu sein. Trotz hoher Prävalenz maternaler Malaria in diesen Regionen sind nur Einzelfälle von konnataler Malaria mit klinischen Symptomen wie Fieber, Lethargie und Nahrungsverweigerung beschrieben worden (McGregor et al., 1983). Die Symptome einer Malaria können mit einer Latenzzeit von bis zu zwei Monaten auftreten, wobei in vielen Fällen nicht sicher zwischen konnataler Infektion und postnataler Neuinfektion unterschieden werden kann. Hauptsächlich betroffen von konnataler Malaria scheinen Kinder nicht-immuner Schwangerer aus nichtendemischen Gebieten zu sein.

Dennoch scheint die transplazentare Infektion mit *Plasmodium falciparum*, feststellbar durch den Nachweis von Parasiten im Nabelschnurblut von Neugeborenen, auch in hyperendemischen Gebieten häufiger aufzutreten als bisher angenommen (Fischer, 1997).

In der bisher größten Studie zur Prävalenz einer transplazentaren Infektion wurden 2080 Schwangere in Malawi untersucht. (Redd et al., 1996). Die Prävalenz einer maternalen Infektion betrug 19%. In 36% dieser Fälle konnte *Plasmodium falciparum* im Nabelschnurblut der Neugeborenen mikroskopisch nachgewiesen werden. Die klinische Bedeutung dieser Beobachtung ist noch weitgehend unklar, da sich daraus nur in seltenen Fällen eine konnatale Malaria entwickelte. Jedoch scheinen Hyperparasitämie der Mutter, Frühgeburt und männliches Geschlecht der Neugeborenen mit einer Nabelschnur-Parasitämie assoziiert zu sein.

Die mikroskopischen Beobachtungen wurden durch auf PCR basierenden Nachweismethoden weitgehend bestätigt (Tobian et al., 2000). Durch die offenbar höhere Sensitivität der PCR-Methode im Vergleich zur mikroskopischen Untersuchung konnte eine Nabelschnurparasitämie bei infizierten Schwangeren von bis zu 44% beschrieben werden (Kassberger et al., 2002).

Bisher wenig verstanden wird der pathogenetische Mechanismus einer transplazentaren Infektion, da die Plazentaschranke den Durchtritt aller zellulären Erreger im Mutterblut, die nicht über spezifische Invasionsmechanismen verfügen, zu verhindern scheint. Jedoch ist der Übertritt zellulärer Blutbestandteile beschrieben worden (Lo et al., 1996). Welche Mechanismen den Übertritt zellulärer Bestandteile ermöglichen, ist bisher unklar. Diskutiert wird eine Schädigung des Trophoblastengewebes infolge chronischer Entzündungsreaktionen. Ob die oben beschriebenen Zytoadhärenzeigenschaften infizierter Erythrozyten mit diesem Phänomen assoziiert sind, ist bisher nicht untersucht worden.

1.6 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Zytoadhärenzverhalten von mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten an die Rezeptoren CSA und HA. Diese auf der Synzytiotrophoblastenoberfläche vorkommenden Rezeptoren werden für die Sequestration infizierter Erythrozyten in der Plazenta verantwortlich gemacht und scheinen somit eine Schlüsselrolle in der Pathogenese maternaler Malaria zu spielen.

Der Vergleich des Bindungsverhaltens der Isolate an diesen Rezeptoren soll zur Klärung der Bedeutung von HA an der Pathogenese der maternalen Malaria beitragen. Die Identifikation eines ausschließlich an HA bindenden Phänotyps würde hierbei für einen CSA-unabhängigen Bindungsmechanismus sprechen.

Durch den Vergleich der Bindungseigenschaften von Isolaten aus Peripherblut und Plazentablut soll untersucht werden, ob der Zytoadhärenzmechanismus es den CSA- bzw. HA-bindenden Parasiten ermöglicht, eine sog. „kryptische“ Subpopulation in der Plazenta zu etablieren und sich so der peripheren Zirkulation und damit der Immunantwort zu entziehen.

Hinweis auf diese Fähigkeit wäre ein signifikanter Unterschied im Bindungsverhalten der Isolate. Desweiteren soll untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Adhärenzphänomen und dem Auftreten transplazentarer Infektionen gibt.

2 Patienten und Methoden

2.1 Studienaufbau

2.1.1 Hintergrund

Das Probenmaterial wurde aus Frauen und deren Neugeborenen gewonnen, bei denen zum Zeitpunkt der Entbindung *Plasmodium falciparum* im Blut nachgewiesen werden konnte.

In dieser Studie sollten Häufigkeit und Spezifität der Bindung infizierter Erythrozyten an die Rezeptoren CSA und HA untersucht werden. Dabei sollte das Bindungsverhalten infizierter Erythrozyten aus dem Plazentablut mit infizierten Erythrozyten aus dem peripheren Blut verglichen werden.

Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der internationalen Stiftung des Albert-Schweitzer-Krankenhauses sowie der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen gebilligt.

2.1.2 Studienort

Die Studie wurde zwischen Oktober 2000 und April 2001 im Albert-Schweitzer-Krankenhaus in Lambaréné in Gabun durchgeführt. Gabun gehört geographisch zu Zentralafrika.

Gabun grenzt im Norden an Äquatorialguinea und Kamerun, im Osten und Süden an die Republik Kongo (Abbildung 3). Lambaréné ist ein regionales Zentrum mit etwa 20 000 Einwohnern in der Provinz Moyen-Ogouée, 180 km südöstlich der Hauptstadt Libreville.

Etwa 75% des Landes sind mit tropischem Regenwald bedeckt, stellenweise kommen Feuchtsavannen vor. Die natürliche Vegetation ist teilweise durch landwirtschaftliche Nutzflächen ersetzt worden.

Es herrscht tropisches Klima mit jährlich gleichbleibend hohen Temperaturen um 27° C und sehr hoher Luftfeuchtigkeit. Die Niederschlagsmengen verteilen sich auf zwei Regenzeiten und bewegen sich zwischen 1600 und 3000 mm pro Jahr.

Das Albert-Schweitzer-Krankenhaus liegt einige Kilometer außerhalb Lambarénés auf der gegenüberliegenden Seite des Ogouée-Flusses. Das Krankenhaus umfasst etwa 150 Betten mit den Abteilungen Chirurgie, Gynäkologie mit Geburtsstation, Innere Medizin, Pädiatrie und Zahnklinik. Ebenfalls befindet sich auf dem Hospitalsgelände das Forschungslabor sowie Unterkünfte der Bediensteten. Seit 1996 besteht eine enge Kooperation des Forschungslabors mit dem Institut für Tropenmedizin in Tübingen.

In Lambaréné und Umgebung wird Malaria entsprechend einem hyperendemischen Gebiet ganzjährig übertragen. Dabei werden etwa 90% der Malariafälle durch *Plasmodium falciparum* verursacht, die restlichen durch *Plasmodium malariae* und *Plasmodium ovale*. Die Transmission unterliegt saisonalen und regionalen Schwankungen, mit den höchsten Raten in den Regenzeiten im Herbst und Frühjahr (Wildling et al., 1995).

In der Geburtsstation des Krankenhauses werden jährlich etwa 700 Entbindungen vorgenommen. Dabei lassen sich zum Zeitpunkt der Geburt bei etwa 20% der Mütter *Plasmodium falciparum* mikroskopisch im Blut nachweisen (Luty, persönliche Mitteilung).

Abbildung 3: Karte von Gabun



2.1.3 Studiengruppe

Im Zeitraum zwischen Oktober 2000 und April 2001 wurden bei 227 Patientinnen, die sich auf der Entbindungsstation des Albert-Schweitzer-Krankenhauses einfanden, eine mikroskopische Malariadiagnostik durchgeführt.

Einschlusskriterien zur Durchführung der Bindungs-Assays waren der Nachweis von *Plasmodium falciparum*, eine Parasitämie $> 1000/\mu\text{l}$ sowie die schriftliche Einverständniserklärung der Patientin (bei Minderjährigen zusätzlich Einverständniserklärung eines Erziehungsberechtigten).

Als Kontrollgruppe wurden 15 nichtschwangere Malariapatienten in die Studie aufgenommen. Einschlusskriterien waren eine Parasitämie $>1000/\mu\text{l}$, keine vorherige Gabe von wirksamen Malariamedikamenten sowie die Einwilligung eines Erziehungsberechtigten.

2.2 Durchführung der Studie

2.1.2 Schematischer Ablauf

Folgende Arbeitsschritte wurden vor und nach der Entbindung durchgeführt (rechts ist der zeitliche Verlauf in Stunden angegeben, Zeitpunkt der Geburt 0 h):

- Aufklärung und Einverständnis, Anamnese und klinische Untersuchung
 - Probenentnahme
 - Aufbereitung der Proben, mikroskopische Malariadiagnostik. Dokumentation der Patientendaten
 - Durchführung der Bindungs-Assays mit Erythrozyten aus der Plazenta
 - Kultivierung der peripheren Erythrozyten, Kontrolle der Parasitenstadien
 - Durchführung der Bindungs-Assays mit Erythrozyten aus dem peripheren Blut
 - Auszählung der Bindungs-Assays
- 
- 0 h
- 0.5 h
- 1-3 h
- 1-36 h
- 12-36 h

2.1.3 Probenentnahme

Unmittelbar nach der Geburt wurde aus folgenden Kompartimenten Blut in Heparin-behandelte Röhrchen (15 I.U. Lithium-Heparin-S-Monovette[®], Sarstedt) entnommen:

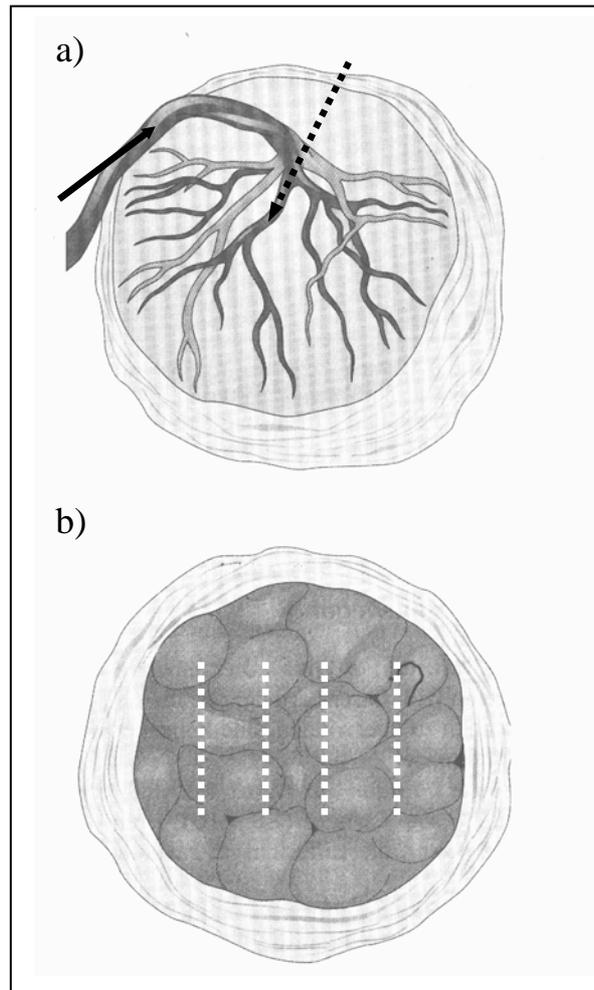
- a) Peripheres Blut aus einer Armvene der Mutter
- b) Blut aus der mütterlichen Seite der Plazenta
- c) Nabelschnurblut (Vena umbilicalis)

Zur Abnahme des Peripherblutes wurden die üblichen Techniken zur Punktion peripherer Venen angewandt (Drews, 1998). Zur Blutentnahme aus der Vena umbilicalis wurde die Nabelschnur etwa 5-10 cm über dem Abgang mit 70% Ethanol gereinigt. Anschließend wurde in die Vena umbilicalis in einem Winkel von etwa 30° eingestochen. War eine Blutentnahme an dieser Stelle aufgrund der einsetzenden Gerinnung nicht mehr möglich, wurde versucht, Blut aus den zuführenden Gefäßen auf der fetalen Plazentaoberfläche zu gewinnen.

Zur Blutentnahme aus der Plazenta wurde mit einem sterilen Skalpell die Dezidua auf der mütterlichen Seite aufgetrennt und die Plazenta durch mehrere, etwa 0,5 cm tiefe, parallele Schnitte zur Blutung angeregt. Durch leichte Kompression wurde das Blut aus der Plazenta gedrückt. Das abtropfende Blut wurde in einer mit Heparin vorbehandelten Petrischale (Ø 15 cm, Greiner) gesammelt.

Abbildung 4: Blutentnahme an Plazenta und Nabelschnur

- a) Plazenta (fetale Seite) mit Einstichstelle in die V. umbilicalis (Pfeil) und in ihre zuführenden Gefäße auf der Plazentaoberfläche (gestrichelter Pfeil).
b) Plazenta (maternale Seite) mit Schnittführung (gestrichelte Linien).



2.2.3 Diagnose

Für die Diagnose der Malaria tropica sowie die quantitative Bestimmung der Parasiten wurde Blut aus allen drei obengenannten Kompartimenten im „Dicken Tropfen“ (Kremsner et al., 1988) mikroskopisch untersucht. Dazu wurde 10 µl Heparin-Vollblut auf ein 10x18 mm großes Feld eines Objektträgers gleichmäßig ausgebracht. Zum Trocknen wurde der Objektträger in den Trockenschrank gelegt. Anschließend wurde der Dicke Tropfen über 20 Minuten in Giemsa-Lösung gefärbt. Die Giemsa-Lösung wurde alle vier Stunden neu aus einer konzentrierten Stocklösung und Titrisolphosphatpuffer (pH 7,2) im Verhältnis 1:5 hergestellt und durch Papier filtriert. Nach der Färbung wurde der Objektträger vorsichtig in Wasser gespült und erneut getrocknet. Unter Ölimmersion wurden bei 1000-facher Vergrößerung je 100 Gesichtsfelder durchgemustert. Die Anzahl der Parasiten auf 100 Gesichtsfeldern wurde mit dem für das Mikroskop spezifischen Umrechnungsfaktor (6) multipliziert und so die Parasitämie pro Mikroliter errechnet. Die Detektionsschwelle dieser Methode liegt bei etwa fünf Parasiten pro Mikroliter.

Zur Stadienbestimmung der Parasiten sowie zur Parasitämiebestimmung in Prozent (prozentualer Anteil der infizierten Erythrozyten an der Gesamterythrozytenzahl) wurde zusätzlich ein Ausstrich angefertigt. Dazu wurden etwa 1-2 µl Vollblut oder Erythrozyten auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem zweiten Objektträger ausgestrichen. Danach wurde das Präparat für 30 Sekunden in Methanol fixiert, getrocknet und anschließend für 30 Minuten in Giemsa-Lösung (siehe oben) gefärbt. Unter 1000-facher Vergrößerung wurde durch Auszählung von 2000 Erythrozyten der prozentuale Anteil infizierter Erythrozyten bestimmt.

2.2.4 Verarbeitung und Kultivierung der Parasiten

Das Blut wurde 10 Minuten bei 560g zentrifugiert. Die Erythrozyten wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die mononukleären Zellen mittels Ficoll-Zentrifugation entfernt. Dazu wurde auf die Erythrozyten 6 ml Ficoll (Gibco BRL) sowie 6 ml Phosphate-buffered Saline (PBS) gegeben und 15 Minuten bei 560g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Erythrozyten erneut zweifach in PBS gewaschen. Die so aufbereiteten Erythrozyten wurden nun zur Kultivierung (Peripherblut) oder zu den Bindungs-Assays verwendet.

Zur Kultivierung wurden 1 ml der Erythrozyten in 20 ml RPMI Medium (Gibco BRL) gegeben, das mit 50 µg/ml Hypoxanthin, 2 mM HEPES (N-2-Hydroethylpiperazine-N'-2-Ethan-Sulfonsäure), NaHCO₃, Glutamax, 5% Albumax II, 2% humanem AB-Serum sowie 2,5 µg/ml Gentamicin angereichert worden war. Die Kultur wurde in Petrischalen (Ø 10 cm, Falcon 1005) bei 37° C in einer durch handelsübliche Kerzen erzeugten Atmosphäre (1% O₂, 4% CO₂, 95% N₂) inkubiert und alle vier Stunden mittels Ausstrich kontrolliert. Der Reifegrad einer Kultur wurde durch Auszählung von bis zu 100 Parasiten bestimmt. Bei einem pH von 7,36 und einem Hämatokrit von 5% lag die Kultivierungszeit, abhängig vom Reifegrad der Parasiten, zwischen 12 und 36 Stunden.

2.2.5 Die Bindungs-Assays

2.2.5.1 Schematischer Aufbau

In den statischen Bindungs-Assays wurden die qualitativen und quantitativen Bindungseigenschaften von infizierten Erythrozyten *in vitro* untersucht.

Dazu wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Inkubation der Petrischalen mit den Rezeptoren, Waschschrift
- Blocken der Bindungsstellen mit BSA (Bovine Serum Albumin)
- Inkubation der Petrischalen mit Patienten-Erythrozyten
- Entfernen der nichtgebundenen Erythrozyten durch Waschschriffe.
- Fixierung der gebundenen Erythrozyten mit Glutaraldehyd.
- Färbung mit Giemsa.
- Mikroskopische Untersuchung der Petrischalen.

Die einzelnen Schritte werden im folgenden beschrieben.

2.2.5.2 Vorbereitung

Auf der Rückseite einer Petrischale (\varnothing 6 cm, Falcon 1061) wurden mit einem nicht wasserlöslichen Stift pro Rezeptorlösung je 2 Versuchsfelder von etwa 1 cm Durchmesser eingekreist. Folgende Rezeptoren wurden verwendet: CSA, HA, sowie als Negativkontrollen Heparin, Heparansulfat und Chondroitinsulfat B (CSB) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

Die Rezeptoren wurden zu je 10 μ l in einer Konzentration von 100 μ g/ml (CSA, HA, Heparin, Heparansulfat und CSB) auf die jeweiligen Versuchsfelder aufgetragen und bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde zur Blockierung der Bindungsstellen 4 ml 1% Bovine Serum Albumin (BSA) - PBS (mit 0,05% Natriumazid und 27 μ g/ml Gentamicin angereichert) in die Petrischalen gegeben. Bei einer Temperatur von 4° C konnten die Platten vier Tage lang zur Verwendung gelagert werden.

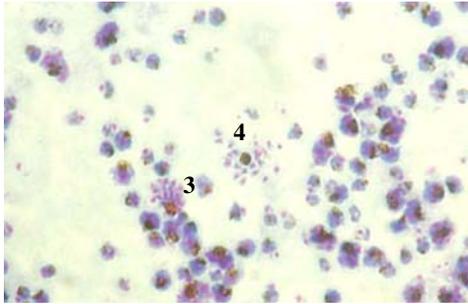
2.2.5.3 Durchführung

Die aus der Plazenta gewonnenen Parasiten wurden - da überwiegend im späten Trophozoiten- und Schizontenstadium befindlich - unmittelbar nach den oben beschriebenen Wasch- und Trennschritten (siehe 2.2.4) für die Bindungs-Assays verwendet. Die aus dem Peripherblut gewonnenen Parasiten hingegen wurden zuvor bis zum Erreichen des späten Trophozoitenstadiums wie oben beschrieben kultiviert.

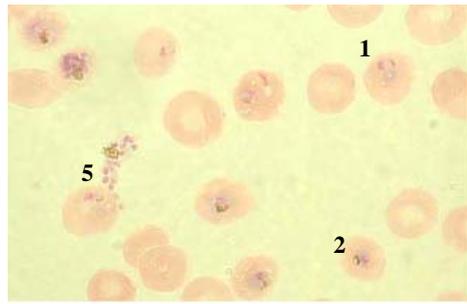
Zur Durchführung der Bindungs-Assays wurden die Erythrozyten mit natriumkarbonatfreiem, glukosehaltigem RPMI Medium (Biochrom KG, Berlin) auf einen Hämatokrit von 5% verdünnt. Nun wurden 2 ml dieser Suspension vorsichtig in die vorbereitete Petrischale gegeben und für 60 Minuten bei 37° C und einem pH von 6,9 inkubiert. Im Abstand von 10 Minuten wurden die abgesunkenen Erythrozyten durch leichte Schüttelbewegungen suspendiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die abgesunkenen Erythrozyten durch vorsichtige Zugabe von 2 ml RPMI Medium unter leichten, standardisierten Schwenkbewegungen abgewaschen. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Zur Fixierung wurde nun für 30 Minuten 2 ml 2%ige Glutaraldehydlösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die fixierten Zellen schließlich mit 2 ml gefilterter Giemsa-Lösung angefärbt (60 Minuten). Farbrückstände wurden mit destilliertem Wasser entfernt.

Abbildung 5: Darstellung ausgewählter Diagnostik- und Arbeitsschritte
Plasmodium falciparum, Stadien: Ringform (1), reifer Trophozoit (2), Schizont (3),
rupturierender Schizont (4)

a. Dicker Tropfen Plazentablut
Vergrößerung 100-fach



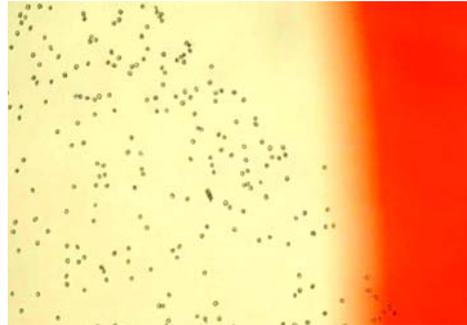
b. Ausstrich Plazentablut
Vergrößerung 100-fach



c. Petrischale Ansicht



d. Petrischale, 10-fache Vergrößerung
Grenzfläche zwischen CSA-Feld und nicht-
inkubierter Umgebung.



2.2.5.4 Auswertung

Unter 10-facher Vergrößerung wurden nun pro Rezeptorfeld acht Felder à 1 mm² ausgezählt und die durchschnittliche Anzahl fixierter Erythrozyten pro mm² bestimmt. Davon wurde die durchschnittliche Anzahl der Erythrozyten, die unmittelbar außerhalb der Rezeptorfelder gebunden hatten, abgezogen. Die so erhaltenen Werte wurden als Rohwerte bezeichnet. Das Bindungsniveau wurde für eine Standardparasitämie ermittelt (100000/µl). Dazu wurde die Parasitämie des jeweiligen Isolates durch 100000 geteilt, dieser Wert als Bindungsfaktor bezeichnet und der Rohwert damit multipliziert.

2.2.6 PCR-gestützte Diagnose einer Nabelschnurblutinfektion

Das unmittelbar nach der Geburt entnommene Nabelschnurblut wurde, wie oben beschrieben, in seine Bestandteile aufgetrennt. Anschließend wurden die Erythrozyten zu je 100 µl eingefroren und bei – 80° C für die spätere Verwendung gelagert.

Zur DNS-Extraktion wurde ein im Fachhandel erhältliches Set verwendet (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Quiagen). Die einzelnen Arbeitsschritte wurden gemäß Herstellerinformation durchgeführt.

Zur Durchführung der PCR wurde DNS verwendet, die aus 2-5 µl der verwendeten Erythrozyten gewonnen wurde. Für den Nachweis Plasmodium-spezifischer DNS wurden gut etablierte, in der Literatur beschriebene *single*- und *nested* PCR-Prozeduren angewendet (Contamin et al., 1995; Ntoumi et al., 1995). Dabei wurden Sequenzen von Genen amplifiziert, die für die Oberflächenantigene MSP-1 und MSP-2 von *Plasmodium falciparum* kodieren. MSP-1-kodierende DNS wurde in einem ersten Arbeitsschritt mittels den Primern T5 und T6 amplifiziert. Da die so isolierte DNS Polymorphismen aufweist, wurde zum sensitiveren Nachweis in einem zweiten Arbeitsschritt die so gewonnene DNS auf das Vorhandensein der Allele K1, MAD20 und RO33 untersucht (*nested* PCR). Zum Nachweis MSP-2-kodierender DNS wurden, analog zum Vorgehen bei MSP-1, zuerst mittels den Primern 1 und 4 eine Region des MSP-2-Genes amplifiziert, in der dann in einer zweiten PCR die Allele FC27 und 3D7 nachgewiesen wurden. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass durch den Nachweis verschiedener Allele unterschiedliche Parasitenfamilien erfasst werden und so die Sensitivität als sehr hoch anzusehen ist.

Die so amplifizierte DNS wurde auf mit Ethidiumbromid gefärbtes, 1,5%igen Agarose-Gel (SeaKem, Sigma) aufgebracht und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die Auswertung der Gelplatten wurde unter ultraviolettem Licht vorgenommen. Ein Vorhandensein spezifischer DNS wurde angenommen, wenn mindestens eine Allelfamilie pro Isolat nachgewiesen werden konnte und die Bandenlänge mit der erwarteten, Allel-spezifischen Bandenlänge der verwendeten Positivkontrolle übereinstimmte. Als Positivkontrolle wurde DNS der Parasitenfamilien K1, 7G8, HB3, 3D7 und FC27 verwendet.

2.2.7 Behandlung der Patienten

Patientinnen mit nachgewiesener *Plasmodium falciparum*-Infektion ohne klinische Symptome wurden im Wochenbett überwacht und ggf. behandelt. Patientinnen mit milder Malaria wurden oral mit Chinin über sieben Tage behandelt (3 x 500 mg pro Tag). Patientinnen mit schwerer Malaria wurden stationär behandelt. Sie erhielten zunächst 710 mg Chininhydrochlorid pro kg Körpergewicht i.v. über 30 Minuten. Anschließend wurde eine zweite Infusion Chininhydrochlorid mit 10 mg/kg über 4 Stunden verabreicht. Als Erhaltungsdosis wurden 10 mg/kg alle 8 Stunden gegeben.

2.2.7 Statistische Auswertung

Die Datenerhebung erfolgte handschriftlich auf vorbereitete Studiendatenblätter. Nach Abschluss der Probenverarbeitung wurden die so ergänzten Daten in eine FileMaker-Datenbank (FileMaker Inc., USA) aufgenommen. Die statistische Auswertung wurde in JMP 4.0 (SAS Institute Inc., USA) vorgenommen.

Für normalverteilte Daten wurde der t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Bei Daten, die keine Normalverteilung aufwiesen, kam als nicht-parametrisches Testverfahren der Mann-Whitney U Test zur Anwendung. Zur Auswertung dichotomer Merkmale zwischen und innerhalb von Gruppen wurden je nach Stichprobenumfang der Chi²-Test bzw. der Fishers Exact Test verwendet. Eine Signifikanz wurde bei allen Tests bei einem $P < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Im Zeitraum von Oktober 2000 bis April 2001 wurden 227 schwangere Frauen in die Studie aufgenommen. Bei 45 (20%) Frauen lag eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* vor, in einem Fall wurde eine Nabelschnurinfektion mikroskopisch gesichert. Davon konnten 28 Isolate aus dem Plazentablut und 21 Isolate aus dem Peripherblut der Mutter auf ihr Bindungsverhalten getestet werden. Einschlusskriterium hierbei war eine Parasitämie $>1000/\mu\text{l}$. Der Analyse des Bindungsverhaltens (ab Kapitel 3.2) wurden allgemeine Betrachtungen zu Alter, Parität, Geburtsgewicht, Parasitämie und hämatologischen Parametern vorangestellt (Kapitel 3.1). Hierbei wurden die Daten aller aufgenommenen Frauen ($n = 227$) verwendet.

3.1.1 Altersverteilung

Das Durchschnittsalter der 227 Frauen lag bei 23,8 Jahren. Das Durchschnittsalter in der Gruppe der Infizierten betrug 22,2 Jahre und unterscheidet sich signifikant ($P = 0,018$) vom Alter der Nichtinfizierten (24,2 Jahre, siehe Tabelle 2).

3.1.2 Entbindungen

Unter den 227 Frauen befanden sich 84 Erstgebärende, 40 Zweitgebärende und 103 Dritt- und Mehrgebärende. In der Gruppe der Infizierten war der prozentuale Anteil der Erst- und Zweitgebärenden höher als in der Gruppe der Nichtinfizierten, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant (siehe Tabelle 2).

Betrachtet man die Anzahl der Infektionen bezüglich der Parität (Erstgebärende, Zweitgebärende, Mehrgebärende), so wies die Gruppe der Zweitgebärenden mit 27,5% die höchste Infektionsrate auf, gefolgt von der Gruppe der Erstgebärenden mit 22,6%. In der Gruppe der Mehrgebärenden fanden sich mit 14,6% deutlich weniger Infektionen ($P = 0,067$, siehe Abbildung 6).

3.1.3 Geburten, Geburtsgewicht, Geburtslänge

Insgesamt 234 Kinder wurden von den Frauen zur Welt gebracht, es gab sieben Zwillingsgeburten. In 15 Fällen wurde durch Kaiserschnitt entbunden. Drei Kinder verstarben während oder unmittelbar nach der Geburt. Alle drei Fälle waren mit maternaler Malaria assoziiert: In einem Fall (Nr. 233) konnte *Plasmodium falciparum* sowohl im mütterlichen Blut als auch im Nabelschnurblut nachgewiesen werden. Im zweiten Fall (Nr. 179) wurden Parasiten in der Plazenta nachgewiesen. Die Mutter des dritten Kindes (Nr. 271) wurde einen Monat vor der Geburt wegen Malaria ambulant mit Chinin behandelt.

Abbildung 6: Anzahl der Infektionen nach Parität

Anzahl der Infektionen schwarz markiert, Vergleich der Erst- und Zweitgebärenden mit der Gruppe der Mehrgebärenden: P 0,067 (Chi²-Test).

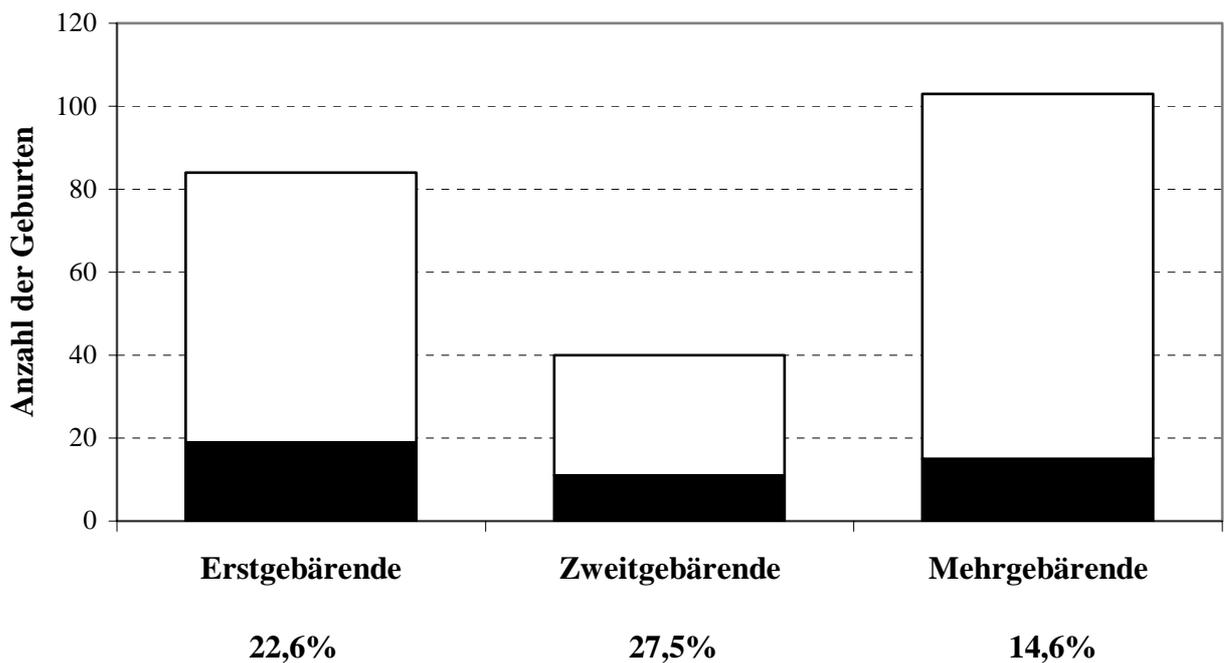


Tabelle 2: Übersicht Patientenkollektiv

Arithmetischer Mittelwert für Alter und Geburtsgewicht, angegeben ist jeweilige Standardabweichung \pm SD, Prozentwerte (%) beziehen sich auf die jeweilige Spalte. GG = Geburtsgewicht, SS = Schwangerschaft.

* Mann-Whitney U Test für Alter, Entbindungen, t-Test für Geburtsgewicht und Geburtslänge, Chi²-Test für Entbindungen und Geburtsgewicht, NS = nicht signifikant.

	Gesamt	<i>P. falc. positiv</i>	P*	<i>P. falc. negativ</i>
Anzahl Geburten	227	45		182
Alter in Jahren	23,8 \pm 6,4	22,2 \pm 7,0	0,0175	24,2 \pm 6,3
Entbindungen	227 (100)	45 (100)	NS	182 (100)
Erstgebärende	84 (37)	19 (42)		65 (36)
Zweitgebärende	40 (18)	11 (24)		29 (16)
Mehrgebärende	103 (45)	15 (34)		88 (48)
Geburtsgewicht in g	2955 \pm 577	2755 \pm 691	0,009	3006 \pm 535
GG nach Parität in g				
Erstgebärende	2765 \pm 560	2524 \pm 753	0,031	2842 \pm 467
Zweitgebärende	2945 \pm 601	2741 \pm 610	0,190	3020 \pm 591
Mehrgebärende	3106 \pm 577	3057 \pm 578	0,710	3114 \pm 537
Geburtslänge in cm	49,4 \pm 0,2	48,4 \pm 0,4	0,004	49,6 \pm 0,2
Geburtsgewicht			NS	
> 2500g	191 (81,6)	31 (68,9)		157 (83,1)
< 2500g	40 (17,1)	12 (26,7)		31 (16,4)
< 1500g	3 (1,3)	2 (4,4)		1 (0,5)
<i>P. falc. Infektion</i>				
während SS	41 (18)	19 (42)		22 (13)
(dokumentiert)				

Das durchschnittliche Geburtsgewicht der Neugeborenen ($n = 234$) lag bei 2955 g. In der Gruppe der Infizierten betrug das durchschnittliche Geburtsgewicht 2755 g und unterscheidet sich damit signifikant vom Geburtsgewicht in der Gruppe der Nichtinfizierten (3006 g, $P = 0,009$). Die Differenz der Mittelwerte lag somit bei 251 g.

Eine genauere Betrachtung unter Berücksichtigung der Parität ergab signifikante Unterschiede im Geburtsgewicht in der Gruppe der Erstgebärenden. In den Gruppen der Zweit- und Mehrgebärenden ist dieser Unterschied nicht mehr signifikant.

Eine gängige Einteilung nach dem Geburtsgewicht unterscheidet Neugeborene unabhängig vom Gestationsalter in Normalgewichtige (Geburtsgewicht > 2500 g), LBW-Infants (*low birth weight*, Geburtsgewicht < 2500 g) und VLBW-Infants (*very low birth weight*, Geburtsgewicht < 1500 g). In 191 von 234 Fällen lag das Geburtsgewicht über 2500g. 40 fielen in die Gruppe der LBW, lediglich drei in die Gruppe der VLBW. Der prozentuale Anteil der LBW/VLBW-Infants in der Gruppe der Infizierten betrug 31,2% und unterscheidet sich damit deutlich von dem Anteil in der Gruppe der Nichtinfizierten (17%, OR 2,2, 95%-Konfidenzintervall 1,05-4,60, siehe Tabelle 2).

Die durchschnittliche Geburtslänge der Neugeborenen lag bei 49,4 cm. In der Gruppe der Infizierten betrug die durchschnittliche Länge 48,4 cm und unterscheidet sich signifikant von der Länge in der Gruppe der Nichtinfizierten (49,6 cm, $P = 0,004$).

Bezüglich der Schwangerschaftsdauer konnten wegen mangelnder Dokumentation auf der Entbindungsstation nur lückenhafte Daten erhoben werden.

Bei der Betrachtung des Geschlechts der Neugeborenen überwog in der Gruppe der Infizierten der prozentuale Anteil weiblicher Neugeborener leicht.

3.1.4 Parasitämie

In der Gruppe der Infizierten (n = 45) lag in 39 Fällen eine Doppelinfection (Plazenta und peripheres Blut) vor. In drei Fällen war nur die Plazenta infiziert, in zwei Fällen konnten ausschließlich im peripheren Blut Plasmodien nachgewiesen werden. Lediglich in einem Fall (Nr. 233) waren neben der Plazenta und dem peripheren Blut auch das Nabelschnurblut infiziert.

Vergleicht man in der Gruppe der Infizierten die Parasitämie in der Plazenta mit der des peripheren Blutes, so ergeben sich für die Plazenta signifikant höhere Werte ($P = 0,037$, siehe Tabelle 3). In 34 von 40 Fällen war die Parasitämie in der Plazenta höher als im peripheren Blut. In lediglich vier Fällen lag die Parasitämie im peripheren Blut höher als in der Plazenta, in zwei Fällen wurden gleiche Werte ermittelt.

Betrachtet man die Höhe der Parasitämie in den Paritätsgruppen, so finden sich in der Gruppe der Zweitgebärenden - sowohl in der Plazenta als auch im peripheren Blut - die höchsten Werte (siehe Tabelle 4). Dieser Unterschied zwischen den Paritätsgruppen ist jedoch nicht signifikant.

Zur besseren Übersicht der Häufigkeitsverteilung der Parasitämie wurden Klassen gebildet (siehe Tabelle 5) und diese in Histogrammform (Abbildungen 7a/7b) dargestellt.

Tabelle 3: Parasitämie Plazentablut vs. Peripherblut

Parasitämie in Parasiten/ μ l, * P ist berechnet nach dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen.

Parasitämie	Plazentablut (n = 43)	P*	Peripherblut (n = 42)
Geometrisches Mittel	6256	0,027	2020
Median	3600		2450
(Spanne)	(200 - 1 373 000)		(18 – 117 250)

Tabelle 4: Parasitämie nach Parität

Parasitämie in Parasiten/ μ l, Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant.

	Erstgebärende (n = 19)	Zweitgebärende (n = 11)	Mehrgebärende (n = 15)
Plazentablut			
Geometrisches Mittel	7144	11 938	3174
Median	3800	23 100	2800
(Spanne)	(250 - 1 373 000)	(200 - 1 012 000)	(400 - 83 750)
Peripherblut			
Geometrisches Mittel	1601	5480	1222
Median	2600	8000	950
(Spanne)	(18 - 117 000)	(200 - 78 000)	(50 - 117 250)

Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung Parasitämie
Parasitämie in Parasiten/ μ l, eingeteilt in Klassen A - D

	A	B	C	D
	Unter 1000	1001 - 10 000	10 001 - 100 000	100 001 - 1 500 000
Plazentablut (n = 43)	11	16	10	6
Peripherblut (n = 42)	18	14	7	3

Abbildung 7a: Häufigkeitsverteilung Parasitämie in der Plazenta

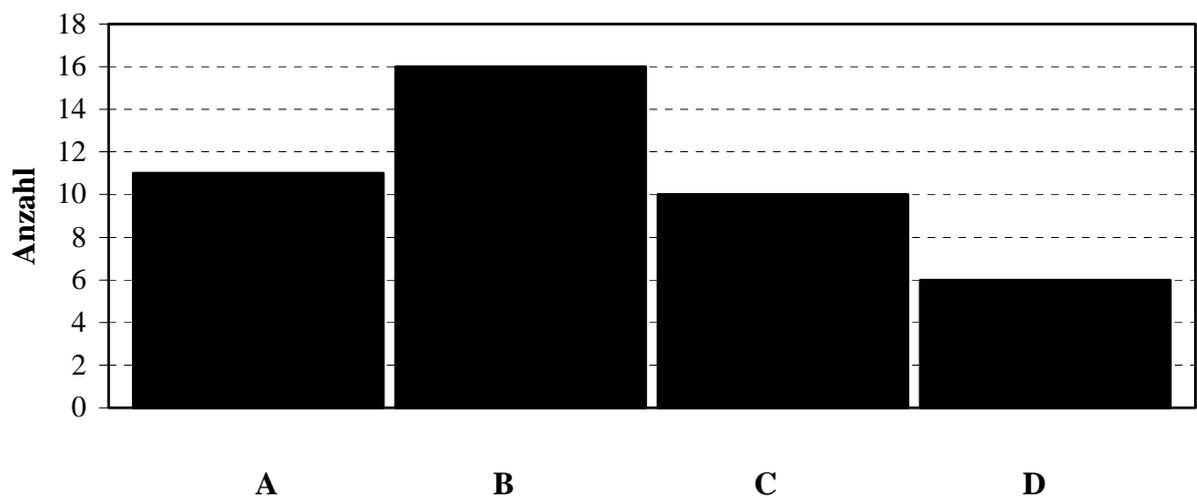
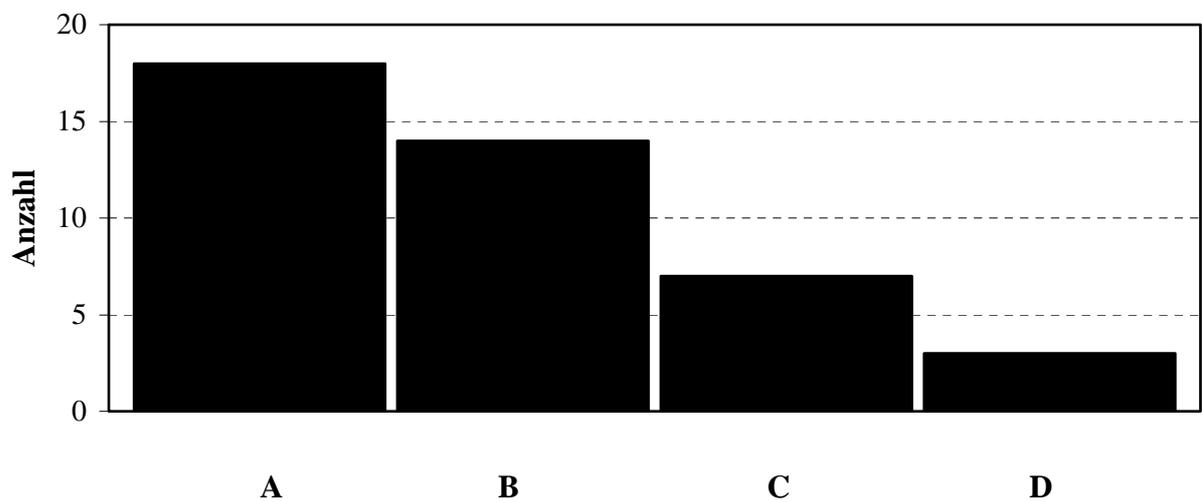


Abbildung 7b: Häufigkeitsverteilung Parasitämie im peripheren Blut



3.1.5 Hämatologische Parameter

Bei Geburt wurden im Peripherblut der Mutter Hämatokrit, Hämoglobin, Thrombozyten, Leukozyten sowie der prozentuale Anteil von mononukleären Zellen (MNZ) und Granulozyten an der Leukozytenzahl bestimmt. Beim Vergleich der Parameter bezüglich dem Vorliegen einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 6a). Untersucht man jedoch die Gruppen auf das Auftreten von Anämien (hier definiert als Hämatokrit < 25%), so weist die Gruppe der Infizierten mit 24% ein deutlich höheres Risiko auf als die Gruppe der Nichtinfizierten (13%, OR 2,35, 95%-Konfidenzintervall 1,04-5,30, siehe Tabelle 6b). Es fand sich keine Assoziation zwischen Malariainfektion und schwerer Anämie (hier definiert als Hämatokrit < 15%, Hb < 5g/dl).

Tabelle 6a: Hämatologische Parameter

Dargestellt als Mittelwerte, Standardabweichung angegeben als \pm SD, MNZ = mononukleäre Zellen, * P berechnet nach Mann-Whitney U Test, NS = nicht signifikant

	<i>P. falc.</i> Positiv	P*	<i>P. falc.</i> negativ
Hämatokrit, %	30,0 \pm 5,9	NS	31,9 \pm 6,2
Hämoglobin, g/dl	9,9 \pm 2,3	NS	10,4 \pm 2,0
Leukozyten, x10³/μl	11,1 \pm 3,0	NS	11,7 \pm 7,5
MNZ, %	25,8 \pm 5,5	NS	27,8 \pm 5,9
Granulozyten, %	74,0 \pm 10,5	NS	72,0 \pm 11,0
Thrombozyten, x10³/μl	217 \pm 108,7	NS	226 \pm 73,3

Tabelle 6b: Häufigkeitsverteilung Anämie

Anämie definiert als Hämatokrit < 25%, Prozentwerte (%) beziehen sich auf die jeweilige Spalte (n = 100%). * P berechnet nach Chi²-Test.

	<i>P. falc.</i> Positiv (n = 45)	P*	<i>P. falc.</i> negativ (n = 182)
Hämatokrit < 25%	11 (24)	0,09	22 (13)
Hämatokrit > 25%	34 (76)		160 (87)

3.2 Auswertung der Bindungs-Assays

3.2.1 Adhärenz an den verschiedenen Rezeptoren

Untersucht wurde das Bindungsverhalten der Isolate aus der Plazenta (Plazentablut, n = 28) und dem peripheren Blut der Mutter (Peripherblut Mutter, n = 21). Als Kontrollgruppe wurden Isolate aus dem peripheren Blut von Schulkindern mit Malaria auf ihr Bindungsverhalten untersucht (Peripherblut Schulkinder, n = 15). Berücksichtigt wurden nur Isolate, deren Parasitämie > 1000/µl betrug, da bei niedrigen Parasitämien mit falsch-negativen Ergebnissen gerechnet werden muß (Newbold et al., 1995) und in vorausgehenden Testreihen bei einer Parasitämie < 1000/µl vermehrt falsch-negative Ergebnisse beobachtet wurden (Khattab, persönliche Mitteilung).

In Abbildung 8 wird für diese drei Gruppen die Prozentzahl derjenigen Isolate dargestellt, die an einen der zwei untersuchten Rezeptoren gebunden hat. Dazu wurden Rohdaten betrachtet, d.h. ausgezählte infizierte Erythrozyten pro mm² abzüglich der Negativ-Kontrolle. Eine signifikante Bindung wurde angenommen, wenn die Zahl der gebundenen Erythrozyten/mm² > 5 war.

Es zeigte sich eine signifikante Bindung der Isolate an CSA sowohl im Plazentablut als auch im Peripherblut der Mutter, wobei der prozentuale Anteil der adhärenzten Isolate im Peripherblut der Mutter überwog (Peripherblut Mutter 67%, Plazentablut 43%, P = 0,09, Chi²-Test). Ein kleinerer Anteil der Isolate adhärenzte an HA, wobei auch hier der prozentuale Anteil im Peripherblut der Mutter höher ist als im Plazentablut (Peripherblut Mutter 57%, Plazentablut 32%, P = 0,07, Chi²-Test). In der Kontrollgruppe konnte weder Bindung an CSA noch an HA festgestellt werden.

Die Isolate aus dem Plazentablut zeigten in neun Fällen Bindungsverhalten sowohl zu CSA als auch HA, in drei Fällen wurde lediglich an CSA gebunden. Ein ausschließlich HA-bindender Phenotyp wurde nicht beobachtet. Ähnliches Bindungsverhalten lag im Peripherblut der Mutter vor: Elf Isolate zeigten einen sowohl CSA- als auch HA-bindenden Phenotyp, drei Isolate banden nur an CSA, wohingegen ein ausschließlich an HA bindender Phenotyp auch hier nicht beobachtet wurde (siehe Tabelle 8a).

Ein direkter Vergleich der Bindungseigenschaften zwischen Isolaten, die aus der gleichen Patientin gewonnen wurde, war in 21 Fällen möglich. In elf Fällen wurde eine signifikante Bindung sowohl im Plazentablut als auch im Peripherblut festgestellt, in einem Fall beschränkte sich das Bindungsverhalten auf das Plazentablut. Dreimal konnte lediglich im Peripherblut eine signifikante Bindung festgestellt werden (siehe Tabelle 8b).

Tabelle 7: Rohdaten der Isolate aus Plazentablut und Peripherblut

Alle Isolate mit einer Parasitämie $> 1000/\mu\text{l}$, die auf ihr Bindungsverhalten untersucht wurden. Angegeben ist die Anzahl der infizierten Erythrozyten pro mm^2 Rezeptorfläche abzüglich der Negativ-Kontrolle. Geometrisches Mittel für Parasitämie, Median für Rezeptorbindung, (Spanne).

Isolat	Parasitämie in μl	Rezeptorbindung	
		CSA	HA
Plazentablut			
156	1080	0	0
165	11000	0	0
170	3100	0	0
171	3600	0	0
172	23100	0	0
174	143100	90	428
179	4100	0	0
181	3200	0	0
185	1500	0	0
196	1600	0	0
197	9900	0	0
204	3500	0	0
205	68000	560	574
212	165300	83	52
213	7500	0	0
218	43200	0	0
220	80000	48	14
233	26000	270	62
238	275600	4858	899
245	83750	6	0
256	26600	5	0
265	1012000	633	90
272	1500	0	0
273	11500	0	0
277	2600	0	0
281	288000	1037	52
310	19500	6	0
337	1373000	1061	22
Geometrisches Mittel/Median	19135 (1080-1373000)	180 (5-4858)	62 (14-899)
Peripherblut Mutter			
165	2700	0	0
170	2500	14	16
171	3000	0	0
172	27300	0	0
174	75600	0	0
181	6000	0	0
197	2400	0	0
205	3000	9	8
212	81200	230	66
213	2500	70	22
218	21600	100	33
220	115000	1364	897
233	2600	196	59
238	2600	164	26
245	117250	192	105
256	24700	225	102
265	78100	189	48
273	8000	0	0
281	117000	484	91
310	3900	11	0
337	49400	22	0
Geometrisches Mittel/Median	13010 (2400-117250)	177 (11-1364)	54 (8-897)

Abbildung 8: Prozentzahl der adhärten Isolate an CSA und HA

Rohdaten, Plazentablut (n=28), Peripherblut Mutter (n=21), Peripherblut Schulkinder (n=15), Chi²-Test für Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung. P=0,09 für CSA_{Peripherblut}:CSA_{Plazentablut}, P=0,07 für HA_{Peripherblut}:HA_{Plazentablut}

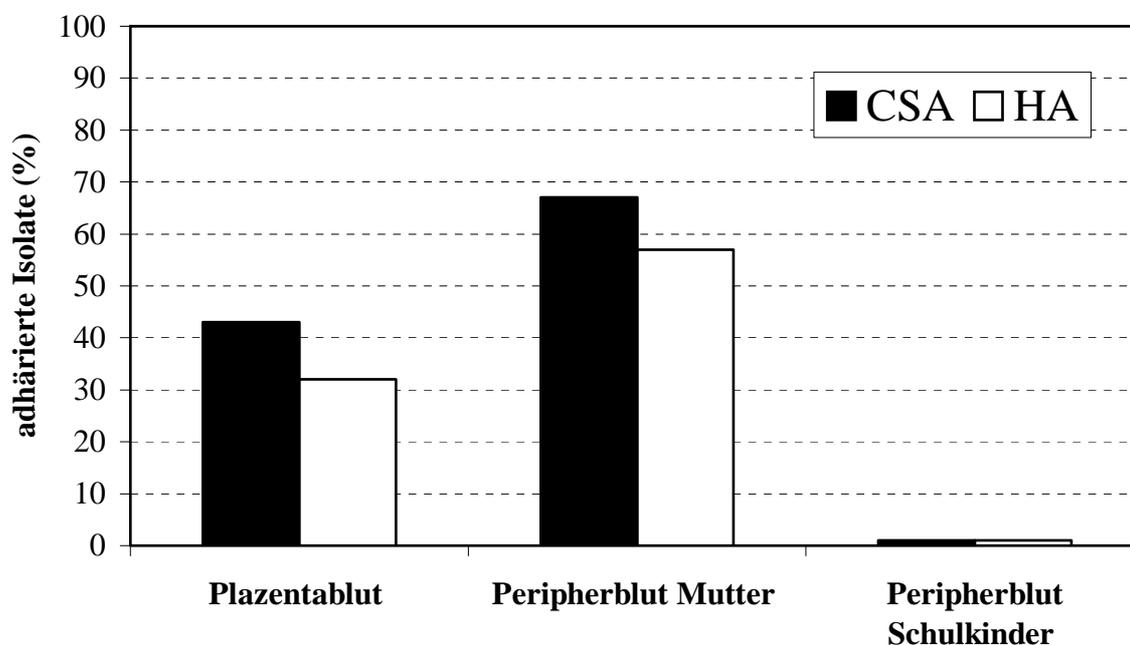


Tabelle 8a: Bindungsverhalten der Isolate aus Plazenta und Peripherblut

Anzahl der adhärten Isolate mit entsprechendem Phenotyp

	Isolate Plazentablut (n = 28)	Isolate Peripherblut (n = 21)
Bindungsverhalten		
CSA und HA	9	12
CSA	3	2
HA	0	0
Kein Bindungsverhalten	16	7

Tabelle 8b: Direkter Vergleich der Bindungseigenschaften aus Plazentablut und Peripherblut

Anzahl der Isolate aus gleicher Patientin (n =21)

Bindungsverhalten	Anzahl
Plazentablut und Peripherblut	11
Nur Plazentablut	1
Nur Peripherblut	3
Kein Bindungsverhalten	6

3.2.2 Quantitative Auswertung

Für die quantitative Analyse der Bindungswerte wurden die Rohdaten auf eine Standardparasitämie von 100000/ μ l korrigiert. Berücksichtigt wurden dabei 28 Isolate aus dem Plazentablut und 21 Isolate aus dem Peripherblut (siehe oben).

Der Vergleich der so ermittelten Bindungsniveaus zwischen CSA (n=49) und HA (n=49) ergab einen Trend zu höheren Werten bei CSA (siehe Tabelle 9b, P = 0,2). Betrachtet man die Bindungsniveaus der zwei Gruppen für CSA, so liegt das Bindungsniveau im Peripherblut signifikant über dem des Plazentablutes (siehe Tabelle 9a, P = 0,016). Ähnlich deutlich wurde dieser Unterschied für das Bindungsniveau von HA beobachtet (siehe Tabelle 9a, P = 0,024). Der Vergleich der Bindungsniveaus von HA und CSA innerhalb einer Gruppe ergab höhere Werte für CSA in beiden Gruppen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (siehe Tabelle 9a, Plazentablut P = 0,27, Peripherblut P = 0,14).

Tabelle 9a: Vergleich der rezeptor-spezifischen Bindungsniveaus nach Gruppe

Arithmetischer Mittelwert der Anzahl gebundener Erythrozyten pro mm^2 Rezeptorfläche, bei korrigierter Parasitämie (100000/ μ l), Standardabweichung angegeben als \pm SD.

* P ist berechnet mittels Mann-Whitney U Test, NS = nicht signifikant.

	Isolate Plazentablut (n = 28)	P*	Isolate Peripherblut (n = 21)
CSA			
Arithmetischer Mittelwert	156 \pm 400	0,016	1024 \pm 2070
(Spanne)	(0-1763)		(0-7538)
P*	NS		NS
HA			
Arithmetischer Mittelwert	64 \pm 178	0,024	320 \pm 552
(Spanne)	(0-844)		(0-2269)

Tabelle 9b: Vergleich der rezeptor-spezifischen Bindungsniveaus nach Rezeptor

Arithmetischer Mittelwert der Anzahl gebundener Erythrozyten pro mm^2 Rezeptorfläche, bei korrigierter Parasitämie (100000/ μ l), Standardabweichung angegeben als \pm SD.

* P ist berechnet mittels Mann-Whitney U Test, NS = nicht signifikant.

	CSA (n = 49)	P*	HA (n = 49)
Arithmetischer Mittelwert	528 \pm 1437	NS	173 \pm 401
(Spanne)	(0-7538)		(0-2269)

3.2.3 Auswirkungen des Bindungsverhaltens

Um die Frage zu beantworten, ob die Fähigkeit der Plasmodien zur Adhärenz Auswirkungen auf verschiedene, klinisch wichtige Parameter hat, wurde ein Vergleich zwischen Patientinnen, bei denen Adhärenz beobachtet wurde und solchen, bei denen keine Adhärenz auftrat, vorgenommen. Dabei fielen Patientinnen, die in mindestens einem Kompartiment Plasmodien mit signifikanten Bindungseigenschaften aufwiesen, in die Gruppe *Bindung +* (n=15), alle anderen in die Gruppe *Bindung -* (n=13). Es wurden nur die Daten von den Patientinnen herangezogen, deren Parasitämie in mindestens einem Kompartiment über 1000/ μ l betrug (n=28). In der Betrachtung berücksichtigt wurden Parasitämie, Geburtsgewicht, Alter und Parität, Hämatokrit und das Vorliegen einer durch PCR diagnostizierten Nabelschnurblutinfektion.

In der Gruppe *Bindung +* lag die Parasitämie im Plazentablut mit durchschnittlich 75937/ μ l deutlich über der Parasitämie in der Gruppe *Bindung -* (3900/ μ l, $P < 0,0001$, siehe Tabelle 10a). Dieser Unterschied war im Peripherblut ähnlich ausgeprägt (*Bindung +* 18460/ μ l, *Bindung -* 1289/ μ l, $P = 0,0029$, siehe Tabelle 10a).

Bezüglich des Hämatokrits wies die Gruppe *Bindung -* signifikant höhere Werte auf (*Bindung +* 27,3%, *Bindung -* 31,9%, $P = 0,038$, siehe Tabelle 10a).

Bei der Untersuchung auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Bindungseigenschaften und dem Nachweis einer Nabelschnurinfektion konnte eine Häufung von Nabelschnurinfektionen in der Gruppe *Bindung +* aufgezeigt werden ($P = 0,04$, Chi²-Test, siehe Tabelle 10b).

Die Untersuchung auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Nabelschnurblutinfektion und der Höhe der Parasitämie in der Plazenta erbrachte dagegen keine signifikanten Unterschiede (Parasitämie Plazenta Nabelschnurblut + (n = 10) zu Parasitämie Plazenta Nabelschnurblut - (n = 18), $P = 0,45$, Mann-Whitney U Test).

Tabelle 10a: Vergleich der Gruppen Bindung + und Bindung –

Einteilung der Patientinnen (n = 28) nach Vorliegen signifikanten Bindungsverhaltens in mindestens einem Kompartiment bei Parasitämie > 1000/µl. Geometrisches Mittel für Parasitämie, arithmetischer Mittelwert für Alter, Hämatokrit und Geburtsgewicht. Prozentwerte (%) beziehen sich auf die jeweilige Spalte. Standardabweichung angegeben als ± s. * P ist berechnet nach dem Mann-Whitney U Test.

	Bindung + (n = 15)	P*	Bindung – (n = 13)
Alter in Jahren	19,8 ± 3,8	NS	21,8 ± 7,0
Parität			
Erst- und Zweitgebärende	11 (73)	NS	9 (69)
Mehrgebärende	4 (27)		4 (31)
Parasitämie Plazenta , /µl			
Geometrisches Mittel	75937	<0,0001	3900
Median	80000		3500
(Spanne)	(3100 – 1373000)		(1080 – 23100)
Parasitämie Peripher , /µl			
Geometrisches Mittel	18460	0,0029	1289
Median	24740		1500
(Spanne)	(2500 – 117100)		(100 – 27300)
Hämatokrit , %	27,3 ± 5,5	0,038	31,9 ± 5,9
(Spanne)	(19,1 – 36,9)		(20,9 – 41)
Geburtsgewicht in g	2647 ± 703	0,14	2958 ± 767
(Spanne)	(1200 – 3550)		(680 – 3624)

Tabelle 10b: Vergleich der Gruppen Bindung + und Bindung – bezüglich dem Vorliegen einer Nabelschnurinfektion

Infektionsnachweis mittels PCR, P ist berechnet nach dem Chi²-Test, Prozentwerte (%) beziehen sich auf die jeweilige Spalte.

	Bindung + (n = 15)	P*	Bindung – (n = 13)
Nabelschnurinfektion	8 (47)	0,04	2 (15)
Keine Nabelschnurinfektion	7 (53)		11 (85)

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Auswertung

Im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit wurde das gesamte Patientenkollektiv (n = 227) auf ausgewählte Merkmale wie Prävalenz, Alter, Geburtsgewicht und Parität bezogen auf das Vorliegen einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* untersucht. Desweiteren wurden die Parasitämie und andere hämatologische Parameter ausgewertet. Mit der Voranstellung dieser Daten und dem darauffolgenden Vergleich bezogen auf das Vorliegen einer Bindungseigenschaft sollten auch epidemiologisch wie laborchemisch relevante Merkmale in die Auswertung miteinbezogen werden.

4.1.1 Prävalenz

Die Prävalenz einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* bei Schwangeren in der vorliegenden Arbeit beträgt 20% und liegt damit eher im unteren Bereich beobachteter Prävalenzen in hyperendemischen Gebieten. Beobachtungen für Lambaréné über einen Zeitraum von zwei Jahren ergaben eine nahezu identische Prävalenz (Luty, persönliche Mitteilung). In der Literatur schwanken die Zahlen je nach Land und Studienort (ländliche vs. städtische Gebiete) zwischen 15% und 65%. Das größte Risiko für Schwangere, sich mit *Plasmodium falciparum* zu infizieren, wiesen danach Frauen einer Studie aus Tansania aus dem Jahr 1996 auf (Matteelli et al., 1996). Für Gabun sind Prävalenzen bis zu 57% bekannt (Bouyou-Akotet et al., 2003; Walter et al., 1982).

Im untersuchten Kollektiv wiesen Erst- und Zweitgebärende ein deutlich höheres Risiko einer Infektion auf als Mehrgebärende (vgl. Kapitel 3.1.2). Die Prävalenz der Zweitgebärenden ist mit 27,5% am höchsten und übersteigt sogar die der Erstgebärenden (22,6%).

Das Phänomen erhöhter Infektionsanfälligkeit bei Erstgebärenden wurde erstmals 1958 von Archibald et al. beschrieben und in zahlreichen Folgestudien bestätigt. Die Prävalenzen bei Erstgebärenden werden dabei als etwa doppelt so hoch wie bei Mehrgebärenden beschrieben (Brabin, 1983). Differenzierte epidemiologische Betrachtungen zur Prävalenz bei Zweitgebärenden sind spärlich, da sich Zweitgebärende in fast allen Studien in der Gruppe der Mehrgebärenden wiederfinden. Die hier gezeigten Daten lassen eine ähnlich hohe Prävalenz wie bei Erstgebärenden vermuten.

Pathophysiologische Erklärungen für die erhöhte Infektionsanfälligkeit bei Erstgebärenden reichen von einer generalisierten, unspezifischen Immunsuppression bei Erstschwangerschaften (Brabin, 1985) bis hin zur bereits in der Einleitung besprochenen malariaspezifischen Adhärenzmechanismen und der damit verbundenen Umgehung der Immunantwort. Nach letzterem Erklärungsmodell kann durch CSA-vermittelte Sequestration in der Plazenta als „neuem“ Organ eine chronische Infektion vor allem in Erstgebärenden etabliert werden, da diese mehrheitlich noch keine spezifischen Antikörper gegen CSA-bindende Parasitenpopulationen aufweisen (Ricke et al., 2000). Durch Ausbildung einer spezifischen Immunantwort gegen diese Populationen sinkt in späteren Schwangerschaften die Anfälligkeit für eine Infektion und somit die Prävalenz. Ob der Zusammenhang zwischen CSA-bindenden Parasitenpopulationen und der Infektanfälligkeit so zutrifft, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Ein Hinweis wäre der fehlende bzw. verminderte Nachweis CSA-bindender Plasmodien in Frauen, die mehrere Schwangerschaften durchgemacht haben.

4.1.2 Geburtsgewicht

Reduziertes Geburtsgewicht stellt neben maternaler Anämie die Hauptmanifestation Schwangerschafts-assoziiierter Malaria in hyperendemischen Gebieten dar. Verantwortlich hierfür scheint sowohl die vermehrte Frühgeburtlichkeit als auch die intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) bei mit *Plasmodium falciparum* infizierten Schwangeren zu sein (Steketee et al., 2001). Dabei sind der Nachweis von Parasiten in Nabelschnur, Plazenta- sowie Peripherblut der Mutter nach der Geburt mit Frühgeburtlichkeit, und klinisch manifeste Malaria während der Schwangerschaft mit IUGR assoziiert (Sullivan et al., 1999).

Reduziertes Geburtsgewicht trägt als einer der Hauptrisikofaktoren wesentlich zur Säuglingssterblichkeit in afrikanischen Ländern bei. Neben Malaria gelten Unterernährung, maternale Anämie sowie andere Infektionskrankheiten (v.a. HIV) als weitere Ursachen reduzierten Geburtsgewichts. Das oft kombinierte Auftreten dieser Risikofaktoren erschwert exakte Zuweisungen zu einzelnen Faktoren. Schätzungen gehen jedoch davon aus, dass pro Jahr zwischen 75000 und 200000 Säuglinge infolge einer Malariaerkrankung der Mutter versterben (Steketee et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit liegt das Geburtsgewicht in der Gruppe der Infizierten signifikant unter dem Geburtsgewicht in der Gruppe der Nichtinfizierten, die Differenz zwischen den errechneten Mittelwerten beträgt 251 g. Ähnliche Werte lassen sich in der Literatur finden (Brabin, 1983). Hier schwanken die Differenzen der Mittelwerte je nach Studie zwischen 75 g und 400 g (Menendez et al., 2000). Die meisten Studien zu diesem Thema beschränken sich auf die Angabe obengenannter Differenzen im durchschnittlichen Geburtsgewicht. Da jedoch das Geburtsgewicht in der Regel mit der Zahl der durchgemachten Schwangerschaften steigt und Erst- und Zweitgebärenden in der Gruppe der Infizierten überrepräsentiert sind (s.o.), ist zur Vermeidung statistischer Fehler eine Betrachtung des Geburtsgewichtes bezogen auf die Parität unumgänglich. Tatsächlich bestätigt sich bei dieser Studie die statistisch signifikante Differenz im Geburtsgewicht so lediglich für die Gruppe der Erstgebärenden (Differenz der Mittelwerte 318g, P 0,03) sowie für die zusammengefasste Gruppe der Erst- und Zweitgebärenden (297 g, P 0,01). Ähnliche Ergebnisse finden sich in der 1983 von McGregor et al. publizierten Studie. Hier ließen sich bei sehr großer Fallzahl (n = 6427) statistisch signifikante Unterschiede im Geburtsgewicht nur bei Erstgebärenden nachweisen, die Differenz der Mittelwerte betrug bei einer nahezu identischen Prävalenz (20,2%) insgesamt 170 g.

Auch die Einteilung der Neugeborenen in geburtsgewichtsbezogene Gruppen (Normalgewichtige vs. LBW-Infants) zeigt das deutlich erhöhte Risiko erniedrigten Geburtsgewichts in der Gruppe der Infizierten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch bei der hier betrachteten Population Malaria während der Schwangerschaft mit einem deutlich erhöhten Risiko einhergeht, ein Kind mit reduziertem Geburtsgewicht zu gebären. Dies betrifft vor allem infizierte Erstgebärende. Die von anderen Studien bekannten Auswirkungen auf die kindliche Mortalität sowie die Möglichkeit, durch Interventionen diesen Risikofaktor zu reduzieren, unterstreicht die Notwendigkeit wirkungsvoller Prophylaxemaßnahmen am Studienort (Steketee et al., 1996).

4.1.3 Parasitämie

Der Vergleich der Parasitämie zwischen den beiden Kompartimenten ergab signifikant höhere Werte für das Plazentablut. In nur vier Fällen lag die Parasitämie im Peripherblut höher als in der Plazenta. Diese Beobachtungen entsprechen nahezu allen durchgeführten Studien zu diesem Thema (siehe auch Einleitung).

Beim untersuchten Patientenkollektiv lag in 39 Fällen eine Doppelinfektion (Plazentablut und peripheres Blut) vor. In lediglich drei bzw. zwei Fällen waren nur Plazentablut bzw. Peripherblut infiziert.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass beim überwiegenden Anteil der untersuchten Frauen eine Doppelinfektion vorliegt und eine alleinige Untersuchung des Peripherblutes zur groben Abschätzung der Prävalenz ausreichend ist. Ähnliche Ergebnisse lassen sich in der Literatur finden (Brabin, 1983). Dagegen wurde in einigen Studien von sehr hohen Einzelinfektionsraten, vor allem im Plazentablut, berichtet (Matteelli et al., 1996; Watkinson and Rushton, 1983). In den Studien wird diese Beobachtung durch die Sequestrationstheorie erklärt.

Diese widersprüchliche Datenlage ist wohl vor allem auf Unterschiede in der Sensitivität der jeweiligen mikroskopischen Diagnostik zurückzuführen als auf eine tatsächliche Abwesenheit von Plasmodien im Peripherblut: Das vermehrte Vorkommen sehr niedriger Parasitämien im Peripherblut kann eine Anfälligkeit für falsch-negative Ergebnisse in diesem Kompartiment erklären. Untersuchungen zur Sensitivität unterschiedlicher Diagnosemethoden im Peripherblut ergaben - gemessen an den mikroskopisch diagnostizierten Infektionen im Plazentablut - für den mikroskopischen Nachweis lediglich 42% (Mockenhaupt et al., 2002). Andere Nachweismethoden hingegen wiesen dabei eine wesentlich höhere Sensitivität auf (80% für *histidine-rich protein 2*-Nachweis, nahezu 100% für den PCR-Nachweis). So ist bei der vorliegenden Arbeit von einer hohen Sensitivität bezüglich des mikroskopischen Nachweises einer Infektion im Peripherblut auszugehen (siehe Kapitel 2.2.3), wobei auch hier im Rahmen einer weiteren Studie andere Diagnosemethoden in mikroskopisch negativen Proben Parasiten oder deren Bestandteile nachweisen konnten (Kassberger et al., 2002).

4.1.4 Anämie und hämatologische Parameter

Bestimmt wurden Hämatokrit, Hämoglobin, Thrombozyten, Leukozyten sowie der prozentuale Anteil von Granulozyten und mononukleären Zellen an der Leukozytenzahl. Alle obengenannten Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich dem Vorliegen einer Plasmodieninfektion.

Maternale Anämie stellt neben reduziertem Geburtsgewicht die zweite Hauptmanifestationsform Schwangerschafts-assoziiertes Malaria in hyperendemischen Gebieten dar (Brabin, 1983). Dabei erschwert die multifaktorielle Genese der Anämie – ähnlich wie beim reduzierten Geburtsgewicht – die Beurteilung der Bedeutung einer Malaria als Risikofaktor. In malariaendemischen Gebieten kommen so neben einer Infektion mit *Plasmodium falciparum* u.a. ernährungsbedingte Defizite wie Folsäure – und Eisenmangel, andere Infektionskrankheiten (z.B. HIV) und Hämoglobinopathien als weitere Ursachen in Betracht (Fleming, 1989). Darüberhinaus muss die allgemein bei Schwangeren beobachtete „Verdünnungsanämie“ (starke Zunahme des Plasmavolumens bei lediglich geringem Anstieg der Erythrozytenzahl) als zusätzlicher Faktor bedacht werden.

In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich bezüglich dem Vorliegen einer Anämie lediglich ein Trend zu niedrigeren Hämatokritwerten ($< 25\%$) in der Gruppe der Infizierten. So scheinen die Auswirkungen einer frisch diagnostizierten Malaria auf die bestimmten Laborparameter im untersuchten Patientengut gering zu sein, insbesondere fällt die fehlende Assoziation zwischen Plasmodieninfektion und schwerer Anämie (hier definiert als $Hkt < 15\%$ oder $Hb < 5 \text{ g/dl}$) auf.

Auffällig im untersuchten Patientengut sind jedoch die allgemein niedrigen Werte für Hämoglobin und Hämatokrit, wobei auch hier zwischen der Gruppe der Infizierten und der Gruppe der Nichtinfizierten kein signifikanter Unterschied festzustellen ist. Diese Beobachtung deckt sich mit anderen Untersuchungen: In fast allen Studien zu diesem Thema werden niedrige Hämatokrit- und Hämoglobinwerte für malariaendemie Gebiete beschrieben. Auffällig dabei ist die fehlende Assoziation mit frisch diagnostizierter Malaria bzw. der Prävalenz am jeweiligen Studienort (Guyatt and Snow, 2001).

Schätzungen gehen indes davon aus, dass etwa ein Viertel aller Schwangerschafts-assoziierten, schweren Anämien in malariaendemischen Gebieten direkt auf eine Malaria zurückgeführt werden kann (Guyatt and Snow, 2001). Die Zahl der tödlichen, durch Malaria verursachten Anämien während der Schwangerschaft wird dabei auf etwa 10000 pro Jahr geschätzt.

4.2 Bindungs-Assays

4.2.1 Übersicht über bisher durchgeführte Bindungsstudien

Die bisher umfangreichsten Studien zum Vergleich der Bindungseigenschaften führten Newbold et al. 1997 sowie Rogerson et al. 1999 in Kenia durch. Sie verglichen jeweils Feldisolate aus Kindern unter dem Gesichtspunkt unterschiedlicher klinischer Manifestationsformen (Anämie, zerebrale Malaria, unkomplizierte Malaria). Beide Studien konnten trotz beachtlichen Umfangs die pathogenetischen Bedeutungen der untersuchten Rezeptoren nicht eindeutig klären.

Die erste Bindungsstudie mit Isolaten aus schwangeren Frauen führte zur Identifikation des CSA als möglichen Hauptrezeptor plazentarer Adhäsion (Fried and Duffy, 1996). Beeson et al. gelang der erste umfassende Vergleich der Bindungseigenschaften für CSA aus Plazentablut und Peripherblut (Beeson et al., 1999). Eine vom gleichen Autor durchgeführte Folgestudie identifizierte HA als weiteren potentiellen Rezeptor plazentaspezifischer Adhäsion (Beeson et al., 2000).

Die Bindungsstudien bei schwangeren Patientinnen konzentrierten sich meist auf die Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Isolaten des Plazentablutes. Das als Kontrolle verwendete Peripherblut wurde meist wegen logistischen Schwierigkeiten aus anderen schwangeren Patientinnen gewonnen, sodass ein direkter Vergleich der Bindungseigenschaften für CSA und HA aus den beiden Kompartimenten derselben Patientin nur eingeschränkt möglich war. Auch wurde z.T. auf kältekonservierte Laborisolate zurückgegriffen, was durch Selektion bestimmter Parasitenklone zu einer Adhärenzprofilveränderung führen kann (Reeder et al., 1994).

Alle bisher publizierten Bindungsstudien bei Schwangeren zeichnen sich durch die geringe Zahl der untersuchten Isolate aus. Der Grund dafür liegt wohl vor allem in der Unberechenbarkeit der Isolatgewinnung und -verarbeitung vor Ort und den damit verbundenen logistischen Schwierigkeiten. So lassen sich qualitative Trends bezüglich der Rezeptoreigenschaften erkennen, die nur z.T. statistische Signifikanz erlangen. Wohl auch deshalb wurde auf einen quantitativen Vergleich der erhobenen Daten meist verzichtet.

Ein Vergleich epidemiologischer und klinischer Daten bezogen auf das Vorliegen einer Bindungseigenschaft wurde in den oben genannten Studien nicht durchgeführt.

In der vorliegenden Studie wurde versucht, eine ausreichend große Anzahl an Isolaten aus Plazentablut und Peripherblut zu sammeln, die in ihren Bindungseigenschaften direkt vergleichbar sind, d.h. aus der selben Patientin stammen. Durch Umrechnung auf Standardparasitämwerte sollte so auch ein direkter Vergleich der Bindungsniveaus ermöglicht werden. Um Verfälschungen durch Selektion bestimmter Klone zu minimieren, wurde ausschließlich mit Plasmodien gearbeitet, die unmittelbar zuvor aus den Patienten gewonnen wurden.

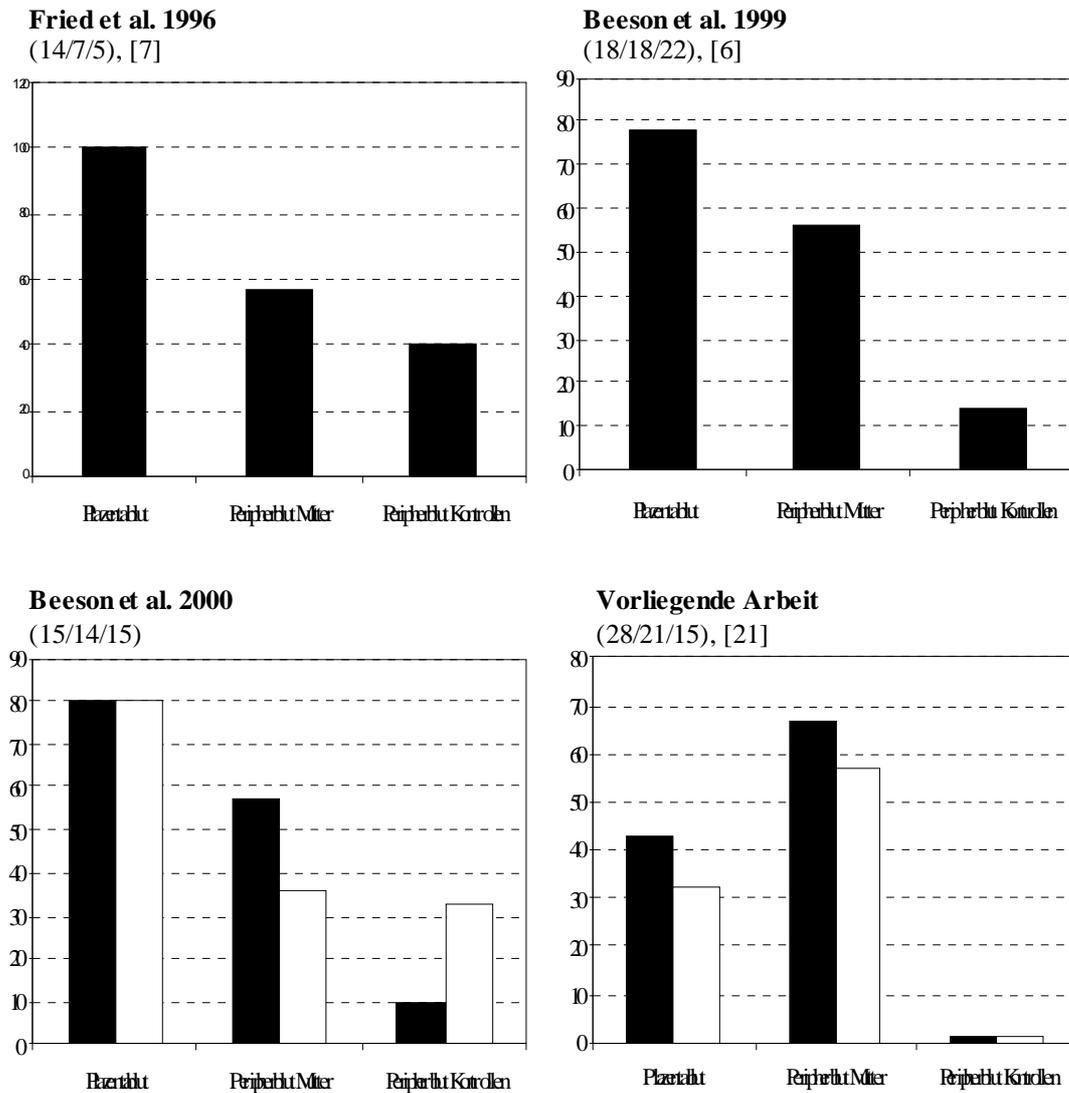
4.2.2 Adhärenz an den verschiedenen Rezeptoren

Untersucht wurde das Bindungsverhalten der Isolate aus der Plazenta (n = 28) und dem peripheren Blut der Mutter (n = 21). Als Kontrollgruppe wurden Isolate aus dem Peripherblut von infizierten Schulkindern herangezogen.

Vergleicht man die Bindungseigenschaften zwischen Plazentablut und mütterlichem Peripherblut, so weisen die Isolate aus dem Peripherblut sowohl für CSA als auch für HA mit 67% bzw. 57% die höchsten Bindungsraten auf. Aufgrund der weniger deutlichen Differenz zwischen den Kompartimenten sowie der immer noch geringen Fallzahl erlangt dieser Unterschied wohl keine statistische Signifikanz, jedoch ist zumindest von einem Trend im Sinne vergleichbar hoher Bindungsraten auszugehen (P 0,09 für CSA, P 0,07 für HA). Diese Beobachtung ist neu und unterscheidet sich von den bisherigen Untersuchungen: In allen vergleichbaren Studien lagen die Bindungsraten für CSA und HA im Plazentablut stets über denen im Peripherblut. So lag bei der Arbeit von Fried et al. die Bindungsrate für CSA im Plazentablut bei 100%, (15 von 15), wohingegen im Peripherblut der gleichen Spenderinnen lediglich 57% (4 von 7) der Isolate Adhärenzeigenschaften für CSA aufwiesen (Fried and Duffy, 1996). Auch die 1999 durchgeführte Bindungsstudie von Beeson et al. ergab höhere Bindungsraten für CSA im Plazentablut (Plazentablut: 14 von 18 bzw. 78%; Peripherblut Mutter: 10 von 18 bzw. 56%). Eine weitere Studie von Beeson et al. beschreibt hohe, mit CSA vergleichbare Bindungsraten für HA im Plazentablut (12 von 15 bzw. 80%) bei sehr niedrigen Bindungsraten für HA im Peripherblut (5 von 14 bzw. 36%). Eine Übersicht über diese Studien gibt Abbildung 9.

Abbildung 9: Vergleich der Bindungseigenschaften

Anzahl der adhärenierten Isolate in Prozent für CSA (■) und HA (□). Zahlen in (Klammern) entsprechen jeweiliger Fallzahl n (n Plazentablut/n Peripherblut Mutter/n Peripherblut Kontrollen). Zahlen in [Klammern] entsprechen Anzahl der direkt vergleichbaren Isolate (i.S. identischer Spenderinnen).



Allerdings sind die Daten aus diesen Studien für einen Vergleich nur eingeschränkt zu verwerten, da sich Fried auf den direkten Vergleich (gleiche Spenderinnen) von nur sieben Isolaten beschränkte und Beeson das Peripherblut überwiegend aus anderen Spenderinnen gewann als das Plazentablut. So war ein direkter Vergleich bei dieser Studie nur in sechs Fällen möglich, wohingegen bei der vorliegenden Arbeit in 21 Fällen Isolate aus der jeweils gleichen Patientin gewonnen werden konnten. Dabei lag in 11 Fällen ein Bindungsverhalten in beiden Kompartimenten vor, in lediglich einem Fall beschränkte sich die Adhärenz auf das Plazentablut (siehe Tabelle 8b).

Bei der vergleichenden Betrachtung der Daten müssen neben der oben erwähnten geringen Anzahl direkt vergleichbarer Isolate auch die erheblichen Unterschiede in der Vorbereitung der Bindungs-Assays berücksichtigt werden: So wurden bei Beeson et al. die aus der Plazenta gewonnenen Isolate durch entsprechende Verfahren auf Parasitämien von bis zu 96% angereichert. Dagegen wurde bei den Isolaten des Peripherblutes auf ein solches Vorgehen meist verzichtet, Einschlusskriterium war hier eine Parasitämie $> 1\%$. Bei Fried et al. lassen sich keine Aussagen zu der Höhe der Parasitämie finden, sodass Verzerrungen im Sinne von für Bindungs-Assays zu niedrigen Parasitämien im Peripherblut nicht auszuschließen sind. Bei der vorliegenden Arbeit wurde durch Verzicht auf Anreicherung sowie Ausschluss aller Isolate, die eine Parasitämie unter $1000/\mu\text{l}$ aufwiesen, versucht, möglichen Verfälschungen vorzubeugen. Um dennoch zu vergleichbaren Daten zu gelangen, wurden die Methoden der Isolatgewinnung, Kultivierung und Bindungs-Assays weitgehend beibehalten.

4.2.3 Quantitative Auswertung

Voraussetzungen für die Durchführung einer quantitativen Auswertung sind zum einen vergleichbare Rezeptorkonzentrationen und zum anderen die Umrechnung auf Standardparasitämiwerte bei nachgewiesener linearer Beziehung zwischen der Anzahl gebundener Erythrozyten mit der Parasitämie eines Isolates. In der vorliegenden Arbeit lagen die auf die Petrischalen aufgetragenen Rezeptorkonzentrationen bei je 100 µg/ml, die Umrechnung erfolgte auf eine Standardparasitämie von 100000/µl. Isolate mit einer Parasitämie < 1000/µl wurden ausgeschlossen, da bei sehr niedrigen Parasitämien von Verfälschungen im Sinne falsch-negativer Ergebnisse auszugehen ist (Newbold et al., 1997). Eine lineare Beziehung zwischen Ligand-spezifischer Adhäsion und der Parasitämie konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (Hasler et al., 1990), wobei bei sehr hohen Parasitämien dieser Zusammenhang aufgehoben zu sein scheint (Newbold et al., 1997). Unter Beachtung dieser Voraussetzungen finden sich in der vorliegenden Arbeit signifikant höhere Werte bei den Isolaten des Peripherblutes sowohl für CSA (P 0,016) als auch für HA (P 0,0024). Dabei liegen die Bindungsniveaus für CSA in beiden Kompartimenten über denen für HA, jedoch erreicht dieser Unterschied keine statistische Signifikanz. Ein Vergleich der quantitativen Auswertung mit früheren Studien ist wiederum nur sehr bedingt möglich: Bei Fried et al. (s.o.) findet sich zwar ein höheres CSA-Bindungsniveau für die Isolate des Plazentablutes, jedoch keine Angaben zur jeweiligen Parasitämie bzw. eventuell vorgenommenen Parasitämiekorrekturen. In der 1999 von Beeson et al. durchgeführten Studie weisen die Isolate aus dem Peripherblut ein höheres CSA-Bindungsniveau bei niedrigerer Prävalenz auf, jedoch scheidet auch hier ein Vergleich an der fehlenden Umrechnung auf Standardparasitämiwerte. In der vom gleichen Autor durchgeführten Folgestudie findet sich ein in etwa gleich hohes Bindungsniveau für die Rezeptoren HA und CSA (Fig. 2b, Beeson et al., 2000), wobei hier die Isolate aus beiden Kompartimenten gemeinsam betrachtet wurden und keine Umrechnung auf Standardparasitämiwerte erfolgte.

4.2.4 Bewertung der Unterschiede in Bindungsprävalenz und Bindungsniveau

Unter Berücksichtigung der vorliegenden Arbeit scheinen die Isolate aus dem Peripherblut sowohl öfters als auch auf signifikant höherem Niveau an die untersuchten Rezeptoren zu binden (s.o.). Die Daten unterstreichen dabei die Bindungspotenz peripher zirkulierender Isolate: Die im Ringstadium gewonnenen Parasiten des Peripherblutes bildeten nach Kultivierung die gleichen Phänotypen aus wie die unmittelbar nach Entnahme untersuchten Trophozoiten des Plazentablutes. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu bisherigen Beobachtungen. Mögliche Ursachen für die höheren Bindungsniveaus könnten in der geringfügig modifizierten Art der Gewinnung der Isolate („mechanische“ Beschädigung der Plazenta-Isolate, dadurch Beeinträchtigung des Bindungsverhaltens), in der Selektion bestimmter Subpopulationen durch Kultivierung oder in der im Peripherblut umfassenderen Synchronisierung der Parasitenstadien liegen. Eine Erklärung für zumindest ähnlich hohe Prävalenzen können oben genannte Faktoren indes nicht liefern. Dabei wurde die bisherige Beobachtung einer höheren Bindungsrate im Plazentablut als Bestätigung für die Existenz einer CSA-bindenden Subpopulation angesehen, die durch ihr Adhärenzprofil in der Plazenta sequestriert und sich so der peripheren Blutbahn gänzlich zu entziehen vermag (Beeson et al., 2001). Bekräftigt wurde diese Theorie durch die niedrigen Bindungsraten in nichtschwangeren Frauen und anderen Kontrollgruppen. Die beschriebene Organspezifität wurde durch die Entdeckung eines CSA-unabhängigen, ringstadienspezifischen Adhärenzmechanismus untermauert (siehe Kapitel 1.4.8, Pouvelle et al., 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen gegen die Wirksamkeit eines solchen Adhärenzmechanismus und für die These, dass die peripher zirkulierenden Parasiten ebenfalls im Trophozoitenstadium an CSA und HA adhäreren und so in der Plazenta akkumulieren. Das würde auch bedeuten, dass die in der Plazenta vorkommenden Plasmodien im Ringstadium dieses Organ verlassen können und in der peripheren Blutbahn rezirkulieren. Dieses Erklärungsmodell würde das zumindest gleichhäufige Vorkommen CSA-bindender Isolate in beiden Kompartimenten erklären und gegen die Existenz einer nichtzirkulierenden, sogenannten kryptischen Subpopulation sprechen.

4.2.5 Bindungseigenschaften der Kontrollgruppe

Ein weiterer Unterschied zu bislang publizierten Arbeiten stellt die Abwesenheit CSA- oder HA-bindender Parasitenpopulationen in den Isolaten der Kontrollgruppe dar. In allen bisherigen Studien wurde eine Bindung an CSA bei Isolaten aus Kindern berichtet, wenngleich sie qualitativ und quantitativ auf niedrigem Niveau lag: In der größten Studie zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften bei infizierten Kindern lag in 20-30% Bindung an CSA vor (Rogerson et al., 1999). Bemerkenswert hierbei ist das niedrige Bindungsniveau, das für CSA nach Korrektur auf Standardparasitämiewerte (1%) bei 1,1 bis 6 infizierten Erythrozyten pro mm^2 Rezeptorfläche lag. In der von Beeson et al. im Jahr 1999 durchgeführten Studie fanden sich in der Kontrollgruppe bei 13,6% der Isolate Bindung an CSA. Auch hier ist das Bindungsniveau mit durchschnittlich 4,7 infizierten Erythrozyten/ mm^2 niedrig. Fraglich ist, ob dabei ohne die vorgenommenen Anreicherungsverfahren (Parasitämiewerte bis zu 97%) signifikante Bindung an CSA festgestellt worden wäre. Die Prävalenz einer HA-Bindung bei Isolaten aus Kindern betrug bei Beeson et al. etwa 30% und lag damit über der von CSA (10%, Beeson et al. 2000).

Wenngleich Prävalenz und Bindungsniveau niedriger als bei Isolaten aus Schwangeren sind, so liegt doch laut Literatur in 10-30% der Fälle Bindung an CSA bzw. HA vor. In einer am gleichen Studienort 1997 durchgeführten Studie erbrachte CSA-Bindungsraten bei Klein- und Schulkindern von bis zu 40% (Van Aaken, 1997). Die Abwesenheit CSA- oder HA-bindender Phänotypen in den Isolaten der Kontrollgruppe in der vorliegenden Arbeit ist daher schwierig zu erklären. Da keine Unterschiede in der Isolatgewinnung – und Verarbeitung im Vergleich zu den peripheren Isolaten der Schwangeren vorliegen, scheinen methodische Ursachen unwahrscheinlich. Lediglich die geringe Anzahl der untersuchten Isolate ($n = 15$) bei vermutlich geringer Bindungsprävalenz kann als mögliche Fehlerquelle in Betracht kommen. Auch kann davon ausgegangen werden, dass CSA-bindende Populationen in Kindern in niedrigerer Konzentration und eher zufällig vorkommen und so höhere Parasitämien zur Detektion mittels statischer Rezeptor-Assays notwendig sind. Die niedrigen Bindungsniveaus für CSA in den oben genannten Studien werfen jedoch auch die Frage nach falsch-positiven Ergebnissen auf, sodass eine abschließende Beurteilung der CSA-Bindungspotenz der Isolate aus Kindern ausbleiben muss.

4.2.6 Die Bedeutung des CSA als Rezeptor

Aus dem oben beschriebenen Bindungsverhalten ergibt sich die Frage nach der Organspezifität der beobachteten Bindungsmechanismen: Ob es sich bei der CSA-vermittelten Adhäsion um ein auf die Plazenta beschränktes Phänomen handelt, ist umstritten. So konnten in verschiedenen Organen CSA nachgewiesen werden (Robert et al., 1995). Auch wurde bei allen CSA-bindenden Isolaten Adhärenz an Endothelzellen, die nicht aus der Plazenta stammen, beobachtet (Muanza et al., 1996). Darüber hinaus wurde Bindung an CSA auch bei Isolaten aus nichtschwangeren Frauen, Männern und Kindern nachgewiesen (Rogerson et al., 1999). Untersuchungen zu diesem Thema ergaben jedoch, dass die massive Sequestration in der Plazenta an organspezifische Voraussetzungen gebunden zu sein scheint: So konnte Alkhalil et al. die strukturellen Voraussetzungen zur Bindungsfähigkeit des CSA auf molekularer Ebene beschreiben und ein im intervillösen Raum der Plazenta vorkommendes, niedrig sulfatiertes CSA als eigentlicher Ligand identifiziert werden (Achur et al., 2000; Alkhalil et al., 2000). Eine weitere Studie sieht in den in der Plazenta vorherrschenden Strömungsbedingungen sowie in der Fähigkeit der CSA-bindenden Isolate, unter diesen Bedingungen kompetitiv zu binden, die Ursache verstärkter Adhäsion in der Plazenta (Pouvelle et al., 2003). Auch die Beobachtung, dass Frauen nach mehreren durchgemachten Schwangerschaften spezifische Antikörper gegen CSA-bindende Isolate aufweisen, unterstreicht den vermuteten Organotropismus (Ricke et al., 2000). So scheint die Plazenta als „neues Organ“ die CSA-vermittelte Sequestration zu begünstigen und so zur Selektion der CSA-bindenden Isolate in Schwangeren beizutragen. Die Rolle der CSA-vermittelten Adhärenz in anderen Organen sowie in anderen Spenderpopulationen konnte jedoch bisher nur unzureichend untersucht werden (Pouvelle et al., 2003).

Auch ist die Beobachtung, dass die Anfälligkeit schwangerer Frauen für eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* in der frühen Phase nach der Geburt erhalten bleibt, durch CSA-vermittelte Adhäsionsmechanismen nicht zu erklären (Diagne et al., 2000). Vielmehr scheinen die beobachtete Unterdrückung der zellvermittelten Immunantwort sowie erniedrigte Cortisol-Konzentrationen in infizierten Schwangeren ebenso an der Pathogenese maternaler Malaria beteiligt zu sein (Riley et al. 1989; Vleugels et al., 1989; Bouyou-Akotet et al., 2004).

Trotz aller noch offen bleibenden Fragen scheint sich die zentrale Rolle des CSA an der Pathogenese maternaler Malaria zu bestätigen (Duffy and Fried, 2003b). Die Entdeckung, dass die als Ligand für CSA identifizierte DBL γ -Domäne des PfEMP-1 hochkonservierte Regionen aufweist (Khattab et al., 2001; Khattab et al., 2003) und Antikörper gegen

rekombinantes DBL_γ die Adhäsion an CSA nahezu komplett inhibieren können (Duffy and Fried, 2003b), bietet vielversprechende Möglichkeiten zur Entwicklung eines geeigneten Impfstoffes. Ob dadurch Komplikationen einer Schwangerschafts-assoziierten Malaria vermindert oder gar vermieden werden können, wird sich an der Frage entscheiden, ob die Adhärenz an CSA allein für die Pathogenese maternaler Malaria verantwortlich ist. Ein erster Hinweis für die klinische Bedeutung des CSA ist der kürzlich aufgezeigte Zusammenhang zwischen dem Fehlen CSA-spezifischer Antikörper und erniedrigtem Geburtsgewicht (Duffy and Fried, 2003a).

4.2.7 Die Bedeutung der Hyaluronsäure als Rezeptor

Die Rolle von Hyaluronsäure ist seit der Beschreibung seiner Bindungseigenschaften umstritten (Beeson et al., 2001). Die bisher berichteten niedrigen Bindungsraten im Peripherblut (Beeson et al., 2000) konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Auch konnte ein allein HA-bindender Phänotyp, wie er von Beeson et al. beschrieben wird, nicht identifiziert werden: Adhärenz an HA lag ausschließlich in Kombination mit CSA-Bindung vor, insgesamt fünf Isolate zeigten dagegen einen exklusiv CSA-bindenden Phänotyp (siehe Kapitel 3.2.1). Zwischenzeitlich wurde dieses Phänomen als Indiz einer Verunreinigung von HA mit CSA angesehen (Valiyaveetil et al., 2001), jedoch konnte in unterschiedlichen Studien die Spezifität der HA-vermittelten Adhäsion nachgewiesen werden (Beeson et al., 2001; Chai et al., 2001; Beeson et al., 2004). Auch wurde eine Koexpression von Liganden auf infizierten Erythrozyten für andere Rezeptoren beschrieben (McCormick et al., 1997). Eine solche Koexpression könnte ein Überlebensvorteil für die Parasiten darstellen und die Suche nach geeigneten Impfstoffen, die sich bisher auf die CSA-vermittelte Adhäsion als Angriffspunkt konzentriert, erheblich erschweren (Beeson et al., 2001). Der bisher nur zweifelhaft erfolgte Nachweis eines ausschließlich HA-bindenden Phänotyps sowie die geringe Konzentration von HA im intervillösen Raum (Achur et al., 2000) lassen jedoch eine untergeordnete Rolle für diesen Rezeptor vermuten. So scheint HA am Adhärenzmechanismus beteiligt zu sein, ohne ihn jedoch eigenständig und von CSA unabhängig vermitteln zu können. Die Identifikation eines HA-spezifischen Liganden bzw. einer entsprechenden Region des PfEMP-1 könnte zur Klärung der Bedeutung von Hyaluronsäure entscheidend beitragen.

4.2.8 Auswirkungen des Bindungsverhaltens

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vergleich der Isolate, bei denen Adhärenz an die untersuchten Rezeptoren vorlag (Bindung +, n=15), mit der Gruppe derjenigen Isolate ohne Bindungseigenschaften (Bindung -, n=13) vorgenommen (siehe Kapitel 3.2.3).

Demnach ist das Vorhandensein CSA- oder HA-bindender Populationen assoziiert mit signifikant höheren Parasitämiewerten in beiden Kompartimenten, niedrigerem Hämatokrit sowie dem Trend zu niedrigerem Geburtsgewicht. Dagegen konnte kein Unterschied bezüglich dem Alter oder der Parität der jeweiligen Spenderinnen festgestellt werden. So wiesen einige Mehrgebärende Isolate mit Bindungseigenschaften auf, was gegen die Wirksamkeit potentiell vorhandener, spezifischer Antikörper spricht.

Insgesamt scheinen also in der Gruppe Bindung + schwere Verläufe gehäuft aufzutreten. Dieses Phänomen wurde bisher nicht beschrieben. Die Ursachen hierfür können zum einen in methodischen Fehlern im Sinne einer höheren Sensitivität der Bindungs-Assays bei hohen Parasitämiewerten liegen oder aber tatsächlich durch die Adhärenzeigenschaften bedingt sein. Gegen methodische Fehler spricht die Tatsache, dass sich in der Gruppe Bindung + mehrere Isolate mit sehr niedrigen Parasitämien wiederfinden (Nr. 170, Nr. 213, Nr. 233, Nr. 238, Nr. 310, siehe Tabelle 7).

Ein naheliegender Erklärungsversuch für die festgestellten Unterschiede liegt in der Möglichkeit CSA-bindender Parasiten, durch Sequestration eine nachhaltige Infektion zu etablieren und damit höhere Parasitämien und auch schwere Verläufe zu begünstigen. Dadurch ließen sich auch die signifikant niedrigeren Hämatokritwerte sowie der Trend zu vermindertem Geburtsgewicht in der Gruppe Bindung + erklären. Das würde die Bedeutung einer CSA- oder HA-vermittelten Sequestration an der Pathogenese maternaler Malaria unterstreichen. Allerdings muss bei der Betrachtung die geringe Fallzahl sowie die begrenzte Übertragbarkeit der statischen Versuchsanordnung auf *in vivo*-Verhältnisse berücksichtigt werden.

Ein weiteres Ergebnis stellt die hohe Anzahl von PCR-gesicherten Nabelschnurblutinfektionen in der Gruppe Bindung + dar. Dabei kann plazentare oder periphere Hyperparasitämie als zunächst naheliegende Ursache dieses Phänomen nicht ausreichend erklären: Es zeigt sich kein Zusammenhang zwischen Nabelschnurblutinfektion und der Höhe der Parasitämie, wie in anderen Studien beschrieben (Redd et al., 1996). Das Vorhandensein CSA- oder HA-bindender Parasiten als Risikofaktor für eine transplazentare Infektion anzusehen, ist aufgrund der geringen Fallzahl gewagt. Entsprechende Literatur lässt

sich nicht finden. Mögliche pathophysiologische Erklärungen sind spekulativ: Denkbar ist eine durch die Sequestration begünstigte Synzytiotrophoblastenschädigung (Walter et al., 1982) mit daraus resultierender, partieller Insuffizienz der Plazentaschranke. Keinen Anhalt gibt es dagegen für spezifische, rezeptorvermittelte Invasionsmechanismen zur Überwindung dieser Schranke, wie dies bei anderen Protozoen beobachtet wurde (z.B. *Toxoplasma gondii*). Andererseits konnte im Nabelschnurblut von Neugeborenen gesunder Mütter mit PCR-gestützten Diagnosemethoden in fast 50% der Fälle mütterliche Zellen nachgewiesen werden (Lo et al., 1996), sodass auch eine von pathologischen Veränderungen unabhängige Übertragung denkbar ist.

Eine abschließende Beurteilung des hier beobachteten Phänomens muss ausbleiben. Weitere Studien, die insbesondere die klinische Bedeutung PCR-gesicherter Nabelschnurinfektionen klären, sind dazu nötig. Ein direkter Zusammenhang zwischen plazentarem Adhärenzmechanismus und der Fähigkeit zur Überwindung der Plazentaschranke scheint möglich, ist jedoch unwahrscheinlich.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Zytoadhärenzverhalten von mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten an die Rezeptoren Chondroitinsulfat A (CSA) und Hyaluronsäure (HA). Diese Rezeptoren, die unter anderem in der Plazenta nachgewiesen werden können, scheinen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese maternaler Malaria zu spielen.

Zur Charakterisierung des Adhärenzverhaltens wurden statische Bindungs-Assays verwendet. Die Parasitenisolate wurden aus mit *Plasmodium falciparum* infizierten Frauen, die kurz zuvor entbunden hatten, gewonnen und direkt verarbeitet. Dazu wurden auf der Geburtsstation des Albert-Schweitzer-Krankenhauses (Lambaréné, Gabun) über einen Zeitraum von sechs Monaten 227 Frauen in die Studie aufgenommen. Bei 45 (20%) lag eine Infektion mit *Plasmodium falciparum* vor. Davon wurden 28 Isolate aus dem Plazentablut und 21 Isolate aus dem Peripherblut auf ihr Bindungsverhalten getestet.

In beiden Kompartimenten finden sich Isolate mit Adhärenzeigenschaften an die untersuchten Rezeptoren (12 von 28 im Plazentablut, 14 von 21 im Peripherblut). Dabei ist sowohl die Prävalenz als auch das Bindungsniveau bei Isolat aus dem Peripherblut höher als im Plazentablut. Diese Beobachtung ist neu und steht im Widerspruch zu bisher publizierten Arbeiten.

Es finden sich überwiegend Isolate mit Bindungseigenschaften an beide Rezeptoren, ein ausschließlich HA-bindender Phänotyp kann nicht identifiziert werden. Das spricht gegen die Existenz eines CSA-unabhängigen, allein durch HA vermittelten Adhärenzmechanismus'.

Die Fähigkeit zur Adhärenz an die untersuchten Rezeptoren ist assoziiert mit Hyperparasitämie, erniedrigtem Hämatokrit, dem Trend zu niedrigerem Geburtsgewicht und dem Vorliegen einer PCR-gesicherten Nabelschnurblutinfektion. Letztere Beobachtung lässt einen Zusammenhang zwischen dem Adhärenzmechanismus und dem Auftreten transplazentarer Infektionen vermuten.

6 Literaturverzeichnis

Achur RN, Valiyaveetil M, Alkhalil A, Ockenhouse CF, Gowda DC (2000), Characterization of proteoglycans of human placenta and identification of unique chondroitin sulfate proteoglycans of the intervillous spaces that mediate the adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to the placenta, *J.Biol.Chem.* 275: 40344-40356

Alkhalil A, Achur RN, Valiyaveetil M, Ockenhouse CF, Gowda DC (2000), Structural requirements for the adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin sulfate proteoglycans of human placenta, *J.Biol.Chem.* 275: 40357-40364

Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, Taraschi TF, Howard RJ (1995), Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes, *Cell* 82: 77-87

Beeson JG, Brown GV, Molyneux ME, Mhango C, Dzinjalama F, Rogerson SJ (1999), Plasmodium falciparum isolates from infected pregnant women and children are associated with distinct adhesive and antigenic properties, *J.Infect.Dis.* 180: 464-472

Beeson JG, Rogerson SJ, Cooke BM, Reeder JC, Chai W, Lawson AM, Molyneux ME, Brown GV (2000), Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria, *Nat.Med.* 6: 86-90

Beeson JG, Reeder JC, Rogerson SJ, Brown GV (2001), Parasite adhesion and immune evasion in placental malaria, *Trends Parasitol.* 17: 331-337

Beeson JG, Brown GV (2004), Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes Demonstrate Dual Specificity for Adhesion to Hyaluronic Acid and Chondroitin Sulfate A and Have Distinct Adhesive Properties, *J.Infect.Dis.* 189: 169-179

Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsh K (1989), Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for Plasmodium falciparum, *Nature* 341: 57-59

Biggs BA, Gooze L, Wycherley K, Wilkinson D, Boyd AW, Forsyth KP, Edelman L, Brown GV, Leech JH (1990), Knob-independent cytoadherence of Plasmodium falciparum to the leukocyte differentiation antigen CD36, *J.Exp.Med.* 171: 1883-1892

Bouyou-Akotet MK, Ionete-Collard DE, Mabika-Manfoumbi M, Kendjo E, Matsiegui PB, Mavoungou E, Kombila M (2003), Prevalence of Plasmodium falciparum infection in pregnant women in Gabon, *Malar.J.* 2: 18

Bouyou-Akotet MK, Issifou S, Meye JF, Kombila M, Ngou-Milama E, Luty AJ, Kremsner PG, Mavoungou E (2004), Depressed natural killer cell cytotoxicity against Plasmodium falciparum-infected erythrocytes during first pregnancies, *Clin.Infect.Dis.* 38: 342-347

Brabin BJ (1983), An analysis of malaria in pregnancy in Africa, *Bull.World Health Organ* 61: 1005-1016

Brabin BJ (1985), Epidemiology of infection in pregnancy, *Rev.Infect.Dis.* 7: 579-603

- Brabin BJ, Hakimi M, Pelletier D (2001), An analysis of anemia and pregnancy-related maternal mortality, *J.Nutr.* 131: 604S-614S
- Buffet PA, Gamain B, Scheidig C, Baruch D, Smith JD, Hernandez-Rivas R, Pouvelle B, Oishi S, Fujii N, Fusai T, Parzy D, Miller LH, Gysin J, Scherf A (1999), Plasmodium falciparum domain mediating adhesion to chondroitin sulfate A: a receptor for human placental infection, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 12743-12748
- Bull PC, Lowe BS, Kortok M, Molyneux CS, Newbold CI, Marsh K (1998), Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria, *Nat.Med.* 4: 358-360
- Bulmer JN, Rasheed FN, Francis N, Morrison L, Greenwood BM (1993), Placental malaria. I. Pathological classification, *Histopathology* 22: 211-218
- Carlson J, Helmbly H, Hill AV, Brewster D, Greenwood BM, Wahlgren M (1990), Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies, *Lancet* 336: 1457-1460
- Chai W, Beeson JG, Kogelberg H, Brown GV, Lawson AM (2001), Inhibition of adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by structurally defined hyaluronic acid dodecasaccharides, *Infect.Immun.* 69: 420-425
- Contamin H, Fandeur T, Bonnefoy S, Skouri F, Ntoumi F, Mercereau-Puijalon O (1995), PCR typing of field isolates of Plasmodium falciparum, *J.Clin.Microbiol.* 33: 944-951
- Cranston HA, Boylan CW, Carroll GL, Sutura SP, Williamson JR, Gluzman IY, Krogstad DJ (1984), Plasmodium falciparum maturation abolishes physiologic red cell deformability, *Science* 223: 400-403
- Diagne N, Rogier C, Sokhna CS, Tall A, Fontenille D, Roussilhon C, Spiegel A, Trape JF (2000), Increased susceptibility to malaria during the early postpartum period, *N.Engl.J.Med.* 343: 598-603
- Duffy PE, Fried M (1999), Malaria during pregnancy: parasites, antibodies and chondroitin sulphate A, *Biochem.Soc.Trans.* 27: 478-482
- Duffy PE, Fried M (2003), Plasmodium falciparum adhesion in the placenta, *Curr.Opin.Microbiol.* 6: 371-376
- Duffy PE, Fried M (2003), Antibodies that inhibit Plasmodium falciparum adhesion to chondroitin sulfate A are associated with increased birth weight and the gestational age of newborns, *Infect.Immun.* 71: 6620-6623
- Fischer PR (1997), Congenital malaria: an African survey, *Clin.Pediatr.(Phila)* 36: 411-413
- Fleming AF (1989), The aetiology of severe anaemia in pregnancy in Ndola, Zambia, *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 83: 37-49
- Fleming AF (1989), Tropical obstetrics and gynaecology. 1. Anaemia in pregnancy in tropical Africa, *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 83: 441-448

- Fried M, Duffy PE (1996), Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta, *Science* 272: 1502-1504
- Fried M, Duffy PE (1998), Maternal malaria and parasite adhesion, *J.Mol.Med.* 76: 162-171
- Fried M, Nosten F, Brockman A, Brabin BJ, Duffy PE (1998), Maternal antibodies block malaria, *Nature* 395: 851-852
- Gamain B, Smith JD, Miller LH, Baruch DI (2001), Modifications in the CD36 binding domain of the Plasmodium falciparum variant antigen are responsible for the inability of chondroitin sulfate A adherent parasites to bind CD36, *Blood* 97: 3268-3274
- Gilbert SC, Plebanski M, Gupta S, Morris J, Cox M, Aidoo M, Kwiatkowski D, Greenwood BM, Whittle HC, Hill AV (1998), Association of malaria parasite population structure, HLA, and immunological antagonism, *Science* 279: 1173-1177
- Gilles HM, Lawson JB, Sibellas M, Voller A, Allan N (1969), Malaria and pregnancy, *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 63: 1
- Granja AC, Machungo F, Gomes A, Bergstrom S, Brabin B (1998), Malaria-related maternal mortality in urban Mozambique, *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 92: 257-263
- Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassalli P, Hommel M, Lambert PH (1989), Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria, *N.Engl.J.Med.* 320: 1586-1591
- Guyatt HL, Snow RW (2001), The epidemiology and burden of Plasmodium falciparum-related anemia among pregnant women in sub-Saharan Africa, *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 64: 36-44
- Gysin J, Pouvelle B, Fievet N, Scherf A, Lepolard C (1999), Ex vivo desequestration of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes from human placenta by chondroitin sulfate A, *Infect.Immun.* 67: 6596-6602
- Hasler T, Handunnetti SM, Aguiar JC, van Schravendijk MR, Greenwood BM, Lallinger G, Cegielski P, Howard RJ (1990), In vitro rosetting, cytoadherence, and microagglutination properties of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes from Gambian and Tanzanian patients, *Blood* 76: 1845-1852
- Helmby H, Cavelier L, Pettersson U, Wahlgren M (1993), Rosetting Plasmodium falciparum-infected erythrocytes express unique strain-specific antigens on their surface, *Infect.Immun.* 61: 284-288
- Howard RJ (1988), Malarial proteins at the membrane of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and their involvement in cytoadherence to endothelial cells, *Prog.Allergy* 41: 98-147
- Jelliffe EF (1968), Low birth-weight and malarial infection of the placenta, *Bull.World Health Organ* 38: 69-78

Kassberger F, Birkenmaier A, Khattab A, Kremsner PG, Klinkert MQ (2002), PCR typing of *Plasmodium falciparum* in matched peripheral, placental and umbilical cord blood, *Parasitol.Res.* 88: 1073-1079

Khattab A, Kun J, Deloron P, Kremsner PG, Klinkert MQ (2001), Variants of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 expressed by different placental parasites are closely related and adhere to chondroitin sulfate A, *J.Infect.Dis.* 183: 1165-1169

Khattab A, Kremsner PG, Klinkert MQ (2003), Common surface-antigen var genes of limited diversity expressed by *Plasmodium falciparum* placental isolates separated by time and space, *J.Infect.Dis.* 187: 477-483

Kremsner PG, Zotter GM, Feldmeier H, Graninger W, Rocha RM, Wiedermann G (1988), A comparative trial of three regimens for treating uncomplicated falciparum malaria in Acre, Brazil, *J.Infect.Dis.* 158: 1368-1371

Lang W, Löscher T (2000), *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*, Thieme Stuttgart.

Leech JH, Aley SB, Miller LH, Howard RJ (1984), *Plasmodium falciparum* malaria: cytoadherence of infected erythrocytes to endothelial cells and associated changes in the erythrocyte membrane, *Prog.Clin.Biol.Res.* 155: 63-77

Lo YM, Lo ES, Watson N, Noakes L, Sargent IL, Thilaganathan B, Wainscoat JS (1996), Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications, *Blood* 88: 4390-4395

Luse SA, Miller LH (1971), *Plasmodium falciparum* malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels, *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 20: 655-660

Luty AJ (2003), (persönliche Mitteilung)

MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warrell DA (1985), Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration, *Am.J.Pathol.* 119: 385-401

Matteelli A, Donato F, Shein A, Muchi JA, Leopardi O, Astori L, Carosi G (1994), Malaria and anaemia in pregnant women in urban Zanzibar, Tanzania, *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 88: 475-483

Matteelli A, Donato F, Shein A, Muchi JA, Abass AK, Mariani M, Leopardi O, Maxwell CA, Carosi G (1996), Malarial infection and birthweight in urban Zanzibar, Tanzania, *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 90: 125-134

Matteelli A, Caligaris S, Castelli F, Carosi G (1997), The placenta and malaria, *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 91: 803-810

Maubert B, Guilbert LJ, Deloron P (1997), Cytoadherence of *Plasmodium falciparum* to intercellular adhesion molecule 1 and chondroitin-4-sulfate expressed by the syncytiotrophoblast in the human placenta, *Infect.Immun.* 65: 1251-1257

- Maubert B, Fievet N, Tami G, Boudin C, Deloron P (2000), Cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in the human placenta, *Parasite Immunol.* 22: 191-199
- McCormick CJ, Craig A, Roberts D, Newbold CI, Berendt AR (1997), Intercellular adhesion molecule-1 and CD36 synergize to mediate adherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to cultured human microvascular endothelial cells, *J.Clin.Invest* 100: 2521-2529
- McGregor IA, Wilson ME, Billewicz WZ (1983), Malaria infection of the placenta in The Gambia, West Africa; its incidence and relationship to stillbirth, birthweight and placental weight, *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 77: 232-244
- McGregor IA (1984), Epidemiology, malaria and pregnancy, *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 33: 517-525
- McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D (1994), Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria, *Nature* 371: 508-510
- Menendez C, Ordi J, Ismail MR, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, Font F, Alonso PL (2000), The impact of placental malaria on gestational age and birth weight, *J.Infect.Dis.* 181: 1740-1745
- Menon R (1972), Pregnancy and malaria, *Med.J.Malaya.* 27: 115-119
- Miller LH, Smith JD (1998), Motherhood and malaria, *Nat.Med.* 4: 1244-1245
- Mockenhaupt FP, Ulmen U, von Gaertner C, Bedu-Addo G, Bienzle U (2002), Diagnosis of placental malaria, *J.Clin.Microbiol.* 40: 306-308
- Muanza K, Gay F, Behr C, Scherf A (1996), Primary culture of human lung microvessel endothelial cells: a useful in vitro model for studying Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadherence, *Res.Immunol.* 147: 149-163
- Newbold C, Warn P, Black G, Berendt A, Craig A, Snow B, Msobo M, Peshu N, Marsh K (1997), Receptor-specific adhesion and clinical disease in Plasmodium falciparum, *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 57: 389-398
- Nosten F, ter Kuile F, Maelankirri L, Decludt B, White NJ (1991), Malaria during pregnancy in an area of unstable endemicity, *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 85: 424-429
- Ntoumi F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape JF, Mercereau-Puijalon O (1995), Age-dependent carriage of multiple Plasmodium falciparum merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections, *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 52: 81-88
- Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C, Ho M, Kan KE, Thway Y, Win K, Aikawa M, Lobb RR (1992), Human vascular endothelial cell adhesion receptors for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1, *J.Exp.Med.* 176: 1183-1189

- Panton LJ, Leech JH, Miller LH, Howard RJ (1987), Cytoadherence of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human melanoma cell lines correlates with surface OKM5 antigen, *Infect.Immun.* 55: 2754-2758
- Pouvelle B, Buffet PA, Lepolard C, Scherf A, Gysin J (2000), Cytoadhesion of Plasmodium falciparum ring-stage-infected erythrocytes, *Nat.Med.* 6: 1264-1268
- Pouvelle B, Traore B, Nogueira PA, Pradines B, Lepolard C, Gysin J (2003), Modeling of Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadhesion in microvascular conditions: chondroitin-4-sulfate binding, A competitive phenotype, *J.Infect.Dis.* 187: 292-302
- Redd SC, Wirima JJ, Steketee RW, Breman JG, Heymann DL (1996), Transplacental transmission of Plasmodium falciparum in rural Malawi, *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 55: 57-60
- Reeder JC, Rogerson SJ, al Yaman F, Anders RF, Coppel RL, Novakovic S, Alpers MP, Brown GV (1994), Diversity of agglutinating phenotype, cytoadherence, and rosette-forming characteristics of Plasmodium falciparum isolates from Papua New Guinean children, *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 51: 45-55
- Reeder JC (1999), Malaria in pregnancy: getting to grips with a sticky problem, *P.N.G.Med.J.* 42: 73-76
- Reeder JC, Cowman AF, Davern KM, Beeson JG, Thompson JK, Rogerson SJ, Brown GV (1999), The adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is mediated by P. falciparum erythrocyte membrane protein 1, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 5198-5202
- Reinhardt MC (1978), Maternal anaemia in Abidjan--Its influence on placenta and newborns, *Helv.Paediatr.Acta Suppl* 43-63
- Ricke CH, Staalsoe T, Koram K, Akanmori BD, Riley EM, Theander TG, Hviid L (2000), Plasma antibodies from malaria-exposed pregnant women recognize variant surface antigens on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in a parity-dependent manner and block parasite adhesion to chondroitin sulfate A, *J.Immunol.* 165: 3309-3316
- Riley EM, Schneider G, Sambou I, Greenwood BM (1989), Suppression of cell-mediated immune responses to malaria antigens in pregnant Gambian women, *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 40: 141-144
- Robert C, Pouvelle B, Meyer P, Muanza K, Fujioka H, Aikawa M, Scherf A, Gysin J (1995), Chondroitin-4-sulphate (proteoglycan), a receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocyte adherence on brain microvascular endothelial cells, *Res.Immunol.* 146: 383-393
- Roberts DJ, Craig AG, Berendt AR, Pinches R, Nash G, Marsh K, Newbold CI (1992), Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria, *Nature* 357: 689-692
- Rogerson SJ, Chaiyaraj SC, Ng K, Reeder JC, Brown GV (1995), Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes, *J.Exp.Med.* 182: 15-20
- Rogerson SJ, Beeson JG (1999), The placenta in malaria: mechanisms of infection, disease and foetal morbidity, *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 93 Suppl 1: S35-S42

- Rogerson SJ, Tembenu R, Dobano C, Plitt S, Taylor TE, Molyneux ME (1999), Cytoadherence characteristics of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes from Malawian children with severe and uncomplicated malaria, *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 61: 467-472
- Rowe JA, Moulds JM, Newbold CI, Miller LH (1997), P. falciparum rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1, *Nature* 388: 292-295
- Sartelet H, Garraud O, Rogier C, Milko-Sartelet I, Kaboret Y, Michel G, Roussilhon C, Huerre M, Gaillard D (2000), Hyperexpression of ICAM-1 and CD36 in placentas infected with Plasmodium falciparum: a possible role of these molecules in sequestration of infected red blood cells in placentas, *Histopathology* 36: 62-68
- Scherf A, Pouvelle B, Buffet PA, Gysin J (2001), Molecular mechanisms of Plasmodium falciparum placental adhesion, *Cell Microbiol.* 3: 125-131
- Shulman CE, Graham WJ, Jilo H, Lowe BS, New L, Obiero J, Snow RW, Marsh K (1996), Malaria is an important cause of anaemia in primigravidae: evidence from a district hospital in coastal Kenya, *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 90: 535-539
- Shulman CE, Graham WJ, Jilo H, Lowe BS, New L, Obiero J, Snow RW, Marsh K (1996), Malaria is an important cause of anaemia in primigravidae: evidence from a district hospital in coastal Kenya, *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 90: 535-539
- Silamut K, Phu NH, Whitty C, Turner GD, Louwrier K, Mai NT, Simpson JA, Hien TT, White NJ (1999), A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain, *Am.J.Pathol.* 155: 395-410
- Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, Pinches R, Newbold CI, Miller LH (1995), Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes, *Cell* 82: 101-110
- Smith JD, Subramanian G, Gamain B, Baruch DI, Miller LH (2000), Classification of adhesive domains in the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family, *Mol.Biochem.Parasitol.* 110: 293-310
- Steketee RW, Wirima JJ, Slutsker L, Heymann DL, Breman JG (1996), The problem of malaria and malaria control in pregnancy in sub-Saharan Africa, *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 55: 2-7
- Steketee RW, Wirima JJ, Hightower AW, Slutsker L, Heymann DL, Breman JG (1996), The effect of malaria and malaria prevention in pregnancy on offspring birthweight, prematurity, and intrauterine growth retardation in rural Malawi, *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 55: 33-41
- Steketee RW, Nahlen BL, Parise ME, Menendez C (2001), The burden of malaria in pregnancy in malaria-endemic areas, *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 64: 28-35
- Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, Ravetch JA, Wellems TE (1995), The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes, *Cell* 82: 89-100

- Sullivan AD, Nyirenda T, Cullinan T, Taylor T, Harlow SD, James SA, Meshnick SR (1999), Malaria infection during pregnancy: intrauterine growth retardation and preterm delivery in Malawi, *J.Infect.Dis.* 179: 1580-1583
- Sunderland CA, Bulmer JN, Luscombe M, Redman CW, Stirrat GM (1985), Immunohistological and biochemical evidence for a role for hyaluronic acid in the growth and development of the placenta, *J.Reprod.Immunol.* 8: 197-212
- Tobian AA, Mehlotra RK, Malhotra I, Wamachi A, Mungai P, Koech D, Ouma J, Zimmerman P, King CL (2000), Frequent umbilical cord-blood and maternal-blood infections with *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, and *P. ovale* in Kenya, *J.Infect.Dis.* 182: 558-563
- Trager W, Jensen JB (1976), Human malaria parasites in continuous culture, *Science* 193: 673-675
- Turner GD, Morrison H, Jones M, Davis TM, Looareesuwan S, Buley ID, Gatter KC, Newbold CI, Pukritayakamee S, Nagachinta B, . (1994), An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration, *Am.J.Pathol.* 145: 1057-1069
- Udeinya IJ, Schmidt JA, Aikawa M, Miller LH, Green I (1981), *Falciparum* malaria-infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells, *Science* 213: 555-557
- Valiyaveetil M, Achur RN, Alkhalil A, Ockenhouse CF, Gowda DC (2001), *Plasmodium falciparum* cytoadherence to human placenta: evaluation of hyaluronic acid and chondroitin 4-sulfate for binding of infected erythrocytes, *Exp.Parasitol.* 99: 57-65
- Vleugels MP, Brabin B, Eling WM, de Graaf R (1989), Cortisol and *Plasmodium falciparum* infection in pregnant women in Kenya, *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 83: 173-177
- Volpi N, Cusmano M, Venturelli T (1995), Qualitative and quantitative studies of heparin and chondroitin sulfates in normal human plasma, *Biochim.Biophys.Acta* 1243: 49-58
- Wahlgren M, Spillmann D (2000), Sticky sugars attract malaria to the fetus, *Nat.Med.* 6: 25-26
- Waller KL, Cooke BM, Nunomura W, Mohandas N, Coppel RL (1999), Mapping the binding domains involved in the interaction between the *Plasmodium falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and the cytoadherence ligand P. *falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1), *J.Biol.Chem.* 274: 23808-23813
- Walter PR, Garin Y, Blot P (1982), Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study, *Am.J.Pathol.* 109: 330-342
- Watkinson M, Rushton DI (1983), Plasmodial pigmentation of placenta and outcome of pregnancy in West African mothers, *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed)* 287: 251-254
- Watkinson M, Rushton DI, Lunn PG (1985), Placental malaria and foetoplacental function: low plasma oestradiols associated with malarial pigmentation of the placenta, *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 79: 448-450

Wickaramsuriya G. (1937) Clinical Features of Malaria in Pregnancy. Malaria and Ankylostomiasis in Pregnant Woman. London, Oxford University Press.

Wildling E, Winkler S, Kremsner PG, Brandts C, Jenne L, Wernsdorfer WH (1995), Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon, *Trop.Med.Parasitol.* 46: 77-82

Zwetyenga J, Rogier C, Tall A, Fontenille D, Snounou G, Trape JF, Mercereau-Puijalon O (1998), No influence of age on infection complexity and allelic distribution in Plasmodium falciparum infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria, *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 59: 726-735

7 Danksagung

Besten Dank an Professor Dr. Peter G. Kreamer für die freundliche Überlassung des Themas und die erfahrene Betreuung.

Danke an PD Dr. Mo Klinkert für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Studie.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Ayman Khattab für die Hilfe bei der Einarbeitung und Durchführung der Studie.

Speziellen Dank an Dr. Larsen Seydel für die kollegiale Zusammenarbeit bei der Probenentnahme in Lambaréné sowie an Ariane Birkenmaier für die organisatorische Unterstützung.

Herzlichen Dank an alle Studienteilnehmerinnen sowie die Hebammen des Albert-Schweitzer-Krankenhauses in Lambaréné für Ihre Bereitschaft zur Teilnahme und Mitarbeit an der Studie.

Danke an alle Mitarbeiter (Oktober 2000 – April 2001) des Forschungslabors des Albert-Schweitzer-Krankenhauses, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, insbesondere Dr. Steffen Borrmann, Dr. Bertrand Lell, Dr. Michel Missinou, Dr. Nicole Szlezak und Dr. Rajko Neubauer.

Mein besonderer Dank gilt Paula González de la Losa.

Herzlichen Dank an meine Eltern Günter und Irene Kaßberger für die Unterstützung während meiner Forschungsarbeit.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Fabian Kaßberger
Geburtstag	18. Mai 1977
Geburtsort	Nürtingen
Familienstand	verlobt

Schulbildung

1983 – 1996	Rudolf-Steiner-Schule Nürtingen (Gesamtschule)
06/1996	Abitur

Hochschulbildung

04/1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
04/1999	Ärztliche Vorprüfung
03/2000	Erstes Staatsexamen
04/2003	Zweites Staatsexamen
04/2003 – 03/2004	Praktisches Jahr
07.05.2004	Drittes Staatsexamen
ab 06/2004	Anstellung als Arzt im Praktikum in der Klinik für Kinderheilkunde, Ludwigsburg

Seit August 2000 Mitarbeit in der Sektion Humanparasitologie des Instituts für Tropenmedizin an der Universität Tübingen bei Professor Dr. P.G. Kremsner.

2000 – 2001 Forschungsaufenthalt im Albert-Schweitzer-Krankenhaus, Lambaréné, Gabun